



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
CAMPUS DE ITAPETINGA

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
PRÉ-TRATADO COM URÉIA

FÁBIO MARTINS OLIVEIRA

ITAPETINGA
BAHIA - BRASIL
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
CAMPUS DE ITAPETINGA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
Área de concentração: Produção de Ruminantes

FÁBIO MARTINS OLIVEIRA

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
PRÉ-TRATADO COM URÉIA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB / *Campus* de Itapetinga – BA, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Zootecnia, área de Concentração: Produção de Ruminantes, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador:

Prof. D. Sc. Mauro Pereira de Figueiredo

Co-orientador:

Prof. D. Sc. Márcio dos Santos Pedreira

ITAPETINGA
BAHIA - BRASIL
2011

636.085 Oliveira, Fábio Martins.

O47h Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com uréia. / Fábio Martins Oliveira. – Itapetinga-BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2011.

86fl.

Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB - *Campus* de Itapetinga. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Mauro Pereira de Figueiredo e co-orientador Prof. D.Sc. Márcio dos Santos Pedreira.

1. Nutrição animal – Cana-de-açúcar 2. Cana-de-açúcar – Bagaço – Alimentação animal. 3. Ureia – Cana-de-açúcar – Digestibilidade – Alimentação de ruminantes. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, *Campus* de Itapetinga. II. Figueiredo, Mauro Pereira de. III. Pedreira, Márcio dos Santos. IV. Título

CDD(21): 636.085

Catálogo na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza– CRB 1014-5ª Região

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Nutrição animal : Cana-de-açúcar : Digestibilidade e degradabilidade
2. Bagaço de cana-de-açúcar : Alimentação de ruminantes : Valor nutritivo
3. Ureia : Cana-de-açúcar : Digestibilidade : Alimentação de ruminantes

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
Área de Concentração: Produção de Ruminantes

Campus Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

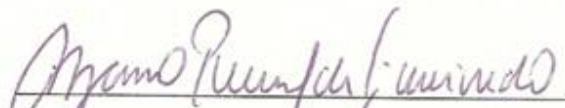
Título: "Hidrólise Enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com uréia".

Autor (a): Fábio Martins Oliveira

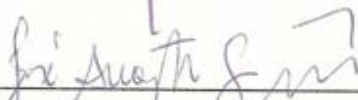
Orientador (a): Prof. Dr. Mauro Pereira de Figueiredo

Co-orientador (a) : Márcio dos Santos Pedreira

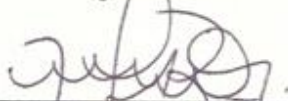
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ZOOTECNIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PRODUÇÃO DE RUMINANTES, pela Banca Examinadora:



Prof. Dr. Mauro Pereira de Figueiredo – UESB
Orientador



Prof. Dr. José Augusto Gomes Azevêdo – UESB



Prof. Dr. Fernando Salgado Bernardino – UESB

Data de realização: 16 de setembro de 2011.

DEDICO

Aos meus pais, pela educação e pelo amor transmitido.

A Alexandra, minha esposa, que sempre está ao meu lado,
pela dedicação e apoio, a quem amo muito.

Ao meu irmão, Allan “*Lanca*” (*in memoriam*) pela nossa amizade,
minha eterna saudade.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por todas as bênçãos derramadas em minha vida.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pela excelente capacitação profissional e por disponibilizar suas instalações para condução do experimento.

Aos professores, coordenadores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Ao Professor Dr. Mauro Pereira de Figueiredo, pela orientação, competência, pelos ensinamentos transmitidos e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Professor Dr. Márcio dos Santos Pedreira pela boa co-orientação.

Ao Dr. Fernando Salgado Bernardino, pela competência, sugestões e pelas ajudas diárias na condução deste experimento.

Ao Professor Dr. Joel Queiroga Ferreira, pelas sugestões e ajudas.

À Professora Roseane Mendonça de Figueiredo pela ajuda na condução da contagem microbiana.

À Professora Maria Lúcia Garcia Simões pela avaliação da atividade enzimática das enzimas fibrolíticas exógenas utilizadas neste experimento.

À minha querida esposa Alexsandra, pela ajuda diária, carinho, paciência, cuidado e por compartilhar todos os momentos da vida ao meu lado.

A Eder Manzini Bordin da Empresa Novozymes, pela disponibilização das enzimas celulases e hemicelulases, amostras importantes para a condução do experimento.

Ao produtor rural Antônio Lôbo pela disponibilização do bagaço de cana, matéria-prima para o experimento.

Aos colegas de mestrado, pelo aprendizado e agradável convivência.

Às amigas Rosimira, Cléia e Patrícia, que ganhei durante esta caminhada.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Animal da UESB em Vitória da Conquista, João Paulo, Egídio, Yann, Daniela, Rafael, Eduardo e Vera, pela ajuda na condução das análises.

A Ailton e Maurício, funcionários do DICAP e Almir, Júnior e Daniel do setor de bovinocultura da UESB.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

O meu muito obrigado!!!

BIOGRAFIA

FÁBIO MARTINS OLIVEIRA, filho de Ubirajara Lima de Oliveira e Audenita Martins de Almeida, nasceu em 03 de junho de 1975, na cidade de Itapetinga, estado da Bahia.

Em 1992 formou-se em Técnico em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Sérgio de Carvalho – EASC, em Vitória da Conquista-BA.

Em 2001 graduou-se em Agronomia pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, em Vitória da Conquista-BA.

Em 2001 ingressou no Serviço Nacional de Aprendizagem Rural – SENAR-BA onde ministra Cursos de Vaqueiro, Manejo de Pastagens, Alimentação Animal e Ovinocaprinocultura.

Em 2006 concluiu o curso de Especialização em Produção de Ruminantes pela Universidade Federal de Lavras – UFLA, em Lavras-MG.

Em março de 2009 iniciou o curso de Pós-Graduação em Zootecnia – Mestrado em Zootecnia – Concentração em Produção de Ruminantes, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Campus de Itapetinga-BA.

Em 16 de setembro de 2011 defendeu a presente dissertação.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Pg.

Tabela 1 - Composição químico-bromatológica do bagaço de cana-de-açúcar.....	4
---	----------

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Composição químico-bromatológica e digestibilidade verdadeira <i>in vitro</i> do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	34
Tabela 2 - Matéria seca e extrato etéreo do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.....	37
Tabela 3 - Componentes da parede celular do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas	39
Tabela 4 - Compostos nitrogenados e minerais do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.....	41
Tabela 5 - pH e digestibilidade verdadeira <i>in vitro</i> da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.....	43
Tabela 6 - Digestibilidade verdadeira <i>in vitro</i> da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas, em diferentes períodos de armazenamento.....	44
Tabela 7 - Unidades formadoras de colônias (LogUFC/g) em bolores e leveduras no bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.....	45

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Composição químico-bromatológica do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.....	56
Tabela 2 - Unidades formadoras de colônias (LogUFC/g) em bolores e leveduras no bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.....	57
Tabela 3 - Fração de compostos nitrogenados do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.....	60
Tabela 4 - Fração de carboidratos do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.....	62

CAPÍTULO 4

Tabela 1 - Composição químico-bromatológica do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.....	73
Tabela 2 - Unidades formadoras de colônias (LogUFC/g) em bolores e leveduras no bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.....	73
Tabela 3 - Parâmetros médios da degradabilidade ruminal <i>in vitro</i> da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.....	76
Tabela 4 - Equações ajustadas para a degradabilidade ruminal <i>in vitro</i> da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.....	77
Tabela 5 - Parâmetros médios da degradação e degradabilidade <i>in vitro</i> da fibra em detergente neutro do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.....	80
Tabela 6 - Equações ajustadas para a fibra em detergente neutro residual do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas...	81

LISTA DE FIGURAS

	Pg.
CAPÍTULO 4	
Figura 1 - Cinética da fermentação ruminal <i>in vitro</i> da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.....	79
Figura 2 - Cinética da fermentação ruminal <i>in vitro</i> da fibra em detergente neutro do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Analysis of variance
BA	Bahia
BIN	Bagaço <i>in natura</i>
CaCl₂2H₂O	Cloreto de Cálcio Diidratado
CEL	Celulose
CIDA	Cinza insolúvel em Detergente Ácido
CIDN	Cinza insolúvel em Detergente Neutro
CNF	Carboidrato não Fibroso
CO₂	Gás Carbônico
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CT	Carboidratos Totais
DE	Degradabilidade Efetiva
DEMS	Degradabilidade Efetiva da Matéria Seca
DEFDN	Degradabilidade Efetiva da Fibra em Detergente Neutro
DEFDA	Degradabilidade Efetiva da Fibra em Detergente Ácido
DP	Degradabilidade Potencial
DRMS	Degradabilidade Ruminal da Matéria Seca
DRFDN	Degradabilidade Ruminal da Fibra em Detergente Neutro
DRFDA	Degradabilidade Ruminal da Fibra em Detergente Ácido
DIVMS	Degradabilidade <i>in vitro</i> da Matéria Seca
DIVFDN	Degradabilidade <i>in vitro</i> da Fibra em Detergente Neutro
DIVMO	Digestibilidade <i>in vitro</i> da Matéria Orgânica
DVIVMS	Digestibilidade verdadeira <i>in vitro</i> da Matéria Seca
EE	Extrato Etéreo
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDNcp	Fibra em Detergente Neutro corrigida para Cinzas e Proteína
g	Grama
g/kg	Grama por Quilo
g/kgMS	Grama por Quilo de Matéria Seca
g/L	Grama por Litro
g/mL	Grama por Mililitro
g/t	Grama por Tonelada
HEM	Hemicelulose
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
kg	Quilo
KH₂PO₄	Dihidrogenofosfato de Potássio
L	Litro
LIG	Lignina
LogUFC/g	Logaritmo de Unidade Formadora de Colônia por Grama
µL	Microlitro

m	Metro
mg/mL	Miligrama por Mililitro
MgSO₄7H₂O	Sulfato de Magnésio Heptahidratado
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MM	Matéria Mineral
MN	Matéria Natural
MO	Matéria Orgânica
MS	Matéria Seca
N	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de Sódio
Na₂CO₃	Carbonato de Sódio
Na₂S	Sulfeto de Sódio
Na₂S9H₂O	Sulfeto de Sódio Nonahidratado
NaOH	Hidróxido de Sódio
NH₂CONH₂	Uréia
NH₃	Amônia
NH₄OH	Hidróxido de Amônio
NIDA	Nitrogênio Insolúvel em Detergente Ácido
NIDA/NT	Nitrogênio Insolúvel em Detergente Ácido em Relação ao Nitrogênio Total
NIDN	Nitrogênio insolúvel em Detergente Neutro
NIDN/NT	Nitrogênio insolúvel em Detergente Neutro em relação ao Nitrogênio Total
nm	Nanômetro
NNP	Nitrogênio não Protéico
NT	Nitrogênio Total
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
PB	Proteína Bruta
pH	Potencial Hidrogeniônico
SAS	Statistical Analysis System
SEI	Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia
TNT	Tecido não Tecido
1,0N	Um Normal
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por Grama
λ	Comprimento de Onda

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Cana-de-açúcar	2
2.2. Bagaço de cana-de-açúcar	3
3. Tratamentos físicos, químicos e biológicos no bagaço	3
3.1. Amonização com uréia (NH₂CONH₂)	5
3.1.1. Fatores que afetam o processo de amonização	8
3.1.1.1. Dose aplicada	8
3.1.1.2. Período de tratamento e temperatura ambiente	9
3.1.1.3. Teor de umidade do material	9
3.1.1.4. Tipo e qualidade do material	10
3.1.2. Efeito da amonização sobre compostos nitrogenados	11
3.1.3. Efeito da amonização sobre os constituintes da parede celular	12
3.1.4. Efeito da amonização sobre a degradabilidade e digestibilidade dos volumosos de baixa qualidade	13
3.1.5. Efeito da amonização sobre a conservação de forragens	15
3.2. Enzimas fibrolíticas exógenas	16
REFERÊNCIAS	21

CAPÍTULO 2

Valor nutricional e estabilidade aeróbia do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas	30
RESUMO	30
ABSTRACT	31
INTRODUÇÃO	32
MATERIAL E MÉTODOS	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	47

CAPÍTULO 3

Fracionamento dos componentes nitrogenados e dos carboidratos do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.....	52
RESUMO	52
ABSTRACT	53
INTRODUÇÃO	54
MATERIAL E MÉTODOS	55
RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64

CAPÍTULO 4

Degradabilidade <i>in vitro</i> do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.....	67
RESUMO	67
ABSTRACT	68
INTRODUÇÃO	69
MATERIAL E MÉTODOS	70
RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	82
CONCLUSÕES	86

CAPITULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A produção estacional de forragem é um fato concreto, que tem causado enormes prejuízos à pecuária, pois a maioria dos produtores não se prepara para suplementar os rebanhos no período de escassez. Por outro lado, esta época coincide com a oferta abundante de resíduos oriundos do processamento da cana-de-açúcar, sendo que esta planta apresenta alta produção por unidade de área cultivada, cultivo relativamente fácil e baixo custo de produção por hectare.

É nesta fase, também, que a planta atinge a maturidade, apresentando maior valor nutritivo, devido ao acúmulo de açúcares em seus tecidos, todavia com a diminuição da digestibilidade da parede celular (Banda & Valdez, 1976).

O uso do bagaço de cana-de-açúcar na alimentação animal é viabilizado com o uso de tratamentos que permitiram melhorar a sua digestibilidade. Estes tratamentos são realizados com o intuito de melhorar sua utilização, podendo ser físicos, como a moagem e o tratamento térmico; ou químicos, como a utilização da uréia, amônia anidra e do hidróxido de sódio (NaOH), que são produtos alcalinos que normalmente promovem redução da fibra em detergente neutro (FDN), podendo influenciar positivamente o consumo de matéria seca (MS) do alimento (Gesualdi et al., 2001).

Em adição, com o objetivo de aumentar a eficiência de utilização de resíduos pelos ruminantes, pesquisadores têm estudado o efeito da utilização de produtos biotecnológicos, destacando-se as enzimas fibrolíticas exógenas compostas de celulases e hemicelulases. Estas enzimas, extraídas de fungos ou bactérias, em atuação conjunta com as enzimas produzidas pelos microrganismos ruminais, potencializam a degradação dos polissacarídeos estruturais e aumentam a taxa de degradação da fibra (Martins et al., 2007).

A grande maioria dos ensaios (Sarmiento et al., 1999; Sarmiento et al., 2001) foram conduzidos com bagaços provenientes da indústria sucroalcooleira, o qual sofre um processo de extração do caldo da cana-de-açúcar muito mais eficiente que o das moendas dos alambiques onde se produz aguardente de forma artesanal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta da família das gramíneas, espécie *Saccharum officinarum*, originária da Ásia Meridional, muito cultivada em países tropicais e subtropicais para obtenção do açúcar, do álcool e da aguardente. Do seu processo de industrialização, obtêm-se produtos que geram resíduos em grande escala, como o bagaço, a ponta de cana, a vinhaça, a torta de filtro (resíduo da filtragem do caldo de cana), a cinza do bagaço (produzido pela sua queima) e a levedura (Castro et al., 2008).

Segundo levantamento feito pela CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) em 2010, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com a área colhida destinada à atividade sucroalcooleira estimada em 8.033,6 mil hectares. O Estado de São Paulo é o maior produtor com 53,60% (4.377,66 mil hectares), seguido por Minas Gerais com 8,65% (706,58 mil hectares), Paraná com 7,51% (613,67 mil hectares), Goiás com 7,34% (599,31 mil hectares), Alagoas com 5,37% (438,57 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 4,92% (401,81 mil hectares) e Pernambuco com 4,21% (343,51 mil hectares).

Na safra brasileira 2010/2011, estima-se que 24.158,1 mil ha será ocupada com soja, 13.338,1 mil ha com milho, 8.033,6 mil ha com cana-de-açúcar e 1.391,0 mil ha com algodão (CONAB, 2011). As áreas de pastagem se configuram na maior “cultura” agrícola do Brasil, ocupando mais de 172 milhões de hectares (IBGE, 2006).

A produção nacional de cana-de-açúcar na safra 2010 foi de 719.156.742 toneladas, com um rendimento médio de 79.196 kg/ha; e a estimativa para a safra de 2011 é de 671.817.569 toneladas, com rendimento médio de 78.449 kg/ha, tendo uma variação de -6,6% e -0,9%, respectivamente, sendo que deste total produzido, 90,3% destinam-se a indústria sucroalcooleira e o restante, 9,7% à fabricação de cachaça, alimentação animal, sementes, fabricação de rapadura, açúcar mascavo e outros fins (IBGE, 2011).

A contribuição do Estado da Bahia no cenário nacional para produção de cana-de-açúcar foi de 1,13% da produção nacional em 2010 em uma área plantada de 91 mil hectares, frente aos 8.033,6 mil ha cultivados nacionalmente. Sua produtividade também situa-se abaixo da nacional. No ano de 2010, o estado produziu 4.976 mil toneladas com uma produtividade de 59.415 kg/ha, inferior à média obtida no País, da ordem de 79.196 kg/ha. A estimativa para o ano de 2011 é de 5.129 mil toneladas, tendo variação de 3,1%, com

rendimento de 59.784 kg/ha (SEI - Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia, 2011).

2.2. Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço é o resultado da extração do caldo da cana que pode ser obtido após passagem do colmo da cana por moendas ou por difusores.

A moagem é um processo estritamente volumétrico, em que o caldo é deslocado com a passagem do colmo da cana entre dois rolos próximos, resultando em uma porção de volume de caldo extraído e outra de bagaço.

A “difusão” consiste em se comprimir a cana-de-açúcar ao máximo, sendo que a “sacarose” aderida ao material fibroso é dissolvida e removida por lixiviação (lavagem), através de difusores. A fim de se reduzir a quantidade de água necessária, procede-se uma operação de retorno, assim ao final da operação, quando o bagaço de cana-de-açúcar se apresenta exaurido ao máximo, faz-se a lavagem com água. O líquido obtido desta lavagem contendo “sacarose”, que conseguiu extrair do bagaço, é usado na lavagem do bagaço anterior que é um pouco mais rico, e assim sucessivamente. Esse retorno pode ser efetuado de 5 a 20 vezes, dependendo do grau de esgotamento desejado (Delgado et al., 1975).

De acordo com Bastos Neto (2007), o equipamento que se convencionou chamar de “difusor” é, na realidade, um lixiviador de cana, no qual a “sacarose” é extraída exclusivamente por um processo de lavagem repetitiva, passando por diluição para a solução de menor concentração. A extração através da difusão constitui um método mais eficiente que a moagem convencional e representa aumento substancial no rendimento operacional. E por isso, o bagaço possui características físicas e químicas diferentes.

A extração do caldo passa de 90-93% com a moagem convencional para 96-98% com a difusão. Por isso, de acordo com o processo de extração do caldo da cana, o bagaço de cana resultante, pode conter diferentes teores residuais de sacarose (Delgado et al., 1975).

Segundo Burgi (1995), de cada tonelada de cana-de-açúcar moída na indústria obtêm-se 700 litros de caldo e 300 kg de bagaço com 50% de MS. Se por um lado a grande disponibilidade deste último, durante o período de entressafra das pastagens, justificaria sua utilização ampla na alimentação de ruminantes, por outro lado, sua reduzida digestibilidade e composição bromatológica rica em fibras e pobre em proteínas limitam seu uso *in natura*.

Na Tabela 1 observa-se uma variação bastante expressiva na composição químico-bromatológica dos bagaços de cana-de-açúcar avaliados, que pode ter origem nas diferenças das variedades de cana utilizadas, nas condições ambientais durante crescimento, maturação das canas e na eficiência de extração do caldo.

Tabela 1. Composição químico-bromatológica do bagaço de cana-de-açúcar

Método de extração	Características								Autor
	MS (%)	PB (%MS)	FDN (%MS)	FDA (%MS)	EE (%MS)	CEL (%MS)	HEM (%MS)	LIG (%MS)	
BINmoa ¹	50,6	2,4	78,5	59,0	-	-	-	-	Evangelista (2001)
BINmoa ¹	40,11	2,32	59,02	38,34	0,07	30,30	20,68	7,34	Carvalho et al. (2006)
BINmoa ¹	50,0	1,8	94,3	62,7	-	45,3	31,6	16,5	Pires et al. (2004a)
BINdif ²	62,28	2,36	91,08	-	-	-	22,22	-	Sarmento et al. (2001)
BINdif ²	84,19	1,24	79,04	56,82	0,18	-	-	18,69	Ferreira et al. (2009)

¹-Bagaço de cana-de-açúcar *in natura* – obtido pela moagem convencional

²-Bagaço de cana-de-açúcar *in natura* – obtido por difusão

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; EE: extrato etéreo; CEL: celulose; HEM: hemicelulose; LIG: lignina.

Mesmo apresentando elevados teores de parede celular, alguns trabalhos indicam que, em situações específicas, o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BIN) pode ser utilizado como fonte de fibra em dietas de bovinos de corte (Berndt et al., 2002). Rabelo et al. (2008a) verificaram que a utilização de 15% de bagaço *in natura* obtido por difusão, acrescido de 35% de bagaço tratado por pressão e vapor em rações com 50% de volumoso, não prejudica a digestibilidade dos nutrientes e os parâmetros ruminais de bovinos de corte. Estes mesmos autores, em outro experimento, avaliando consumo de MS e comportamento ingestivo em bovinos de corte indicaram que o bagaço de cana obtido por difusão, pode ser utilizado até o teor de 15% sem prejudicar o desempenho produtivo destes animais (Rabelo et al., 2008b).

O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo que se caracteriza pela baixa digestibilidade, variando entre 25 e 30% e teor de nitrogênio abaixo de 2% na MS, sendo que mais de 90% deste N é recuperado na FDA, indicando que provavelmente quase todo o nitrogênio encontra-se indisponível para o animal (Evangelista, 2001).

3. Tratamentos físicos, químicos e biológicos no bagaço

Tratamentos são realizados para melhorar o valor nutricional do bagaço de cana-de-açúcar, podendo ser físicos e/ou químicos. Entre os tratamentos físicos, destacam-se a

moagem e o tratamento térmico, e entre os químicos, a uréia, a amônia anidra e o hidróxido de sódio (NaOH), produtos alcalinos que normalmente promovem redução da FDN, podendo melhorar a digestibilidade e o consumo do alimento (Pires et al., 2006).

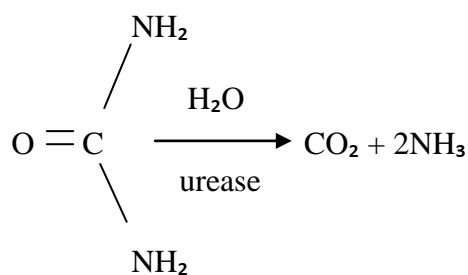
Pesquisas através de processos biotecnológicos com o uso de enzimas têm sido feitas no sentido de utilizar o bagaço para a produção de etanol e proteína enriquecida. As etapas envolvidas neste processo consistem em hidrólise seguida de fermentação. Essa hidrólise é feita por sacarificação enzimática (Pietrobon, 2008). Os efeitos positivos do uso de enzimas fibrolíticas na alimentação de ruminantes estão relacionados ao aumento da digestibilidade da matéria orgânica (MO) e da FDN (Yang et al., 1999).

3.1. Amonização com uréia (NH₂CONH₂)

Dentre os tratamentos químicos, destacam-se o uso da amônia anidra (NH₃) ou da uréia, processo denominado de amonização. Segundo Van Soest (1994), a melhoria no valor nutricional das palhadas com álcali forte, como a amônia anidra ou uréia como fonte de amônia, resulta em aumento da digestibilidade e do teor de nitrogênio total e na preservação de resíduos úmidos, pelo controle de crescimento microbiano.

A uréia é um produto químico que se apresenta em estado sólido, na cor branca, sendo higroscópica e solúvel em água, álcool e benzina, tendo sua forma química NH₂CONH₂. A utilização da uréia como fonte de amônia tem sido estudada por apresentar baixo custo e fácil manuseio. O tratamento de forragens com uréia (46% de N) como fonte de amônia, vem sendo alvo de estudo (Dolberg, 1992). Sua utilização tem mostrado viabilidade, sendo utilizada em fenos com alta umidade, pois, na presença de umidade e sob a ação da enzima urease existente na planta e nos microrganismos, sofre hidrólise e produz duas moléculas de NH₃ e uma de CO₂ (Silanikove et al., 1988; Henning et al., 1990). Outro fator importante a ser considerado, no uso da uréia, é a facilidade de aplicação em pequenas quantidades de feno.

Simultaneamente, ocorrem dois processos dentro da massa da forragem tratada com uréia: ureólise, a qual transforma a uréia em amônia, sendo que esta, subsequentemente, gera os efeitos nas paredes da célula da forragem (Garcia & Pires, 1998).



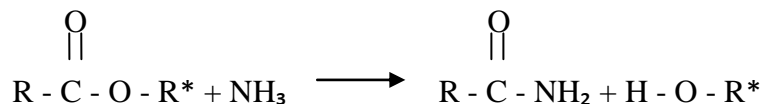
A urease é facilmente encontrada nas plantas, principalmente em certas leguminosas, como por exemplo, a soja crua, lab-lab e outras, sendo praticamente ausente nas palhas ou material morto, como por exemplo, os capins secos. Somente em casos específicos de forragens muito secas, e que não possam ser umedecidas, a adição de fontes exógenas de urease seria necessária. As condições adequadas à atividade da urease nos volumosos, segundo Sundstol & Coxworth (1984), ocorre quando o conteúdo de água da forragem varia de 25 a 30%.

Sarmento et al. (2001), afirmam que a utilização de 7,5% de uréia na MS para amonização do bagaço sem urease, proporcionou resultados mais expressivos do que com o uso de soja crua nos níveis de 0; 2,5; 3,75; e 7,5% da MS, sugerindo que no tratamento do bagaço de cana com uréia o uso de fonte de urease não é imprescindível.

Têm-se observado em pesquisas que a grande maioria das gramíneas tropicais, assim como alguns resíduos agrícolas, possui um teor significativo de urease¹, dispensando a adição de aditivos no momento do tratamento (Cândido et al., 1999; Sarmento et al., 2001; Bertipaglia et al., 2005).

Dois teorias procuram explicar o efeito da amônia sobre a parede celular das forragens. A primeira proposta por Tarkow & Feist (1969), denominada de “amoniólise”, baseia-se na reação entre a amônia e um éster, produzindo uma amida. As ligações ésteres entre a hemicelulose e a lignina com grupos de carboidratos são rompidas com a consequente formação de amida, cuja reação pode ser esquematizada da seguinte forma:

¹ A urease catalisa a hidrólise de uréia em dióxido de carbono e amônia. Encontra-se principalmente em sementes, microrganismos e invertebrados. Nas plantas, a urease é um hexâmero – consiste em seis cadeias idênticas – e localiza-se no citoplasma. Em bactérias, é constituída por duas ou três subunidades diferentes. Para ser ativada, a urease precisa ligar-se a dois íons níquel por subunidade. (*Science in School*, 2011).

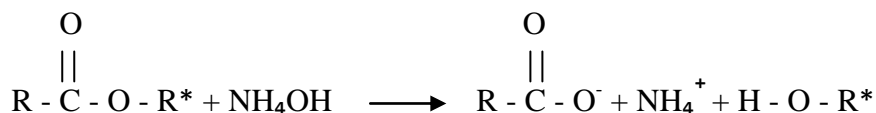


onde,

R = molécula de carboidrato estrutural, e

R* = outra molécula de carboidrato estrutural, ou um átomo de hidrogênio de um ácido carboxílico ou uma unidade fenil-propano da lignina.

A segunda teoria proposta por Buettner et al. (1982), baseia-se na característica da amônia em apresentar alta afinidade com a água, resultando na formação de uma base fraca, o hidróxido de amônio (NH₄OH), durante o tratamento de material úmido com esse composto. No processo, ocorre hidrólise alcalina resultante da reação do hidróxido de amônio com as ligações ésteres entre os carboidratos estruturais, conforme a seguinte reação:



onde,

R = molécula de carboidrato estrutural, e

R* = outra molécula de carboidrato estrutural, ou um átomo de hidrogênio de um ácido carboxílico ou uma unidade fenil-propano da lignina.

No processo de amonização, a base fraca forma-se por meio de reação exotérmica que pode ser constatada pelo aumento da temperatura na forragem em tratamento (Knapp et al., 1975; Sundstol et al., 1978; Urias et al., 1984).

Na amonização de volumosos de baixa qualidade observa-se elevação do pH, o que pode ser atribuído ao fato de a amônia apresentar caráter alcalino. Como foi constatado por Carvalho et al. (2006) ao tratar bagaço de cana nas doses de 0; 2,5; 5,0 e 7,5% de uréia (MS), encontrando valores de pH de 3,66; 5,48; 7,31 e 9,14, respectivamente.

Além dos efeitos químicos da amônia sobre as ligações do tipo éster, sua alta afinidade com a água promove expansão da parede celular e ruptura de componentes dos tecidos de forragens amonizadas, que podem ser constatados por meio de estudos de microscopia eletrônica.

3.1.1. Fatores que afetam o processo de amonização

De acordo com Sundstol & Coxworth (1984) inúmeros fatores podem afetar a eficiência da amonização, destacando-se a quantidade aplicada, o período de tratamento e a umidade da forragem. Além destes, o poder tampão das plantas exerce efeito pronunciado na eficiência do tratamento (Dias-da-Silva & Guedes, 1990). Nos tratamentos no qual se usa uréia como fonte de amônia, a umidade e a atividade ureática têm influência marcante nas respostas dos volumosos amonizados (Sundstol & Coxworth, 1984; Joy et al., 1992).

3.1.1.1. Dose aplicada

Segundo Pires (2000), a dose de nitrogênio foi um dos primeiros fatores a ser avaliado nos estudos sobre amonização de volumosos. Doses acima de 4% de amônia anidra e de 7,5% de uréia na MS não são utilizadas normalmente, pois não apresentam melhoria na qualidade do material tratado. Além disso, ocorrem maiores perdas de nitrogênio por volatilização, no momento da abertura do material amonizado. Entretanto, esses valores podem ser usados visando melhorar a qualidade da forragem, quando esta possui baixa digestibilidade. Doses mais baixas de amônia anidra e uréia são utilizadas quando se deseja conservar forragens com umidade acima de 18% e abaixo de 50%. Nesse caso, utilizam-se normalmente, 1,0 a 1,5% de amônia anidra ou 1,9 a 2,8% de uréia, com base na MS da forragem.

Dolberg (1992) relata que a maior eficiência do tratamento com uréia pode ser obtido quando o volumoso possui teor de umidade de 30% e a uréia é aplicada na dosagem de 4 a 8% da MS da forragem tratada.

Outros trabalhos de amonização de volumosos de baixa qualidade recomendam que sejam utilizadas de 3 a 4% de amônia anidra com base na MS (82% N) (Garcia & Neiva, 1994), o que equivale de 5,58 a 7,28% de uréia na MS (45% N), respectivamente.

Dentro dos limites citados acima (base MS) de utilização da uréia no processo de amoniólise de volumosos de baixa qualidade, vários autores também utilizam a uréia para este fim, sendo recomendadas doses de: 3% de uréia (Cândido et al., 1999; Santos et al., 2004; Zanine et al., 2007); 4% de uréia (Alfaya et al., 2002; Rocha et al., 2006); 5% de uréia (Souza & Santos, 2005; Carvalho et al., 2007); 5,4% de uréia (Reis et al., 2001a); 6% de uréia (Reis et al., 2003); 7% de uréia (Gobbi et al., 2005); 7,5% de uréia (Sarmiento et al., 2001; Carvalho et al., 2006); 8% de uréia (Faria et al., 2008). Portanto, deve-se ter o cuidado no fornecimento

de volumosos amonizados aos ruminantes, pois existe risco de intoxicação, devendo-se inicialmente ser ofertado aos animais uma menor quantidade dos volumosos tratados, para que ocorra adaptação da microbiota ruminal a este novo alimento.

3.1.1.2. Período de tratamento e temperatura ambiente

As reações químicas que ocorrem com a amonização se processam mais rapidamente em temperaturas mais altas do que nas baixas. Após a aplicação de amônia, a temperatura interna aumenta rapidamente, atingindo valores máximos até seis horas após a aplicação (Garcia & Pires, 1998).

A temperatura ambiente tem importante efeito na velocidade de reação entre a amônia e a forragem tratada. Em temperaturas próximas de 100 °C as reações são quase imediatas, enquanto que, quando próximas de 0 °C, são extremamente lentas (Garcia & Pires, 1998). Entretanto, deve ser ressaltado que um aumento exagerado da temperatura pode favorecer a reação de Maillard, tornando parte do nitrogênio adicionado ao material indisponível para o animal (Van Soest, 1994).

Para forragens de baixa qualidade, tratadas com 3 a 4% de NH₃ na MS, Sundstol et al. (1978) e Borhami & Sundstol (1982) recomendam os seguintes tempos de tratamento: menos de 5 °C, mais de 8 semanas; de 5 a 15 °C, de 4 a 8 semanas; de 15 a 30 °C, de 1 a 4 semanas; mais de 30 °C, menos que 1 semana de tratamento.

3.1.1.3. Teor de umidade do material

O teor de umidade é outro fator importante que determina o efeito do tratamento com amônia. Em condições tropicais, onde palhadas e restos de cultura podem apresentar níveis de umidade muitos baixos, o umedecimento da forragem é o mais indicado para que se tenha melhor efeito da amonização (Garcia & Neiva, 1994).

A umidade do material possui efeito marcante, em virtude de a amônia possuir alta afinidade com a água. Deve-se ressaltar a importância da umidade em materiais tratados com uréia, que necessitam além da presença da enzima urease, de umidade para que ocorra a ureólise e, como resultado, a produção de amônia. A umidade mínima recomendada em geral

pela literatura situa-se em torno de 30%, podendo ser usada forragens com até 50% de umidade com resultados satisfatórios (Pires et al., 2010).

Embora a umidade seja importante na retenção de N, o aumento demasiado no conteúdo de umidade do material pode levar a acréscimo na temperatura e, conseqüentemente, à formação dos polímeros de “Maillard” que são indigestíveis (Borhami & Sundstol, 1982).

Com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes quantidades de uréia e de água adicionadas em feno de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, colhido após a queda das sementes, Rosa et al. (2000) observaram que o teor médio de N total aumentou com as doses crescentes de uréia e decresceram com o aumento da quantidade de água adicionada. Não se verificou diferenças significativas entre os teores médios de FDN e de hemicelulose em todos os tratamentos. Por outro lado, as doses de 4 e 6% de uréia (base da MS) com 40% de água adicionada permitiram os menores teores médios de FDA.

3.1.1.4. Tipo e qualidade do material

A resposta à amonização é variável de acordo com o tipo de forragem tratada, sendo que os resultados de pesquisa mostram efeito mais pronunciado para forragens que apresentam digestibilidade muito baixa (Garcia & Pires, 1998). Forragens com menor valor nutritivo, quando amonizadas, normalmente apresentam respostas melhores que as de maior valor nutritivo. Isto se deve principalmente ao fato destas últimas apresentarem alta digestibilidade e baixos teores dos constituintes da parede celular. Nas gramíneas e seus respectivos resíduos, a amonização possui efeito marcante, principalmente no que diz respeito ao aumento na digestibilidade, o que, em leguminosas normalmente não é observado. Isto ocorre porque a maioria das ligações presentes nas gramíneas é do tipo éster, ao passo que as leguminosas apresentam ligações tipo éter. A amônia, por ter a capacidade de quebrar as ligações tipo éster, apresentará melhor resultado quando utilizada em gramíneas ou resíduos das mesmas (Pires et al., 2010).

Palhadas de todos os tipos de cereais podem ser tratadas, sendo que as de arroz podem ser tratadas inteiras, embora se aconselhe picar as palhas oriundas de cereais de caules mais duros, como as de trigo (Dolberg, 1992). O mesmo autor afirma que, em termos relativos, os melhores resultados desse tipo de tratamento são obtidos com os volumosos de pior qualidade.

3.1.2. Efeito da amonização sobre compostos nitrogenados

A maioria dos trabalhos tem mostrado elevação do teor de nitrogênio após a amonização de resíduos agroindustriais e fenos de baixa qualidade (Grotheer et al., 1986; Lines et al., 1996; Rosa et al., 1998; Souza et al., 2001), sendo que a elevação do teor de proteína, está relacionada a adição do nitrogênio na forma de NNP.

Aumento no teor de PB foi verificado por Cândido et al. (1999), ao tratarem bagaço de cana-de-açúcar com 8% de uréia (base MS). Esses autores encontraram valores de 1,2% de PB para o controle e 18% de PB para o tratado com uréia. Sarmiento et al. (1999), trabalhando também com bagaço de cana-de-açúcar contendo 55% de MS, tratado com doses de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10% de uréia e 5% de soja crua moída (base MS), como fonte de urease, e armazenado por 97 dias, verificaram valores de 3,65; 5,59; 7,71; 9,96 e 12,54% de PB para as doses estudadas. Elevação nos teores de PB também foram observadas por Carvalho et al. (2007) ao amonizar o bagaço de cana-de-açúcar com uréia durante 110 dias, nas doses de 0; 2,5; 5,0; e 7,5% (base MS), onde encontraram valores de PB de 3,88; 6,95; 9,41 e 13,28%, respectivamente.

Apesar de a literatura relatar aumentos expressivos no conteúdo de compostos nitrogenados de forragens amonizadas, a retenção de nitrogênio adicionado nestes volumosos sofre grande variação.

Uma explicação é dada por Cardoso (2000), que explica que os compostos nitrogenados são retidos por meio de uma reação de amoniólise em meio aquoso. Assim, a retenção de nitrogênio seria limitada primeiramente pelo baixo teor de umidade do material, bem como o número de ligações ésteres susceptíveis à reação de amoniólise. Schneider & Flachowsky (1990) constataram melhoria na retenção do nitrogênio adicionado a palha de trigo, quando o conteúdo de umidade foi elevado de 12 para 30%.

A retenção do N aplicado, pode também variar em função da quantidade de amônia adicionada, sendo registrados maiores valores com o uso de doses menores de amônia (Reis et al., 2001b). Parte significativa do N aplicado pode ser perdida por volatilização da amônia durante o período de armazenamento ou após abertura das medas ou silos (Pires, 2000).

Podem ocorrer aumentos nos teores de NIDN e NIDA das forragens quando amonizadas, reduzindo a disponibilidade de nitrogênio total nesses materiais (Van Soest & Fox, 1992). Gobbi et al. (2005) observaram um comportamento quadrático nos teores de NIDN, com valores máximos de 0,56% para um nível de 6% de uréia, e não verificaram alteração nos teores de NIDA em feno de *Brachiaria decumbens* amonizados com diferentes

níveis de uréia (0; 2; 4; 6; 8 e 10% em base da MS). Reis et al. (2001b) observaram aumento médio de 0,21 e de 0,14% nos teores de NIDN e NIDA, respectivamente, em feno de *Brachiaria decumbens* amonizados com uréia (5,4%) ou com NH₃ (3,0%).

3.1.3. Efeito da amonização sobre os constituintes da parede celular

O efeito da amonização sobre os constituintes da parede celular tem mostrado algumas contradições. A fração FDN normalmente diminui em razão da solubilização parcial da hemicelulose. Entretanto, algumas vezes estes efeitos não foram relatados (Fernandes et al., 2001; Reis et al., 2003). No que se refere à FDA, apesar da maioria dos trabalhos mostrarem a não alteração deste componente, alguns relataram diminuição, e outros aumentos. O acréscimo da fração FDA é atribuído ao N adicionado, que se apresenta, em parte, na forma de NIDA e, quando se observa diminuição, parte da lignina pode ser solubilizada. Relatos de pesquisa indicam uma forma de ação na fração celulose, ocorrendo expansão da mesma, constatando-se que, mesmo quando não há redução na parede celular de materiais amonizados, pode ocorrer aumento na DIVMS (Fahmy & Klopfenstein, 1994).

Aragão et al. (2009) amonizaram o co-produto do desfibramento do sisal durante quatro semanas com uréia, onde observaram os valores de FDN iguais a 23,0; 33,6; 31,3 e 31,0% para doses de 0; 5; 10 e 15% de uréia na MS, respectivamente. Da mesma forma, Ribeiro et al. (2009) relataram que amonizando o bagaço do pseudofruto de caju com uréia na dose de 5,0% da MS durante 20 dias, os teores de FDN elevaram de 68,34% para 73,94% e FDA de 47,89% para 52,12%. Teores maiores de FDN nos fenos de capim-Annoni 2 (*Eragrostis plana* Nees) amonizados com uréia (4% MS) também foram encontrados por Alfaya et al. (2002).

Gomes et al. (2009) registraram aumento nos teores de FDN, FDA, celulose e lignina, e não verificaram efeito sobre a hemicelulose ao amonizar o resíduo agroindustrial da carnaúba (*Copernicia prunifera*) conhecido como bagana, utilizando uréia nas doses de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10% (MS) e grão de soja tostado como fonte de urease nas doses de 0 e 20% (MS).

Reis et al. (2003) avaliaram a amonização do feno de coast-cross, relatando que os tratamentos (6% de uréia e 3,5% de amônia anidra na MS) não afetaram os teores de FDA, celulose e lignina. Da mesma forma, Reis et al. (1995) amonizaram *Brachiaria brizantha* e observaram que os teores de FDA e de celulose não foram alterados. Por sua vez, Rosa et al. (1998) constataram que os valores de lignina da *Brachiaria decumbens* diminuíram em

consequência da aplicação de uréia, não tendo sido observadas alterações nos teores de celulose com a amonização. Ao aplicar 2; 4 e 6% de uréia e, 20, 30 e 40% de água, em feno de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, Rosa et al. (2000) observaram que os tratamentos com 40% de água e 4 e 6% de uréia permitiram maior redução dos teores de FDA.

Garcia et al. (2000) registraram menor teor de FDN (64,4%) na casca de café tratada com 4% de uréia e 1% de grão de soja moído, quando comparado ao valor de FDN (70,5%) da casca de café sem tratamento. Reis et al. (2001a) registraram decréscimos de 6,0 e 4,1 unidades percentuais nos teores de FDN e de 5,9 e de 3,5 unidades nos de hemicelulose, em resposta à adição de amônia anidra ou de uréia nos fenos de *Brachiaria decumbens* Stapf, *Brachiaria brizantha* (Hochst ex. A. Rich) Stapf e jaraguá (*Hyparrhenia rufa* Ness Stapf), colhidos no estágio de maturação das sementes e tratados com amônia anidra (3,0% MS) ou uréia (5,4% MS). Trabalhando com amonização de feno de *Brachiaria decumbens* Stapf (3% de NH₃ na MS), Pereira et al. (1993) verificaram diminuição no conteúdo de hemicelulose, de 31,2% para 26,5%, sendo uma redução de aproximadamente 15,06%.

Os efeitos de diferentes fontes e níveis de amônia sobre a composição bromatológica do bagaço de cana-de-açúcar foram estudados por Gesualdi et al. (2001), sendo utilizadas as doses de 0; 1; 2 e 4% (MS) de amônia anidra, uréia e sulfato de amônio, onde para o material tratado com amônia anidra os valores encontrados foram 94,46; 93,52; 91,82 e 90,31% de FDN; tratado com uréia os valores encontrados foram 94,44; 94,23; 92,00 e 89,33% de FDN; tratado com sulfato de amônio os valores encontrados foram 94,30; 86,94; 87,03 e 86,29% de FDN para as respectivas doses citadas.

3.1.4. Efeito da amonização sobre a degradabilidade e digestibilidade dos volumosos de baixa qualidade

Uma das formas de se avaliar a eficiência da amonização é por meio da avaliação da degradabilidade no rúmen. De acordo com Paiva et al. (1995), a degradação ruminal e o consumo de alimentos, geralmente estão correlacionados, e o conhecimento da extensão da degradabilidade de forragens submetidas à amonização permite, portanto, obter estimativas da ingestão voluntária desses alimentos pelos ruminantes. Van Soest (1994) relata que o consumo está associado com a digestibilidade e não pode ser tratado como uma variável independente, sendo que a digestibilidade e o consumo são positivamente correlacionados, particularmente no caso de dietas de baixa qualidade.

A maioria dos trabalhos sobre amonização de volumosos de baixa qualidade tem mostrado que esse tipo de tratamento promove aumento das degradabilidades da MS e dos constituintes da parede celular destas forragens, sendo que este aumento está relacionado ao acréscimo do teor de nitrogênio total das forragens e ao seu efeito, rompendo ligações ésteres entre os constituintes da parede celular e ácidos fenólicos, e à despolimerização parcial da lignina.

Segundo Klopfenstein (1978), o modo de ação da amônia seria por meio da solubilidade parcial da fração hemicelulolítica, levando a um aumento da degradabilidade da parede celular. Autores têm relatado que a amonização causa expansão da celulose, facilitando, assim, o ataque da parede celular pelos microrganismos do rúmen. Tudo isso pode ser resultante da quebra das pontes de éster entre lignina e carboidratos estruturais causada pela amonização (Buettner et al., 1982).

Segundo Manson et al. (1988), citados por Goto et al. (1993), o aumento da digestibilidade de forragens amonizadas também tem sido atribuído a fatores antiqualitativos, como compostos fenólicos e grupo acetil. A redução dos compostos fenólicos e do grupo acetil pela amônia resulta em correlação positiva com a digestibilidade. Isto ocorre em razão desses compostos serem tóxicos aos microrganismos ruminais.

Pires et al. (2004b) estudaram a degradabilidade ruminal da matéria seca (DRMS), da fibra em detergente neutro (DRFDN) e da fibra em detergente ácido (DRFDA) do bagaço de cana-de-açúcar tratado com amônia anidra e/ou sulfeto de sódio (2,5% de Na₂S; 4% de NH₃ e 2,5% de Na₂S + 4% de NH₃) e relataram que o bagaço tratado com amônia anidra apresentou melhoria na DRMS, DRFDN e DRFDA. De acordo com os mesmos autores, o sulfeto não demonstrou eficiência no tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, mesmo quando associado à amônia anidra.

Carvalho et al. (2007) trabalhando com o bagaço de cana amonizado com uréia nas doses de 0; 2,5; 5,0 e 7,5% (base MS) concluíram que houve incrementos nas degradabilidades de 73,6; 61,3; 45,6 e 65,7% para a MS, FDN, FDA e hemicelulose, respectivamente, no maior tempo de incubação (96 horas).

Cândido et al. (1999) utilizando doses de 0; 2; 4; 6 e 8% de uréia (base MS) na ausência ou presença de grãos de soja (proporção de 5 de uréia para 1 de soja) no tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, contendo 30% MS e armazenado por 42 dias, relataram que a DIVMS média do tratamento controle (23,2%) foi inferior à DIVMS média dos tratamentos com uréia (28,5%).

Gobbi et al. (2005) amonizaram durante 35 dias o feno de *Brachiaria decumbens* colhida no estágio de pós-florescimento, utilizando uréia nas doses de 0; 2; 4; 6; 8 e 10% (base seca), onde observaram que a DIVMS foi influenciada de forma quadrática pelos níveis de uréia, estimando-se valor máximo de 68,9% para o nível de 7,15% de uréia.

No entanto, Souza et al. (2001) não verificaram diferenças para a DIVMS, ao tratarem a casca de café com doses de 0; 2,0; 3,2 e 4,2% de amônia anidra, sendo encontrados valores de 29,59; 29,01; 28,0 e 28,84% para os respectivos tratamentos.

A amonização nem sempre promove aumento na degradabilidade de forragens, o que pode estar relacionado ao método empregado e às condições ambientais, principalmente a temperatura, que pode influenciar as reações químicas entre a amônia e o material tratado (Paiva et al., 1995).

3.1.5. Efeito da amonização sobre a conservação de forragens

Pelo seu pronunciado efeito fungistático e bacteriostático, a amonização via uréia ou amônia anidra (NH₃), proporciona a conservação de forragens armazenadas com umidade acima dos 20% (Pires et al., 2010). A amônia atua no controle de crescimento de microrganismos, principalmente pelas alterações de pH do meio (Grotheer et al., 1986). Sendo assim, esta prática torna-se interessante, uma vez que as atividades fúngicas e bacterianas se constituem nas principais causas de deterioração de forragens armazenadas com alto conteúdo de umidade.

Cândido et al. (1999), utilizando doses de 0; 2; 4; 6 e 8% de uréia no tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, contendo 30% de MS e armazenado por 42 dias, verificaram que as doses de 2 e 4% de uréia não foram suficientes para conservar o material. Segundo esses autores, provavelmente, a quantidade de amônia liberada foi insuficiente para exercer sua ação fungistática, sendo as doses de 6 e 8% eficientes no controle dos fungos.

Gesualdi et al. (2001) verificaram que o tratamento do bagaço e ponta de cana-de-açúcar com 0; 1; 2 e 4% (N-amônia na MS) nas formas de amônia anidra, uréia e sulfato de amônio em silos, proporcionou boa preservação em todos os tratamentos, sendo que no bagaço de cana houve conservação até o 48º dia. Em relação à ponta, só foi possível coletar amostras até o 24º dia, ocorrendo aparecimento de fungos, deteriorando totalmente todo o material.

3.2. Enzimas fibrolíticas exógenas

Com o objetivo de aumentar a eficiência de utilização dos alimentos pelos ruminantes, pesquisadores têm estudado o efeito da utilização de produtos biotecnológicos, destacando o uso de enzimas fibrolíticas exógenas, compostas de celulases e hemicelulases, que de forma isolada ou em combinação com algum tipo de pré-tratamento proporcionam maior eficiência e melhoria na utilização de resíduos lignocelulósicos de diferentes culturas agrícolas, porque na presença destas enzimas, a celulose e hemicelulose podem ser convertidas a açúcares solúveis.

A maioria das preparações comerciais enzimáticas consiste em subprodutos ou extratos fermentativos microbianos (*Bacillus* sp.) ou fúngicos (*Trichoderma* sp. e *Aspergillus* sp.), que normalmente produzem três tipos principais de celulases, chamados endocelulases (endoglucanase, endo- β -1,4-glucanase, carboximetil celulase ou β -1,4-glucana-glucano-hidrolase), exocelulases (exoglucanase, exo- β -1,4-glucanase, celulase β -1,4-celobiosidase) e β -glicosidases (celobiase ou gluco-hidrolase) tanto como entidades separadas ou na forma de complexos agregados para a hidrólise da celulose (Bhat & Bhat, 1997).

A temperatura de aproximadamente 60 °C e um pH entre 4 e 5 são as condições ideais para atuação da maioria das enzimas fibrolíticas comerciais (Coughlan, 1985).

Em geral, endoglucanases hidrolisam sítios aleatórios da cadeia de celulose, produzindo oligômeros de graus variados de polimerização; exoglucanases hidrolisam terminações não reduzidas produzindo celobiose; e β -glicosidases liberam glicoses a partir de celobiose e oligossacarídeos de cadeia curta (Bhat & Hazlewood, 2001).

Já a fração hemicelulose requer maior diversidade de enzimas para a hidrólise completa a açúcares solúveis. As duas enzimas principais são endoxilanases (xilanases) e endomananases (mananases), que atuam na região interna do polímero. Outras hemicelulases incluindo β -xilosidases, β -manosidases, α -L-arabinofuranosidases, α -D-glicuronidases, α -galactosidases, acetil e fenil esterases clivam cadeias lineares e substituintes (Coughlan & Hazlewood, 1993; Bhat & Hazlewood, 2001).

Willis et al. (1980) realizaram estudos para determinar os efeitos do hidróxido de sódio (NaOH), de enzimas microbianas (hemicelulase, pectinase e β -glucosidase) e combinações de tratamentos com NaOH e enzimas sobre a digestibilidade em palha de arroz ensilada. Eles observaram que a DIVMS da palha de arroz tratada com pectinase e β -glucosidase individualmente, e em associação com hemicelulase foram menores do que o controle, 27,3; 29,9; 28,0 e 32,2%, respectivamente, e o tratamento com hemicelulase resultou em valores

semelhantes ao controle, iguais a 31,2 e 32,2%, respectivamente. Porém, a digestibilidade da MS do material tratado com 2 a 5% NaOH foi melhorada significativamente, variando de 46,4 para 55,4%. A adição de enzimas ao mesmo tempo com hidróxido de sódio reduz a DIVMS, quando comparado com o tratamento à 2% de NaOH isoladamente. Os resultados observados da DIVMS foram de 58,8% (2% de NaOH) a 43,4% para hemicelulase, 49,1% para pectinase e 54,6% para β -glucosidase. A adição de enzimas após 3 dias, com o tratamento de 2% NaOH não teve qualquer efeito benéfico em relação a enzima alguma. A adição de enzimas em associação com 5% NaOH após 3 dias de pré-tratamento aumentou a DIVMS, quando a hemicelulase foi acrescentada ao mesmo tempo com 5% de NaOH causou uma redução na DIVMS, em comparação ao tratamento só com NaOH. Entretanto, a DIVMS da palha de arroz tratada com a combinação de 5% NaOH e as enzimas hemicelulase ou pectinase, nas concentrações de 10; 15; 20; 25 e 30 mg/100 g de MS e 3 dias de pré-tratamento, foram superiores ao controle, porém não foram detectadas diferenças entre hemicelulase e pectinase em qualquer nível. Não houve, também, diferença nos tratamentos entre 20 ou 25 mg de enzima, contudo, o tratamento com 20 mg foi superior.

Beauchemin et al. (2003) relatam que a utilização de enzimas fibrolíticas exógenas prometem melhorar o aproveitamento da forragem madura, visando um aumento da eficiência produtiva dos ruminantes. A mensuração da atividade enzimática deve ser realizada em condições bem definidas, no que diz respeito à temperatura, pH, força iônica, concentração do substrato e tipo de substrato, uma vez que todos estes fatores afetarão a atividade de uma enzima.

Bjerre et al. (1996) trabalharam com pré-tratamento da palha de trigo, combinando oxidação úmida e alcalina no nível de 10 g/L de Na_2CO_3 , 10 bar O_2 , 170 °C e 10 min em autoclave, para tratamento enzimático da celulose à glicose e para dissolver hemicelulose sem inibidores da produção microbiana, utilizando enzimas (1,2 g/mL) celulase (Celluclast) e β -glucosidase (Novozym 188). Os autores concluíram que este é um processo eficiente para quebrar lignina e preparar a celulose e hemicelulose para tratamento enzimático, assim, obtendo uma alta convertibilidade da celulose a glicose, pois o conteúdo de lignina e hemicelulose foram reduzidos por 54% e 63%, respectivamente, e 45% da hemicelulose dissolvida poderia ser identificada, como sacarídeos.

Wang et al. (2004) realizaram experimento para determinar a relação entre tratamento alcalino e enzimas exógenas em palha de trigo, concluindo que as enzimas exógenas

aumentam a taxa de digestão da palha de trigo tratada com álcali, *in vivo* e *in situ* e aumenta a extensão da palha de trigo na digestão *in vivo*.

Tang et al. (2008) testaram o efeito de leveduras e enzimas sobre características de fermentação *in vitro* em palhadas de cereais, encontrando interação entre levedura e enzimas fibrolíticas no desaparecimento da MS e MO, sugerindo que os níveis adequados de suplementação de levedura e enzimas fibrolíticas são de 5,0 e 7,5 g/kg MS de palhadas, respectivamente. Quando a levedura e enzimas fibrolíticas foram ajustadas a estes níveis, ocorreram os maiores valores de DIVMS e DIVMO.

Estudos mostram que enzimas fibrolíticas podem agir diretamente sobre a fibra ou aumentar a degradação da MS e da FDN no rúmen (Feng et al., 1996; Hristov et al., 2000). De acordo com McAllister et al. (2001), essas ações estariam interligadas, de modo que as alterações mediadas pelas enzimas antes do consumo refletiriam nas digestões ruminal e pós-ruminal dos nutrientes, com aumento da produção de leite (Schingoethe et al., 1999) ou do ganho de peso dos bovinos (Beauchemin et al., 1995).

O método de aplicação das enzimas fibrolíticas é um fator decisivo para a ação das mesmas, daí a necessidade de determinar se as enzimas fibrolíticas são mais efetivas quando adicionadas diretamente na forragem, no concentrado ou na mistura total da ração (Yang et al., 1999). Segundo Yang et al (2000), as enzimas fibrolíticas, quando aplicadas diretamente no concentrado da dieta para vacas, no início de lactação, proporcionaram aumentos na produção de leite em razão do incremento da digestibilidade de nutriente no trato digestivo total. No entanto, quando estas enzimas eram misturadas diretamente na ração de mistura total, não havia aumento na produção de leite, apesar de aumentar a digestibilidade.

Sutton et al. (2003), avaliando diferentes formas de aplicação de enzimas fibrolíticas, pulverizando-as na ração de mistura total e no concentrado uma hora antes do fornecimento, ou através de infusão ruminal, constataram que o melhor tratamento ocorreu quando se aplicava as enzimas sobre a mistura total da ração. Contudo, os três métodos de aplicação apresentaram resultados semelhantes quanto a fermentação e cinética ruminal.

A aplicação de enzimas à forragem, minutos antes de seu fornecimento ao ruminante, possibilita maior flexibilidade no manejo da alimentação, além de reduzir qualquer probabilidade de interação negativa que o processo de conservação possa proporcionar à eficiência do aditivo enzimático. Quando fornecidas dessa maneira, as enzimas fibrolíticas formam ligações com os substratos, que as protegem da degradação ruminal e podem aumentar a digestibilidade da forragem através de diferentes mecanismos, como a hidrólise

direta, melhoria da aceitabilidade, alterações na viscosidade intestinal e mudança do local de digestão.

Michal et al. (1996) realizaram a aplicação direta de enzimas fibrolíticas em feno de alfafa momentos antes de ofertar aos animais, e propuseram como uma forma viável a utilização deste método como modo de aplicação. Metodologia semelhante foi conduzida por Kung Jr. et al. (2002), quando utilizaram enzimas fibrolíticas (celulase e xilanase) diluídas em água e pulverizadas sobre a silagem de milho e feno de alfafa, deixando-as agir por 30 min antes do fornecimento aos animais.

Em trabalho mais recente sobre avaliação do desempenho de vacas holandesas, alimentadas com forragens recebendo aplicação direta de enzimas fibrolíticas imediatamente antes de ofertar aos animais, Dhiman et al. (2002) verificaram que o consumo, a produção de leite e o ganho de peso não foram alterados em função do tratamento aplicado.

Em dietas contendo 55% de concentrado, 30% de silagem de milho e 15% de feno de alfafa, a aplicação das enzimas fibrolíticas celulase e xilanase também não se mostraram eficiente no incremento da produção de leite e ingestão de MS em vacas leiteiras (Kung Jr. et al., 2002).

Segundo Knowlton et al. (2002), vacas holandesas em diferentes estágios de lactação recebendo forragem tratada com enzimas fibrolíticas minutos antes de seu fornecimento, apresentaram maior ganho de peso corporal. Porém não houve alteração significativa da digestibilidade aparente ou da excreção de nitrogênio e fósforo ou retenção desses nutrientes no tecido corporal.

A quantidade de enzimas ativas aplicadas nos alimentos é muito importante para a determinação da eficiência do tratamento. A dificuldade em se mensurar a eficiência de distribuição de pequenas quantidades de preparações enzimáticas nos alimentos, reflete na grande relação líquido:sólido usada em experimentos: 0,05 mL de enzimas diluídas para cada 0,5 g de alimento, equivalente a 100 L/tonelada. Esta diluição é muito superior aquela recomendada para aplicação comercial de 1,5 ou 2,0 L/tonelada (Loures, 2004).

De acordo com Wallace & Hartnell (2001) é mais fácil misturar pequenas quantidades da preparação enzimática em condições experimentais do que grandes quantidades, normalmente usadas em fazendas. Os autores sugerem que a efetividade dos aditivos enzimáticos seria dependente de seu local de ação. Se a eficiência do aditivo dependesse principalmente do manejo pré-alimentar, haveria necessidade de uma distribuição homogênea no alimento antes do consumo. Caso contrário, se essa eficácia dependesse de parâmetros

ruminais, essa distribuição homogênea passaria a não ser crítica, uma vez que as enzimas seriam misturadas no rúmen como parte do processo de digestão.

Entretanto, Loures et al. (2005) relatam que a aplicação de 150 g da preparação enzimática foram diluídos em 500 L de água destilada e dessa solução, foram aplicados 10 L por tonelada de silagem minutos antes do fornecimento da ração proporcionando os melhores resultados sobre a digestibilidade da fração fibrosa indicando que, talvez essa forma de aplicação seja o método mais adequado para garantir maior efetividade das enzimas fibrolíticas.

Quanto à composição da dieta, espera-se que enzimas exógenas sejam mais efetivas com maior teor de umidade como nas silagens. O requerimento de água para hidrólise de polímeros complexos é um princípio bioquímico fundamental. No entanto, na prática, enzimas exógenas se mostram mais efetivas quando adicionadas a alimentos secos (Beauchemin et al., 1998).

Feng et al. (1996) utilizando gramíneas secas, frescas ou reidratadas, observaram maior digestibilidade *in vitro* e *in vivo* da MS e da FDN em gramíneas secas tratadas com enzimas fibrolíticas. Yang et al. (2000) relataram aumento da digestibilidade da dieta quando enzimas foram adicionadas ao concentrado, não observando efeito para mistura total.

Face o exposto, foi hipotetizado que o pré-tratamento alcalino pode aumentar a eficácia da ação de enzimas fibrolíticas exógenas, conseqüentemente melhorando o valor nutricional de volumosos de baixa qualidade.

Diante deste contexto, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da combinação de uréia e enzimas fibrolíticas exógenas (celulases e hemicelulases) na composição químico-bromatológica, digestibilidade verdadeira *in vitro* da MS, fracionamento dos carboidratos e compostos nitrogenados, além da cinética de degradação ruminal *in vitro* do bagaço de cana-de-açúcar.

Os capítulos 2, 3 e 4 foram escritos de acordo com as normas da Revista Brasileira de Zootecnia.

REFERÊNCIAS

- ALFAYA, H.; SUÑÉ, L.N.P.; SIQUEIRA, C.M.G.; et al. Efeito da amonização com uréia sobre os parâmetros de qualidade do feno do capim-Annoni 2 (*Eragrotis plana* Nees). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.842-851, 2002 Suplemento.
- ARAGÃO, A.S.L.; BRANDÃO, L.G.N.; PEREIRA, L.G.R.; et al. Composição bromatológica do co-produto de desfibramento do sisal submetido a amonização. **46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, UEM, Maringá-PR, 2009.
- BANDA, M.; VALDEZ, R.E. Effect of stage of maturity on nutritive value of sugarcane. **Tropical Animal Production**, v.1, n.1, p.94-97, 1976.
- BASTOS NETO, A.O. [2007]. Aspectos da extração de sacarose da cana-de-açúcar por difusão. 2007. Disponível em: <<http://unisystems.locaweb.com.br>> Acesso em: 15/08/2009.
- BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M.; SEWALT, V.J.H. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Canadian Journal Animal Science**, v.75, p.641-644, 1995.
- BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M.; YANG, W.Z. et al. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In: PACIFIC NORTHWEST NUTRITION CONFERENCE, 33rd, 1998. Vancouver. **Proceedings...** Vancouver, 1998, 14 p.
- BEAUCHEMIN, K.A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.P. et al. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.81, p.37-47, 2003.
- BERNDT, A.; HENRIQUE, W.; LANNA, D.P.D. et al. Milho úmido, bagaço de cana e silagem de milho em dietas de alto teor de concentrado. Composição corporal e taxas de deposição dos tecidos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.5, p.2105-2112, 2002.
- BERTIPAGLIA, L.M.A.; DE LUCA, S.; MELO, G.M.P. et al. Avaliação de fontes de urease na amonização de fenos de *Brachiaria brizantha* com dois teores de umidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.378-386, 2005.
- BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v.15, p.583-620, 1997.

- BHAT, M.K.; HAZLEWOOD, G.P. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: BEDFORD, M.; PARTRIDGE, G.G. **Enzymes in farm animal nutrition**. Ed. CABI Publishing, Oxon, UK. p.11-60, 2001.
- BJERRE, A.B.; OLESEN, A.B.; FERNQVIST, T. et al. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicelulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.49, p.568-577, 1996.
- BORHAMI, B.E.A.; SUNDSTOL, F. Studies on ammonia treated straw. The effects of type and levels of ammonia, moisture content and treatment time on the digestibility *in vitro* and enzyme soluble organic matter of oat straw. **Animal Feed Science and Technology**, v.7, p.45-51, 1982.
- BUETTNER, M.R.; LECHTENBERG, V.L.; HENDRIX, K.S. et al. Composition and digestion of ammoniated tall fescue (*Festuca arundinaceae* Schreb.) hay. **Journal of Animal Science**, v.54, p.173-178, 1982.
- BURGI, R. Utilização de resíduos culturais e de beneficiamento na alimentação de bovinos. **Anais do 6º simpósio sobre nutrição de bovinos da FEALQ**. Piracicaba- SP, p.153-169, 1995.
- CÂNDIDO, M.J.D.; NEIVA, J.N.M.; PIMENTEL, J.C.M. et al. Avaliação do valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar amonizado com uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.5, p.928-935, 1999.
- CARDOSO, G.C. Desempenho de novilhos simental alimentados com ração contendo palhada de arroz amonizada, silagem de sorgo, cana-de-açúcar e uréia. 2000. 50p. **Tese (Mestrado em Zootecnia)** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; VELOSO, C.M. et al. Valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar amonizado com quatro doses de uréia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.1, p.125-132, 2006.
- CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; GARCIA, R.; SILVA, R.R. et al. Degradabilidade *in situ* da matéria seca e da fração fibrosa do bagaço de cana-de-açúcar tratado com uréia. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.3, p.447-455, 2007.
- CASTRO, L.B.B.N.; OLIVEIRA, L.A.; MOREIRA, R.F. et al. [2008]. Bagaço da cana-de-açúcar para alimentação de ruminantes. **PUBVET**, Londrina, v.2, n.30, 5 Jul, 2008. Disponível em: < http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=432 > Acesso em: 01/06/2009.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – **CONAB** (2011). Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>> Acesso em: 16/06/2011.

- COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.17, p.259-289, 1993.
- COUGHLAN, M.P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.3. p.39-109, 1985.
- DELGADO, A.A. Tecnologia dos produtos agropecuários: Tecnologia do açúcar e das fermentações industriais. Piracicaba: **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, 1975, p.209.
- DHIMAN, T.R.; ZAMAN, M.S.; GIMENEZ, R.R. et al. Performance of dairy cows fed forage treated with fibrolytic enzymes prior to feeding. **Animal Feed Science and Technology**, v.101, p.115-125, 2002.
- DIAS-DA-SILVA, A.A.D.; GUEDES, C.V.M. Variability in the nutritive value of cultivars of wheat, rye and triticale and response to urea treatment. **Animal Feed Science and Technology**, v.28, n.1, p.79-89, 1990.
- DOLBERG, F. Progressos na utilização de resíduos de culturas tratadas com uréia-amônia. In: Simpósio Internacional em Ruminantes. Lavras, 1992. **Anais...** Lavras, 1992. p.322-337.
- EVANGELISTA, A.R. Aproveitamento de resíduos da fabricação da aguardente. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). Produção de aguardente de cana-de-açúcar. **Lavras: UFLA**, p.128-151, 2001.
- FAHMY, S.T.M.; KLOPFENSTEIN, T.J. Treatment with different chemicals and their effects on the digestibility of maize stalks. 2. Intake and *in vivo* digestibility as affected by chemical treatment and monensin supplementation. **Animal Feed Science and Technology**, v.45, n.34, p.309-316, 1994.
- FARIA, M.M.; SANTANA, F.; JAEGER, S.M.P.L. et al. Composição bromatológica do co-produto do desfibramento do sisal tratado com uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.3, p.377-382, 2008.
- FENG, P.; HUNT, C.W.; PRITCHRD, G.T. et al. Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vivo* additives degradation and *in vivo* digestives characteristics of mature cool-season grass in beef steers. **Journal of Animal Science**, v.74, p.1349-1357, 1996.
- FERNANDES, L.O.; REIS, R.A.; RODRIGUES, L.R.A. Quality of ammoniated *Brachiaria decumbens* hay. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS 21, São Pedro, SP, 2001, **Proceedings...** p.779-780.

- FERREIRA, M.A.; SILVA, R.R.; RAMOS, A.O. et al. Síntese de proteína microbiana e concentrações de uréia em vacas alimentadas com dietas à base de palma forrageira e diferentes volumosos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.1, p.159-165, 2009.
- GARCIA, I.F.F.; PEREZ, J.R.O.; TEIXIERA, J.C. et al. Desempenho de cordeiros Texel x Bergamácia, Texel x Santa Inês e Santa Inês Puros, terminados em confinamento, alimentados com casca de café como parte da dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.564-72, 2000.
- GARCIA, R.; NEIVA, J.N.M. Utilização da amonização na melhoria da qualidade de volumosos para ruminantes. In: Simpósio Nordeste de Alimentação de Ruminantes, 5, 1994. **Anais...** Salvador: Sociedade Nordestina de Produção Animal, p.41-61, 1994.
- GARCIA, R.; PIRES, A.J.V. Tratamento de volumosos de baixa qualidade para utilização na alimentação de ruminantes. In: Congresso Nacional dos Estudantes de Zootecnia, Viçosa, 1998. **Anais...** Viçosa: AMEZ, p.33-60, 1998.
- GESUALDI, A.C.L.S.; SILVA, J.F.C.; VASQUEZ, H.M. et al. Efeito da amonização sobre a composição, a retenção de nitrogênio e a conservação do bagaço e da ponta de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.508-517, 2001.
- GOBBI, K.F.; GARCIA, R.; GARCEZ NETO, A.F. et al. Composição química e digestibilidade *in vitro* do feno de *Brachiaria decumbens* Stapf. tratado com uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.720-725, 2005.
- GOMES, J.A.F.; LEITE, E.R.; CAVALCANTE, A.C.R. et al. Resíduo agroindustrial da carnaúba como fonte de volumoso para terminação de ovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.1, p.58-67, 2009.
- GOTO, M.; YOKOE, Y.; TAKABE, K. et al. Effects of gaseous ammonia on chemical and structural features of cell walls in spring barley straw. **Animal Feed Science and Technology**, v.40, p.207-221, 1993.
- GROTHER, M.D.; CROSS, D.L.; GRIMES, L.W. Effect of ammonia level and time of exposure to ammonia on nutritional and preservatory characteristics of dry and high moisture coastal Bermuda grass hay. **Animal Feed Science and Technology**, v.14, p.55-65, 1986.
- HENNING, J.C.; DOUGHERTY, C.T.; O'LEARY, J. et al. Urea for preservation of moist hay. **Journal of Feed Science and Technology**, v.31, n.3, p.193-204, 1990.
- HRISTOV, A.N.; McALLISTER, T.A.; CHENG, K.J. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle feed barley grain diets. **Journal of Animal Science**, v.78, p.477-487, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-**IBGE** (2006). Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/tabela1_1.pdf> Acesso em: 16/06/2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-**IBGE** (2011). Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201108_5.shtm> Acesso em: 16/06/2011.

JOY, M.; ALIBÉS, X.; MUÑOZ, F. Chemical treatment of lignocellulosic residues with urea. **Animal Feed Science and Technology**, v.38, n.3-4, p.319-333, 1992.

KLOPFENSTEIN, T.J. Chemical treatment of crops residues. **Journal of Animal Science**, v.46, p.841-848, 1978.

KNAPP, W.R.; HOLT, D.A.; LECHTENBERG, V.L. Hay preservation and quality improvement by anhydrous ammonia treatment. **Agronomy Journal**, v.67, p.766-769, 1975.

KNOWLTON, K.F.; MCKINNEY, J.M.; COBB, C. Effect of a direct-fed fibrolytic enzyme formulation on nutrient intake, partitioning, and excretion in early and late lactation Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.3328-3335, 2002.

KUNG JR., L.; COHEN, M.A.; RODE, L.M. et al. The effect of fibrolytic enzymes sprayed onto forages and fed in a total mixed ratio to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2396-2402, 2002.

LINES, L.W.; KOCH, M.E.; WEISS, W.P. Effect of ammoniation on the chemical composition of alfalfa hay baled with varying concentrations of moisture. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.11, p.2000-2004, 1996.

LOURES, D.R.S. Enzimas fibrolíticas e emurchecimento no controle de perdas da ensilagem e na digestão de nutrientes em bovinos alimentados com rações contendo silagem de capim Tanzânia. 2004. 146p. **Tese (Doutorado em Agronomia)** - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

LOURES, D.R.S.; NUSSIO, L.G.; PAZIANI, S.F. et al. Efeito de enzimas fibrolíticas e do teor de matéria seca em silagens de capim-tanzânia sobre os parâmetros ruminiais, o comportamento ingestivo e a digestão de nutrientes, em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.736-745, 2005.

MARTINS, A.S.; VIEIRA, P.F.; BERCHIELLI, T.T. et al. Degradabilidade *in situ* e observações microscópicas de volumosos em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1927-1936, 2007.

- McALLISTER, T.A.; HRISTOV, A.N.; BEAUCHEMIN, K.A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M, R.; PARTRIDGE, G.G. **Enzymes in farm animal nutrition**. Oxon: Cab International, 2001. cap.11, p.273-298.
- MICHAL, J.J.; JOHNSON, K.A.; TREACHER, R.J. et al. The impact of direct-fed fibrolytic enzymes on the growth rate and feed efficiency of growing beef steers and heifers. **Journal of Animal Science**, v.74, supl.1, p.296, Abst. 757, 1996.
- PAIVA, J.A.J.; GARCIA, R.; QUEIROZ, A.C. et al. Efeito dos níveis de amônia anidra e períodos de amonização sobre a degradabilidade da matéria seca e de constituintes da parede celular da palhada de milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.24, n.5, p.693-705, 1995.
- PEREIRA, J.R.A.; EZEQUIEL, J.M.B.; REIS, R.A. et al. Efeitos da amonização sobre o valor nutritivo do feno de capim braquiária. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.28, p.1451-1455, 1993.
- PIETROBON, V.C. Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais. 2008. 67p. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)** – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- PIRES, A.J.V. Bagaço de cana-de-açúcar tratado com amônia anidra e, ou, sulfeto de sódio para novilhas em crescimento. 2000. 65p. **Tese (Doutorado em Zootecnia)** - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- PIRES, A.J.V.; CARVALHO, G.G.P.; RIBEIRO, L.S.O. Chemical treatment of roughage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.192-203, 2010 (supl. especial).
- PIRES, A.J.V.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Novilhas alimentadas com bagaço de cana-de-açúcar tratado com amônia anidra e, ou, sulfeto de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1078-1085, 2004a.
- PIRES, A.J.V.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Degradabilidade do bagaço de cana-de-açúcar tratado com amônia anidra e, ou, sulfeto de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1071-1077, 2004b.
- PIRES, A.J.V.; REIS, R.A.; CARVALHO, G.G.P. et al. Bagaço de cana-de-açúcar tratado com hidróxido de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.953-957, 2006 (supl.).
- RABELO, M.M.A.; PIRES, A.V.; SUSIN, I. et al. Digestibilidade dos nutrientes e parâmetros ruminais de bovinos de corte alimentados com rações contendo bagaço de cana-de-açúcar obtido pelo método de extração por difusão ou por moagem convencional. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.9, p.1696-1703, 2008a.

- RABELO, M.M.A.; PIRES, A.V.; SUSIN, I. et al. Avaliação do efeito do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* obtido por dois métodos sobre o desempenho e o comportamento ingestivo de bovinos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária de Zootecnia**, v.60, n.3, p.698-704, 2008b.
- REIS, R.A.; ANDRADE, P.; RODRIGUES, L.R.A. Palha de arroz e feno de *Brachiaria brizantha* amonizados e suplementados com energia ou proteína na alimentação de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.24, p.832-840, 1995.
- REIS, R.A.; RODRIGUES, L.R.A.; PEREIRA, J.R.A. et al. Composição química e digestibilidade de fenos tratados com amônia anidra ou uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.666-673, 2001a.
- REIS, R.A.; RODRIGUES, L.R.A.; RESENDE, K.T. et al. Avaliação de fontes de amônia para o tratamento de feno de gramíneas tropicais. 2. Compostos nitrogenados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.682-686, 2001b.
- REIS, R.A.; BERCHIELLI, T.T.; ANDRADE, P. et al. Valor nutritivo do feno de capim coast-cross (*Cynodon dactylon* L. Pers) submetido à amonização. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, SP, v.19, n.2, p.143-149, 2003.
- RIBEIRO, T.P.; COSTA, J.B.; SILVA, V.L. et al. Digestibilidade dos constituintes fibrosos de dietas contendo o co-produto de caju amonizado ou não com uréia. **Revista da FZVA**, v.16, n.2, p.160-172, 2009.
- ROCHA, F.C.; GARCIA, R.; FREITAS, A.W.P. et al. Amonização sobre a composição química e digestibilidade da silagem de capim-elefante. **Revista Ceres**, v.53, n.306, p.228-233, 2006.
- ROSA, B.; REIS, R.A.; RESENDE, K.T. et al. Valor nutritivo do feno de *Brachiaria decumbens* Stapf. Cv basilisk submetido a tratamento com amônia anidra ou uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.4, p.815-822, 1998.
- ROSA, B.; SOUZA, H.; RODRIGUES, K.F. Composição química do feno de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu tratado com diferentes proporções de uréia e de água. **Ciência Animal Brasileira**, v.1, n.2, p.107-113, 2000.
- SANTOS, J.; CASTRO, A.L.A.; PAIVA, P.C.A. et al. Efeito dos tratamentos físicos e químicos no resíduo de lixadeira do algodão. **Ciência e agrotecnologia**, v.28, n.4, p.919-923, 2004.
- SARMENTO, P.; GARCIA, R.; PIRES, A.J.V.; et al. Tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.6, p.1203-1208, 1999.

- SARMENTO, P.; GARCIA, R.; PIRES, A.J.V. et al. Grãos de soja como fonte de urease na amonização do bagaço de cana-de-açúcar com uréia. **Scientia Agricola**, v.58, n.2, p.223-227, 2001.
- SCHINGOETHE, D.J.; STEGEMAN, G.A.; TREACHER, R.J. Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at time of feeding. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.5, p.996-1003, 1999.
- SCHNEIDER, M.; FLACHOWSKY, G. Studies on ammonia treatment of wheat straw effects on level of ammonia, moisture content, treatment time and temperature on straw composition and degradation in the rumen of sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v.29, n.34, p.252-264, 1990.
- SCIENCE IN SCHOOL** (2011). Disponível em:
<<http://www.scienceinschool.org/print/957>> Acesso em 19 de junho de 2011.
- SILANIKOVE, N.; COHEN, O.; LEVANOND, D. et al. Preservation and storage of green-panic (*Panicum maximum*) as moist hay with urea. **Animal Feed Science and Technology**, v.20, n.2, p.87-96, 1988.
- SOUZA, A.L.; GARCIA, R. PERREIRA, O.G. et al. Composição químico-bromatológica da casca de café tratada com amônia anidra e sulfeto de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.983-991, 2001(supl.1).
- SOUZA, O.; SANTOS, I.E. [2005]. Aproveitamento de co-produtos e co-produtos agropecuários pelos ruminantes – **Artigos Técnicos da EMBRAPA Tabuleiros Costeiros**, 2005. Disponível em:
<<http://www.cpatc.embrapa.br/index.php?idpagina=artigos&artigo=914>> Acesso em: 18/10/2010.
- SUNDSTOL, F.; COXWORTH, E.M.; MOWAT, D.N. Mejora del valor nutritivo de la paja mediante tratamiento con amoníaco. **Revista Mundial de Zootecnia**, v.26, n.1, p.13-21, 1978.
- SUNDSTOL, F., COXWORTH, E.M. Ammonia treatment. In: SUNDSTOL, F., OWEN, E. (Eds.) Straw and others fibrous by-products as feed. **Elsevier Press**, p.196-247, 1984.
- SUPERINTENDÊNCIA DE ESTUDOS ECONÔMICOS E SOCIAIS DA BAHIA-SEI** (2011). Disponível em:
<http://www.sei.ba.gov.br/images/indicadores_especiais/pdf/previsao_da_safra_baiana.pdf>
Acesso em: 16/06/2011.
- SUTTON, J.D.; PHIPPS, R.H.; BEEVER, D.E. et al. Effect of method of application of a fibrolytic enzyme product on digestive process and milk production in Holstein-Friesian cows. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.546-556, 2003.

- TANG, S.X.; TAYO, G.O.; TAN, Z.L. et al. Effects of yeast culture and fibrolytic enzymes supplementation on *in vitro* fermentation characteristics of low-quality cereal straws. **Journal of Animal Science**, v.86, p.1164-1172, 2008.
- TARKOW, H.; FEIST, W.C. Mechanism for improving the digestibility of lignocelulosic materials with dilute alkali and liquid ammonia. **Advances in Chemistry**, v.95, p.197-218, 1969.
- URIAS, A.R.; DELFINO, F.J.; SWINGLE, R.S. Crude protein content and *in vitro* digestibility of wheat straw ammoniated under high environmental temperatures. **Journal of Animal Science**, v.59, p.290-291, 1984.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, 1994, p.476.
- VAN SOEST, P.J.; FOX, D. G. Discounts for net energy and protein - fifth revision. In: Cornell Nutritional Conference, 1992. **Proceeding...** Ithaca: University of Cornell, p.40-68, 1992.
- WALLACE, R.J.; HARTNELL, G.F. Technical note: methods for detecting liquid enzyme additives added to animal feeds. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.2731-2735, 2001.
- WANG, Y.; SPRATLING, B.M.; ZOBELL, D.R. et al. Effect of alkali pretreatment of wheat straw on the efficacy of exogenous fibrolytic enzymes. **Journal of Animal Science**, v.82, p.198-208, 2004.
- WILLIS, C.M.; STALLCUP, O.T.; KREIDER, D.L. Influence of sodium hydroxide and enzyme additions on nutritive values of rice straw. **Journal of Animal Science**, v.50, p.303-308, 1980.
- YANG, W.Z.; BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.391-403, 1999.
- YANG, W.Z.; BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M. Comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.2512-2520, 2000.
- ZANINE, A.M.; SANTOS, E.M.; FERREIRA, D.J. et al. Efeito de níveis de uréia sobre o valor nutricional do feno de capim-Tanzânia. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina. v.28, n.2, p.333-340, 2007.

CAPÍTULO 2

Valor nutricional e estabilidade aeróbia do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

RESUMO - Objetivou-se determinar a composição químico-bromatológica do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas. Utilizou-se esquema fatorial 2x3, sendo duas doses de uréia (0 e 7%) e três doses de enzimas (0; 0,5 e 1%), com base na matéria seca, com 3 repetições. O material foi armazenado por 35 dias em sacos de polietileno com dimensões de 0,50 x 0,70 m (4,5 kg de MN/saco). Foram determinados os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose (CEL), hemicelulose (HEM), lignina (LIG), extrato etéreo (EE), cinzas, cinza insolúvel em detergente neutro (CIDN), cinza insolúvel em detergente ácido (CIDA), pH, nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN/NT), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA/NT), digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (DVIVMS) e feita contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Ao se avaliar o teor de MS, EE, NIDN/NT, NIDA/NT e DVIVMS verificou-se interação ($P < 0,05$) entre uréia e enzimas fibrolíticas. Para o bagaço sem adição de uréia, a adição de enzimas alterou o conteúdo de NIDN/NT, NIDA/NT e não alterou de MS, EE e DVIVMS em relação ao bagaço sem enzimas. Entretanto, para o bagaço com 7% de uréia, verificou-se que a aplicação de 0,5 e 1% de enzimas proporcionou DVIVMS superiores ao bagaço sem enzimas. Ao se avaliar a aplicação de uréia dentro das doses de enzimas 0 e 0,5%, verificaram-se maiores valores de DVIVMS para o bagaço sem uréia. Porém, para o bagaço com 1% de enzimas, a aplicação de uréia não promoveu alteração na DVIVMS. Não foi verificada interação ($P > 0,05$) entre uréia e enzimas fibrolíticas para o conteúdo de PB, FDN, FDA, HEM, CEL, LIG, CIDN, CIDA e pH. O uso de enzimas fibrolíticas não alterou ($P > 0,05$) a composição químico-bromatológica, porém verificou-se efeito ($P < 0,05$) da uréia para PB, cinzas, FDN, FDA, HEM e CEL. Ao se avaliar o número de UFC/g do material no momento da abertura dos sacos, verificou-se maior contagem de UFC/g no material com uréia. Nas semanas 1, 2, 3 e 4, o material sem uréia apresentou maior contagem de UFC/g ($P < 0,05$) em relação aos que tinham uréia. O uso de enzimas fibrolíticas não afeta a composição química do bagaço da cana-de-açúcar. A aplicação de uréia promove aumentos nos teores de PB e não reduz os constituintes da parede celular.

Palavras-chave: amonização, celulase, hemicelulase, nutrição animal, resíduo

Nutritional value and aerobic stability of sugarcane bagasse with urea and exogenous fibrolytic enzymes

ABSTRACT - This work aimed to determine the chemical-bromatological composition of sugarcane bagasse with urea and exogenous fibrolytic enzymes. A 2x3 factorial arrangement, with two doses of urea (0 and 7%) and three doses of enzymes (0, 0.5 and 1%), based on dry matter, with 3 replications, was used. The material was stored for 35 days in polyethylene bags with dimensions of 0.50 x 0.70 m (4.5 kg NM/bag). The levels of dry matter (DM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), cellulose (CEL), hemicellulose (HEM), lignin (LIG), ether extract (EE), ash, ash insoluble in neutral detergent (AIND), ash insoluble in acid detergent (AIAD), pH, nitrogen insoluble in neutral detergent (NIND), nitrogen insoluble in acid detergent (NIAD), *in vitro* true digestibility of dry matter (IVTDDM) and colony forming units (CFU) were analysed. When evaluating the content of DM, EE, NDIN/TN, ADIN/TN and IVTDMD, there was interaction ($P<0.05$) between urea and fibrolytic enzymes. For bagasse without the addition of urea, the inclusion of enzymes altered the contents of NDIN/TN and ADIN/TN, but the DM, EE and IVTDMD did not change in relation to bagasse without enzymes. However, for the bagasse with 7% of urea, it was found that the application of 0.5 and 1% of enzymes gave higher values of IVTDMD to bagasse without enzymes. When evaluating the application of urea within of the doses of enzymes of 0 and 0.5%, there were higher values of IVTDMD for the bagasse without urea. But, for the bagasse with 1% of enzymes, application of urea did not promote change in IVTDMD. There was no interaction ($P>0.05$) between urea and fibrolytic enzymes for the content of CP, NDF, ADF, HEM, CEL, LIG, NDIA, ADIA and pH. The use of fibrolytic enzymes did not change ($P>0.05$) the chemical-bromatological composition, but there was effect ($P<0.05$) of urea for CP, ash, NDF, ADF, HEM and CEL. When evaluating the number of CFU/g of material at the moment opening of the bags, there was a higher number of CFU/g in the material with urea. In weeks 1, 2, 3 and 4, the material without urea a higher number of CFU/g ($P<0.05$) than those of urea were shown. The use of fibrolytic enzymes does not affect the chemical composition of sugarcane bagasse. The application of urea promotes increases in levels of CP and does not reduce its cell wall constituents.

Key Words: ammoniation, animal nutrition, cellulase, hemicellulase, residue

INTRODUÇÃO

Na produção de açúcar, álcool e cachaça são gerados resíduos, entre eles o bagaço de cana-de-açúcar, o qual tem sido objeto de grande interesse como fonte de alimento para os ruminantes. Além disso, o período onde se concentra a produção de açúcar, álcool e cachaça, coincide com o período de escassez de forragens, já que este é o período mais frio e seco do ano.

O bagaço é o produto resultante da extração do caldo de cana-de-açúcar e é caracterizado como um alimento que apresenta limitações na composição bromatológica para uso como fonte de nutrientes (Pires et al., 2004). No entanto, o valor nutritivo de diferentes volumosos pode ser melhorado com a utilização de tratamentos químicos (Andrade et al., 2001; Reis et al., 2001), dentre os quais, a amonização com amônia anidra ou uréia tem sido o mais empregado (Souza et al., 2002).

Pesquisas mostram que o tratamento químico do bagaço da cana, por meio da uréia, promove aumento nos teores de PB e propicia melhoria na qualidade da fibra, devido à solubilização parcial da hemicelulose, com conseqüente melhoria no seu aproveitamento (Pires et al., 2004). Além disso, atua como fungistático na conservação do material amonizado.

Para tratar volumosos de baixa qualidade e melhorar seu valor nutritivo recomenda-se utilizar a uréia nas doses de 4 a 8% na base seca (Dolberg, 1992; Garcia & Neiva, 1994; Gobbi et al., 2005).

Recentemente, enzimas fibrolíticas exógenas têm sido avaliadas quanto ao seu potencial para melhorar a utilização dos alimentos para ruminantes (Wang & McAllister, 2002a). A aplicação de enzimas exógenas diretamente no alimento promove a liberação de açúcares redutores (Hristov et al., 1996) e, em alguns casos, solubilização parcial da fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) (Krause et al., 1998). Assim, Tang et al. (2008) relataram que os níveis de enzimas fibrolíticas (celulase e xilanase) de 5,0 e 7,5 g/kg MS proporcionaram os maiores valores de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) em palhadas de cereais.

Pesquisadores têm sugerido que ligações esterificadas entre celulose, hemicelulose e lignina restringem a digestão de palhadas de cereais pelos microrganismos ruminais (Waghorn & McNabb, 2003). Tratamentos alcalinos, tais como hidróxido de sódio ou amônia, são eficazes para clivar ligações ésteres da parede celular das plantas, aumentando a

sacarificação enzimática durante a fermentação (Gould, 1984) e melhorando a digestão ruminal de palhadas de cereais (Sundstol, 1988).

Face o exposto, objetivou-se avaliar o efeito da combinação de uréia e enzimas fibrolíticas exógenas (celulases e hemicelulases) na composição químico-bromatológica e digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal e no Laboratório de Controle de Água da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, no Campus de Vitória da Conquista, BA, no período de 30 de junho a 04 de agosto de 2010, com temperatura média de 17,3 °C, apresentando média para máxima e mínima de 22,19 e 14,12 °C, respectivamente, durante o período experimental.

Realizou-se delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3, sendo duas doses de uréia (0 e 7%) e três doses de enzimas (0; 0,5 e 1%) com base na matéria seca, com 3 repetições (U0E0: testemunha; U0E05: 0% de uréia + 0,5% de enzimas; U0E1: 0% de uréia + 1% de enzimas; U7E0: 7% de uréia + 0% de enzimas; U7E05: 7% de uréia + 0,5% de enzimas e U7E1: 7% de uréia + 1% de enzimas).

As enzimas fibrolíticas exógenas utilizadas, foram extraídas dos fungos *Aspergillus aculeatus* e *Humicola insolens*. O produto¹ constituiu de celulases e hemicelulases, na forma líquida, de coloração marrom, com densidade de 1,2 g/mL, tendo como condições ótimas para atividade enzimática da celulase 45-50 °C e pH 4,5-6,5, e da hemicelulase 40-60 °C e pH 5,0-6,5. Esta última, além da hemicelulase, contém outras enzimas, incluindo β -glucanases, xilanases, arabinases, celulases e pentosanases.

Para a avaliação da atividade das enzimas celulases e hemicelulases, utilizou-se a metodologia descrita por Yoshioka et al. (1981) e Miller (1959). Para o preparo do meio, foram homogeneizados 10 g de farelo de trigo, 10 mL de água destilada e esterilizados. O preparo das enzimas foi feito com 9,95 mL de água destilada e 50 μ L de enzima, sendo utilizados 2 mL desta solução. Foi feito controle positivo com solução de glicose a 0,5% em água destilada e outro, constituído apenas por farelo de trigo. Após período de incubação de

¹ Novozymes Latin America Ltda: celulase (NS 50013) e hemicelulase (NS 22022).

48 h, os extratos (triplicatas) foram obtidos por filtração com bomba a vácuo e as leituras das respectivas absorvâncias, determinadas em espectrofotômetro, modelo Cintra 20, da GBC em λ de 540 nm. A quantificação dos açúcares redutores dos extratos recuperados, que representam as atividades das enzimas, foram de 51 e 28 mg/mL para celulases e hemicelulases, respectivamente, mostrando a efetividade das enzimas.

O bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) utilizado, foi adquirido em usina de produção artesanal de cachaça da região de Vitória da Conquista-BA e, após o descarregamento, foi picado em máquina forrageira estacionária. Antes da adição de enzimas fibrolíticas exógenas e da uréia ao bagaço, foram retiradas amostras para determinação da composição químico-bromatológica (Silva & Queiroz, 2005; Nunes et al., 2005), carboidratos não-fibrosos (CNF) (Sniffen et al., 1992) e digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (ANKOM TECHNOLOGY, 2010) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição químico-bromatológica e digestibilidade verdadeira *in vitro* do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*

Componente	Composição (%)
Matéria seca (%)	40,14
Proteína bruta (%MS)	1,21
Fibra em detergente neutro (%MS)	66,58
FDNcp (%MS)	66,1
Fibra em detergente ácido (%MS)	46,36
Hemicelulose (%MS)	23,51
Celulose (%MS)	35,65
Lignina (%MS)	9,47
Extrato etéreo (%MS)	1,44
Cinzas (%MS)	1,02
NIDA (%MS)	0,06
NIDN (%MS)	0,08
NIDA (%NT)	28,86
NIDN (%NT)	40,66
pH	5,50
CNF	30,23
DVIVMS (%)	55,09

FDNcp: fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; NIDA: nitrogênio insolúvel em detergente ácido; NIDN: nitrogênio insolúvel em detergente neutro; CT: carboidratos totais; CNF: carboidratos não-fibrosos; DVIVMS: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca.

No bagaço de cana (4,5 kg de MN por unidade experimental) sem adição de uréia, apenas enzimas (U0E05 e U0E1), após mensurar o pH e sem necessitar ajustá-los, as quantidades de 7,5 mL e 15 mL de enzimas, que correspondem a 0,5% e 1% de enzimas na base seca, foram diluídas em 100 mL de água destilada, na proporção de 60% de celulase e

40% de hemicelulase, sendo borrifadas no bagaço, deixando-as agir por 30 min (Kung Jr. et al., 2002). Em seguida, foram coletadas amostras de cada unidade experimental, acondicionadas em sacos plásticos identificados e armazenadas sob refrigeração para posteriores análises. O restante do material foi vedado com fitas adesivas em sacos de polietileno com dimensões de 0,50 x 0,70 m e armazenados em local protegido e cobertos com lona plástica durante o mesmo período do bagaço de cana com uréia.

No bagaço de cana com inclusão de uréia usou-se a quantidade de 7% de uréia (base MS), onde foi misturada ao bagaço (4,5 kg de MN por unidade experimental), homogeneizadas e acondicionadas em sacos de polietileno com dimensões de 0,50 x 0,70 m. Após o enchimento, todos os sacos foram vedados com fitas adesivas e armazenados em local protegido e cobertos com uma lona plástica durante o período de 35 dias, como recomendado por Sundstol et al. (1978).

Ao final do período de amonização, os sacos foram abertos e aerados por 6 h para permitir a liberação do excesso de amônia. Após aeração foram retiradas amostras para análise de pH e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Para a contagem de UFC/g, utilizou-se a metodologia descrita por Silva et al. (1997). Foram utilizados 25 g do material, os quais foram diluídos em 225 mL de água peptonada. Da diluição inicial foi retirado 1 mL, em seguida foram efetuadas as diluições para contagem de fungos e leveduras. Utilizou-se o meio de cultura Batata Dextrose Ágar. As placas ficaram incubadas em estufa apropriada por um período de cinco dias, sendo então contadas as UFC. Devido à amplitude dos dados, contados em número de UFC/mL, os valores foram convertidos para seus respectivos logaritmos naturais.

Apenas no bagaço de cana com 7% de uréia e 1% de enzimas, devido à elevação do pH (6,90) após a amonização, foi necessário ajustar o pH para 5,0, utilizando 75 mL de ácido sulfúrico 1,0N borrifado. Logo após foi aplicada a dose proposta de enzimas, da mesma forma do bagaço de cana com 0% de uréia e 0,5% de enzimas e 0% de uréia e 1% de enzimas, deixando-as agir por 30 min. Em seguida foram coletadas amostras, acondicionadas em sacos plásticos identificados e armazenadas sob refrigeração para posteriores análises.

Ao final do tempo de amonização (35 dias), foram coletadas amostras em 7, 14, 21 e 28 dias após abertura dos sacos, representados pelas semanas 1, 2, 3 e 4, respectivamente, com o objetivo de avaliar a estabilidade aeróbia do material conservado.

A digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (DVIVMS) foi realizada em todos os bagaços de cana. Porém, nos bagaços de cana com 7% de uréia e 0% de enzimas, 7% de

uréia e 0,5% de enzimas, e 7% de uréia e 1% de enzimas, foi analisada também a DVIVMS nas semanas 0, 1, 2 e 3 após abertura dos sacos.

Para a realização das análises químico-bromatológicas, as amostras coletadas em cada combinação de uréia e enzimas foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 65 °C, por 72 h, sendo posteriormente processadas em moinho tipo “Willey” com peneira de crivos de 1 mm. Os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), cinzas (MM) e lignina (LIG), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), cinza insolúvel em detergente neutro (CIDN) e cinza insolúvel em detergente ácido (CIDA) foram determinados de acordo com os procedimentos descritos por Silva & Queiroz (2005). A determinação da fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram realizadas sequencialmente segundo Nunes et al. (2005), utilizando-se sacolas confeccionadas com TNT (Tecido Não Tecido) nº 100, no aparelho de fibra TE-149 (TECNAL).

Para avaliar a DVIVMS, o material foi incubado utilizando os sacos de filtro ANKOM F57, adaptada para o rúmen artificial TE-150 (TECNAL) durante 48 h. A solução tampão foi preparada em recipientes pré-aquecidos (39 °C). A solução A (g/litro) composta por: 10,0 g KH_2PO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g NaCl; 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 g uréia; e a solução B (g/100mL): 15,0 g Na_2CO_3 ; 1,0 g $\text{Na}_2\text{S}_9\text{H}_2\text{O}$. As soluções foram misturadas adicionando-se cerca de 266 mL de solução B para 1330 mL de solução A (relação 1:5), a um pH final de 6,8 e temperatura de 39 °C. Adicionaram-se cerca de 1600 mL de mistura combinada de A/B para cada jarro, em seguida 400 mL de líquido ruminal foram adicionados em cada jarro de vidro do rúmen artificial contendo os sacos de filtro ANKOM F57. Após o período de incubação, foi realizada a digestão em detergente neutro (FDN) como recomendado pela ANKOM (ANKOM TECHNOLOGY, 2010).

Os dados obtidos foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância, realizada dentro de um esquema fatorial, sendo as médias e interações comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Nos resultados de contagem de UFC/g foi feita ANOVA, onde foram realizadas análises de regressão para o fator semanas; e para o fator tratamento, as médias foram comparadas pelo teste t a 5% de probabilidade. Para condução das análises estatísticas, foi utilizado o programa SAS (SAS, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No momento da abertura dos sacos, observaram-se colorações esverdeadas escuras e odor amoniacal nos bagaços que receberam uréia, enquanto os bagaços só com enzimas fibrolíticas permaneceram com coloração própria deste volumoso/resíduo e odor alcoólico. Resultados de mudança de cor em materiais amonizados ocorrem em virtude da oxidação de grupos fenóis ou condensação da fração aldeído dos açúcares com o nitrogênio, características da reação de Maillard (Schuerch & Davidson, 1971).

Observou-se interação entre a uréia e as doses de enzimas para as variáveis MS e EE (Tabela 2). Ao se avaliar o teor de MS e EE verificou-se que para o bagaço de cana sem adição de uréia, a adição de enzimas não alterou estas variáveis. Porém, nos bagaços de cana que receberam uréia foram encontrados maiores teores ($P < 0,05$) de MS para o bagaço de cana que não recebeu enzimas, em relação ao bagaço de cana com 0,5% de enzimas fibrolíticas, porém o bagaço de cana com 1% de enzimas fibrolíticas não diferiu ($P > 0,05$) dos demais. Para EE, dentro dos bagaços de cana que receberam uréia, foram encontrados maiores teores ($P < 0,05$) para o bagaço que não recebeu enzimas em relação aos que receberam enzimas e os que receberam enzimas não diferiram ($P > 0,05$) entre si. Ao se estudar o fator uréia dentro das doses de enzimas, observou-se mesmo efeito para todos os níveis, sendo encontrados maiores teores de MS e menores de EE para o bagaço sem uréia, em comparação à aplicação de 7%, exceto nos bagaços de cana com 1% de enzimas, os quais não diferiram ($P > 0,05$) entre si.

Tabela 2. Matéria seca e extrato etéreo do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Enzima (%)	Uréia (%)		Média
	0	7	
	Matéria seca (%)		
0	40,14Aa	36,08Ab	38,11
0,5	38,77Aa	33,71Bb	36,24
1	39,16Aa	35,93ABb	37,55
Média	39,35	35,24	
			CV (%) = 1,49
	Extrato etéreo (%MS)		
0	1,44Ab	3,14Aa	2,29
0,5	1,75Ab	3,03Aa	2,39
1	1,68Aa	1,75Ba	1,72
Média	1,63	2,64	
			CV (%) = 18,08

Médias seguidas de mesma letra maiúscula/minúscula em mesma coluna/linha não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Cysneiros et al. (2006) verificaram que os teores de MS da silagem de capins brachiaria e tanzânia não foram afetadas com o uso de enzimas fibrolíticas (celulase e xilanase). Essa redução de MS no material amonizado pode ser explicada pelo elevado poder higroscópico da uréia e da amônia, fazendo com que o material absorva umidade do ambiente (Cândido et al., 1999). Resultados semelhantes foram encontrados por Cândido et al. (1999) e Gesualdi et al. (2001), em bagaço de cana-de-açúcar amonizado.

Observou-se efeito significativo do uso da uréia ($P < 0,05$) para os componentes da parede celular com exceção da lignina, não havendo interação entre esta e as doses de enzimas (Tabela 3). Os constituintes da parede celular do bagaço de cana elevaram-se ($P < 0,05$) pela adição da uréia e não foram influenciados ($P > 0,05$) pela adição das enzimas fibrolíticas exógenas. Normalmente, materiais que receberam enzimas fibrolíticas exógenas (celulases e hemicelulases) e uréia, espera-se que apresentem teores mais baixos da parede celular, em função da solubilização dos seus componentes.

A não efetividade da uréia no processo de amoniólise, possivelmente, deveu-se à baixa temperatura ambiental durante o período da amonização (Mandell et al., 1988; Mann et al., 1988). A provável reduzida atividade ureática do bagaço, influenciou negativamente a reação enzimática de transformação da uréia em amônia.

Outra possibilidade, que atuando isoladamente ou em associação ao efeito negativo da temperatura, pode ter sido a disponibilização do N através da uréia, disponibilizando este nutriente para os bolores e leveduras desenvolverem-se em razão do elevado teor de CNF (30,23%) encontrado no bagaço. Este se mostrou superior aos teores de CNF de bagaços oriundos de usinas de álcool que apresentam valores médios de 17,36% (Ferreira et al., 2009), devido o método de extração do caldo da cana ser mais eficiente, quando comparado ao bagaço gerado em alambiques de produção de cachaça artesanal.

Este fator pode ter contribuído significativamente para que os microrganismos (bolores e leveduras) consumissem esses açúcares, elevando então a participação percentual da FDN, FDA, hemicelulose e celulose. Esta hipótese encontra amparo nos resultados da quantificação de bolores e leveduras, onde foi observado um maior número de UFC/g no bagaço com a uréia, no momento da abertura dos sacos, representado pela semana 0 (Tabela 7). De acordo com Alli et al. (1983), na ensilagem da cana-de-açúcar ocorre extensa atividade de leveduras, podendo estar presentes na ordem de 10^6 UFC/g de forragem, que convertem os carboidratos solúveis da forragem a etanol, CO_2 e água, resultando em perdas excessivas de MS, baixos teores de ácidos láctico e acético e aumento no teor de FDA das silagens.

Tabela 3. Componentes da parede celular do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Enzima (%)	Uréia (%)		Média
	0	7	
	Fibra em detergente neutro (%MS)		
0	66,58	73,93	70,26A
0,5	65,65	74,34	70,00A
1	66,92	72,83	69,87A
Média	66,38b	73,70a	
			CV (%) = 2,18
	Fibra em detergente ácido (%MS)		
0	46,36	52,34	49,35A
0,5	45,60	50,19	47,90A
1	45,80	50,71	48,25A
Média	45,92b	51,08a	
			CV (%) = 2,83
	Hemicelulose (%MS)		
0	23,51	25,08	24,30A
0,5	23,21	26,08	24,64A
1	23,57	24,35	23,96A
Média	23,43b	25,17a	
			CV (%) = 4,41
	Celulose (%MS)		
0	35,65	40,48	38,06A
0,5	34,96	39,46	37,21A
1	34,95	39,41	37,18A
Média	35,19b	39,78a	
			CV (%) = 4,47
	Lignina (%MS)		
0	9,47	12,14	10,81A
0,5	9,61	11,05	10,33A
1	11,30	11,16	11,23A
Média	10,13a	11,45a	
			CV (%) = 13,95

Médias seguidas de mesma letra maiúscula/minúscula em mesma coluna/linha não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Alguns dos resultados de experimentos com amonização sobre os teores das frações fibrosas também não evidenciaram modificações nas frações fibrosas dos volumosos tratados (Reis et al., 2003; Fernandes et al., 2001). Conforme Fischer et al. (1985), na amonização, resultados deste tipo são passíveis de ocorrer e foram observados mais frequentemente em relação à fração de FDA e seus componentes (celulose e lignina); e segundo Sundstol & Coxworth (1984) pode ocorrer com outros componentes da parede celular.

De fato, Gomes et al. (2009) ao amonizar o resíduo agroindustrial da carnaúba (*Copernicia prunifera*) conhecido como bagana, utilizando uréia nas doses de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10% (MS) e grão de soja tostado como fonte de urease nas doses de 0 e 20% (MS), registraram aumento nos teores de FDN de 72,3; 79,0; 81,6; 79,4 e 78,9% na MS (sem urease) e de 71,3; 80,3; 80,4; 79,8 e 78,7% na MS (com urease) para as respectivas doses de uréia. Porém, diminuições da FDN foram verificadas em trabalhos com amonização de materiais fibrosos (Reis et al., 2003; Gobbi et al., 2005; Carvalho et al., 2006).

Trabalhando com enzimas fibrolíticas exógenas, Wang et al. (2004) pulverizaram xylanase e β -glucanase nas doses de 0 e 1,5 mg/g de MS deixando-as agir por 24 horas na palha de trigo pré-tratada com 5% de NaOH (base MS), estes autores não observaram decréscimo nos teores de FDN deste volumoso.

Yang et al. (2000) observaram que a pulverização de enzimas fibrolíticas sobre a mistura total da ração não foi efetiva, e Beauchemin et al. (1995) também não verificaram efetividade aplicando enzimas sobre as silagens, ambos concordando com os resultados aqui encontrados.

Resultados diferentes ao deste trabalho foram encontrados por Krause et al. (1998), onde verificaram que a adição de enzimas fibrolíticas à dieta alterou a composição química do volumoso, reduzindo os teores de FDN e FDA quando o produto utilizado foi diluído em água e aplicado ao alimento um dia antes do fornecimento aos animais.

Observou-se efeito significativo do uso da uréia ($P < 0,05$) para PB e cinzas, com exceção das variáveis CIDN e CIDA, havendo interação ($P < 0,05$) entre esta e as doses de enzimas para NIDN/NT e NIDA/NT (Tabela 4).

Independente do uso de enzimas fibrolíticas observou-se aumento do teor de PB ($P < 0,05$) ao se aplicar uréia, que está ligado à retenção de nitrogênio, e esta, à atividade ureolítica responsável pela transformação da uréia em amônia. A retenção do N aplicado pode ser aumentada, quando se trata de volumosos com maior conteúdo de água, devido à formação de NH_4OH (Joy et al., 1992). Assim, o N dosado refere-se ao efetivamente retido na

fração fibrosa, ou aquele que reagiu com a água contida na forragem. Incrementos nos teores de PB com uso de uréia, também, foram encontrados por Carvalho et al. (2006) ao trabalharem com bagaço de cana-de-açúcar, Fadel et al. (2003) com palha de arroz, e Gobbi et al. (2005) com feno de brachiaria.

Tabela 4. Compostos nitrogenados e minerais do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Enzima (%)	Uréia (%)		Média
	0	7	
	PB (%MS)		
0	1,21	18,94	10,08A
0,5	1,21	20,48	10,85A
1	1,28	19,72	10,51A
Média	1,24b	19,72a	
			CV(%) = 10,92
	NIDN (%NT)		
0	40,66Aa	4,41Ab	22,53
0,5	29,26Ba	4,52Ab	18,89
1	27,57Ba	4,07Ab	15,83
Média	32,50	4,33	
			CV (%) = 17,06
	NIDA (%NT)		
0	28,86Aa	3,31Ab	16,08
0,5	12,22Ba	3,18Aa	12,94
1	22,73ABa	3,16Ab	7,70
Média	21,27	3,22	
			CV (%) = 35,44
	CIDN (%MS)		
0	0,40	0,31	0,36A
0,5	0,20	0,23	0,22A
1	0,14	0,18	0,16A
Média	0,25a	0,24a	
			CV (%) = 89,48
	CIDA (%MS)		
0	0,16	0,25	0,20A
0,5	0,17	0,22	0,20A
1	0,11	0,13	0,12A
Média	0,14a	0,20a	
			CV (%) = 51,03
	Cinzas (%MS)		
0	1,02	1,10	1,06A
0,5	1,01	1,14	1,07A
1	1,05	1,33	1,19A
Média	1,03b	1,19a	
			CV (%) = 7,88

Médias seguidas de mesma letra maiúscula/minúscula em mesma coluna/linha não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Independente do uso de enzimas fibrolíticas observou-se elevação dos teores de cinzas ($P < 0,05$) ao se aplicar uréia. A determinação de cinzas tem relativamente pouco valor quando se trata de forrageiras, porque fornece pouca informação sobre sua composição, uma vez que seus componentes em minerais são muito variáveis, e as forrageiras são ricas em sílica (Silva & Queiroz, 2005).

Os valores de NIDN/NT e NIDA/NT diminuíram nos bagaços em que se utilizou uréia. O decréscimo nos teores de NIDN/NT verificado, foi decorrente do processo de amonização e evidencia que a adição do NNP, em forma de uréia, pode aumentar a quantidade de N disponível para síntese de proteína microbiana, dependendo do material tratado.

Observou-se que o valor de NIDN/NT para o bagaço *in natura* é de 40,66% NT, e no material com a uréia, sem e com 0,5 e 1% de enzimas fibrolíticas apresentou valores de 4,41; 4,52 e 4,07% NT, respectivamente, não diferindo ($P > 0,05$) entre si. Para os bagaços de cana sem adição de uréia, foram encontrados maiores teores ($P < 0,05$) para o bagaço que não recebeu enzimas e os que receberam enzimas não diferiram ($P > 0,05$) entre si. Esse nitrogênio insolúvel em detergente neutro tem seu aproveitamento dependente da taxa de passagem do bagaço de cana pelo rúmen.

A relação NIDA/NT também diminuiu em resposta à aplicação de uréia, apresentando valores de 3,31; 3,18 e 3,16% NT para o material com a uréia, e com 0,5 e 1% de enzimas, respectivamente, que não diferiram ($P > 0,05$) entre si. Nos bagaços sem uréia, diferiram ($P < 0,05$) o bagaço sem e com 0,5% de enzimas fibrolíticas. Em relação aos bagaços de cana com 0,5% de enzimas fibrolíticas e 7% de uréia com 0,5% de enzimas fibrolíticas não diferiram ($P > 0,05$) entre si.

A observação destes resultados demonstra que a adição de NNP, em forma de uréia promoveu diluição do conteúdo de NIDA, aumentando o N total, sendo que a importância do conhecimento da modificação no teor de NIDA é justificada pelo fato do N presente nessa forma, permanecer indisponível para o animal (Agricultural and Food Research Council, 1995).

Para os resultados médios de pH e DVIVMS observou-se que a adição de uréia e de enzimas não promoveram alteração significativa ($P > 0,05$) (Tabela 5).

Em volumosos amonizados, o pH da forragem deve ser aumentado suficientemente para permitir o rompimento das ligações do tipo éster entre a lignina e os carboidratos estruturais (Mascarenhas-Ferreira et al., 1989). A formação de NH_4OH é importante no processo de amonização, pois proporciona aumento na eficiência do tratamento por meio da hidrólise

alcalina, rompendo as ligações ésteres entre os carboidratos estruturais (Sundstol & Coxworth, 1984), sendo que elevações de pH normalmente ocorrem, em razão do caráter alcalino deste composto.

Os valores de pH elevaram-se significativamente no bagaço de cana de 3,66 para 9,14 com o acréscimo de 7,5% de uréia (base seca) no ensaio conduzido por Carvalho et al. (2006), evidenciando a eficácia da amoniólise e redução significativa das frações fibrosas deste volumoso. Os resultados médios (Tabela 5) mensurados neste experimento com ou sem uréia variaram de 5,53 a 5,89 ($P > 0,05$), ou seja, bem semelhantes e abaixo dos relatados por Carvalho et al. (2006) para quantidades próximas de uréia (7,5%/MS).

Este fato evidencia que, embora tenha sido observada alteração na coloração e odor do material com a uréia, a amoniólise não ocorreu em sua plenitude, o que explica também a inexistência de efeitos positivos sobre as frações fibrosas do bagaço de cana.

Tabela 5. pH e digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Enzima (%)	Uréia (%)		Média
	0	7	
	pH		
0	5,50	6,03	5,77A
0,5	5,60	4,73	5,17A
1	5,50	6,90	6,20A
Média	5,53a	5,89a	
	CV (%) = 16,50		
	DVIVMS (%)		
0	55,09Aa	44,29Bb	49,69
0,5	55,27Aa	46,35ABb	50,81
1	54,03Aa	50,48Aa	52,28
Média	54,80	47,04	
	CV (%) = 3,78		

Médias seguidas de mesma letra maiúscula/minúscula em mesma coluna/linha não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados médios da DVIVMS foram superiores no bagaço sem a inclusão da uréia quando comparados com os que continham este composto, diferindo significativamente ($P < 0,05$) para os bagaços sem e com 0,5% de enzimas. A adição de enzimas não influenciou no bagaço da cana sem uréia e o acréscimo de 0,5 e 1% destes catalisadores proporcionaram aumento na DVIVMS quando comparado ao controle com uréia.

Em experimentos com uréia, Carvalho et al. (2006) observaram aumentos de 13,78; 24,20 e 32,42%, na DVIVMS dos bagaços de cana com a aplicação de 2,5; 5,0 e 7,5% de uréia em relação ao bagaço sem uréia e Gobbi et al. (2005), utilizando 7% de uréia (base seca) no

feno de *Brachiaria decumbens* colhida no estágio de pós-florescimento, observaram que este nível de uréia, proporcionou a máxima digestibilidade *in vitro* da matéria seca (68,9%).

Utilizando níveis de enzimas fibrolíticas exógenas (5,0 e 7,5 g/kg/MS) próximos aos utilizados neste experimento, Tang et al. (2008) concluíram que estes níveis enzimáticos proporcionaram os maiores valores de DIVMS e DIVMO em palhadas de cereais, e Wang et al. (2004) concluíram que as enzimas aumentaram a taxa de digestão da palha de trigo tratada com álcali, *in vivo* e *in situ* e aumentaram a extensão da digestão *in vivo*.

Na literatura tem-se observado que a aplicação de enzimas fibrolíticas exógenas após tratamento alcalino em palhadas, aumenta a taxa e a extensão da digestão da MS (Wang et al., 2004). Este sinergismo provavelmente ocorre devido à remoção de barreiras estruturais realizada pelo álcali, facilitando a ação das enzimas fibrolíticas exógenas, onde propiciaria maior disponibilidade de açúcares solúveis, para conseqüentemente, facilitar a colonização e o crescimento dos microrganismos ruminais (Wang & McAllister, 2002b).

Contudo, este sinergismo não foi constatado neste trabalho, pois não ocorreu decréscimo na fração fibrosa com o uso da uréia. Houve elevação dos teores de PB no bagaço amonizado, porém não propiciou melhora na DVIVMS.

Após a abertura dos invólucros, representados pelas semanas 0 (dia da abertura), 1, 2 e 3, foi analisada a DVIVMS apenas nos bagaços de cana com 7% de uréia e 0% de enzimas fibrolíticas; 7% de uréia e 0,5% de enzimas fibrolíticas; e 7% de uréia e 1% de enzimas fibrolíticas (Tabela 6), foi verificado que este decréscimo da digestibilidade reflete o aumento da instabilidade do material, mesmo com uréia e enzimas, após abertura ao final do período de amonização. Já na primeira semana (41,88%), este efeito se evidencia quando diferiu significativamente ($P < 0,05$) do material colhido na semana 0 (47,04%). A adição de enzimas não influenciou a DVIVMS.

Tabela 6. Digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas, em diferentes períodos de armazenamento

Uréia (%)	Enzimas (%)	Semanas				Equação de regressão	CV (%)
		0	1	2	3		
	0	44,28	43,38	46,0	45,32		
7	0,5	46,35	40,93	41,13	36,43	Y=-2,03x+46,005 (R ² =0,76)	8,22
	1	50,48	41,32	41,97	37,91		
	Média	47,04a	41,88b	43,03ab	39,89b		

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A disponibilidade de oxigênio e de substrato propiciou a multiplicação de bolores e leveduras já na 1ª semana (Tabela 7) resultando em conseqüente decréscimo nas frações digestivas do bagaço.

Observou-se presença de bolores no momento da abertura dos sacos em todos os bagaços de cana (Tabela 7). Nas semanas 1, 2, 3 e 4, o material sem uréia apresentou maior quantidade de unidades formadoras de colônias em relação aos que receberam uréia. Este fato evidencia o efeito do álcali utilizado como fungistático, uma vez que a aplicação da uréia torna o meio menos favorável ao desenvolvimento microbiano, muito embora a digestibilidade do material também tenha sido reduzida ao longo das três semanas (Tabela 6).

Tabela 7. Unidades formadoras de colônias (LogUFC/g) em bolores e leveduras no bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Trat	Semanas					Equação de regressão	CV (%)
	0	1	2	3	4		
U0E0	15,87ab	23,20a	27,07a	27,67a	27,93a	$Y=16,140952+7,831429*x-1,242857*x^2$ ($R^2=0,98$)	19,55
U0E05	12,80b	21,97ab	27,63a	28,03a	28,20a	$Y=13,02952+10,334286*x-1,661905*x^2$ ($R^2=0,98$)	26,09
U0E1	13,17b	21,47ab	25,47a	27,53a	27,47a	$Y=13,420000+8,80000*x-1,333333*x^2$ ($R^2=0,94$)	24,92
U7E0	18,17a	19,03b	21,50b	21,00b	12,40b	$Y=17,204762+5,300476*x-1,564286*x^2$ ($R^2=0,80$)	18,56
U7E05	17,63a	18,10b	20,00b	22,10b	15,83b	$Y=18,7333$	42,95
U7E1	18,03a	19,57ab	20,73b	23,20b	13,07b	$Y=17,032381+5,665238*x-1,573810*x^2$ ($R^2=0,65$)	18,85

U0E0: testemunha; U0E05: 0% de uréia + 0,5% enzimas; U0E1: 0% de uréia + 1% de enzimas; U7E0: 7% de uréia + 0% de enzimas; U7E05: 7% de uréia + 0,5% de enzimas; U7E1: 7% de uréia +1% de enzimas. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem ($P>0,05$) pelo teste t.

Na semana 2 e 3, os bagaços de cana contendo só enzimas fibrolíticas não diferiram entre si, ocorrendo o mesmo nos bagaços de cana contendo uréia, e apresentaram valores de UFC inferiores aos bagaços só com enzimas e ao testemunha. Na semana 4, observaram-se os menores valores de UFC para os bagaços de cana com 7% de uréia e 0% de enzimas fibrolíticas, 7% de uréia e 0,5% de enzimas fibrolíticas e 7% de uréia e 1% de enzimas fibrolíticas. No entanto, todos os bagaços contendo uréia apresentaram valores significativamente mais baixos ($P<0,05$) do que as contagens observadas para o bagaço sem uréia.

Avaliando-se o fator semanas dentro de cada combinação, uréia e enzimas fibrolíticas, observou-se comportamento quadrático para os bagaços de cana com 0% de uréia e 0% de enzimas fibrolíticas, 0% de uréia e 0,5% de enzimas fibrolíticas, 0% de uréia e 1% de enzimas

fibrolíticas, 7% de uréia e 0% de enzimas fibrolíticas, e 7% de uréia e 1% de enzimas fibrolíticas, atingindo a contagem de UFC/g máxima em 3,1506; 3,1092; 3,3000; 1,6942 e 1,7998 semanas, obtendo-se valores de 28,48; 29,09; 27,94; 21,69 e 22,13 UFC/g, respectivamente. Não foi observada diferença para o bagaço de cana com 7% de uréia e 0,5% de enzimas fibrolíticas ao longo do período de armazenamento do material, obtendo-se o valor médio de 18,73 UFC/g.

Gesualdi et al. (2001) verificaram que o bagaço de cana-de-açúcar amonizado com 0, 1, 2 e 4% (N-amônia na matéria seca) nas formas de amônia anidra, uréia e sulfato de amônio em silos, proporcionou boa preservação em todos os bagaços até o último período de avaliação visual, que foi aos 48 dias.

A utilização das enzimas fibrolíticas não influenciou o desenvolvimento das unidades formadoras de colônias. O substrato utilizado para a respiração depende do tipo do microrganismo, sendo que leveduras consomem apenas compostos solúveis (açúcares e produtos da fermentação), enquanto bolores degradam uma ampla variedade de nutrientes, inclusive carboidratos estruturais e lignina (McDonald et al., 1991).

No entanto, a possibilidade de ação das enzimas fibrolíticas exógenas sobre a celulose e hemicelulose, convertendo-as em carboidratos menos complexos, não influenciou o desenvolvimento de bolores e leveduras (UFC/g) nos bagaços de cana que receberam apenas enzimas. Já nos bagaços de cana com uréia, com ou sem enzimas, prevaleceu à ação fungistática da uréia aplicada nestes bagaços, não sendo observada diferença entre estes para todas as semanas ($P>0,05$).

O ocorrido no material amonizado neste experimento deveu-se provavelmente, à ineficácia da reação de ureólise, a qual transforma a uréia em amônia, talvez devido a um reduzido teor de urease no bagaço, ou mesmo à baixa temperatura (17,3 °C) durante o período experimental, sendo que esta reação, subsequentemente, propiciaria melhoria na qualidade da fibra, devido à solubilização parcial da hemicelulose, com conseqüente aumento no seu aproveitamento (Pires et al., 2004).

Discordando dos relatos de Pires et al. (2004), ocorreu um incremento percentual das frações fibrosas em detrimento das não fibrosas de carboidratos, resultando na redução da digestibilidade do material.

Além disso, possivelmente o tempo de ação das enzimas fibrolíticas exógenas (30 minutos), na temperatura em que se realizou o ensaio, pode ter sido insuficiente para solubilizar a celulose e hemicelulose do bagaço de cana, o que somado à ineficiência do uso

da uréia, que provocaria um afrouxamento da parte fibrosa deste resíduo, resultando em uma maior exposição da celulose e hemicelulose para a hidrólise enzimática e liberação de açúcares solúveis, melhorando assim o valor nutricional deste volumoso.

CONCLUSÕES

A adição de uréia ao bagaço de cana-de-açúcar promove aumentos nos teores de PB, FDN, FDA, HEM e CEL e reduz a DVIVMS. A adição de enzimas na dose de 0,5 e 1% proporciona aumento na DVIVMS do bagaço com a uréia.

A aplicação de 7% de uréia é eficiente na conservação do bagaço de cana, apresentando menores valores de unidades formadoras de colônias em um período de armazenamento de até quatro semanas.

REFERÊNCIAS

- ALLI, I.; FAIRBAIRN, R.; BAKER, B.E. et al. The effects of ammonia on the fermentation of chopped sugarcane. **Animal Feed Science and Technology**, v.9, p.291-299, 1983.
- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL. **Energy and protein requirements of ruminants**. Farnham Royal: CAB International, 1995. 59p.
- ANDRADE, J.B.; FERRARI JÚNIOR, E.; BRAUN, G. Valor nutritivo da silagem de cana-de-açúcar tratada com uréia e acrescida de rolão-de-milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p.1169-1174, 2001.
- ANKOM TECHNOLOGY - 08/05, *In Vitro* True Digestibility using the DAISY^{II} Incubator [on line], 2010. Disponível em <<http://www.ankom.com>> Acesso em 15 de julho de 2010.
- BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M.; SEWALT, V.J.H. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Canadian Journal Animal Science**, v.75, p.641-644, 1995.

- CÂNDIDO, M.J.D.; NEIVA, J.N.M.; PIMENTEL, J.C.M. et al. Avaliação do valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar amonizado com uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.5, p.928-935, 1999.
- CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; VELOSO, C.M. et al. Valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar amonizado com quatro doses de uréia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.125-132, 2006.
- CYSNEIROS, C.S.S.; FRANCO, G.L.; ULHOA, C.J. et al. Efeito de enzimas fibrolíticas sobre a composição bromatológica de silagens de capins tropicais. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.1, p.1-10, 2006.
- DOLBERG, F. Program in the utilization of urea – ammonia treated crop residues: nutritional dimensions and application of the technology on small farm. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES, Lavras, MG. 1992, **Anais...** p.130-145.
- FADEL, R.; ROSA, B.; OLIVEIRA, I.P. et al. Avaliação de diferentes proporções de água e de uréia sobre a composição bromatológica da palha de arroz. **Ciência Animal Brasileira**, v.4, n.2, p.101-107, 2003.
- FERNANDES, L.O.; REIS, R.A.; RODRIGUES, L.R.A. Quality of ammoniated *Brachiaria decumbens* hay. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS 21, São Pedro, SP, 2001, **Proceedings...** p.779-780.
- FERREIRA, M.A.; SILVA, R.R.; RAMOS, A.O. et al. Síntese de proteína microbiana e concentrações de uréia em vacas alimentadas com dietas á base de palma forrageira e diferentes volumosos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.159-165, 2009.
- FISCHER, R.E.; BAYLEY, P.; HARRISON, K. et al. Nutritive value of coastal bermudagrass hay as influenced by ammoniation and grain supplementation. **Arkansas Farm Research**, v.34, n.3, p.8, 1985.
- GARCIA, R.; NEIVA, J.N.M. Utilização da amonização na melhoria da qualidade de volumosos para ruminantes. In: SIMPÓSIO NORDESTINO DE ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, 5., Salvador, 1994. **Anais...** Salvador: Sociedade Nordestina de Produção Animal, 1994. p.41-61.
- GESUALDI, A.C.L.S.; SILVA, J.F.C.; VASQUEZ, H.M. et al. Efeito da amonização sobre a composição, a retenção de nitrogênio e a conservação do bagaço e da ponta de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.508-517, 2001.
- GOBBI, K.F.; GARCIA, R.; GARCEZ NETO, A.F. et al. Composição química e digestibilidade *in vitro* do feno de *Brachiaria decumbens* Stapf. tratado com uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.720-725, 2005.

- GOMES, J.A.F.; LEITE, E.R.; CAVALCANTE, A.C.R. et al. Resíduo agroindustrial da carnaúba como fonte de volumoso para terminação de ovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.1, p.58-67, 2009.
- GOULD, J.M. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, v.26, p.46-52, 1984.
- HRISTOV, A.N.; RODE, L.M.; BEAUCHEMIN, K.A. et al. Effect of a commercial enzyme preparation on barley silage *in vitro* and *in sacco* dry matter degradability. **Proceedings of Western Section of American Society of Animal Science**, v.47, p.282-284, 1996.
- JOY, M.; ALIBÉS, X.; MUÑOZ, F.. Chemical treatment of lignocellulosic residues with urea. **Animal Feed Science and Technology**, v.38, p.319-333, 1992.
- KRAUSE, M.; BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M. et al. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2912-2920, 1998.
- KUNG JR, L.; COHEN, M.A.; RODE, L.M. et al. The effect of fibrolytic enzymes sprayed onto forages and fed in a total mixed ratio to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2396-2402, 2002.
- MANDELL, I.B.; CHRISTISON, G.I.; NICHOLSON, H.H. et al. The effect of variation in the water content of wheat straw before ammoniation on its nutritive value for beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v.20, p.111-124, 1988.
- MANN, M.E.; COHEN, R.D.H.; NICHOLSON, H.H. et al. The feeding value of ammoniate flax straw, wheat straw and wheat chaff for beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v.21, p.57-66, 1988.
- MASCARENHAS-FERREIRA, A.; GUEDES, C.V.M.; DIAS-DA-SILVA, A.A. Effect of urea treatment on chemical composition and *in vitro* digestibility of meadow hays of Northern Portugal. **Animal Feed Science and Technology**, v.25, n.1, p.157-167, 1989.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. New York: Chalcombe Publications, 1991. 339p.
- MILLER, G.H. Use a dinitro-salicílico acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-429, 1959.
- NUNES, C.S.; VELASQUEZ, P.A.T.; CARRILHO, E.N.V.M. et al. Material alternativo para confecção de filtros empregados na metodologia “nylon bag” para determinação de fibra. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., **Anais....** Goiânia, 2005. CD-ROM.

- PIRES, A.J.V.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Degradabilidade do bagaço de cana-de-açúcar tratado com amônia anidra e, ou, sulfeto de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.1071-1077, 2004.
- REIS, R.A.; RODRIGUES, L.R.A.; RESENDE, K.T. et al. Avaliação de fontes de amônia para o tratamento de fenos de gramíneas tropicais. Compostos Nitrogenados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.682-686, 2001.
- REIS, R.A.; BERCHIELLI, T.T.; ANDRADE, P. et al. Valor nutritivo do feno de capim coast-cross (*Cynodon dactylon* L. Pers.) submetido à amonização. **ARS Veterinária**, v.19, p.143-149, 2003.
- STATISTICAL ANALYSES SYSTEM - SAS. **User's guide statistics**: version 8.0 edition. Cary, 1999. 956p.
- SCHUERCH, C.; DAVIDSON, R.W. Plasticizing wood with ammonia-control of color changes. **Journal of Polymer Science**, Part C. v.36, p.231-239, 1971.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 2005. 235p.
- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3562-3577, 1992.
- SOUZA, A.L.; GARCIA, R.; PEREIRA, O.G. et al. Valor nutritivo da casca de café tratada com amônia anidra. **Revista Ceres**, v.49, p.669-681, 2002.
- SUNDSTOL, F.; COXWORTH, E.M.; MOWAT, D.N. Mejora del valor nutritivo de la paja mediante tratamiento con amoníaco. **Revista Mundial de Zootecnia**, v.26, n.1, p.13-21, 1978.
- SUNDSTOL, F.; COXWORTH, E. Ammonia treatment. In: SUNDSTOL, F.; OWEN, E. (Eds.) **Straw and other fibrous by-products as feed**. Amsterdam: Elsevier, p.196-247, 1984.
- SUNDSTOL, F. Straw and other fibrous by-products. **Livestock Production Science**. v.19, p.137-158, 1988.

- TANG, S.X.; TAYO, G.O.; TAN, Z.L. et al. Effects of yeast culture and fibrolytic enzymes supplementation on *in vitro* fermentation characteristics of low-quality cereal straws. **Journal of Animal Science**, v.86, p.1164-1172, 2008.
- WAGHORN, G.C.; McNABB, W.C. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.62, p.383-392, 2003.
- WANG, Y.; McALLISTER, T.A. Rumen microbes, enzymes and feed digestion: A review. Asian-Australas. **Journal of Animal Science**, v.15, p.1659-1676, 2002a.
- WANG, Y.; McALLISTER, T.A. Investigation of exogenous fibrolytic enzyme activity on barley straw using *in vitro* incubation. **Journal of Animal Science**, v.80, p.316, 2002b (Suppl. 1).
- WANG, Y.; SPRATLING, B.M.; ZOBELL, D.R. et al. Effect of alkali pretreatment of wheat straw on the efficacy of exogenous fibrolytic enzymes. **Journal of Animal Science**, v.82, p.198-208, 2004.
- YANG, W.Z.; BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M. Effects of barley grain processing on extent of digestion and milk production of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p.554-568, 2000.
- YOSHIOKA, H.; CHAVANICH, S.; NILUBOL, N. et al. Production and characterization of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.45, p.579-586, 1981.

CAPÍTULO 3

Fracionamento dos componentes nitrogenados e dos carboidratos do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

RESUMO - Objetivou-se determinar as frações nitrogenadas e dos carboidratos do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas. Utilizou-se esquema fatorial 2x3, sendo duas doses de uréia (0 e 7%) e três doses de enzimas (0; 0,5 e 1%), com base na matéria seca, com 3 repetições. O fracionamento dos compostos nitrogenados foi realizado obtendo as seguintes frações: “A” (nitrogênio não protéico), “B1” (proteína verdadeira de degradação enzimática rápida), “B2” (proteína verdadeira de degradação enzimática intermediária), “B3” (proteína verdadeira de degradação enzimática lenta) e “C” (proteína indigestível). Os carboidratos foram fracionados em carboidratos não-fibrosos (CNF), que correspondem às frações “A+B1” (açúcares solúveis, ácidos orgânicos somados ao amido e a pectina, respectivamente), “B2” (fibra disponível) e “C” (fibra indigerível). Nos compostos nitrogenados verificou-se interação ($P < 0,05$) entre uréia e enzimas fibrolíticas para as frações A, B3 e C. Não foi verificada interação ($P > 0,05$) para NT (nitrogênio total) e frações B1 e B2, porém verificou-se efeito ($P < 0,05$) da uréia e das enzimas sobre a fração B2. A adição de uréia elevou ($P < 0,05$) os teores de NT do bagaço. Entretanto, a aplicação de enzimas não proporcionou efeito nesta variável. A fração B1 não foi influenciada ($P > 0,05$) pela adição de enzimas enquanto que, o bagaço com uréia promoveu redução ($P < 0,05$) desta fração. A adição de 1% de enzimas elevou a fração B2. A fração B3 foi reduzida com a adição da uréia, exceto no bagaço com 1% de enzimas. No fracionamento dos carboidratos não foi verificada interação ($P > 0,05$) para a fração C, porém verificou-se efeito ($P < 0,05$) da uréia para CT (carboidratos totais), A+B1 e B2. A adição de uréia diminuiu os teores de CT, A+B1 e elevou B2. A aplicação de enzimas não proporcionou efeito nestas variáveis. A aplicação de uréia eleva os teores de nitrogênio total e da fração A da proteína e B2 dos carboidratos, e reduz os teores das frações B1, B2, B3 e C da proteína e os teores de CT e A+B1 dos carboidratos. O uso de enzimas fibrolíticas não afeta as frações nitrogenadas e de carboidratos do bagaço de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: nutrientes, tratamento biológico, tratamento químico

Fractionation of carbohydrates and nitrogenous components of sugarcane bagasse with urea and exogenous fibrolytic enzymes

ABSTRACT - The objective of this study was to determine the nitrogenous and the carbohydrates fractions of sugarcane bagasse treated with urea and exogenous fibrolytic enzymes. A 2x3 factorial arrangement, with two doses of urea (0 and 7%) and three doses of enzyme (0, 0.5 and 1%), with three replications was used. The fractionation of nitrogenous compounds was obtained with following fractions: "A" (non-protein nitrogen), "B1" (true protein of enzymatic degradation rapid), "B2" (true protein of enzymatic degradation intermediate), "B3" (true protein of enzymatic degradation slow), and "C" (indigestible protein). Carbohydrates were fractionated in non-fibrous carbohydrates (NFC), which corresponds to fractions "A+B1" (soluble sugars, organic acids starch and pectin), "B2" (available fiber) and "C" (indigestible fiber). In the nitrogenous compounds there was interaction ($P < 0.05$) between urea and fibrolytic enzymes for fractions A, B3 and C. There was no interaction ($P > 0.05$) for TN (total nitrogen) and fractions B1 and B2, but there was an effect ($P < 0.05$) of urea and enzyme on the fraction B2. The addition of urea increased ($P < 0.05$) levels of TN bagasse. However, the application of enzymes did not show effect on this parameter. The fraction B1 was not affected ($P > 0.05$) by the addition of enzymes, while bagasse with urea promoted reduction ($P < 0.05$) of this fraction. The addition of 1% of enzymes increased fraction B2. The fraction B3 was reduced with the addition of urea, except in the bagasse with 1% enzymes. In the fractionation of carbohydrates there was no significant interaction ($P > 0.05$) for the fraction C, but there was an effect ($P < 0.05$) of urea for TC (total carbohydrates), A+B1 and B2. The addition of urea decreased the levels of TC, A+B1 and increased B2. The application of enzymes did not show effect on these variables. The application of urea increased the contents of total nitrogen and of the fraction A of the protein, and B2 of carbohydrates, and lowers levels of fractions B1, B2, B3 and C of the protein and the levels of TC and A+B1 of carbohydrates. The use of fibrolytic enzymes does not affect the nitrogenous fractions and the carbohydrates of sugarcane bagasse.

Key Words: biological treatment, chemical treatment, nutrients

INTRODUÇÃO

A busca por alimentos volumosos para suplementação nutricional na época da estação seca, que sejam economicamente viáveis, tem levado muitos pecuaristas a utilizarem resíduos na alimentação de ruminantes.

O bagaço de cana-de-açúcar possui posição de destaque devido à grande disponibilidade em regiões produtoras de aguardentes. Mas, a difusão da sua utilização fica limitada, pois, o bagaço de cana, assim como outros alimentos fibrosos, é constituído de celulose, hemicelulose e lignina, o que confere a este volumoso, baixa digestibilidade e consumo.

Portanto, o tratamento químico de alimentos volumosos tem crescido bastante nos últimos anos e várias pesquisas têm evidenciado que o valor nutritivo de diferentes volumosos pode ser melhorado com a utilização de produtos químicos (Reis et al., 2001; Santos et al., 2004), dentre eles os tratamentos com amônia anidra, uréia, hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio e óxido de cálcio (Souza et al., 2002; Pires et al., 2006).

De acordo com Pires et al. (2004), o tratamento com uréia promove o rompimento de ligações ésteres entre constituintes da parede celular e ácidos fenólicos com a despolimerização parcial da lignina, além de incrementar os teores de nitrogênio dietéticos.

Os efeitos da amonização em volumosos não são observados apenas quanto ao aumento do teor de proteína bruta, mas também, na alteração nas proporções das frações nitrogenadas. Este efeito pode ser demonstrado pelos estudos realizados por Bertipaglia et al. (2005) e Reis et al. (2001).

A proteína bruta dietética de baixa qualidade pode ser utilizada de forma eficiente pelos ruminantes em razão da participação da microbiota ruminal na síntese da proteína microbiana. Todavia, a quantidade de nitrogênio normalmente excretada pelas fezes é até 400% maior do que a secretada no leite, evidenciando a necessidade de ajustes na dieta (Broderick, 2011).

O tratamento de resíduos agrícolas com uréia aumenta a quantidade de nitrogênio não proteico nestes volumosos, que pode substituir apenas uma parte do que é degradável no rúmen (Satter & Slyter, 1974). Por isso, o fracionamento dos componentes nitrogenados em conjunto com os dos carboidratos, que formarão a energia necessária para que as frações degradáveis do nitrogênio no rúmen possam ser incorporadas à proteína microbiana, devem ser mensurados.

Paralelamente, com o objetivo de aumentar a eficiência de utilização dos alimentos pelos ruminantes, pesquisadores têm estudado o efeito da utilização de produtos

biotecnológicos, destacando-se a suplementação com enzimas fibrolíticas exógenas compostas de celulase e hemicelulase (Martins et al., 2007). A aplicação de enzimas exógenas diretamente no alimento, provoca a liberação de açúcares redutores (Hristov et al., 1996) e, em alguns casos, solubilização parcial da FDN e FDA (Krause et al., 1998).

Assim, objetivou-se com este experimento determinar as frações dos compostos nitrogenados e de carboidratos do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, no Campus de Vitória da Conquista, BA, no período de 30 de junho a 04 de agosto de 2010, com temperatura média de 17,3 °C, apresentando média para a máxima e mínima de 22,19 e 14,12 °C, respectivamente, durante o período experimental.

Realizou-se delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3, sendo duas doses de uréia (0 e 7%) e três doses de enzimas (0; 0,5 e 1%) com base na matéria seca, com 3 repetições (U0E0: testemunha; U0E05: 0% de uréia + 0,5% de enzimas; U0E1: 0% de uréia + 1% de enzimas; U7E0: 7% de uréia + 0% de enzimas; U7E05: 7% de uréia + 0,5% de enzimas e U7E1: 7% de uréia + 1% de enzimas).

As enzimas fibrolíticas exógenas utilizadas foram extraídas dos fungos *Aspergillus aculeatus* e *Humicola insolens*. O produto¹ constituiu de celulases e hemicelulases, na forma líquida, de coloração marrom, com densidade de 1,2 g/mL, tendo como condições ótimas para atividade enzimática da celulase 45-50 °C e pH 4,5-6,5, e da hemicelulase 40-60 °C e pH 5,0-6,5. Esta última, além da hemicelulase, contém outras enzimas, incluindo β -glucanases, xilanases, arabinases, celulases e pentosanases.

Para a avaliação da atividade das enzimas celulases e hemicelulases, utilizou-se a metodologia descrita por Yoshioka et al. (1981) e Miller (1959). Para o preparo do meio, foram homogeneizados 10 g de farelo de trigo, 10 mL de água destilada e esterilizados. O preparo das enzimas foi feito com 9,95 mL de água destilada e 50 μ L de enzima, sendo utilizados 2 mL da solução. Foi feito controle positivo com solução de glicose a 0,5% em água destilada e outro, constituído apenas por farelo de trigo. Após período de incubação de

¹ Novozymes Latin America Ltda: celulase (NS 50013) e hemicelulase (NS 22022).

48 h, os extratos (triplicatas) foram obtidos por filtração com bomba a vácuo, e as leituras das respectivas absorvâncias, determinadas em espectrofotômetro, modelo Cintra 20, da GBC em λ de 540 nm. A quantificação dos açúcares redutores dos extratos recuperados, que representam as atividades das enzimas, foram de 51 e 28 mg/mL para celulasas e hemicelulasas, respectivamente, mostrando a efetividade das enzimas.

O bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) utilizado, foi adquirido em usina de produção artesanal de cachaça da região de Vitória da Conquista-BA e, após o descarregamento, foi picado em máquina forrageira estacionária. Antes e após da adição de enzimas fibrolíticas exógenas e da uréia, foram retiradas amostras para determinação da composição químico-bromatológica (Tabela 1) e contagem de unidades formadoras de colônias (Tabela 2) sendo obtidas segundo metodologia descrita por Silva & Queiroz (2005), Nunes et al. (2005) e Silva et al. (1997).

Tabela 1. Composição químico-bromatológica do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Variáveis	Tratamentos					
	U0E0	U0E05	U0E1	U7E0	U7E05	U7E1
MS (%)	40,14	38,77	39,16	36,08	33,71	35,93
PB (%MS)	1,21	1,21	1,28	18,94	20,48	19,72
FDN (%MS)	66,58	65,65	66,92	73,93	74,34	72,83
FDNcp	66,10	65,39	66,72	73,49	73,97	72,52
FDA (%MS)	46,36	45,60	45,80	52,34	50,19	50,71
Extrato etéreo	1,44	1,75	1,68	3,14	3,03	1,75
Hemicelulose (%MS)	23,51	23,21	23,57	25,08	26,08	24,35
Celulose (%MS)	35,65	34,96	34,95	40,48	39,46	39,41
Lignina (%MS)	9,47	9,61	11,30	12,14	11,05	11,16
Cinzas (%MS)	1,02	1,01	1,05	1,10	1,14	1,33

U0E0: testemunha; U0E05: 0% de uréia + 0,5% enzimas; U0E1: 0% de uréia + 1% de enzimas; U7E0: 7% de uréia + 0% de enzimas; U7E05: 7% de uréia + 0,5% de enzimas; U7E1: 7% de uréia + 1% de enzimas; MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDNcp: fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; FDA: fibra em detergente ácido.

No bagaço de cana (4,5 kg de MN por unidade experimental) sem adição de uréia, apenas enzimas (U0E05 e U0E1), após mensurar o pH e sem necessitar ajustá-los, as quantidades de 7,5 mL e 15 mL de enzimas, que correspondem a 0,5% e 1% de enzimas na base seca, foram diluídas em 100 mL de água destilada, na proporção de 60% de celulase e 40% de hemicelulase, sendo borrifadas no bagaço, deixando-as agir por 30 min (Kung Jr. et al., 2002). Em seguida, foram coletadas amostras de cada unidade experimental, acondicionadas em sacos plásticos identificados e armazenadas sob refrigeração para posteriores análises. O restante do material foi vedado com fitas adesivas em sacos de

polietileno com dimensões de 0,50 x 0,70 m e armazenados em local protegido e cobertos com lona plástica durante o mesmo período do bagaço de cana com uréia.

Tabela 2. Unidades formadoras de colônias (LogUFC/g) em bolores e leveduras no bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Tratamento	LogUFC/g
U0E0	15,87
U0E05	12,80
U0E1	13,17
U7E0	18,17
U7E05	17,63
U7E1	18,03

U0E0: testemunha; U0E05: 0% de uréia + 0,5% enzimas; U0E1: 0% de uréia + 1% de enzimas; U7E0: 7% de uréia + 0% de enzimas; U7E05: 7% de uréia + 0,5% de enzimas; U7E1: 7% de uréia + 1% de enzimas

No bagaço de cana com inclusão de uréia, usou-se a quantidade de 7% de uréia (base MS), onde foi misturada ao bagaço (4,5 kg de MN por unidade experimental), homogeneizadas e acondicionadas em sacos de polietileno com dimensões de 0,50 x 0,70 m. Após o enchimento, todos os sacos foram vedados com fitas adesivas e armazenados em local protegido e cobertos com uma lona plástica durante o período de 35 dias, como recomendado por Sundstol et al. (1978).

Ao final do período de amonização, os sacos foram abertos e aerados por 6 h para permitir a liberação do excesso de amônia. Apenas no bagaço de cana com 7% de uréia e 1% de enzimas, devido à elevação do pH (6,90) após a amonização, foi necessário ajustar o pH para 5,0, utilizando 75 mL de ácido sulfúrico 1,0N borrifado. Logo após, foi aplicada a dose proposta de enzimas, da mesma forma do bagaço de cana com 0% de uréia e 0,5% de enzimas, e 0% de uréia e 1% de enzimas, deixando-as agir por 30 min. Em seguida, foram coletadas amostras, acondicionadas em sacos plásticos identificados e armazenadas sob refrigeração para posteriores análises.

As amostras coletadas em cada combinação, uréia e enzimas, foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 65 °C, por 72 h, sendo posteriormente processadas em moinho tipo “Willey” com peneira de crivos de 1 mm.

Foram realizadas análises dos teores de nitrogênio total (NT) e das frações dos compostos nitrogenados, representados por: nitrogênio não protéico (A); proteína verdadeira de degradação enzimática rápida (B1); proteína verdadeira de degradação enzimática intermediária (B2); proteína verdadeira que apresenta degradação enzimática lenta (B3); proteína indigestível (C). As análises foram realizadas de acordo com metodologia descrita

por Licitra et al. (1996). O nitrogênio não protéico, representado pela fração A, foi determinado após o tratamento da amostra com ácido tricloroacético (TCA) a 10%, sendo obtido pela diferença entre o nitrogênio total (NT) e o nitrogênio insolúvel em TCA (NR), estimado pela seguinte fórmula: Fração “A” (%) = %NT - NR(%). O nitrogênio solúvel total, foi obtido através da incubação da amostra em tampão borato-fosfato (TBF) e azida sódica a 10%, sendo que após o tratamento com o TBF, o nitrogênio solúvel total, correspondente às frações “A” e “B1” foi solubilizado, restando no resíduo obtido o restante das frações nitrogenadas (Frações “B2”, “B3” e “C”). A fração “B1” foi obtida após o desconto da fração “A”, como se segue: Fração “B1” (%) = %NT - (%NR - %N na Fração “A”). A fração “B3” foi determinada pela diferença entre o nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e o nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), como se segue: Fração “B3” (%) = %NIDN - %NIDA, onde o NIDN e NIDA, respectivamente, são as frações de nitrogênio determinado no resíduo da FDN e da FDA. A fração “C” foi considerada como o NIDA e a fração “B2” foi obtida pela diferença entre o nitrogênio total e as frações “A”, “B1”, “B3” e “C”.

As frações que compõem os carboidratos totais (CT) foram estimadas conforme Sniffen et al. (1992), através da fórmula: $CT = 100 - (PB + EE + MM)$ em que PB corresponde à proteína bruta da amostra, extrato etéreo e MM às cinzas. Os carboidratos não-fibrosos (CNF), que correspondem às frações “A + B1”, foram estimados pela seguinte fórmula: $CNF = 100 - (PB + FDN_{ncp} + EE + MM)$ em que FDN_{ncp} corresponde ao FDN, corrigido o seu conteúdo para proteína e cinzas. A fração “B2” (fibra disponível) é obtida por meio da diferença entre a FDN_{ncp} e a fração de fibra indigestível (“C”). A fração “C”, que representa a fibra indigerível, foi estimada por meio da multiplicação do valor percentual da fração de lignina pelo fator 2,4.

Os dados obtidos foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância, e as médias comparadas pelo teste Tukey, adotando-se o nível de 5% de probabilidade. Para realizar as análises estatísticas, foi utilizado o programa SAS (SAS, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frações nitrogenadas podem caracterizar de maneira mais precisa os componentes de um alimento quanto ao teor de NNP e da degradação ruminal da proteína verdadeira e N indisponível (Tabela 3).

Verificou-se interação ($P < 0,05$) entre o acréscimo de uréia e enzimas fibrolíticas para as frações A, B3 e C.

A adição de uréia, independente da adição de enzimas fibrolíticas, elevou ($P < 0,05$) os teores de NT do bagaço em 1575%, apresentando médias que foram, respectivamente, de 0,20 a 3,15% para, sem e com 7% de inclusão da uréia. Entretanto, a aplicação de enzimas não proporcionou efeito nesta variável.

Ao se aplicar enzima no bagaço com 7% de uréia, não foi observada diferenças ($P > 0,05$) entre as doses de enzimas fibrolíticas nos teores da fração A. Para o bagaço sem uréia, observou-se que a aplicação de 1% de enzima resultou em maiores teores da fração A (54,85%NT) em relação às demais doses. Analisando o uso da uréia dentro das doses de enzimas, observou-se aumento ($P < 0,05$) da fração A em todas as doses avaliadas.

Independente da dose de uréia, a fração B1 não foi influenciada ($P > 0,05$) pela adição de enzimas. Já o bagaço de cana com uréia promoveu redução ($P < 0,05$) da fração B1, independente da dose de enzima. A adição de 1% de enzimas elevou a fração B2 (5,55%) em relação às demais doses de enzimas e independente da dose de uréia, enquanto que o bagaço com uréia promoveu decréscimo ($P < 0,05$) nesta fração, observando-se valores de 5,91 e 2,78%, respectivamente, independente da dose da enzima. Ressalta-se que a redução nas frações B1 e B2 pode ser decorrente do efeito proporcional da inclusão do nitrogênio, que aparece na forma de NNP (Fração A). Conforme Pereira & Rossi (1994), essas frações representam a porção de proteína verdadeira da forragem, que são pouco afetadas pela inclusão de fontes externas de nitrogênio na forma de uréia ou amônia. Resultados semelhantes foram encontrados por Bertipaglia et al. (2005) e Roth et al. (2010) ao amonizarem volumosos.

Independente da dose de enzima fibrolítica, a fração B3 foi reduzida ($P < 0,05$) com a adição da uréia, exceto no bagaço com 1% de enzimas. A diminuição do teor da fração B3 com a adição de uréia pode ser explicada, possivelmente, pelo aumento da fração A nestes bagaços. A diminuição da fração B3 em materiais amonizados foi observada por Bertipaglia et al. (2005) e Roth et al. (2010). Esta fração representa as proteínas de ligação da parede celular, que possuem taxa de degradação dependente da taxa de passagem. Já o bagaço de cana com enzimas não alterou ($P > 0,05$) o teor desta fração quando combinada com 7% de uréia. Dentro dos bagaços de cana que receberam enzimas, os bagaços sem e com 1% de enzimas, e sem e com 0,5% de enzimas não diferiram ($P > 0,05$) entre si.

Tabela 3. Fração de compostos nitrogenados do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Enzima (%)	Uréia (%)		Média
	0	7	
	NT (%)		
0	0,19	3,03	1,61A
0,5	0,19	3,28	1,74A
1	0,21	3,16	1,68A
Média	0,20b	3,15a	
			CV (%) = 10,93
	A (%NT)		
0	44,46Bb	91,62Aa	68,04
0,5	48,33ABb	92,20Aa	70,27
1	54,85Ab	92,18Aa	73,51
Média	49,21	92,00	
			CV (%) = 3,77
	B1 (%NT)		
0	13,72	1,44	7,58A
0,5	18,92	0,52	9,72A
1	11,21	0,63	5,92A
Média	14,62a	0,86b	
			CV (%) = 39,75
	B2 (%NT)		
0	4,52	2,53	3,53B
0,5	5,18	2,75	3,96B
1	8,03	3,06	5,55A
Média	5,91a	2,78b	
			CV (%) = 27,59
	B3 (%NT)		
0	10,37ABa	1,09Ab	5,73
0,5	16,04Aa	1,33Ab	8,68
1	4,85Ba	0,95Aa	2,90
Média	10,42	1,12	
			CV (%) = 57,99
	C (%NT)		
0	26,93Aa	3,30Ab	15,12
0,5	11,54Ba	3,18Aa	7,36
1	21,06Aa	3,16Ab	12,11
Média	19,84	3,21	
			CV (%) = 26,91

NT: nitrogênio total; A: nitrogênio não protéico, B1: proteína verdadeira de degradação enzimática rápida, B2: proteína verdadeira de degradação enzimática intermediária, B3: proteína verdadeira de degradação enzimática lenta, C: proteína indigestível. Médias seguidas de mesma letra maiúscula/minúscula em mesma coluna/linha não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Independente da dose de enzima fibrolítica, a fração C foi reduzida ($P < 0,05$) com a adição da uréia. Já o bagaço sem adição de uréia com 0,5% de enzimas, não diferiu ($P > 0,05$)

do bagaço com uréia e 0,5% de enzimas. Para os bagaços que receberam enzimas, o bagaço com 0,5% de enzimas, diferiu ($P < 0,05$) dos demais. A fração C representa a proteína associada à lignina e é indigestível para os microrganismos ruminais. Neste aspecto, Bertipaglia et al. (2005) e Roth et al. (2010) observaram diminuição dos teores da fração C, na amonização de fenos de brachiarias. Assim, a diminuição da fração C, com a adição de fonte de amônia, no tratamento de alimentos volumosos, é benéfica do ponto de vista de melhoria do valor nutritivo dos mesmos, uma vez que, aumenta a quantidade de nitrogênio disponível para digestão.

Independente da dose de enzima fibrolítica, observou-se efeito significativo do uso da uréia ($P < 0,05$), com exceção da fração C. Não houve ($P > 0,05$) interação entre esta e as doses de enzimas para nenhuma das frações dos carboidratos (Tabela 4).

Os resultados médios de CT mensurados neste experimento com ou sem uréia variaram de 96,11 a 76,45%, ou seja, abaixo do relatado por Carvalho et al. (2006) que encontraram para os carboidratos totais valores que variaram de 94,02 para 85,11% para quantidade semelhante de uréia (7,5%MS). Os valores de carboidratos totais são influenciados pelos teores de PB, EE e MM, haja vista a utilização dessas variáveis para determinação dos mesmos. Portanto, como nos bagaços que receberam uréia ocorreram os maiores valores de PB, devido à contribuição da uréia em aumentar o teor de nitrogênio dos bagaços, estes apresentaram menores frações de carboidratos totais.

Os CNF que correspondem às frações A+B1 são referentes à concentração de açúcares solúveis com rápida degradação ruminal e amido, frutanas, galactanas, β -glucanas e pectina, com degradação intermediária, respectivamente. Os resultados médios para estas frações decresceram ($P < 0,05$) de 30,04 para 3,13% com a inclusão da uréia independente da dose de enzima. A diminuição da fração A+B1 podem ser explicados pela redução dos teores de carboidratos totais, devido aos teores de PB e pelo aumento proporcional da fração disponível da fibra em detergente neutro (B2), em função da adição de uréia.

Roth et al. (2010) observaram que os fenos com 5% de uréia e 30% de umidade apresentaram menor valor das frações A+B1 (7,6%), apresentando diferença significativa apenas dos fenos controle, com 3% de uréia com 25 e 30% de umidade, com valores de 11,4%, 12,0% e 11,3%, respectivamente. Entretanto, Carvalho et al. (2006) observaram elevações nos valores de CNF de 15,97; 18,86; 21,74 e 24,63%, respectivamente, para os bagaços de cana com 0; 2,5; 5,0 e 7,5% de uréia (base MS). Este aumento é justificado pela redução dos componentes fibrosos, em especial hemicelulose, resultando em decréscimo da

fração FDN, e quanto mais acentuada for à redução desta fração, maior será o conteúdo dos CNF, uma vez que a FDN é subtraída na obtenção dos CNF.

Tabela 4. Fração de carboidratos do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Enzima (%)	Uréia (%)		Média
	0	7	
	CT (%MS)		
0	96,33	76,81	86,57A
0,5	96,03	75,35	85,69A
1	95,98	77,19	86,59A
Média	96,11a	76,45b	
			CV (%) = 1,55
	CNF (A+B1) (%MS)		
0	30,23	3,33	16,78A
0,5	30,63	1,39	16,01A
1	29,27	4,68	16,97A
Média	30,04a	3,13b	
			CV (%) = 9,95
	B2 (%MS)		
0	43,37	44,36	43,87A
0,5	42,33	47,44	44,89A
1	38,94	45,73	42,34A
Média	41,54b	45,85a	
			CV (%) = 7,72
	C (%MS)		
0	22,73	29,12	25,93A
0,5	23,07	26,52	24,79A
1	27,77	26,79	27,28A
Média	24,53a	27,48a	
			CV (%) = 13,53

CT: carboidratos totais; A: fração rapidamente degradável; B1: fração com degradação intermediária; B2: fração lentamente degradável; C: fração indigestível. Médias seguidas de mesma letra maiúscula/minúscula em mesma coluna/linha não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A adição de uréia elevou ($P < 0,05$) os valores da fração B2 do bagaço, com médias que variaram de 41,54 a 45,85%, independente da dose de enzima. Esta fração representa a fração correspondente à fibra potencialmente degradável, ou seja, são polissacarídeos que compõe a parede celular, como celulose e hemicelulose. É demonstrado no presente estudo a ineficiência do uso da uréia e enzimas fibrolíticas exógenas em solubilizar a parte fibrosa (celulose e hemicelulose) do bagaço de cana, pois os valores médios da variável FDN elevaram-se de 66,38 para 73,70% com a dose de 7% de uréia (base MS). Provavelmente, a não efetividade da uréia no processo de amoniólise deveu-se à baixa temperatura ambiental

durante o período da amonização (Mandell et al., 1988; Mann et al., 1988). A provável reduzida atividade ureática do bagaço, influenciou negativamente a reação enzimática de transformação da uréia em amônia.

Outra possibilidade, que atuando isoladamente ou em associação ao efeito negativo da temperatura, poderia ter sido a disponibilização do N através da uréia, disponibilizando este nutriente para os bolores e leveduras desenvolverem-se em razão do elevado teor de CNF (30,23%) encontrado neste bagaço. Este, mostrou-se superior aos teores de CNF de bagaços oriundos de usinas de álcool que apresentam valores médios de 17,36% (Ferreira et al., 2009), devido o método de extração do caldo da cana ser mais eficiente, quando comparado ao bagaço gerado em alambiques de produção de cachaça artesanal.

Este fator pode ter contribuído significativamente para que os microrganismos (bolores e leveduras) consumissem esses açúcares, elevando então a participação percentual da FDN, FDA, hemicelulose e celulose. Esta hipótese encontra amparo nos resultados encontrados na quantificação de bolores e leveduras onde foi observado um maior número de UFC/g no bagaço com a uréia, no momento da abertura dos sacos (Tabela 2).

Segundo Russel et al. (1992), alimentos com elevado teor da fração B2 provocam maior demanda de nitrogênio não-protéico para atender aos requisitos de microrganismos fermentadores de carboidratos estruturais.

Os valores da fração C, que representa a fração indigestível dos carboidratos, não diferiram significativamente, evidenciando a não interferência da adição de uréia e enzimas fibrolíticas sobre este parâmetro. De forma similar, Roth et al. (2010) trabalhando com amonização, não encontraram diferenças significativas sobre esta variável.

CONCLUSÕES

A aplicação de uréia no bagaço de cana eleva os teores de nitrogênio total e da fração A, reduzindo os teores das frações B1, B2, B3 e C dos compostos nitrogenados.

A aplicação de uréia no bagaço de cana eleva a fração B2 e reduz os carboidratos totais e fração A+B1 dos carboidratos.

O uso de enzimas fibrolíticas não afeta os teores das frações nitrogenadas e dos carboidratos do bagaço de cana.

REFERÊNCIAS

- BERTIPAGLIA, L.M.A.; DE LUCA, S.; MELO, G.M.P. et al. Avaliação de fontes de urease na amonização de fenos de *Brachiaria brizantha* com dois teores de umidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.378-386, 2005.
- BRODERICK, G.A. Manipulation of the dietary N-fractions to improve ruminal microbial synthesis and yield. **Proceedings of 22nd Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium**. Department of Animal Sciences, University of Florida, Gainesville, Florida 2011.
- CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; VELOSO, C.M. et al. Valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar amonizado com quatro doses de uréia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.125-132, 2006.
- FERREIRA, M.A.; SILVA, R.R.; RAMOS, A.O. et al. Síntese de proteína microbiana e concentrações de uréia em vacas alimentadas com dietas á base de palma forrageira e diferentes volumosos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.159-165, 2009.
- HRISTOV, A.N.; RODE, L.M.; BEAUCHEMIN, K.A. et al. Effect of a commercial enzyme preparation on barley silage *in vitro* and *in sacco* dry matter degradability. **Proceedings of Western Section of American Society of Animal Science**, v.47, p.282-284, 1996.
- KRAUSE, M.; BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M. et al. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2912-2920, 1998.
- KUNG JR, L.; COHEN, M.A.; RODE, L.M. et al. The effect of fibrolytic enzymes sprayed onto forages and fed in a total mixed ratio to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2396-2402, 2002.
- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, p.347-358, 1996.
- MANDELL, I.B.; CHRISTISON, G.I.; NICHOLSON, H.H. et al. The effect of variation in the water content of wheat straw before ammoniation on its nutritive value for beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v.20, p.111-124, 1988.
- MANN, M.E.; COHEN, R.D.H.; NICHOLSON, H.H. et al. The feeding value of ammoniate flax straw, wheat straw and wheat chaff for beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v.21, p.57-66, 1988.

- MARTINS, A.S.; VIEIRA, P.F.; BERCHIELLI, T.T. et al. Degradabilidade *in situ* e observações microscópicas de volumosos em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1927-1936, 2007.
- MILLER, G.H. Use a dinitro-salicílico acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-429, 1959.
- NUNES, C.S.; VELASQUEZ, P.A.T.; CARRILHO, E.N.V.M. et al. Material alternativo para confecção de filtros empregados na metodologia “nylon bag” para determinação de fibra. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, **Anais....** Goiânia, 2005. CD-ROM.
- PEREIRA, J.R.A.; ROSSI JR., P.P. **Manual de avaliação nutricional de alimentos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1994. 34p.
- PIRES, A.J.V.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Novilhas alimentadas com bagaço de cana-de-açúcar tratado com amônia anidra e, ou, sulfeto de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1078-1085, 2004.
- PIRES, A.J.V.; REIS, R.A.; CARVALHO, G.G.P. et al. Bagaço de cana-de-açúcar tratado com hidróxido de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.953-957, 2006 (supl.).
- REIS, R.A.; RODRIGUES, R.L.A.; PEREIRA, J.R.A. et al. Composição química e digestibilidade de fenos tratados com amônia anidra ou uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.666-673, 2001.
- ROTH, M.T.P.; REIS, R.A.; RESENDE, F.D. et al. Chemical treatment of post-harvest Marandu grass seed residues with different moisture contents. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.3, p.479-486, 2010.
- RUSSEL, J.B; O’CONNOR, J.D; FOX, D.G. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets – I Ruminant fermentation. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3551-3561, 1992.
- SANTOS, J.; CASTRO, A.L.A.; PAIVA, P.C.A. et al. Efeito dos tratamentos físicos e químicos no resíduo de lixadeira do algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.4, p.919-923, 2004.
- STATISTICAL ANALYSES SYSTEM - SAS. **User’s guide statistics**: version 8.0 edition. Cary, 1999. 956p.
- SATTER, L.D.; SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. **British Journal of Nutrition**, v.32, p.199-208, 1974.

- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 235p.
- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3562-3577, 1992.
- SOUZA, A.L.; GARCIA, R.; PEREIRA, O.G. et al. Valor nutritivo da casca de café tratada com amônia anidra. **Revista Ceres**, v.49, n.286, p.669-681, 2002.
- SUNDSTOL, F.; COXWORTH, E.M.; MOWAT, D.N. Mejora del valor nutritivo de la paja mediante tratamiento com amoníaco. **Revista Mundial de Zootecnia**, v.26, n.1, p.13-21, 1978.
- YOSHIOKA, H.; CHAVANICH, S.; NILUBOL, N. et al. Production and characterization of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.45, p.579-586, 1981.

CAPÍTULO 4

Degradabilidade *in vitro* do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

RESUMO - O experimento foi desenvolvido para avaliar a degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas. O bagaço de cana foi submetido a dois níveis de uréia (0 e 7%, com base na MS) e três níveis de enzimas fibrolíticas (0; 0,5 e 1%, com base na MS). Amostras de 0,5 g dos bagaços foram colocadas em sacos F-57 (ANKOM®) e incubadas nos jarros de vidro do fermentador ruminal TE-150 (TECNAL) por períodos de 0 (lavados diretamente), 6, 12, 18, 24, 48, 72 e 96 h. Para DIVMS, verificou-se interação ($P < 0,05$) entre uréia e enzimas fibrolíticas para tempo de colonização. Para o bagaço sem adição de uréia, a adição de enzimas não alterou este parâmetro. Porém, nos bagaços que receberam uréia foram encontrados maiores valores ($P < 0,05$) para o bagaço com 0,5% de enzimas, em relação ao bagaço que não recebeu enzimas e com 1% de enzimas, que diferiram ($P < 0,05$) entre si. Ao se estudar o fator uréia dentro das doses de enzimas, foram encontrados maiores valores ($P < 0,05$) nos bagaços que receberam uréia. A fração solúvel “a”, coeficiente “c”, e degradabilidade efetiva (DE) a taxas de passagem de 2, 5 e 8% decresceram ($P < 0,05$), enquanto que a fração potencialmente degradável “b” e degradabilidade potencial (DP) não sofreram alteração com o uso da uréia. A adição de enzimas fibrolíticas exógenas nas doses de 0,5 e 1% elevou a DE. Para DIVFDN, os parâmetros da degradação e degradabilidade avaliados, apresentaram valores semelhantes ($P > 0,05$). Conclui-se que a adição de uréia reduz a fração solúvel “a”, coeficiente “c” e degradabilidade efetiva (DE) da MS. A adição de enzimas fibrolíticas exógenas na dose de 0,5 e 1% eleva a DE da MS. O uso de uréia e enzimas fibrolíticas no bagaço de cana afeta o tempo de colonização da MS e não altera os parâmetros de degradação e degradabilidade da FDN.

Palavras-chave: celulase, hemicelulase, tratamento químico, volumoso

***In vitro* degradability of sugarcane bagasse with urea and exogenous fibrolytic enzymes**

ABSTRACT - The experiment was designed to evaluate the *in vitro* degradability of dry matter (IVDDM) and neutral detergent fiber (NDF) of sugarcane bagasse with urea and exogenous fibrolytic enzymes. The bagasse was subjected to two levels of urea (0 and 7% based on DM) and three levels of fibrolytic enzymes (0, 0.5 and 1% based on DM). Samples of 0.5 g of bagasse were placed in bags F-57 (ANKOM[®]) and incubated in glass jars in the artificial ruminal fermentator TE-150 (TECNAL) for periods of 0 (washed directly), 6, 12, 18, 24, 48, 72 and 96 h. For IVDDM, there was interaction ($P < 0.05$) between urea and fibrolytic enzymes to colonization time. For the bagasse without the addition of urea, the addition of enzymes did not change this parameter. However in the bagasses receiving urea were found higher values ($P < 0.05$) for the residue with 0.5% in relation to bagasse that did not receive enzymes and with 1% of enzymes, which differ ($P < 0.05$) between each other. By studying the factor urea within the doses of enzymes, were found higher values ($P < 0.05$) in the bagasses receiving urea. The soluble fraction "a", coefficient "c", and effective degradability (ED), passage rates of 2, 5, and 8% decrease ($P < 0.05$), while the fraction potentially degradable "b" and potential degradability (PD) did not change with the use of urea. The addition of exogenous fibrolytic enzymes at doses of 0.5 and 1% increases the ED. For IVDNDF, the degradation and degradability parameters evaluated were very similar ($P > 0.05$). It is concluded that the addition of urea reduces the soluble fraction "a", coefficient "c" and effective degradability (ED) of DM. The addition of exogenous fibrolytic enzymes in doses of 0.5 and 1% increases the ED of DM. The use of urea and fibrolytic enzyme of sugarcane bagasse affects the time of colonization of DM, and does not change the parameters of degradation and degradability of NDF.

Key Words: cellulase, chemical treatment, forage, hemicellulase

INTRODUÇÃO

O corte da cana-de-açúcar para processamento agroindustrial coincide com o período de escassez das pastagens. Assim, a elevada disponibilidade do bagaço da cana nas regiões onde tradicionalmente se produz aguardentes, representa uma alternativa para os problemas da redução da disponibilidade de alimentos volumosos para os ruminantes.

A produção brasileira de cana-de-açúcar na safra 2010-2011 foi estimada em 624,99 milhões de toneladas (CONAB, 2011), gerando uma produção anual de 187,49 milhões de toneladas de bagaço. Por outro lado, este volumoso constituído basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, tem sua utilização restrita por ser considerado de baixa qualidade nutricional.

Buscando melhorar o seu valor nutritivo, pesquisadores (Gesualdi et al., 2001; Sarmiento et al., 2001; Torres et al., 2003) têm despendido esforços para encontrar meios de melhorar a disponibilidade dos nutrientes para ruminantes. Algumas pesquisas têm apontado a amonização, com amônia anidra ou uréia, como alternativa viável para a melhoria da qualidade do bagaço de cana (Souza et al., 2002; Pires et al., 2004).

Para tratar volumosos de baixa qualidade e melhorar seu valor nutritivo, recomenda-se utilizar a uréia nas doses de 4 a 8% na base seca (Dolberg, 1992; Garcia & Neiva, 1994; Gobbi et al., 2005). Neste sentido, não existe um consenso da dose ideal de amônia ou uréia para melhorar o valor nutritivo de volumosos de baixa qualidade.

Uma das formas de se determinar a eficácia da amonização é por meio da avaliação da degradabilidade ruminal dos volumosos. De acordo com Paiva et al. (1995), a degradação ruminal e o consumo de alimentos, geralmente estão correlacionados, e o conhecimento da extensão da degradabilidade de forragens submetidas à amonização, permite portanto, obter estimativas da ingestão voluntária desses alimentos pelos ruminantes.

Pires et al. (2004) estudaram a degradabilidade ruminal da matéria seca (DRMS), da fibra em detergente neutro (DRFDN) e da fibra em detergente ácido (DRFDA) do bagaço de cana-de-açúcar com amônia anidra e/ou sulfeto de sódio (2,5% de Na₂S; 4% de NH₃ e 2,5% de Na₂S + 4% de NH₃); e relataram que o bagaço com amônia apresentou melhoria em relação ao controle, sendo observado valores de 38,3 a 65,5% para DRMS, de 44,03 a 51,64% para DRFDN e de 42,64 a 57,35% para DRFDA. De acordo com os mesmos autores, maiores valores para as degradabilidades efetivas da matéria seca (DEMS), da fibra em detergente neutro (DEFDN) e da fibra em detergente ácido (DEFDA) foram verificados para o bagaço

com amônia, não havendo influência do sulfeto de sódio sobre as frações estudadas, enquanto para a DEMS, os resultados foram semelhantes. Para a taxa de passagem de 2%, os maiores valores encontrados foram de 36,34 e 37,37% para DEMS, 29,80 e 28,58% para DEFND e, 30,98 e 30,66% para a DEFDA, respectivamente, para os bagaços com amônia e amônia mais sulfeto de sódio, enquanto o controle e o sulfeto de sódio apresentaram valores de 22,56 e 24,65%; 23,69 e 21,83%; e 21,79 e 22,89% para DEMS, DEFND e DEFDA, concluindo que o sulfeto não demonstrou eficiência no bagaço de cana-de-açúcar, mesmo quando associado à amônia.

Mais recentemente, pesquisas com o uso de enzimas fibrolíticas exógenas tem sido conduzidas com o objetivo de aumentar o valor nutritivo dos alimentos volumosos e palhadas na alimentação de ruminantes. A aplicação de enzimas fibrolíticas exógenas diretamente no alimento promove a liberação de carboidratos solúveis e remove barreiras estruturais que limitam a digestão dos alimentos pelos microrganismos ruminais (Beauchemin et al., 2000).

Estudos têm indicado aumento na degradabilidade *in situ* da MS de 70,8 para 71,1% e da FDN de 63,6 para 64,0% quando enzimas fibrolíticas foram adicionadas à dieta de ruminantes em comparação ao controle (Lewis et al., 1996). Resultados promissores também foram encontrados por Tang et al. (2008), onde relataram que os níveis de enzimas fibrolíticas (celulase e xilanase) de 5,0 e 7,5 g/kg MS proporcionaram os maiores valores de DIVMS e DIVMO em palhadas de cereais.

O tratamento de resíduos com elevado teor de fibra com uréia ou enzimas fibrolíticas, tem isoladamente, proporcionado incrementos na degradabilidade ruminal e digestibilidade destes volumosos. Entretanto, o uso de enzimas fibrolíticas exógenas, posteriormente à amoniólise, não foi ainda verificado no bagaço de cana.

Assim, objetivou-se avaliar a cinética de degradação ruminal *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas (celulases e hemicelulases).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, no Campus de Vitória da Conquista, BA, no período de 30 de

junho a 04 de agosto de 2010, com temperatura média de 17,3 °C, apresentando média para a máxima e mínima de 22,19 e 14,12 °C, respectivamente, durante o período experimental.

Realizou-se delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3, sendo duas doses de uréia (0 e 7%) e três doses de enzimas (0; 0,5 e 1%) com base na matéria seca, com 3 repetições (U0E0: testemunha; U0E05: 0% de uréia + 0,5% de enzimas; U0E1: 0% de uréia + 1% de enzimas; U7E0: 7% de uréia + 0% de enzimas; U7E05: 7% de uréia + 0,5% de enzimas e U7E1: 7% de uréia + 1% de enzimas).

As enzimas fibrolíticas exógenas utilizadas, foram extraídas dos fungos *Aspergillus aculeatus* e *Humicola insolens*. O produto¹ constituiu de celulases e hemicelulases, na forma líquida, de coloração marrom, com densidade de 1,2 g/mL, tendo como condições ótimas para atividade enzimática da celulase 45-50 °C e pH 4,5-6,5, e da hemicelulase 40-60 °C e pH 5,0-6,5. Esta última, além da hemicelulase, contém outras enzimas, incluindo β -glucanases, xilanases, arabinases, celulases e pentosanases.

Para a avaliação da atividade das enzimas celulases e hemicelulases, utilizou-se a metodologia descrita por Yoshioka et al. (1981) e Miller (1959). Para o preparo do meio, foram homogeneizados 10 g de farelo de trigo, 10 mL de água destilada e esterilizados. O preparo das enzimas foi feito com 9,95 mL de água destilada e 50 μ L de enzima, sendo utilizados 2 mL da solução. Foi feito controle positivo com solução de glicose a 0,5% em água destilada e outro, constituído apenas por farelo de trigo. Após período de incubação de 48 h, os extratos (triplicatas) foram obtidos por filtração com bomba a vácuo, e as leituras das respectivas absorbâncias, determinadas em espectrofotômetro, modelo Cintra 20, da GBC em λ de 540 nm. A quantificação dos açúcares redutores dos extratos recuperados, que representam as atividades das enzimas, foram de 51 e 28 mg/mL para celulases e hemicelulases, respectivamente, mostrando a efetividade das enzimas.

O bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) utilizado, foi adquirido em usina de produção artesanal de cachaça da região de Vitória da Conquista-BA e, após o descarregamento, foi picado em máquina forrageira estacionária.

No bagaço de cana (4,5 kg de MN por unidade experimental) sem adição de uréia, apenas enzimas (U0E05 e U0E1), após mensurar o pH e sem necessitar ajustá-los, as quantidades de 7,5 mL e 15 mL de enzimas, que correspondem a 0,5% e 1% de enzimas na base seca, foram diluídas em 100 mL de água destilada, na proporção de 60% de celulase e 40% de hemicelulase, sendo borrifadas no bagaço, deixando-as agir por 30 min (Kung Jr. et

¹ Novozymes Latin America Ltda: celulase (NS 50013) e hemicelulase (NS 22022).

al., 2002). Em seguida, foram coletadas amostras de cada unidade experimental, acondicionadas em sacos plásticos identificados e armazenadas sob refrigeração para posteriores análises. O restante do material foi vedado com fitas adesivas em sacos de polietileno com dimensões de 0,50 x 0,70 m e armazenados em local protegido e cobertos com lona plástica durante o mesmo período do bagaço de cana com uréia.

No bagaço de cana com inclusão de uréia usou-se a quantidade de 7% de uréia (base MS), onde foi misturada ao bagaço (4,5 kg de MN por unidade experimental), homogeneizadas e acondicionadas em sacos de polietileno com dimensões de 0,50 x 0,70 m. Após o enchimento, todos os sacos foram vedados com fitas adesivas e armazenados em local protegido e cobertos com uma lona plástica durante o período de 35 dias, como recomendado por Sundstol et al. (1978).

Ao final do período de amonização, os sacos foram abertos e aerados por 6 h para permitir a liberação do excesso de amônia. Apenas no bagaço de cana com 7% de uréia e 1% de enzimas, devido à elevação do pH (6,90) após a amonização, foi necessário ajustar o pH para 5,0, utilizando 75 mL de ácido sulfúrico 1,0N borrifado. Logo após, foi aplicada a dose proposta de enzimas, da mesma forma do bagaço de cana com 0% de uréia e 0,5% de enzimas, e 0% de uréia e 1% de enzimas, deixando-as agir por 30 min. Em seguida foram coletadas amostras, acondicionadas em sacos plásticos identificados e armazenadas sob refrigeração, para posteriores análises.

As amostras coletadas em cada combinação, uréia e enzimas, foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 65 °C, por 72 h, sendo posteriormente processadas em moinho tipo “Willey” com peneira de crivos de 1 mm. A composição químico-bromatológica, carboidratos não-fibrosos (CNF) (Tabela 1), e contagem de unidades formadoras de colônias (Tabela 2) dos bagaços estudados, foram obtidas segundo metodologia descrita por Silva & Queiroz (2005), Nunes et al. (2005), Sniffen et al. (1992) e Silva et al. (1997).

Para a coleta do líquido ruminal, utilizaram-se duas vacas holandesas, canuladas no rúmen, com peso vivo médio de 500 kg, mantidas em pasto de *Brachiaria decumbens*. Os fluídos colhidos dos dois animais foram misturados para compor o volume necessário. A solução tampão foi preparada em recipientes pré-aquecidos (39 °C). A solução A (g/litro) composta por: 10,0 g KH_2PO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g NaCl ; 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 g uréia; e a solução B (g/100mL): 15,0 g Na_2CO_3 ; 1,0 g $\text{Na}_2\text{S}_9\text{H}_2\text{O}$. As soluções foram misturadas adicionando-se cerca de 266 mL de solução B para 1330 mL de solução A (relação 1:5), a um pH final de 6,8 e temperatura de 39 °C. Para determinar a degradabilidade *in vitro*

da MS e FDN do bagaço, foi utilizada metodologia ANKOM® (ANKOM TECHNOLOGY, 2010), adaptada ao rúmen artificial, utilizando a incubadora TE-150 (TECNAL). Foram colocados 0,5 g de amostra do bagaço de cana em sacos de filtro (F-57 ANKOM®), que em seguida foram lacrados a quente utilizando-se uma seladora com lâmina incandescente marca Barbi M-300T. Os sacos foram colocados em sete jarros de incubação de vidro, sendo 24 amostras por jarro. Cada jarro correspondeu a um dos tempos de incubação, sendo 0 (lavados diretamente), 6, 12, 18, 24, 48, 72 e 96 horas.

Tabela 1. Composição químico-bromatológica do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Variáveis	Tratamentos					
	U0E0	U0E05	U0E1	U7E0	U7E05	U7E1
MS (%)	40,14	38,77	39,16	36,08	33,71	35,93
PB (%MS)	1,21	1,21	1,28	18,94	20,48	19,72
FDN (%MS)	66,58	65,65	66,92	73,93	74,34	72,83
FDNcp	66,10	65,39	66,72	73,49	73,97	72,52
FDA (%MS)	46,36	45,60	45,80	52,34	50,19	50,71
Extrato etéreo	1,44	1,75	1,68	3,14	3,03	1,75
Hemicelulose (%MS)	23,51	23,21	23,57	25,08	26,08	24,35
Celulose (%MS)	35,65	34,96	34,95	40,48	39,46	39,41
Lignina (%MS)	9,47	9,61	11,30	12,14	11,05	11,16
Cinzas (%MS)	1,02	1,01	1,05	1,10	1,14	1,33
NIDA (%NT)	28,86	12,22	22,73	3,31	3,18	3,16
NIDN (%NT)	40,66	29,26	27,57	4,41	4,52	4,07
CNF (%MS)	30,23	30,63	29,27	3,33	1,39	4,68

U0E0: testemunha; U0E05: 0% de uréia + 0,5% enzimas; U0E1: 0% de uréia + 1% de enzimas; U7E0: 7% de uréia + 0% de enzimas; U7E05: 7% de uréia + 0,5% de enzimas; U7E1: 7% de uréia + 1% de enzimas; MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDNcp: fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; FDA: fibra em detergente ácido; NIDA: nitrogênio insolúvel em detergente ácido; NIDN: nitrogênio insolúvel em detergente neutro; CNF: carboidratos não-fibrosos.

Tabela 2. Unidades formadoras de colônias (LogUFC/g) em bolores e leveduras no bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Tratamento	LogUFC/g
U0E0	15,87
U0E05	12,80
U0E1	13,17
U7E0	18,17
U7E05	17,63
U7E1	18,03

U0E0: testemunha; U0E05: 0% de uréia + 0,5% enzimas; U0E1: 0% de uréia + 1% de enzimas; U7E0: 7% de uréia + 0% de enzimas; U7E05: 7% de uréia + 0,5% de enzimas; U7E1: 7% de uréia + 1% de enzimas.

Após o período de incubação, os sacos de filtro foram retirados e lavados em água corrente, até o total clareamento, por aproximadamente 5 min. Após a lavagem, todos os sacos foram secos em estufa de ventilação forçada (65 °C/48 h), e na sequência, em estufa não-ventilada (105 °C/4 h), acondicionados em dessecador e pesados.

A determinação da degradação da FDN foi efetuada de acordo com a metodologia ANKOM® (ANKOM TECHNOLOGY, 2010), com o uso do aparelho para determinação da fibra TE-149 (TECNAL). Após a digestão em detergente neutro por 1 h a 100 °C, os sacos de filtro foram lavados em água quente 4 vezes durante 5 min, e acetona durante 5 min. Após esse tratamento, os sacos foram secos em estufa de ventilação forçada (65 °C/48 h) e em estufa não-ventilada (105 °C/4 h), acondicionados em dessecador e pesados.

As estimativas da fração degradada da matéria seca e da FDN foram obtidas pela diferença de peso encontrada entre as pesagens efetuadas antes e após a incubação no rúmen artificial e a extração com detergente neutro, expressos em porcentagem.

Foi utilizado o modelo de McDonald (1981) para a estimativa da degradabilidade potencial da MS e parâmetros da cinética da degradabilidade ruminal de cada bagaço de cana, de acordo com a fórmula: $p = a + b(1 - e^{-c \times (t-L)})$, em que “p”, é degradabilidade potencial; “a”, fração solúvel em água; “b”, fração potencialmente degradável; “c”, taxa de degradação da fração “b” (h^{-1}); “t”, tempo de incubação (h) e “L”, tempo de colonização.

Para a fração fibrosa (FDN), foi utilizado o modelo de Mertens & Loften (1980), de acordo com a fórmula: $\hat{Y} = b \times e^{(-c \times (T-L))} + I$ quando $t > L$ e $\hat{Y} = b + I$ quando $0 < t < L$, onde “Y” é o resíduo não degradável no tempo T; “b”, a fração potencialmente degradável da fibra (no tempo $t \leq L$, $b = \hat{Y} - I$); “c”, a taxa de degradação de b (h^{-1}); “T”, o período de incubação, em horas; “L”, a latência ou tempo de incubação (h); e “I”, a fração indigestível da fibra.

A degradabilidade efetiva ou real do bagaço de cana-de-açúcar foi calculada pela fórmula: $p = a + [(b \times c) / (c + k) \times e^{-(c+k) \times L}]$ em que “k” é a taxa de passagem (McDonald, 1981). Utilizaram-se as taxas de passagem de 2, 5 e 8% para o cálculo da degradabilidade efetiva.

Utilizou-se um esquema fatorial 2 x 3, com duas doses de uréia (0 e 7%) e três doses de enzimas fibrolíticas (0; 0,5 e 1%), em delineamento inteiramente casualizado, com seis combinações entre, dose de uréia e enzimas fibrolíticas, e três repetições, em oito períodos de incubação (0, 6, 12, 18, 24, 48, 72 e 96 horas). O ensaio foi analisado como parcelas subdivididas, onde os tratamentos corresponderam às parcelas, e os tempos de incubação, às subparcelas. Os dados obtidos foram interpretados estatisticamente por meio de análise de

variância, e as médias comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As médias foram analisadas com o auxílio do programa estatístico SAS (1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exceção da fração “b” e degradabilidade potencial (DP), observou-se efeito significativo do uso da uréia ($P < 0,05$) para a fração “a”, coeficiente “c” e degradabilidade efetiva (DE), e apenas para DE observou-se efeito das enzimas fibrolíticas exógenas, havendo interação entre a uréia e as doses de enzimas fibrolíticas para o tempo de colonização nos parâmetros da degradabilidade ruminal *in vitro* da matéria seca (Tabela 3 e 4 e Figura 1).

Para a fração “a”, observou-se que nos bagaços de cana amonizados, os valores médios foram significativamente menores (29,07%), quando comparados ao bagaço de cana sem uréia (32,78%).

Normalmente na literatura, relata-se que o uso da uréia em amonização promove aumento no teor de nitrogênio não-protéico, e como este é altamente solúvel em água, ocorre aumento da fração “a” (Carvalho et al., 2007), o que não foi constatado no presente trabalho, para esta fração. Uma das possíveis hipóteses reside no fato de os microrganismos (bactérias e leveduras) utilizarem o N que foi disponibilizado através da uréia, que foi utilizada como nutriente para desenvolverem-se, consumindo a elevada quantidade de carboidratos não fibrosos (30,23%) existentes no bagaço de cana. Esta hipótese encontra amparo na maior quantidade de UFC nos bagaços com uréia (Tabela 2).

O uso de uréia e enzimas fibrolíticas exógenas não influenciou ($P > 0,05$) a fração “b”, apresentando valor médio para esta variável de 28,97%. Dessa forma, observa-se que a amônia liberada pela adição da uréia não foi eficiente em solubilizar a hemicelulose do bagaço de cana, sendo que desta forma proporcionaria aumento da fração “b” do bagaço de cana. Pires et al. (2004) verificaram menores valores da fração “b” no bagaço de cana controle e com Na_2S (40,85 e 44,74%), e maiores para os bagaços com NH_3 e com $\text{NH}_3 + \text{Na}_2\text{S}$ (53,26 e 48,81%), respectivamente. Diferenças nesta fração foram também constatadas por Martins et al. (2007) em bagaço de cana, sem e com adição de enzimas fibrolíticas exógenas, com valores de 33,27 e 42,57%, respectivamente.

Tabela 3. Parâmetros médios da degradabilidade ruminal *in vitro* da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Enzima (%)	Uréia (%)		Média
	0	7	
	a ¹ (%)		
0	32,12	28,39	30,25A
0,5	32,77	29,37	31,07A
1	33,46	29,44	31,45A
Média	32,78a	29,07b	
			CV (%) = 2,61
	b ² (%)		
0	27,50	28,76	28,12A
0,5	28,22	32,91	30,57A
1	26,81	29,63	28,22A
Média	27,51a	30,43a	
			CV (%) = 12,41
	c ³ (%/h)		
0	0,03	0,02	0,02A
0,5	0,03	0,02	0,02A
1	0,03	0,03	0,02A
Média	0,03a	0,02b	
			CV (%) = 23,96
	DP ⁴ (%)		
0	59,62	57,15	58,38A
0,5	60,99	62,29	61,64A
1	60,27	59,08	59,67A
Média	60,29a	59,51a	
			CV (%) = 5,48
	DE ⁵ 2%/h (%)		
0	45,84	38,62	42,23B
0,5	46,52	39,57	43,04AB
1	46,91	41,81	44,36A
Média	46,42a	40,00b	
			CV (%) = 2,68
	DE ⁵ 5%/h (%)		
0	39,96	32,95	36,45B
0,5	40,37	33,47	36,92AB
1	41,01	35,58	38,29A
Média	40,44a	34,00b	
			CV (%) = 2,78
	DE ⁵ 8%/h (%)		
0	37,30	30,84	34,07B
0,5	37,69	31,41	34,55AB
1	38,44	33,08	35,76A
Média	37,81a	31,77b	
			CV (%) = 2,83
	Tempo de colonização (h)		
0	3,45Ab	9,21Ba	6,33
0,5	3,97Ab	11,35Aa	7,66
1	3,02Ab	6,23Ca	4,62
Média	3,48	8,93	
			CV (%) = 14,37

¹fração solúvel; ²fração potencialmente degradável; ³taxa de degradação da fração b; ⁴degradabilidade potencial, ⁵degradabilidade efetiva. Médias seguidas de mesma letra maiúscula/minúscula em mesma coluna/linha não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Para o coeficiente “c”, observou-se médias significativamente menores nos bagaços de cana amonizados (0,02%/h) quando comparados ao bagaço de cana sem uréia (0,03%/h). Resultados semelhantes para taxa de degradação foram encontrados por Carvalho et al. (2007) com bagaço de cana amonizado com uréia, sendo os valores de 0,035 e 0,036%/h para 0 e 7,5% de uréia (base MS), respectivamente; e Krueger et al. (2008) trabalhando com enzimas fibrolíticas (Biocellulase A20) e NH₃ em feno de capim bermuda, relataram que o coeficiente “c” não foi afetado, apresentando valores de 4,75; 5,14; 4,27; 3,84 e 4,09%/h para o controle, NH₃, enzimas aplicadas após o corte, no enfardamento e no momento da alimentação dos animais, respectivamente.

Tabela 4. Equações ajustadas para a degradabilidade ruminal *in vitro* da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Tratamento	Equações ajustadas	R2
U0E0	$\hat{Y} = p = 32,12 + 27,50 \times (1 - e^{-0,033 \times (t-3,45)})$	96,35
U0E05	$\hat{Y} = p = 32,77 + 28,22 \times (1 - e^{-0,028 \times (t-3,97)})$	96,17
U0E1	$\hat{Y} = p = 33,46 + 26,81 \times (1 - e^{-0,028 \times (t-3,02)})$	97,57
U7E0	$\hat{Y} = p = 28,39 + 28,76 \times (1 - e^{-0,023 \times (t-9,21)})$	96,22
U7E05	$\hat{Y} = p = 29,37 + 32,91 \times (1 - e^{-0,019 \times (t-11,35)})$	94,00
U7E1	$\hat{Y} = p = 29,44 + 29,63 \times (1 - e^{-0,025 \times (t-6,23)})$	96,81

U0E0: testemunha; U0E05: 0% de uréia + 0,5% enzimas; U0E1: 0% de uréia + 1% de enzimas; U7E0: 7% de uréia + 0% de enzimas; U7E05: 7% de uréia + 0,5% de enzimas; U7E1: 7% de uréia + 1% de enzimas.
 $p = a + b (1 - e^{-c \times (t-L)})$, em que “p” é degradabilidade potencial; “a”, fração solúvel em água; “b”, fração potencialmente degradável; “c”, taxa de degradação da fração “b” (h⁻¹); “t”, tempo de incubação (h) e “L”, tempo de colonização.

O uso de uréia e enzimas fibrolíticas exógenas não influenciou (P>0,05) a DP, apresentando valor médio de 59,89%, e para DE observou-se médias significativamente menores nos bagaços com uréia, com valores de 40,00; 34,00 e 31,77%, e de 46,42; 40,44 e 37,81% sem uréia, para taxas de passagem de 2; 5 e 8%/h, respectivamente. Estes resultados são diferentes dos encontrados por Carvalho et al. (2007) ao amonizarem o bagaço de cana com uréia nas doses de 0; 2,5; 5,0 e 7,5% (base MS), que obtiveram para as doses de uréia utilizadas, os valores de 41,36; 46,06; 66,27 e 71,87% para DP; 26,32; 29,61; 42,60 e 46,20% para DE com taxa de passagem de 2%; 17,03; 19,28; 27,74 e 30,09% com taxas de passagem de 5%; e 12,59; 14,29; 20,57 e 22,30% com taxa de passagem de 8%, respectivamente.

Quando volumosos são amonizados, há uma tendência dos parâmetros da degradabilidade aumentarem devido ao incremento no teor protéico do alimento, assim como ocorrer à solubilização da hemicelulose, com decréscimo nos teores de FDN, o que elevaria as taxas de degradação destes materiais. O decréscimo encontrado na fração solúvel (a) para o

bagaço com uréia em relação ao não tratado (32,78 e 29,07%, respectivamente) influenciou negativamente os resultados da degradabilidade efetiva (Tabela 3).

Em relação à aplicação de enzimas fibrolíticas exógenas, as maiores degradabilidades efetivas a taxas de passagem de 2; 5 e 8%/h, foram observadas nos bagaços de cana que receberam as doses de 0,5 e 1% de enzimas, que não diferiram ($P>0,05$) entre si, entretanto, o bagaço de cana com 0 e 0,5% de enzimas não diferiram ($P>0,05$) entre si. Segundo Beauchemin et al. (2000) a aplicação de enzimas fibrolíticas exógenas diretamente no alimento promove a liberação de carboidratos solúveis, devido a remoção de barreiras estruturais que limitariam a digestão dos alimentos pelos microrganismos ruminais.

Martins et al. (2007), trabalhando também com o bagaço de cana, demonstraram aumento da DP de 38,5 para 47,2% e DE (2%/h) da MS de 28,22 para 31,43% sem e com adição de enzimas fibrolíticas exógenas, respectivamente. Estes autores relataram que o teor de fibra existente no bagaço de cana pode ter disponibilizado maior número de sítios de degradação para a atuação enzimática, de origem microbiana ou do próprio suplemento, uma vez que as enzimas foram aplicadas dentro do rúmen através de cânula ruminal, com isso propiciando maior tempo de contato entre a enzima e o bagaço.

Ao se avaliar o tempo de colonização verificou-se que para o bagaço de cana sem adição de uréia, a adição de enzimas fibrolíticas não alterou este parâmetro. Porém nos bagaços de cana que receberam uréia foram encontrados maiores valores ($P<0,05$) para o bagaço com 0,5% de enzimas fibrolíticas em relação ao bagaço de cana que não recebeu enzimas e com 1% de enzimas, que diferiram ($P<0,05$) entre si. Ao se estudar o fator uréia dentro das doses de enzimas foram encontrados maiores valores ($P<0,05$) nos bagaços que receberam uréia.

Miranda et al. (1999) relataram valores de 2,5 a 3,0 h de tempo de colonização em incubações com restos da cultura de milho com 70% de FDN; e Krueger et al. (2008) trabalhando com feno de capim bermuda, encontraram valores de 5,1; 4,3; 5,5; 3,7 e 4,4 h para tempo de colonização nos respectivos tratamentos: controle, NH_3 (3% base MS) e enzimas fibrolíticas exógenas (16,5 g/t) aplicadas no momento do corte, no enfardamento e no momento da alimentação, os quais são menores que os observados neste estudo.

Deve ser levado em conta que quanto menor o tempo de colonização, mais rapidamente a microbiota ruminal conseguirá degradar o alimento, com isso, alimentos de baixa degradabilidade ruminal necessitam de um tempo mais longo para a ação dos microrganismos ruminais. Diante deste fato, observou-se que o uso da uréia e das enzimas fibrolíticas

exógenas no bagaço de cana não contribuíram para diminuir o tempo de colonização, contrariando o esperado ocorreu elevação para este parâmetro.

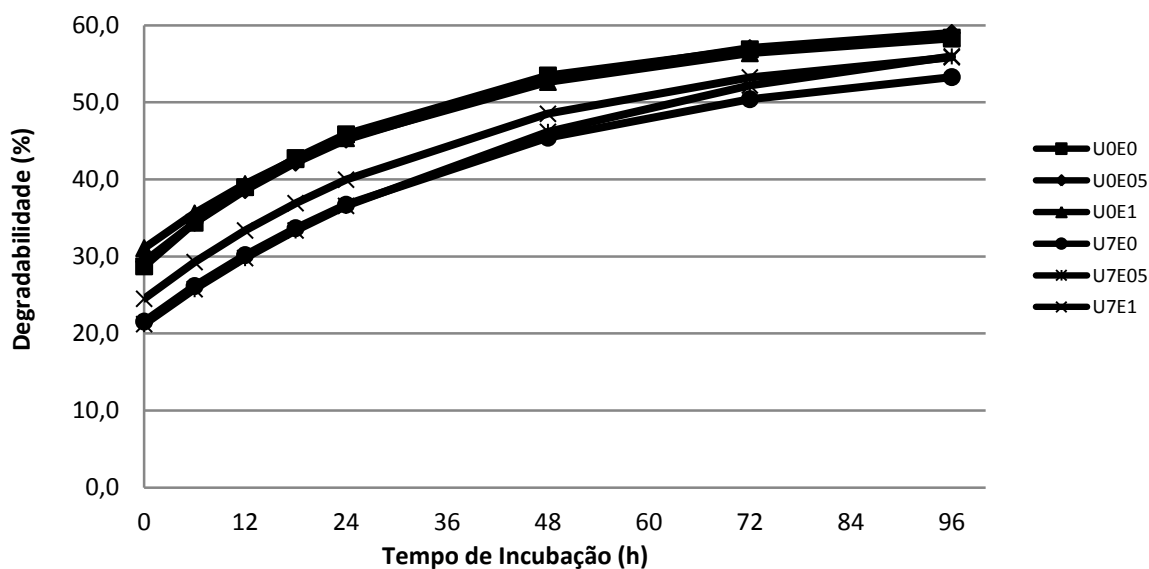


Figura 1. Cinética da fermentação ruminal *in vitro* da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

A fração “b”, o coeficiente “c”, a fração indigestível da fibra “I”, DE nas taxas de passagem de 2, 5 e 8%/h e tempo de colonização da degradabilidade ruminal *in vitro* da FDN não foram alterados, não havendo efeito significativo do uso da uréia e das enzimas ($P>0,05$) e nem interação entre as mesmas para nenhuma destas variáveis (Tabela 5 e 6 e Figura 2).

Carvalho et al. (2007) verificaram decréscimo na fração indigestível “I”, com valores que foram de 61,34 para 36,07%, e aumentos na fração “b”, que foram de 38,66 para 63,93%, DP e DE (2, 5 e 8%/h) da FDN que foram de 38,66 para 63,93% e de 23,20 para 41,88%, 14,50 para 27,61% e 10,54 para 20,59%, respectivamente, com a adição de 7,5% de uréia (base MS) ao bagaço de cana, reforçando os relatos da literatura de que, em volumosos amonizados, ocorre solubilização parcial da hemicelulose e expansão da parede celular, permitindo desta forma, que os microrganismos do rúmen tenham maior superfície específica para se aderirem e, conseqüentemente, aumentar a degradabilidade ruminal do material.

Tabela 5. Parâmetros médios da degradação e degradabilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Enzima (%)	Uréia (%)		Média
	0	7	
	b ¹ (%)		
0	38,97	37,47	38,22A
0,5	39,77	40,30	40,03A
1	39,83	39,17	39,50A
Média	39,52a	38,98a	
			CV (%) = 5,48
	c ² (%/h)		
0	0,05	0,04	0,04A
0,5	0,04	0,04	0,04A
1	0,04	0,04	0,04A
Média	0,04a	0,04a	
			CV (%) = 24,35
	I ³ (%)		
0	61,03	62,53	61,78A
0,5	60,23	59,70	59,96A
1	60,16	60,83	60,49A
Média	60,47a	61,02a	
			CV (%) = 3,54
	DE ⁴ 2%/h (%)		
0	20,68	19,74	20,21A
0,5	21,50	20,73	21,11A
1	24,09	21,70	22,89A
Média	22,09a	20,72a	
			CV (%) = 10,22
	DE ⁴ 5%/h (%)		
0	18,64	17,75	18,19A
0,5	19,63	18,36	18,99A
1	22,85	19,62	21,23A
Média	20,37a	18,58a	
			CV (%) = 13,20
	DE ⁴ 8%/h (%)		
0	16,83	15,96	16,39A
0,5	17,92	16,30	17,11A
1	21,69	17,75	19,72A
Média	18,81a	16,67a	
			CV (%) = 16,40
	Tempo de colonização (h)		
0	3,62	3,55	3,58A
0,5	3,07	4,13	3,60A
1	1,84	3,44	2,64A
Média	2,84a	3,71a	
			CV (%) = 36,41

¹fração potencialmente degradável; ²taxa de degradação da fração b; ³fração indigestível da fibra; ⁴degradabilidade efetiva. Médias seguidas de mesma letra maiúscula/minúscula em mesma coluna/linha não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Pires et al. (2004) observaram comportamento semelhante para a FDN residual, para o bagaço de cana-de-açúcar controle e com Na₂S, bem como para o bagaço com NH₃ e NH₃ mais Na₂S. Maiores valores da fração potencialmente degradável “b” e menores valores da

fração indigerível “I” foram verificados para o bagaço com NH₃, independentemente do sulfeto de sódio, com valores de 44,03; 41,06; 51,64; e 53,43% para “b” e 51,56; 49,79; 34,07; e 34,49% para “I”, respectivamente, para o bagaço controle, Na₂S, NH₃ e NH₃ mais Na₂S. Verificou-se, portanto, a eficiência da amônia anidra no aumento da degradabilidade da fibra em detergente neutro para o bagaço de cana-de-açúcar com NH₃, independentemente do sulfeto de sódio.

No presente experimento é demonstrado a não efetividade da reação de amoniólise nas ligações ésteres da parede celular e das enzimas fibrolíticas exógenas sobre a celulose e hemicelulose do bagaço de cana, sendo notado que, para a fração “b” (potencialmente degradável) da degradação da MS e da FDN, as médias foram semelhantes em todos os bagaços de cana e a fração indigestível “I” da fibra em detergente neutro não sofreu alteração.

Tabela 6. Equações ajustadas para a fibra em detergente neutro residual do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

Tratamento	Equações ajustadas	R2
U0E0	$\hat{Y} = 38,97 \times e^{(-0,050 \times (T-3,62))} + 61,03$	97,34
U0E05	$\hat{Y} = 39,76 \times e^{(-0,039 \times (T-3,06))} + 60,23$	97,40
U0E1	$\hat{Y} = 39,83 \times e^{(-0,044 \times (T-1,84))} + 60,16$	97,81
U7E0	$\hat{Y} = 37,47 \times e^{(-0,038 \times (T-3,55))} + 62,53$	98,40
U7E05	$\hat{Y} = 40,13 \times e^{(-0,038 \times (T-4,13))} + 59,70$	97,97
U7E1	$\hat{Y} = 39,17 \times e^{(-0,045 \times (T-3,44))} + 60,83$	98,68

U0E0: testemunha; U0E05: 0% de uréia + 0,5% enzimas; U0E1: 0% de uréia + 1% de enzimas; U7E0: 7% de uréia + 0% de enzimas; U7E05: 7% de uréia + 0,5% de enzimas; U7E1: 7% de uréia + 1% de enzimas.

$\hat{Y} = b \times e^{(-c \times (T-L))} + I$, em que “Y” é o residuo não degradável no tempo T; “b”, a fração potencialmente degradável da fibra; “c”, a taxa de degradação de b (h⁻¹); “T”, o período de incubação, em horas; “L”, a latência ou tempo de incubação (h); e “I”, a fração indigestível da fibra.

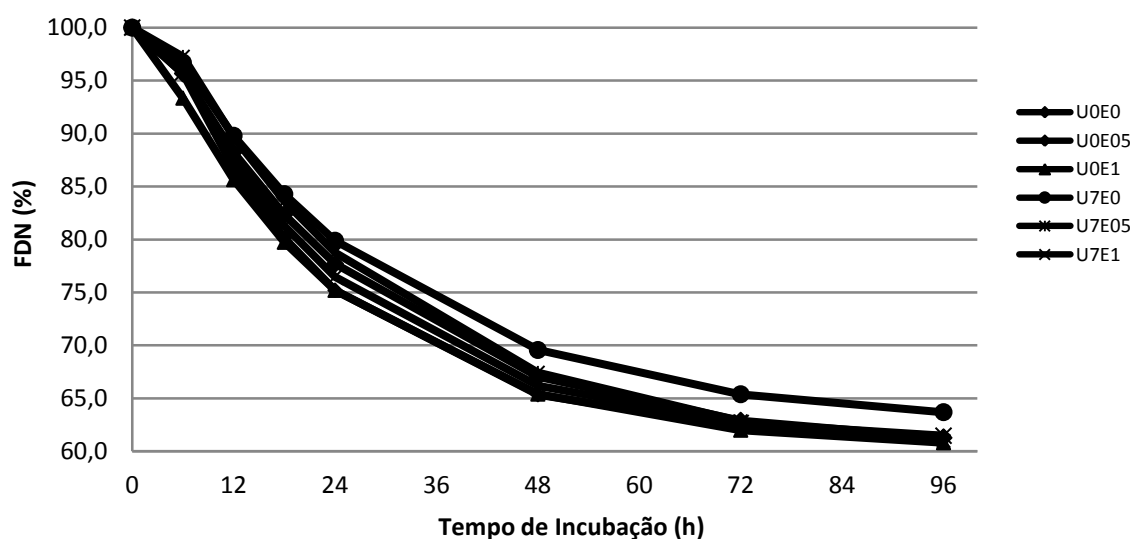


Figura 2. Cinética da fermentação ruminal *in vitro* da fibra em detergente neutro do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas

CONCLUSÕES

A adição única de uréia reduz a fração solúvel “a” e o coeficiente “c”, e o uso de enzimas fibrolíticas exógenas nas doses de 0,5 e 1% proporciona aumento nas degradabilidades efetivas da matéria seca.

O uso de enzimas fibrolíticas exógenas não afeta o tempo de colonização, contudo, a adição de enzimas na dose de 0,5% aumenta o tempo de colonização do bagaço de cana com a uréia para a degradabilidade da matéria seca.

A combinação de uréia com enzimas fibrolíticas exógenas não altera a degradabilidade da fibra em detergente neutro do bagaço de cana.

Sugere-se que outras pesquisas sejam feitas com a uréia e com um tempo maior de ação das enzimas fibrolíticas exógenas sobre a parte fibrosa do bagaço de cana-de-açúcar, para embasar a recomendação dessa prática.

REFERÊNCIAS

ANKOM TECHNOLOGY - 08/05, *In Vitro* True Digestibility using the DAISY^{II} Incubator [on line], 2010. Disponível em <<http://www.ankom.com>> Acesso em 15 de julho de 2010.

- BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M.; YANG, W.Z. et al. Enzymes and direct fed microbials in diets dairy cows, 2000. In: **PROCEEDINGS OF THE TRISTATE NUTRITION CONFERENCE**, 2000. 10 p.
- CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; GARCIA, R. et al. Degradabilidade *in situ* da matéria seca e da fração fibrosa do bagaço de cana-de-açúcar tratado com uréia. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.3, p.447-455, 2007.
- CONAB (2011). Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar 2010/2011: terceiro levantamento, 2011. 19 p. Disponível em:
<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_09_14_50_boletim_cana_3o_lev_safra_2010_2011..pdf> Acesso em: 03 fevereiro 2011.
- DOLBERG, F. Program in the utilization of urea – ammonia treated crop residues: nutritional dimensions and application of the technology on small farm. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES, Lavras, MG. 1992, **Anais...** p.130-145.
- GARCIA, R.; NEIVA, J.N.M. Utilização da amonização na melhoria da qualidade de volumosos para ruminantes. In: SIMPÓSIO NORDESTINO DE ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, 5., Salvador, 1994. **Anais...** Salvador: Sociedade Nordestina de Produção Animal, 1994. p.41-61.
- GESUALDI, A.C.L.S.; SILVA, J.F.C.; VASQUES, H.M. et al. Efeito da amonização sobre a composição, retenção de nitrogênio e a conservação do bagaço e da ponta de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.2, p.508-517, 2001.
- GOBBI, K.F.; GARCIA, R.; GARCEZ NETO, A.F. et al. Composição química e digestibilidade *in vitro* do feno de *Brachiaria decumbens* Stapf. tratado com uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.720-725, 2005.
- KRUEGER, N.A.; ADESOGAN, A. T.; STAPLES, C.R. Effect of method of applying fibrolytic enzymes or ammonia to Bermudagrass hay on feed intake, digestion, and growth of beef steers. **Journal of Animal Science**, v.86, p.882-889, 2008.
- KUNG JR, L.; COHEN, M.A.; RODE, L.M. et al. The effect of fibrolytic enzymes sprayed onto forages and fed in a total mixed ratio to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2396-2402, 2002.
- LEWIS, G.E.; HUNT, C.W.; SANCHEZ, W.K. et al. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a foragebased diet fed to beef steers. **Journal of Animal Science**, v.74, n.3, p.3020-3028, 1996.

- MARTINS, A.S.; VIEIRA, P.F.; BERCHIELLI, T.T. et al. Degradabilidade *in situ* e observações microscópicas de volumosos em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1927-1936, 2007.
- McDONALD, I. 1981. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, v.96, p.251-252, 1981.
- MERTENS, D.R.; LOFTEN, J.R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.63, p.1437-1446, 1980.
- MILLER, G.H. Use a dinitro-salicílico acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-429, 1959.
- MIRANDA, R.L.A.; COBOS, M.A.P.; MENDOZA, M.G.D. et al. Degradación *in vitro* de rastrojo de maíz con cultivos mixtos de bacterias ruminales. **Agrociência**, v.33, n.2, p. 133-139. 1999.
- NUNES, C.S.; VELASQUEZ, P.A.T.; CARRILHO, E.N.V.M. et al. Material alternativo para confecção de filtros empregados na metodologia “nylon bag” para determinação de fibra. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, **Anais....** Goiânia, 2005. CD-ROM.
- PAIVA, J.A.J.; GARCIA, R.; QUEIROZ, A.C. et al. Efeito dos níveis de amônia anidra e períodos de amonização sobre a degradabilidade da matéria seca e de constituintes da parede celular da palhada de milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.24, n.5, p.693-705, 1995.
- PIRES, A.J.V.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Degradabilidade do bagaço de cana-de-açúcar tratado com amônia anidra e, ou, sulfeto de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1071-1077, 2004.
- SARMENTO, P.; GARCIA, R.; PIRES, A.J.V. et al. Grãos de soja como fonte de urease na amonização do bagaço de cana-de-açúcar com uréia. **Scientia Agrícola**, v.58, n.2, p.223-227, 2001.
- STATISTICAL ANALYSES SYSTEM - SAS. **User's guide statistics**: version 8.0 edition. Cary, 1999. 956p.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 235p.

- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3562-3577, 1992.
- SOUZA, A.L.; GARCIA, R.; PEREIRA, O.G. et al. Valor nutritivo da casca de café tratada com amônia anidra. **Revista Ceres**, v.49, n.286, p.669-681, 2002.
- SUNDSTOL, F.; COXWORTH, E.M.; MOWAT, D.N. Mejora del valor nutritivo de la paja mediante tratamiento com amoníaco. **Revista Mundial de Zootecnia**, v.26, n.1, p.13-21, 1978.
- TANG, S.X.; TAYO, G.O.; TAN, Z.L. et al. Effects of yeast culture and fibrolytic enzymes supplementation on *in vitro* fermentation characteristics of low-quality cereal straws. **Journal of Animal Science**, v.86, p.1164-1172, 2008.
- TORRES, L.B.; FERREIRA, M.A.; VÉRAS, A.S.C. et al. Níveis de bagaço de cana e uréia como substituto ao farelo de soja em dietas para bovinos leiteiros em crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.3, p.760-767, 2003.
- YOSHIOKA, H.; CHAVANICH, S.; NILUBOL, N. et al. Production and characterization of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.45, p.579-586, 1981.

CONCLUSÕES

Para bagaço de cana com altos teores de carboidratos não fibrosos observou-se que a adição de uréia promove aumento nos componentes da parede celular com exceção da lignina, e reduz a digestibilidade verdadeira *in vitro*.

O uso de enzimas fibrolíticas exógenas, não afeta a composição químico-bromatológica, contudo, a adição de enzimas na dose de 0,5 e 1% proporciona aumento na digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca do bagaço de cana com a uréia.

A aplicação de uréia no bagaço de cana eleva os teores de nitrogênio total e da fração A, reduzindo os teores das frações B1, B2, B3 e C dos compostos nitrogenados.

A aplicação de uréia no bagaço de cana eleva a fração B2 e reduz os carboidratos totais e fração A+B1 dos carboidratos.

O uso de enzimas fibrolíticas não afeta os teores das frações nitrogenadas e dos carboidratos do bagaço de cana.

A adição única de uréia reduz a fração solúvel “a” e o coeficiente “c”, e o uso de enzimas fibrolíticas exógenas nas doses de 0,5 e 1% proporciona aumento nas degradabilidades efetivas da matéria seca.

O uso de enzimas fibrolíticas exógenas não afeta o tempo de colonização, contudo, a adição de enzimas na dose de 0,5% aumenta o tempo de colonização do bagaço de cana com a uréia para a degradabilidade da matéria seca.

A combinação de uréia com enzimas fibrolíticas exógenas não altera a degradabilidade da fibra em detergente neutro do bagaço de cana.

A aplicação de 7% de uréia é eficiente na conservação do bagaço de cana, apresentando menores valores de unidades formadoras de colônia em um período de armazenamento de até quatro semanas.

Sugere-se que outras pesquisas sejam feitas com bagaço de cana contendo teores elevados de carboidratos não fibrosos, testando outros níveis de uréia sob uma temperatura ambiental maior que 17,3 °C e com um tempo maior de ação das enzimas fibrolíticas exógenas sobre a parte fibrosa deste volumoso, para embasar a recomendação dessa prática na alimentação de ruminantes.