

CÁSSIO JOSÉ DA SILVA

AVALIAÇÃO DE FONTES DE ENXOFRE EM SUPLEMENTOS  
PROTEINADOS PARA BOVINOS

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-Graduação  
em Zootecnia, para obtenção do título de  
“Magister Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008

CÁSSIO JOSÉ DA SILVA

AVALIAÇÃO DE FONTES DE ENXOFRE EM SUPLEMENTOS  
PROTEINADOS PARA BOVINOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 29 de Julho de 2008.

---

Dr. Fernando de Paula Leonel  
(Co-Orientador)

---

Prof. Ricardo A. M. Vieira  
(Co-Orientador)

---

Prof. Rogério de Paula Lana

---

Dr. Daniel de N. F. V. da Cunha

---

Prof. José Carlos Pereira  
(Orientador)

## **DEDICO**

***A Deus, pela saúde e pela força concedida para realização deste trabalho;***

***Aos meus pais Natalício e Nair, pelo carinho e amor e por serem o exemplo que sigo em minha vida;***

***Aos meus irmãos, pelo incentivo, amor, força e carinho;***

***Aos meus amigos, por estarem junto em todo o caminho e por sempre me incentivar.***

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento parcial deste trabalho.

Ao Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da UFV, pela estrutura e apoio.

Ao professor José Carlos Pereira, pela orientação, apoio, confiança e sabedoria dedicados à realização deste trabalho.

Aos professores Rogério de Paula Lana, Ricardo A. M. Vieira e Augusto César de Queiroz pelos ensinamentos e amizade.

Ao amigo e membro da banca Fernando de Paula Leonel, Assistente Técnico da Serrana Nutrição Animal, pelos ensinamentos e atenção dispensada em todos os momentos.

À professora Maria Ignez Leão pela pelas intervenções cirúrgicas para colocação de fístula nos animais, o que foi imprescindível para realização deste trabalho.

Ao professor Hilário Cuquetto Mantovani pelas sugestões e suporte através do Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios da UFV.

Aos funcionários do Setor de Bovinocultura de corte, em especial ao Sr. Lourival e Sr. Divino, pela ajuda imprescindível.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal, Fernando, Monteiro, Valdir, Vera e Welington pelo apoio e colaboração.

Aos estagiários Daniel Condé, Marina, Sarah e Leandro, por nos auxiliar no experimento e nas análises laboratoriais.

Aos irmãos científicos Marcone, Marinaldo, Franscine e Claudilene, pelo companheirismo e por ajudarem de forma incondicional na realização deste trabalho.

À Fernanda, do Departamento de Microbiologia, pelas inestimáveis orientações e ajuda nas análises microbiológicas.

À minha querida Mônica, pela paciência, carinho e amor dedicados a mim.

Aos meus verdadeiros amigos Gustavo, Cléo, Ronan, Josmar, Fran, Nery e Biel, pelo convívio, força e carinho durante todo nosso caminho.

À família Fialho, Sr. Renato, Dona Ilma, seus filhos e toda a família; e a Dona Maria do Carmo e família por me acolherem com todo carinho em Viçosa.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

CÁSSIO JOSÉ DA SILVA, filho de Natalício e Nair Dias da Silva, nasceu em Guanhães-MG, em 21 de janeiro de 1982.

Iniciou os estudos nas Ciências Agrárias na Escola Agrotécnica Federal de São João Evangelista em janeiro de 1998, diplomando-se Técnico Agrícola/Habilitação em Agropecuária em dezembro de 2000.

Em agosto de 2002, iniciou na Universidade Federal de Viçosa (UFV) o Curso de Graduação em Zootecnia, concluindo-o em outubro de 2006.

Em outubro de 2006, ingressou no Curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese no dia 29 de julho de 2008, em Viçosa, MG.

## ÍNDICE

|                                                                                                                               |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| LISTA DE TABELAS.....                                                                                                         | viii |
| RESUMO .....                                                                                                                  | x    |
| ABSTRACT .....                                                                                                                | xii  |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL.....                                                                                                      | 1    |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....                                                                                                 | 3    |
| 2.1. Enxofre e suas funções.....                                                                                              | 3    |
| 2.2. Influências na microbiota ruminal.....                                                                                   | 4    |
| 2.3. Exigências em enxofre .....                                                                                              | 5    |
| 2.4. Deficiência de enxofre em ruminantes.....                                                                                | 6    |
| 2.5. Interação do enxofre com outros minerais.....                                                                            | 7    |
| 2.6. Toxicidade do enxofre em ruminantes.....                                                                                 | 8    |
| 2.7. Sulfato de cálcio e enxofre elementar.....                                                                               | 9    |
| 2.8. Referências bibliográficas .....                                                                                         | 11   |
| 3. CAPÍTULO 1: Avaliação de fontes de enxofre em suplementos<br>proteinados para bovinos - Consumo e parâmetros ruminais..... | 15   |
| 3.1. Introdução.....                                                                                                          | 15   |
| 3.2. Material e métodos.....                                                                                                  | 17   |
| 3.2.1. Local, animais, tratamentos e coletas.....                                                                             | 17   |
| 3.2.2. Determinação do pH, amônia e enxofre fecal.....                                                                        | 18   |
| 3.2.3. Excreção fecal e digestibilidade.....                                                                                  | 19   |
| 3.2.4. Delineamento experimental.....                                                                                         | 24   |
| 3.2.5. Cinética de passagem e degradação de partículas.....                                                                   | 25   |
| 3.3. Resultados e discussão.....                                                                                              | 29   |
| 3.4. Conclusões.....                                                                                                          | 35   |
| 3.5. Referências bibliográficas.....                                                                                          | 36   |

|                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4. CAPÍTULO 2: Avaliação de fontes de enxofre em suplementos<br>proteínados para bovinos - Produção de proteína microbiana “ <i>in vitro</i> ”<br>e perfil de aminoácidos no abomaso..... | 39 |
| 4.1. Introdução.....                                                                                                                                                                      | 39 |
| 4.2. Material e métodos.....                                                                                                                                                              | 41 |
| 4.2.1. Local, animais, tratamentos e coletas.....                                                                                                                                         | 41 |
| 4.2.2. Síntese de proteína microbiana “ <i>in vitro</i> ” sob diferentes<br>relações de sulfato de cálcio e enxofre elementar.....                                                        | 42 |
| 4.2.3. Determinação do perfil de aminoácidos no abomaso.....                                                                                                                              | 43 |
| 4.2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas.....                                                                                                                             | 44 |
| 4.3. Resultados e discussão.....                                                                                                                                                          | 45 |
| 4.4. Conclusões.....                                                                                                                                                                      | 50 |
| 4.5. Referências bibliográficas.....                                                                                                                                                      | 51 |
| 5. CONCLUSÕES GERAIS.....                                                                                                                                                                 | 53 |
| APÊNDICE.....                                                                                                                                                                             | 54 |



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Porcentagem dos ingredientes no sal proteinado, expresso na base da matéria seca.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 21 |
| 2 | Proporção de macronutrientes e micronutrientes, proteína bruta (PB), nutrientes digestíveis totais (NDT), nitrogênio não protéico (NNP) e relação nitrogênio: enxofre presentes no sal proteinado.....                                                                                                                                                                                                                                            | 22 |
| 3 | Teores médios de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), carboidratos não-fibrosos (CNF), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (LIG), proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN), macrominerais e microminerais do feno utilizado em cada período (P).....                                                                                                  | 23 |
| 4 | Médias e coeficientes de variação (CV) para os consumos diários de matéria seca de feno (CMSF), proteinado (CMSP), proteína bruta (CPB), fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína (CFDNcp), matéria orgânica (CMO), carboidratos não fibrosos (CNF), nutrientes digestíveis totais (CNDT), concentração de NDT na dieta e na digesta do abomaso e digestibilidade total da PB e FDNcp obtida para as dietas experimentais..... | 29 |
| 5 | Valores médios de pH e amônia ruminal e enxofre fecal em função das diferentes dietas experimentais.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 31 |
| 6 | Fração indigestível (U), período de latência (L) e taxa de passagem das partículas no rúmen (k) para o modelo de degradação em função das diferentes fontes de enxofre.....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 32 |
| 7 | Valores médios de TMR-TGI, TMR-RR, $k_p$ , $k_d$ , DE, B, i, $k_e$ , $\tau$ , $\lambda_r$ , C (0), $N_r$ e $k_r$ .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 33 |

### CAPÍTULO 2

|   |                                                                                                                                        |    |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Perfil de aminoácidos na digesta abomasal em função dos diferentes tratamentos e seus respectivos coeficientes de variação (CV%) ..... | 45 |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|   |                                                                                                                            |    |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2 | Produção de proteína microbiana “ <i>in vitro</i> ” sob diferentes relações de sulfato de cálcio e enxofre elementar ..... | 48 |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## APÊNDICE A

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1A | Animal, tratamento (Trat: EE 70S – enxofre elementar 70S, EE 98S – enxofre elementar 98S, SC H – Sulfato de cálcio hidratado, SC A - sulfato de cálcio anidro e S A – sulfato de amônio) e consumo total de matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína (FDNcp), matéria mineral (MM), carboidratos não-fibrosos (CNF), carboidratos totais (CHO) e matéria seca (MS) .....                                   | 54 |
| 2A | Animal, tratamento (Trat: EE 70S – enxofre elementar 70S, EE 98S – enxofre elementar 98S, SC H –Sulfato de cálcio hidratado, SC A - sulfato de cálcio anidro e S A – sulfato de amônio) e consumo de matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína (FDNcp), matéria mineral (MM), carboidratos não-fibrosos (CNF), carboidratos totais (CHO) e matéria seca (MS) do feno de <i>Brachiaria dictyoneura</i> ..... | 55 |
| 3A | Animal, tratamento (Trat: EE 70S – enxofre elementar 70S, EE 98S – enxofre elementar 98S, SC H – sulfato de cálcio hidratado, SC A - Sulfato de cálcio anidro e S A – sulfato de amônio) e consumo de matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína (FDNcp), carboidratos não-fibrosos (CNF), carboidratos totais (CHO) e matéria seca (MS) do suplemento proteinado .....                                      | 56 |
| 4A | Animal, tratamento (Trat: EE 70S – enxofre elementar 70S, EE 98S – enxofre elementar 98S, SC H – sulfato de cálcio hidratado, SC A - sulfato de cálcio anidro e S A – sulfato de amônio) e amônia ruminal em função do tempo e fonte de enxofre .....                                                                                                                                                                                                                                         | 57 |
| 5A | Animal, tratamento (Trat: EE 70S – enxofre elementar 70S, EE 98S – enxofre elementar 98S, SC H – sulfato de cálcio hidratado, SC A – sulfato de cálcio anidro e S A – sulfato de amônio) e pH ruminal em função do tempo e fonte de enxofre.....                                                                                                                                                                                                                                              | 58 |

## APÊNDICE B

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Modelo 1 - Modelo utilizado para determinação dos valores de proteína microbiana “in vitro”..... | 61 |
| Modelo 2 - Modelo utilizado para estimativa dos parâmetros de degradação da fibra.....           | 63 |

## RESUMO

SILVA, Cássio José, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2008.

**Avaliação de fontes de enxofre em suplementos proteinados para bovinos.** Orientador: José Carlos Pereira. Co-orientadores: Fernando de Paula Leonel e Ricardo Augusto Mendonça Vieira.

Objetivou-se avaliar a utilização de diferentes fontes de enxofre em suplementos proteinados para bovinos. Os experimentos foram realizados na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Corte e no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa. No primeiro experimento avaliou-se a resposta de novilhos mestiços alimentados com feno de capim *Brachiaria dictyoneura*, variando-se a fonte de enxofre no suplemento proteinado, sendo: enxofre elementar 70S; enxofre elementar 98S; sulfato de cálcio (Gesso hidratado); sulfato de cálcio (Gesso anidro) e sulfato de amônio, sobre o consumo e a digestibilidade aparente dos nutrientes, pH e amônia ( $\text{N-NH}_3$ ) ruminal, perfil de aminoácidos na digesta abomasal, degradabilidade da fibra e taxa de passagem de partículas, mantendo-se uma relação nitrogênio:enxofre de 11:1. Utilizou-se cinco novilhos mestiços Holandês/Zebu fistulados no rúmen e no abomaso, distribuídos em um quadrado latino 5 X 5. O experimento constou de cinco períodos com duração de 16 dias cada um, sendo os dez primeiros para adaptação e os demais para a coleta de dados. No segundo experimento objetivou-se avaliar a produção de proteína microbiana “*in vitro*” em função de diferentes relações entre sulfato de cálcio e enxofre elementar em líquido ruminal proveniente de um novilho de corte em crescimento e de uma vaca em lactação. As diferentes fontes de enxofre no suplemento não afetaram ( $P>0,05$ ) os consumos de matéria seca do feno e do suplemento proteinado, proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína (FDNcp), matéria orgânica (MO), carboidratos não fibrosos (CNF), extrato etéreo (EE) e nutrientes digestíveis totais (NDT), os coeficientes de digestibilidade da FDNcp e

da PB, o pH ruminal e a concentração de amônia no rúmen. Neste estudo os perfis de degradação da FDN obtidos foram interpretados utilizando o modelo e as estimativas dos parâmetros da cinética de passagem de partículas ajustando os dados a diferentes modelos bicompartimentais (G1G1, G2G1, G3G1, G4G1, G5G1 e G6G1). Os modelos G2G1, G3G1, G5G1, G4G1 e G3G1 mostraram-se mais eficientes na determinação das estimativas dos parâmetros de cinética de passagem de partículas para os tratamentos: enxofre elementar 70S, enxofre elementar 98S, sulfato de cálcio (Gesso hidratado), sulfato de cálcio (Gesso anidro) e sulfato de amônio, respectivamente. A degradação ruminal da fibra sofreu pouca influência da fonte de enxofre utilizada. As concentrações dos aminoácidos disponíveis na digesta abomasal (g/kg MS) não diferiram ( $P>0,05$ ) entre as dietas avaliadas. A disponibilidade dos aminoácidos avaliados na digesta abomasal não variou e seu perfil não dependeu das fontes de enxofre presente nas dietas. No segundo experimento não foram verificadas diferenças nos teores de proteína microbiana “*in vitro*” para as relações avaliadas ( $P>0,05$ ). As fontes de enxofre avaliadas podem ser utilizadas na formulação de suplementos para bovinos de corte, mantendo-se a relação nitrogênio:enxofre de 11:1.

## ABSTRACT

SILVA, Cássio José, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, July 2008.

### **Evaluation of sulfur sources in protein supplements for bovines.**

Adviser: José Carlos Pereira. Co-advisers: Fernando de Paula Leonel and Ricardo Augusto Mendonça Vieira.

The scope of this work was to evaluate the use of different sulfur sources in protein supplements for bovines. The experiments were carried out at the Unit of Teaching, Research and Extension on Beef Cattle and Laboratory of Animal Health in the Department of Animal Science at the Federal University of Viçosa, MG, Brazil. In the first experiment, crossbred calves were fed with *Brachiaria dictyoneura* grass hay, with different sulfur sources in the protein supplement: 70S elemental sulfur; 98S elemental sulfur; calcium sulfate (hydrated gypsum); calcium sulfate (anhydrous gypsum) and ammonium sulfate. The calf response to the different sulfur sources was evaluated by means of the nutrient intake and apparent digestibility, ruminal pH and N-NH<sub>3</sub>, amino acid profile in the abomasal digesta, fiber degradability and particle flow-rate. An 11:1 nitrogen:sulfur ratio was used. Five Holstein/Zebu male calves fistulated in the rumen and abomasum were used distributed in a 5 x 5 Latin square. The experiment had five 16-day periods, in which the first ten days were used as the adaptation period and the other days were used for collecting the data. The scope of the second experiment was to evaluate the “*in vitro*” microbial protein production regarding the different ratios of calcium sulfate and elemental sulfur in the ruminal liquid of a beef cattle calf at growing stage and a lactating cow. The different sulfur sources in the supplement did not affect ( $P>0.05$ ) the intakes of hay dry matter and protein supplement, crude protein (CP), neutral detergent fiber corrected for ash and protein (NDFap), organic matter (OM), nonfiber carbohydrate (NFC), ether extract (EE) and total digestible nutrients (TDN), digestibility coefficients of NDFap and CP, ruminal pH and the ruminal ammonia concentration. In this study, the degradation profiles of NDF

achieved were interpreted according to the solid transit kinetics parameters model and estimations. The data was adjusted to different double-compartment models (G1G1, G2G1, G3G1, G4G1, G5G1 and G6G1). The models G2G1, G3G1, G5G1, G4G1 and G3G1 showed to be, respectively, more efficient on determining the estimations of the following treatments: 70S elemental sulfur, 98S elemental sulfur, calcium sulfate (hydrated gypsum), calcium sulfate (anhydrous gypsum) and ammonium sulfate. The sulfur source used influenced slowly the ruminal fiber degradation. The concentration of available amino acids in the abomasal digesta (g/kg DM, where DM is dry matter) did not change ( $P>0.05$ ) in the evaluated diets. The availability of the amino acids evaluated in the abomasal digesta did not vary and their profile did not depend on the sulfur sources found in the diets. In the second experiment, differences in the rates of "*in vitro*" microbial protein for the evaluated ratios were not found ( $P>0.05$ ). The sulfur sources evaluated may be used to formulate beef cattle supplements, as long as an 11:1 nitrogen:sulfur ratio is used.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos o cenário do setor pecuário nacional passou e está passando por transformações que têm levado à modernização e intensificação dos sistemas de produção. Neste sentido, com margens de lucro cada vez mais estreitas, o maior desafio dos pesquisadores, produtores e empresas ligadas ao setor produtivo é produzir de forma eficiente e competitiva.

O aumento dos índices de produtividade, alcançados nesse recente período, pela pecuária tanto de leite quanto de corte é fruto de melhoria nos manejos nutricional, forrageiro, reprodutivo, sanitário e genético. Porém, é consenso geral que várias questões permanecem ainda em aberto, principalmente na área de nutrição. Assim as pesquisas estão sendo focadas para se obter maior eficiência de utilização dos nutrientes, seja pelo correto balanceamento das rações ou pela utilização de co-produtos e aditivos.

A nutrição mineral de bovinos não é um assunto novo, todavia, devido à limitação de equipamentos e metodologias adequadas, estudos sobre o enxofre não resultaram em muitos avanços.

A necessidade de enxofre para ruminantes, primeiramente, se deve para o suprimento de substratos necessários para a máxima eficiência e síntese microbiana, objetivando assegurar uma adequada digestibilidade da fibra e aporte de nutrientes para a absorção.

O suprimento de enxofre pode ser realizado a partir de diversas fontes: aminoácidos sintéticos, sais de sulfato como: sulfato de sódio, sulfato de amônio, sulfato de cálcio e enxofre elementar, chamado “flor de enxofre” ou “enxofre ventilado”. Entretanto, a maior parte do enxofre absorvido está na composição de aminoácidos sulfurados, após incorporação do elemento na massa microbiana. Todavia, uma pequena fração pode ser absorvida na forma de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) e juntamente com o enxofre proveniente da oxidação de metionina e cisteína que formam ânions sulfatos, participam do equilíbrio ácido base do organismo animal.

Com o propósito de redução de custos de alimentação nos sistemas de produção de bovinos, tem-se utilizado largamente de o nitrogênio não



protéico (NNP), principalmente uréia, porém neste caso se faz imprescindível a correção dos teores de enxofre para síntese de aminoácidos sulfurados e conseqüentemente maximização do crescimento microbiano.

O enxofre também é matéria-prima básica de extrema necessidade, utilizado largamente na agricultura, que consome cerca de 53,0% da produção total, seguida pelas indústrias químicas (47,0%). O consumo está diretamente relacionado à produção de ácido sulfúrico, que por sua vez, é destinado em cerca de 70 a 80,0% para produção de ácido fosfórico e de fertilizantes. Como subprodutos da produção de fosfato bicálcico podem ser gerados duas fontes de enxofre com real potencial de uso na nutrição de ruminantes, o sulfato de cálcio e o enxofre elementar.

Devido à deficiência de fósforo nos solos Brasileiros torna-se evidente então a necessidade da produção em grande escala de fontes de fósforo, tanto para produção de fertilizantes como para suplementos minerais, gerando assim um acúmulo de grandes quantidades de fontes de enxofre, como o sulfato de cálcio e o enxofre elementar 70S (74% de enxofre), tais co-produtos apresentam o inconveniente de necessitarem de grandes áreas para estocagem, sendo estes estocados na maioria das vezes a céu aberto, podendo levar a contaminações do meio ambiente. Como apresentam real possibilidade de uso na nutrição animal, faz-se necessário então o estudo mais detalhado da contribuição verdadeira de cada uma dessas fontes.

Assim considerando uma enorme disponibilidade de uso de fontes oriundas de processos industriais para produção de ácido fosfórico e na necessidade de destinação viável dos excessos de fontes de enxofre produzidos, estabeleceu-se o objetivo do trabalho avaliar diferentes fontes inorgânicas: enxofre elementar (flor de enxofre), sulfato de cálcio e sulfato de amônio, sobre o consumo de matéria seca, digestibilidade dos nutrientes e parâmetros ruminais (pH e amônia) em bovinos canulados, bem como, avaliar a produção microbiana “*in vitro*” em função de diferentes relações de massa de enxofre elementar: sulfato de cálcio.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Enxofre e suas funções**

O enxofre possui diversas funções, assim como às proteínas, das quais ele faz parte. De acordo com Andriguetto (1981), o organismo animal contém cerca de 0,2% de enxofre, encontrando-se este elemento tanto na forma mineral quanto orgânica. Os compostos orgânicos compreendem principalmente os aminoácidos sulfurados, cistina e metionina; vitaminas, tiamina e biotina; e hormônios como insulina e ocitocina. O enxofre está presente em grupos reativos sulfidril ou disulfeto, mantendo a configuração espacial do polipeptídeo, elaborado em cadeias e provendo o local de ligação entre grupos prostéticos e participando da determinação da conformação do centro, o que é essencial à atividade das enzimas.

O enxofre entra nas rotas metabólicas como sulfato ou sulfeto. No ciclo do enxofre as diferentes formas de enxofre podem ser oxidadas para sulfatos ou reduzidas para sulfeto viabilizando a utilização deste pelas plantas e animais (NRC, 1980; O' Dell e Sunde, 1997). Moléculas ricas em cisteína fazem um papel vital protegendo animais de excesso de metais pesados como cobre, cádmio e zinco, enquanto outras que também contém enxofre influenciam no transporte de selênio e protegem os tecidos da toxidez por excesso de selênio.

A glutathione, um tripeptídeo linear, constituído pelos aminoácidos, glicina, ácido glutâmico e cisteína, sendo o grupo tiol deste último o local ativo responsável pelas suas propriedades bioquímicas, pode facilitar a captação de cobre pelo fígado, além de proteger tecidos contra agentes oxidantes por meio da interconversão entre os estados reduzido e oxidado. O enxofre está presente no tecido conjuntivo como sulfato de condroitina, e na heparina, um anticoagulante natural, além de ser relativamente abundante na queratina que compõe cascos, chifres e pêlos.

Em ruminantes, a maior limitação causada pelo enxofre durante a deficiência, não é relacionada a nenhuma das funções listadas acima e sim no processo de fermentação e síntese de proteína microbiana no rúmen.

Diversos estudos mostraram que o enxofre inorgânico, administrado por via oral, pode ser utilizado pelos ruminantes para a síntese de metionina e cisteína. A incorporação do enxofre nas proteínas pelos ruminantes foi demonstrada por meio do elemento marcado, onde o  $S^{35}$  (enxofre radioativo) foi transferido para os aminoácidos do leite, lã, sangue e tecidos. Block et al. (1951) introduziram  $S^{35}$  na forma de sulfato de sódio diretamente no rúmen de cabras e ovelhas e encontraram 80% deste enxofre na proteína do leite. Pope et al. (1979) concluíram que o sulfato, proteínas contendo enxofre e os aminoácidos livres contendo enxofre são reduzidos para sulfeto pelos microrganismos do rúmen, e este é incorporado nos aminoácidos microbianos.

## **2.2. Influências na microbiota ruminal**

Muitas bactérias do rúmen necessitam de enxofre, esse elemento pode ser obtido por diversas formas, algumas são capazes de degradar fontes inorgânicas de enxofre para sulfeto e incorporá-lo em aminoácidos, enquanto outras utilizam somente enxofre orgânico (Kandylis, 1984a; Durand e Komisarczuk, 1988).

Aproximadamente 50% do enxofre bacteriano orgânico foi derivado de sulfato em ovelhas recebendo pasto ou feno de leucena (Kennedy e Milligan, 1978). Suprimentos de enxofre nas dietas são complementados através de enxofre reciclado na saliva, em uma mistura do elemento nas formas inorgânica e orgânica (Kennedy e Siebert, 1972b; Bird, 1974).

A proporção de fluxo de enxofre total no rúmen que é incorporada a proteína microbiana ruminal varia amplamente e é determinada por fatores como a fonte de enxofre (metionina que é menos degradada que outros aminoácidos sulfurados (Bird, 1972a) e pela co-disponibilidade de outros substratos, como nitrogênio principalmente (Moir, 1970; Beever, 1996). O nível ótimo de síntese microbiana e captura de enxofre acontece quando a energia de fermentação, fonte de enxofre, nitrogênio e fósforo estão disponíveis em taxas iguais à capacidade cinética do rúmen e da biomassa microbiana. O excesso de enxofre é rapidamente absorvido no rúmen como sulfato, que tem pequeno valor nutricional, mas é potencialmente tóxico.

Os protozoários do rúmen engolfam bactérias ruminais, reduzindo a incorporação de enxofre na proteína bacteriana e conseqüentemente aumentando disponibilidade de sulfato no rúmen (Kandylis, 1984a). Experimentalmente a eficiência ruminal na síntese de proteína microbiana pode ser aumentada através de defaunação ruminal, ou seja, removendo os protozoários, um processo que deveria diminuir as concentrações de sulfato ruminal (Hegarty et al., 1994). Fins semelhantes podem ser alcançados transferindo genes de bactérias que codificam enzimas para fixarem sulfato em rotas metabólicas de espécies comuns de bactérias que habitam o rúmen.

Fungos anaeróbios podem fazer um papel importante na degradação estrutural de fibra no rúmen. Essa atividade é dependente do enxofre dietético e contribui significativamente para a síntese de aminoácidos sulfurados (Weston et al., 1988).

### **2.3. Exigências em enxofre**

O enxofre na digesta escapa do rúmen de várias formas: elementar, proteína dietética, proteína microbiana, sulfito e sulfato e as proporções são determinadas através de análise da composição da dieta e da eficiência de incorporação na proteína microbiana (Bray e Till, 1975). O sulfato é absorvido através de transporte ativo, enquanto a maior parte dos aminoácidos sulfurados absorvidos no intestino delgado são oriundos de digestão proteolítica. Nos tecidos ocorre a retirada de um grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) da metionina, o metil se agrupa para a elaboração de cadeias de carbono, deixando homocisteína, da qual a cistationa dos aminoácidos sulfurados é liberada formando cisteína processando a síntese de proteína no tecido animal.

Os principais locais de produção de cisteína ou secreção são os músculos e a glândula mamária, e os produtos, como caseína, contêm nitrogênio e enxofre em uma relação de cerca de 0,067. Lã, e pelos são muito ricos em enxofre, contendo 2,7 a 5,4% de enxofre, principalmente como cisteína, e com uma relação enxofre: nitrogênio de 0,2.

A determinação das exigências dietéticas de enxofre para ruminantes envolveu a suplementação da dieta com metionina, cisteína, sais sulfatados, ou enxofre elementar em estudos feitos com radioisótopos. Loosli e Harris (1945) observaram que a suplementação de uréia com sulfato ou uréia com metionina, passando de 6,55% de proteína bruta para 10,28% de proteína bruta, aumento na taxa de crescimento de cordeiros. Hume e Bird (1970) demonstraram que o sulfato de sódio, sulfato de cálcio, DL-metionina e hidroximetionina foram equivalentes em melhorar a digestão da celulose “*in vitro*”, e concluíram que o nível ótimo de enxofre foi de 0,16 a 0,24% da matéria seca para ruminantes. Grieve et al. (1973), verificaram que quando o enxofre da dieta oriundo da fonte sulfato de cálcio excedia 0,3% da matéria seca, as vacas em lactação reduziam a ingestão de alimentos, e Hidroglou et al. (1977) relataram que a adição de 0,5% de sulfato de cálcio na matéria seca, prejudicava o ganho de peso dos cordeiros. Mcdowell (1992) relatou que a exigência de enxofre para ruminantes em regime de pastejo situa-se entre 0,10 e 0,32% de enxofre na matéria seca.

#### **2.4. Deficiência de enxofre em ruminantes**

Na deficiência de enxofre, a síntese da proteína microbiana é reduzida e os animais apresentam aspecto distrófico. A deficiência de enxofre aumenta o desenvolvimento de microrganismos no rúmen que não utilizam o lactato, levando ao acúmulo deste ácido no rúmen, sangue e urina. Frequentemente em casos de deficiência podem ocorrer redução do apetite e do crescimento, debilidade muscular, lacrimejamento, tontura e fraqueza podendo levar a morte (Mcdowell, 1992). Assim deve ser dada atenção especial aos solos do Brasil central, cujas queimadas agravam as perdas de enxofre, por volatilização. Dietas deficientes em enxofre também podem reduzir a digestibilidade, e a produção de leite em vacas lactantes (Bouchard e Conrad, 1973).

A suplementação deve ser contínua e será ineficaz se outros fatores estiverem limitando a atividade microbiana ruminal, podendo frequentemente ser necessário prover fontes de carboidratos fermentescíveis e nitrogênio (uréia), juntamente com o suplemento de enxofre. A microbiota dos

ruminantes tem capacidade de converter o enxofre inorgânico em compostos orgânicos sulfurados, que são utilizados pelo animal ou pelos próprios microrganismos do rúmen. Com o crescente aumento do uso de nitrogênio não-protéico (NNP) para suplementar parte da proteína na dieta dos ruminantes, aumentam as probabilidades de ocorrência de carência de enxofre. A suplementação com enxofre pode ser importante para ruminantes sob dieta com volumoso de baixa qualidade, produzido em solos com baixos níveis desse mineral ou volumosos fornecidos com alguma fonte de nitrogênio não-protéico.

Bovinos alimentados com dietas purificadas, deficientes em enxofre, tiveram elevados níveis de serina, alanina, cisteína e outros aminoácidos menos a glicina e a tirosina no plasma sanguíneo (Harms e Buresh, 1987). Foi verificado um nível normal de sulfato no soro de ovelhas alimentadas com uma dieta basal contendo 0,09% de enxofre na matéria seca, mostrando que talvez o sulfato possa ser de origem endógena e, portanto, o seu uso como um indicador do nível de enxofre na dieta pode ser questionável. A avaliação de enxofre na dieta, acompanhada da análise de desempenho dos animais, são os melhores indicadores para verificar deficiência de enxofre na dieta de ruminantes (Mcdowell, 1992).

## **2.5. Interação do enxofre com outros minerais**

A interação entre enxofre (S), cobre (Cu) e molibdênio (Mo) pode acontecer no trato digestivo ou ocorre durante a metabolização, devido à redução de sulfato para sulfeto no rúmen; logo este sulfeto reage com Mo para formar tiomolibdatos (TMs); e posteriormente a formação de Cu-TMs ( $\text{CuMoS}_4$ ) que são compostos altamente insolúveis e não utilizáveis. Então a interação manifesta-se com maior intensidade em ruminantes devido à relação do enxofre com o metabolismo ruminal. Quando o nível de S aumenta, a excreção urinária de Mo eleva-se substancialmente, enquanto o depósito nos tecidos diminui proporcionalmente.

Uma inter-relação entre Cu-Mo-S foi relatada por Dick (1956), mostrando que dietas com elevado teor de molibdênio diminuem o acúmulo de cobre no fígado, assim como os sulfatos inorgânicos têm efeito

antagonista aos elementos cobre e molibdênio. Mcfarlane, Judson e Turnbull (1991) estudaram o efeito da adição de 0,4% de sulfato inorgânico na dieta, ou uma combinação de 50 ppm de Mo com 0,4% de sulfato, avaliando a resposta no plasma de cordeiros recebendo uma injeção intravenosa com cobre radioativo ( $^{64}\text{Cu}$ ). Quando ambos, Mo e Cu, estavam presentes na dieta, houve uma redução no acúmulo de cobre no fígado.

As ingestões em excesso de S, Cu, Mo podem alterar o requerimento para cada um dos outros elementos (Mcdowell, 1992). Halpin e Baker, 1984, verificando o efeito da deficiência de selênio na formação de metionina e cisteína em aves, mostraram que a eficiência da transulfuração pode ser prejudicada pelo baixo nível de selênio na dieta. A adição de sulfeto de ferro (500ppm) em dietas contendo alto cobre (200 ppm) fez reduzir o acúmulo de cobre no fígado de leitões, de 278 para 21ppm (Lima et al. 1981).

## **2.6. Toxicidade do enxofre em ruminantes**

A margem entre a concentração desejável e prejudicial de enxofre na dieta de ruminantes é estreita, essa baixa tolerância é geralmente atribuída a toxicidade de sulfito (Bird, 1972b), e o primeiro local a ser afetado é o rúmen onde o sulfito é gerado e a motilidade ruminal pode ser prejudicada. Assim a maior probabilidade de ocorrer toxicidade de enxofre em ruminantes é quando os animais estão recebendo dietas suplementares com alto nível de enxofre, como sulfato de amônio para fornecer nitrogênio não protéico, ou sulfato de cálcio para fornecer cálcio. É conhecido que o sulfeto de hidrogênio formado a partir do sulfato pelos microrganismos gastrintestinais pode causar envenenamento em ruminantes e monogástricos. O sulfeto reduz a motilidade do rúmen e causa alterações nervosas e dificuldades respiratórias (Mcdowell, 1992).

Bouchard e Conrad (1974) administraram 15 g de enxofre como sulfito de sódio vaca/dia, e gradativamente aumentaram a dosagem para 50g/vaca/dia, sendo verificada uma completa anorexia e queda na gordura do leite de 3,7 para 3,4%. De acordo com o NRC (2001), concentração máxima tolerável de enxofre na dieta de bovinos tem sido estimada em 0,40% e níveis excedentes a este podem resultar em grave intoxicação.

## 2.7. Sulfato de Cálcio e Enxofre Elementar 70S

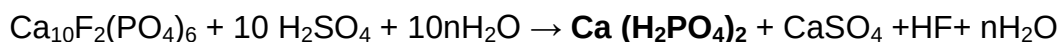
O ácido sulfúrico é importante tanto para produção agrícola (produção de fertilizantes) quanto para obtenção de fontes de fósforo de elevada pureza e biodisponibilidade para nutrição animal (produção de fosfatos).

O processo de produção de ácido sulfúrico ocorre inicialmente com a fusão do enxofre na presença de água, sendo oxidado a dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), passando do estado sólido (98% de S) ao líquido a uma temperatura de 115 °C. Daí recebe oxigênio e calor (1.000 °C) passando do estado líquido para o gasoso. Este gás de enxofre superaquecido deve ser resfriado para ser convertido a trióxido de enxofre (SO<sub>3</sub>) via reação com oxigênio atmosférico intermediada por catalise com pentóxido de vanádio (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). No processo de resfriamento ocorre a formação de vapor d'água o qual é utilizado para a geração de energia elétrica através do acionamento de uma turbina que produz de 6 a 8 Megawatts/ hora. Além desta função o vapor produzido também serve para aquecer os demais sistemas de reações que necessitam de calor.

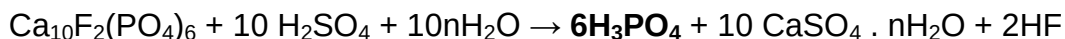
O SO<sub>3</sub> entra em contato com a água formando o ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) que poder ser utilizado na produção de ácido fosfórico, superfosfato simples, dentre diversas finalidades.

Parte do enxofre sólido fica impregnada na borda da “dorna de reação” e não sofre fusão, sendo utilizado então como enxofre 70S, que por conter alta porcentagem de enxofre apresenta grande potencial de utilização como fonte de enxofre em suplementos minerais.

A reação do ácido sulfúrico com rocha fosfática (apatita), a depender do *stand* de mistura, pode formar superfosfato simples:

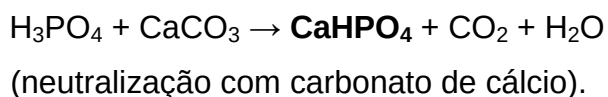


utilizado com fertilizante agrícola, ou ácido fosfórico:



com várias finalidades, dentre essas, produção de fosfato bicálcico:





O processo detalhado da produção de fosfato bicálcico para nutrição animal consta-se da adição do concentrado de apatita ao ácido sulfúrico que cataliza a reação, disponibilizando o fósforo (P) do fosfato tricálcico (apatita) e doando hidrogênio (H) (reação de dupla troca) para a formação de ácido fosfórico, ou seja, o  $\text{H}^+$  do ácido sulfúrico reage com o P da apatita formando o ácido fosfórico. O enxofre do ácido sulfúrico reage com o cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) da apatita formando o sulfato de cálcio ou gesso ( $\text{CaSO}_4$ ), em estado sólido, que pode ser separado por filtragem. Todo o cálcio do fosfato-tricálcico é convertido sulfato de cálcio.

Para cada tonelada de fosfato bicálcico produzida são necessários aproximadamente 300 kg de enxofre elementar e são geradas aproximadamente quatro toneladas de sulfato de cálcio (Leonel, 2008).

Com base nas informações relatadas, a hipótese deste trabalho é de que as diferentes formas de enxofre apresentadas poderiam ser utilizadas na suplementação com este elemento para bovinos. As diferentes relações de massa entre sulfato de cálcio e enxofre elementar supririam conjuntamente as exigências em enxofre dos microrganismos ruminais, podendo assim ser destinado o excesso de produção destes co-produtos a nutrição animal e consequentemente reduzindo potenciais riscos de impactos ambientais devido ao acúmulo dos mesmos.

## 2.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRIGUETTO, J.M. **Nutrição animal**. 4.ed. São Paulo: Nobel, v.1, p.396. 1981.
- BEEVER, D.E. Meeting the protein requirements of ruminant livestock. **South African Journal of Animal Science**, v. 26, p.20-26.1996.
- BIRD, P.R. Sulphur metabolism and excretion studies in ruminants. V. Ruminal desulphuration of methionine and cysteine. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.25, p.185-193,1972a.
- BIRD, P.R. Sulphur metabolism and excretion studies in ruminants. X. Sulphide toxicity in sheep. **Australian Journal of Biological Sciences** n.25, p.1087-1098, 1972b.
- BIRD, P.R. Sulphur metabolism and excretion studies in ruminants. XIII. Intake and utilisation of wheat straw by sheep and cattle. **Australian Journal of Agricultural Sciences.**, v. 25, 631–642.1974.
- BLOCK, R.J.; STEKOL, J.A.; LOOSLI, J.K. Synthesis of sulfur amino acids from inorganic sulfate by ruminants. Synthesis of cystine and methionine from sodium sulfate by the goat and by the microorganisms of the rumen of the ewe. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.33, p.353, 1951.
- BOUCHARD, R.; CONRAD. H.R. Sulfur requirement of lactating dairy cows. I. Sulfur balance and dietary supplementation. **Journal of Dairy Science**, v.56, p.1276-1282, 1973.
- BOUCHARD, R.; CONRAD. H.R. Sulfur metabolism and nutritional changes in lactating cows associated with supplemental sulfate and methionine hydroxyl analog. **Canadian Journal of Animal Science.**, v.54, p.587-596, 1974.
- BRAY, A.C.; TILL, A.R. Metabolism of sulphur in the gastro-intestinal tract. In: McDonald, I.W. and Warner, A.C.I. (eds) **Digestion and Metabolism in the Ruminant**. University of New England Publishing Unit, Armidale, New South Wales, pp. 243–260,1975.
- BRYANT, M.P. Nutritional requirements of predominant rumen cellulolytic bacteria. **Fed. Proc.**, v.32, p.1809-1813, 1973.
- DICK, A.T. Molybdenum in animal nutrition. **Soil Science**, v. 81, p.229-258, 1956.
- DURAND, M.; KOMISARCZUK, K. (1988) Influence of major minerals on rumen microbiota. **Journal of Nutrition**, v.118, p.249-260,1988.

- EMERY, R.S.; SMITH, C.K; AND HUFFMAN, C.F. Utilization of inorganic sulfate by rumen microorganisms. I. Incorporation of inorganic sulfate into amino acids. **App. Microbiol.** v.5, p.360-363, 1957.
- GOODRICH, R.D.; KAHLON, T.S.; PAMP, D.D. et al. **Sulfur in ruminant nutrition.** Des Moines: National Feeds Ingredient Association, 1978.
- GRIEVE, D.G.; MERRILL, W.G.; COPPOCK, C.E. Sulfur supplementation of urea containing silages and concentrates. Ration Digestibility, nitrogen and sulfur balances. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 56, p. 224-32, 1973.
- HUME, I.D.; BIRD, P.R. Synthesis of microbial protein in the rumen, the influence of the level and form of dietary sulphur. **Australian journal of Agricultural Science**, Champaign, v.66, p.1948-1501, 1988.
- HALPIN, K.M.; BEAKER, D.H. Selenium deficiency and transsulfuration in the chick. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.114, p.606-612, 1984.
- HARMS, R.H.; BURESH, R.E. A comparison of diets with and without supplemented inorganic sulfate and collie for use in comparing relative potencies of various methionine supplements. **Nutr. Report International** Los Altos, v.35, p.909-920, 1987.
- HEGARTY, R.S., NOLAN, J.V.; LENG, R.A. The effects of protozoa and of supplementation nitrogen and sulphur on digestion and microbial metabolism in the rumen of sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.45, p.1215-1227, 1994.
- HUNTER, R.A.; SIEBERT, B.D. Utilization of low-quality roughage by *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. 2. The effect of rumen degradable nitrogen and sulfur on voluntary food intake and rumen characteristics. **British Journal of Nutrition**, v. 53, p.649-656, 1985.
- HIDIROGLOU, M. Mineral in Animal health. Effects of levels of dietary on the growth performance and blood mineral profile of sheep feed urea-supplement corn silage. **International Journal Vitamin Nutrient Research**, Berne, v.47, p.284-291, 1977.
- ISHIMOTO, M.J.; KOYAMA, J.; OMURA, T.; et al. Biochemical studies on sulfate reducing bacteria. III. Sulfate reduction by cell suspension. **Journal Biochemistry** v. 41, p.537-546, 1954.
- JACOBSON, D.R.; BARNETT, J.W.; CARR, S.B.; et al. Voluntary intake, milk production, rumen content and plasma free amino acid levels of lactating cows on low sulfur and sulfur supplemented diets. **Journal of Dairy Science**, v.50, p.1248-1254, 1967.
- KAHLON, T.S.; MEISKE, J.C.; GOODRICH, R.D. Sulfur metabolism in Ruminants. I. "in vitro" availability of various chemical forms of sulfur. **Journal of Animal Science**. v.41; p.1147-1153, 1975a.

- KAHLON, T.S.; MEISKE, J.C.; GOODRICH, R.D.; Sulfur metabolism in Ruminants. II. In vivo availability of various chemical forma of sulfur. **Journal Animal Science**.v.41; p.1154-1160, 1975b.
- KENNEDY, P.M.; SIEBERT, B.D. The utilization of spear grass (*Heteropogon contortus*). II. The influence of the sulfur on energy intake and rúmen and blood parameters in cattle and sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.23, p.45-56, 1972.
- KANDYLIS, K. The role of sulphur in ruminant nutrition: a review. **Livestock Production Science**. v.11, p.611-624, 1984a
- KENNEDY, P.M.; MILLIGAN, L.P. Quantitative aspects of the transformations of sulphur in sheep. **British Journal of Nutrition.**, 39, 65–84, 1978.
- KENNEDY, P.M.; SIEBERT, B.D. The utilisation of spear grass (*Heteropogon contortus*). II. The influence of sulphur on energy intake and rúmen and blood parameters in sheep and cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.23, p.45–46, 1972a.
- KANDYLIS, K. The role of sulphur in ruminant nutrition: a review. **Livestock production science**, v.11, p.611-624,1984a.
- LEONEL, F.P. Comunicação pessoal. 11/05/2007. Serrana Nutrição animal, São Paulo - Brasil.
- LOOSLI, J.K.; HARRIS, L.E. Methionine increases the value of urea for lambs. **Journal of Animal Science**, v.4, p.435-437, 1945.
- McFLARNE, J.D.; JUDSON, G.J.; TURNBULL, R.K. An evaluation of copper containing soluble glass pellets, copper oxide particles and injectable cooper as supplements for cattle and sheep. **Australioan Journal Exp. Agricultural**. Melbourne, v.31, p.165-73,1991.
- McDOWELL, L.R. **Mineral in Animal and Human Nutrition**. New York: Academic Press, 1992.
- MORRISON, M.; MURRRAY, M.; BONIFACE, A.N. Nutrient metabolism and rúmen microorganisms in sheepa feed a por quality tropical grass hay supplement with sulphate. **Journal of Agricultural Science** v.115, p.269-275, 1990.
- MOIR, R.J. Implications of the N:S ratio and differential recycling. In: Muth, O.H. and Oldfield, J.E. (eds) **Sulphur in nutrition – Symposium Proceedings**. AVI Publishing Company, Westport, Connecticut, p.165-170.1970.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7 ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 200. 381p.

- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7.ed. Washington, D.C.:National Academy Press, 1996. 242p.
- O'DELL, B. L. Mineral-ion interaction as assessed by bioavailability and ion channel function. In: B. L. O'Dell and R. A. Sunde (Eds.) **Handbook of nutritionally essential mineral elements**. 1997. p. 641-659.
- POPE, A.L. The effect of sulphur and Se<sup>75</sup> absorption and retention in sheep. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.109, p.1448-55, 1979.
- RODRIGUES, A.A.; TORRES, R.A.; ESTEVES, S.N. Efeito da suplementação com nitrogênio e enxofre no consumo e ganho de peso por novilhas alimentadas com cana-de-açúcar. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.8, p.148-155, 1992a.
- RODRIGUES, A.A.; VIEIRA, P.F.; TORRES, R.A. et al. Efeito da uréia e sulfato de cálcio na digestibilidade de cana-de-açúcar por ruminantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p.1421-1427, 1992b.
- RIBEIRO, L.F.; STAHLY, T.S.; CROMWELL, G.L. Effects of copper, with or without ferrous sulfide, and antibiotics on the performance of pigs. **Journal of Animal Science**. n.52 p.241, 1981.
- RESS, M.C.; MINSON, D.J. Fertilizer sulphur as a factor affecting voluntary intake, digestibility and retention time of pangola grass (*Digitaria decumbens*) in sheep. **British Journal of Nutrition**, v.39, p.5-11, 1978.
- SPEARS, J. W., D. G. ELY AND L. P. BUSH. Influence of supplemental sulfur on “*in vitro*” and *in vivo* microbial fermentation of Kentucky 31 tall fescue. **Journal of Animal Science**. v.47. p.552, 1978.
- UNDERWOOD, E.J. **The mineral nutrition of livestock**, 3.ed. New York: CABI Publishing, 2000.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. New York: Cornell University Press, Ithaca, 1994. 476p.
- WESTON, R.H., LINDSAY, J.R., PURSER, D.B., GORDON, G.L.R. AND DAVIS, P. Feed intake and digestion responses in sheep to the addition of inorganic sulfur to a herbage diet of low sulfur content. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.39, p.1107-1119, 1988.

### **3. CAPÍTULO 1**

## **Avaliação de fontes de enxofre em suplementos proteínados para bovinos: Consumo, digestibilidade e parâmetros ruminais**

### **3.1. INTRODUÇÃO**

O valor dos alimentos como fontes de enxofre para ruminantes depende da disponibilidade e de outros fatores importantes para a síntese de proteína microbiana, como a presença de nitrogênio e de fontes de energia sendo então o valor nutritivo mais relacionado a relações enxofre: nitrogênio que propriamente a concentração de enxofre.

Algumas fontes inorgânicas podem ser mais solúveis que outras e sua utilização pode se tornar viável. O enxofre pode ser encontrado em diversas formas no mercado, na composição de suplementos prontos, em sua forma pura ou de sulfatos. Para cada forma existe uma fórmula do elemento, uma porcentagem de enxofre contida em sua fórmula e outras características, como a forma física e a biodisponibilidade, que é quanto do enxofre estará disponível para o aproveitamento do animal na digestão. Para tornar-se disponível, o enxofre inorgânico (elementar) deve ser oxidado a sulfato ou reduzido a sulfito, constituindo o chamado ciclo do enxofre (Underwood e Suttle, 1999). Esse ciclo é altamente dependente dos microrganismos.

O enxofre pode ser adicionado na ração ou no sal mineral que será fornecido ao animal, sem diferenças notáveis nos dois processos, sendo que o enxofre é geralmente adicionado ao sal, visto que vários suplementos encontrados no mercado possuem este elemento em sua composição.

O consumo de alimentos pode ser influenciado diretamente pela presença de enxofre na dieta, pois a síntese de aminoácidos sulfurados é essencial para o máximo crescimento microbiano e conseqüentemente maior digestibilidade da matéria seca, sabe-se que a ingestão de enxofre juntamente com a uréia melhora a capacidade de aproveitamento da amônia existente no rúmen, formada a partir do nitrogênio (protéico ou não) proveniente da dieta, pelos microrganismos ruminais, já que há formação de

aminoácidos sulfurados que serão utilizados mais rapidamente no rúmen, determinando um aproveitamento mais efetivo da proteína.

O metabolismo protéico também libera enxofre que é incorporado à proteína microbiana. A proporção de nitrogênio (N): enxofre (S) na proteína microbiana é 14,5 : 1. A deficiência de enxofre na dieta ocasiona mudanças na fermentação microbiana. A utilização de nitrogênio não protéico (NNP) é prejudicada por baixos níveis de enxofre no fluido ruminal e o crescimento microbiano é retardado. Esta deficiência também reduz a utilização de lactato pelas bactérias ruminais, resultando no seu acúmulo. Ocorre, então, uma apreciável redução na digestão de celulose, possivelmente devido à redução do crescimento bacteriano (Church, 1988). Por esta razão o enxofre melhora a digestão microbiana de celulose, contribuindo para a síntese de aminoácidos, em especial de metionina e cistina.

Nesse contexto, objetivou-se avaliar os efeitos da utilização de diferentes fontes inorgânicas de enxofre em suplementos proteinados sobre o consumo de matéria seca, digestibilidade dos nutrientes e parâmetros ruminais (pH e amônia) em novilhos mestiços.

## 3.2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1. Local, animais, tratamentos e coletas

O experimento foi conduzido na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Corte (UEPE-GC) do Departamento de Zootecnia (DZO), e as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do DZO da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

A cidade de Viçosa está localizada na Zona da Mata Mineira, com 649 m de altitude. Geograficamente está definida pelas coordenadas de 20°45'20" de latitude sul e 42°52'40" de longitude oeste. De acordo com dados fornecidos pelo Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, o clima de Viçosa é subtropical, com inverno frio e seco e verão quente e úmido, sendo classificado como Cwa subtropical, segundo a classificação proposta por Köppen. Apresenta precipitação pluviométrica anual média de 1342 mm, sendo que 80% das chuvas caem entre os meses de outubro a março, período chuvoso, e os 20% restantes, entre os meses de abril a setembro, período seco. A temperatura média das máximas é de 26,1°C; a média das mínimas, de 14°C; e a umidade relativa do ar, de 80%

Foram utilizados cinco novilhos mestiços Holandês x Zebu, fistulados no rúmen e no abomaso, com peso médio inicial de aproximadamente 280 kg, distribuídos em um delineamento quadrado latino 5 X 5.

O experimento constou de cinco períodos com duração de 16 dias cada, sendo os dez primeiros para adaptação e os demais para a coleta de dados.

Os animais foram mantidos em baias cobertas e individuais, com cochos para alimentação volumosa, suplementar (alimentos em teste) e água. Os alimentos foram fornecidos *ad libitum* duas vezes ao dia, às 8:00 e às 15:00 hs. Diariamente foram feitas pesagens das quantidades das dietas fornecidas e das sobras de cada tratamento para estimativa do consumo. Realizou-se monitoramento diário do consumo a fim de manter as sobras dos alimentos em torno de 10% do oferecido, com base na matéria seca. No



momento da alimentação, durante o período experimental, foram feitas amostragens das dietas e sobras.

Os animais foram submetidos a cinco tratamentos, variando-se a fonte de enxofre no sal proteinado, sendo: 1 - enxofre elementar 70S; 2 - enxofre elementar 98S; 3 - sulfato de cálcio (Gesso hidratado); 4 - sulfato de cálcio (Gesso anidro) e 5 - sulfato de amônio. O volumoso fornecido foi o feno de *Brachiaria dictyoneura*. Foram usados na formulação dos sais proteinados, fubá de milho, farelo de soja, carbonato de cálcio, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de ferro, fosfato bicálcico, iodato de cálcio, óxido magnésio, sulfato de manganês, selenito sódio, sal branco, sulfato de zinco e uréia. Em todos os tratamentos foi mantida uma relação nitrogênio: enxofre de 11: 1.

As dietas foram isoprotéicas, com 50% de proteína bruta nas misturas minerais e formuladas para atender as exigências nutricionais, segundo recomendações do NRC (1996) para um ganho médio diário (GMD) de 0,5 kg /dia de peso vivo (PV).

O preparo das amostras compostas dos alimentos fornecidos e das sobras diárias de cada animal e as análises de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), compostos nitrogenados (N), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (LIG) seguiram as especificações descritas por Silva e Queiroz (2002).

### **3.2.2. Determinação do pH, amônia ruminal e enxofre fecal**

As coletas do fluido ruminal, para medição do pH e análise das concentrações de amônia ( $\text{N-NH}_3$ ) ruminal, foram realizadas 0, 4, 8 e 12 horas após o fornecimento da alimentação matinal, no 15º dia de cada período experimental. Para medição do pH foram colhidos 100 mL do líquido ruminal, aproximadamente, fazendo-se a leitura imediatamente com auxílio de um potenciômetro digital. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a 50%, a cada amostra com objetivo de cessar a atividade microbiana e, em seguida, as amostras foram armazenadas em “freezer” a

-20 °C para posterior análise das concentrações de N-NH<sub>3</sub> ruminal. A análise de amônia foi feita pelo método colorimétrico de Chaney e Marbach (1962)

O teor de enxofre nas fezes foi determinado segundo Willians et al. (1962) utilizando-se espectrômetro de absorção atômica.

### 3.2.3. Excreção fecal e digestibilidade

Utilizou-se como indicador externo o óxido crômico (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) com 57% de cromo, em uma quantidade de 10 g/animal/dia, infundido diretamente via fístula ruminal para estimativa da produção fecal e de digesta abomasal com objetivo de determinar a digestibilidade “*in vivo*”. As fezes foram coletadas diretamente no reto entre o 11º e 15º dias de cada período experimental, com diferença de duas horas em cada dia de coleta, sendo as fezes acondicionadas em bandejas de alumínio devidamente identificadas, e em seguida secas em estufa a 65°C.

Após, as amostras foram moídas em moinho tipo “Willey”, com peneira de 1 mm, e armazenadas como amostras compostas por animal e período, em vidros com tampa de polietileno. Nestas amostras foram efetuadas as análises da concentração de cromo, matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (corrigida para cinzas e proteína) (FDNcp), proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN), cinza insolúvel em detergente neutro (CIDN) e extrato etéreo (EE) para a determinação da digestibilidade total.

Os teores de carboidratos não-fibrosos (CNF) foram estimados segundo Sniffen et al.(1992):

$$\text{CNF} = 100 - [\% \text{PB} + \% \text{EE} + \% \text{MM} + \% \text{FDNcp}]$$

O teor de cromo nas fezes e digesta abomasal foi determinado segundo Williams et al. (1962), utilizando-se espectrômetro de absorção atômica.

A equação utilizada para cálculo do NDT foi:

$$\text{NDT} = \text{PBD} + 2,25 \times \text{EED} + \text{FDNcpD} + \text{CNFD}$$

Em que PBD, EED, FDNcpD e CNFD significam: proteína bruta digestível, extrato etéreo digestível, fibra em detergente neutro (corrigida para cinzas e proteína) digestível e carboidratos não fibrosos digestíveis.

Durante os seis dias de fornecimento do indicador, procedeu-se à coleta de 500 mL de amostras da digesta abomasal em intervalos de 26 horas, totalizando quatro amostras, que foram conservadas em “freezer” a -20°C, para a determinação das digestibilidades parciais. O material coletado, após ser descongelado e seco em estufa a 65°C, formou amostras compostas por animal e período, no qual foram determinados os teores de cromo, MS, MM, PB, FDNcp, EE e CNF, análises estas relativas às digestibilidades parciais.

O valor do coeficiente de digestibilidade total (CDN) de cada nutriente foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Coef. Dig. Nutr.} = 100 - 100 \left[ \frac{\frac{\% \text{ do indicador na MS do alimento}}{\% \text{ do indicador na MS abomasal ou fecal}} \times \frac{\% \text{ do nutriente no abomaso ou fezes}}{\% \text{ do nutriente no alimento}} \right]$$

Nas Tabelas 1 e 2, são apresentadas as porcentagens dos ingredientes utilizados na formulação dos proteinados e as quantidades dos ingredientes em cada mistura. Na Tabela 3 são apresentadas as composições bromatológicas médias dos feno.

TABELA 1 – Porcentagem dos ingredientes no sal proteinado, expresso na base da matéria seca

| Item                           | EE 70S <sup>1</sup> | EE 98S <sup>2</sup> | SC H <sup>3</sup> | SC A <sup>4</sup> | SA <sup>5</sup> |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
|                                | (%)                 |                     |                   |                   |                 |
| Carbonato de cálcio            | 2,1772              | 2,1793              | 0,2373            | 0,6122            | 2,1772          |
| Sulfato de cobalto             | 0,0150              | 0,0150              | 0,0150            | 0,0150            | 0,0150          |
| Sulfato de cobre               | 0,1200              | 0,1200              | 0,1200            | 0,1200            | 0,1200          |
| Enxofre elementar 70S          | 0,8065              | -                   | -                 | -                 | -               |
| Enxofre elementar 98S          | -                   | 0,6061              | -                 | -                 | -               |
| Sulfato de cálcio di-hidratado | -                   | -                   | 3,0769            | -                 | -               |
| Sulfato de cálcio anidro       | -                   | -                   | -                 | 2,7027            | -               |
| Sulfato de amônio              | -                   | -                   | -                 | -                 | 2,5000          |
| Sulfato de ferro               | 0,0000              | 0,0000              | 0,0000            | 0,0000            | 0,0000          |
| Fosfato bicálcico              | 13,8889             | 13,8889             | 13,8889           | 13,8889           | 13,8889         |
| Iodato de cálcio               | 0,0040              | 0,0040              | 0,0040            | 0,0040            | 0,0040          |
| Óxido magnésio                 | 0,0000              | 0,0000              | 0,0000            | 0,0000            | 0,0000          |
| Sulfato de manganês            | 0,1071              | 0,1071              | 0,1071            | 0,1071            | 0,1071          |
| Selenito sódio                 | 0,0011              | 0,0011              | 0,0011            | 0,0011            | 0,0011          |
| Sal branco                     | 27,0270             | 27,0270             | 27,0270           | 27,0270           | 26,8243         |
| Sulfato de zinco               | 0,1714              | 0,1714              | 0,1714            | 0,1714            | 0,1714          |
| Farelo de milho                | 25,4500             | 25,4500             | 25,4500           | 25,4500           | 25,4500         |
| Farelo de soja                 | 15,0000             | 15,0000             | 15,0000           | 15,0000           | 15,0000         |
| Uréia                          | 14,9000             | 14,9000             | 14,9000           | 14,9000           | 13,7400         |
| Veículo qsp                    | 0,3300              | 0,5300              | 0,0000            | 0,0000            | 0,0000          |
| Total                          | 100                 | 100                 | 100               | 100               | 100             |

<sup>1</sup> EE 70S = Enxofre elementar 70S (74% de enxofre); <sup>2</sup> EE 98S = Enxofre elementar 98S (98% de enxofre); <sup>3</sup> SC H = Sulfato de cálcio di-hidratado (12,75% de enxofre); <sup>4</sup> SC A = Sulfato de cálcio anidro (17,23% de enxofre); <sup>5</sup> SA = Sulfato de amônio (24% de enxofre).

TABELA 2 – Proporção de macronutrientes e micronutrientes, proteína bruta (PB), nutrientes digestíveis totais (NDT), nitrogênio não protéico (NNP) e relação nitrogênio: enxofre presentes no sal proteinado

| Item                     | EE 70S <sup>1</sup> | EE 98S <sup>2</sup> | SC H <sup>3</sup> | SC A <sup>4</sup> | SA <sup>5</sup> |
|--------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| (g/kg)                   |                     |                     |                   |                   |                 |
| Enxofre                  | 6,42                | 6,42                | 6,42              | 6,42              | 6,42            |
| Cálcio                   | 40,22               | 40,01               | 40,00             | 40,00             | 40,01           |
| Fósforo                  | 25,00               | 25,00               | 25,00             | 25,00             | 25,00           |
| Magnésio                 | 2,50                | 2,50                | 2,50              | 2,50              | 2,50            |
| Sódio                    | 100,00              | 100,00              | 100,00            | 100,00            | 94,55           |
| (mg/kg)                  |                     |                     |                   |                   |                 |
| Cobalto                  | 30,00               | 30,00               | 30,00             | 30,00             | 30,00           |
| Cobre                    | 300,00              | 300,00              | 300,00            | 300,00            | 300,00          |
| Ferro                    | 347,22              | 347,22              | 347,22            | 347,22            | 347,22          |
| Iodo                     | 25,00               | 25,00               | 25,00             | 25,00             | 25,00           |
| Manganês                 | 300,00              | 300,00              | 300,00            | 300,00            | 300,00          |
| Selênio                  | 5,00                | 5,00                | 5,00              | 5,00              | 5,00            |
| Zinco                    | 600,00              | 600,00              | 600,00            | 600,00            | 600,00          |
| (%)                      |                     |                     |                   |                   |                 |
| NDT                      | 30,94               | 30,94               | 30,94             | 30,53             | 30,94           |
| PB                       | 50,91               | 50,91               | 50,91             | 49,52             | 50,91           |
| (g/kg)                   |                     |                     |                   |                   |                 |
| NNP equivalente proteína | 418,69              | 418,69              | 418,69            | 418,69            | 418,69          |
| NNP                      | 67,05               | 67,05               | 67,05             | 67,05             | 67,05           |
| EM (Kcal/kg)             | 1118,67             | 1118,67             | 1118,67           | 1103,70           | 1118,67         |
| Relação N:S              | 11,18               | 11,18               | 11,18             | 11,18             | 11,175          |

<sup>1</sup> EE 70S = Enxofre elementar 70S (74% de enxofre); <sup>2</sup> EE 98S = Enxofre elementar 98S (98% de enxofre); <sup>3</sup> SC H = Sulfato de cálcio di-hidratado (12,75% de enxofre); <sup>4</sup> SC A = Sulfato de cálcio anidro (17,23% de enxofre); <sup>5</sup> SA = Sulfato de amônio (24% de enxofre).

TABELA 3 – Teores médios de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), carboidratos não-fibrosos (CNF), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (LIG), proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN), macrominerais e microminerais do feno utilizado em cada período (P)

| Item      | Volumosos |        |        |        |        |
|-----------|-----------|--------|--------|--------|--------|
|           | P1        | P2     | P3     | P4     | P5     |
| % MS      | 90,43     | 90,65  | 90,57  | 90,97  | 92,00  |
| (% MS)    |           |        |        |        |        |
| MO        | 84,32     | 84,44  | 85,10  | 75,93  | 84,00  |
| PB        | 7,62      | 6,25   | 4,40   | 3,64   | 4,39   |
| EE        | 1,60      | 1,15   | 1,16   | 1,01   | 1,52   |
| FDN       | 79,32     | 80,29  | 81,14  | 80,83  | 77,90  |
| CNF       | 5,62      | 8,68   | 10,43  | 12,58  | 10,14  |
| FDA       | 50,70     | 51,36  | 49,40  | 47,11  | 49,20  |
| LIG       | 6,02      | 6,00   | 4,75   | 4,67   | 5,15   |
| PIDN      | 3,47      | 2,10   | 1,42   | 1,80   | 2,54   |
| (g/kg MS) |           |        |        |        |        |
| Mg        | 2,38      | 2,59   | 2,73   | 3,13   | 2,76   |
| Ca        | 1,47      | 1,50   | 1,52   | 1,72   | 1,57   |
| K         | 0,18      | 0,01   | 0,01   | 0,00   | 0,03   |
| P         | 0,00      | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   |
| S         | 2,62      | 2,76   | 2,58   | 2,63   | 2,60   |
| Na        | 0,3792    | 0,3872 | 0,3023 | 0,3360 | 0,3023 |
| Mn        | 0,2062    | 0,2042 | 0,1327 | 0,2126 | 0,1814 |
| Cr        | 0,0000    | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| Zn        | 0,0172    | 0,0164 | 0,0079 | 0,0295 | 0,0131 |
| Pb        | 0,0144    | 0,0136 | 0,0144 | 0,0146 | 0,0135 |
| Ni        | 0,0000    | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| Cd        | 0,0005    | 0,0005 | 0,0006 | 0,0006 | 0,0006 |
| Cu        | 0,0510    | 0,0062 | 0,0040 | 0,0312 | 0,0040 |
| Al        | 0,2835    | 0,2787 | 0,1876 | 0,2856 | 0,2178 |
| Fe        | 0,1830    | 0,1433 | 0,1352 | 0,1816 | 0,1282 |

### 3.2.4. Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi o quadrado latino com cinco períodos e cinco tratamentos, descrito por meio do modelo matemático a seguir:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + p_j + a_k + e_{ijk}$$

em que  $\mu$  = média geral;  $T_i$  = efeito fixo da dieta;  $p_j$  = efeito aleatório de período;  $a_k$  = efeito aleatório de animal;  $e_{ijk}$  = erro experimental.

Os dados coletados foram analisados por segundo o procedimento MIXED do programa estatístico Statistical Analyses System (SAS, 2007). Este procedimento define as variáveis fixas e aleatórias do modelo e utiliza o método de máxima verossimilhança restrita para estimar os componentes de variância (Perri & lemma, 1999). Foi considerado 5% como nível de significância.

Para as variáveis pH e N-NH<sub>3</sub>, utilizou-se o comando MIXED para a análise das medidas repetidas no tempo. As diferenças estatísticas dos parâmetros no tempo foram determinadas utilizando-se o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijkl} = \mu + D_i + p_j + a_k + e_{ijk} + T_l + (T*D)_{il} + k_{ijkl}$$

em que  $\mu$  = média geral;  $D_i$  = efeito fixo da dieta;  $p_j$  = efeito aleatório do período;  $a_k$  = efeito aleatório do animal;  $e_{ijk}$  = erro experimental da parcela;  $T_j$  = efeito fixo do tempo;  $(D*T)_{il}$  = interação tempo\*tratamento;  $k_{ijkl}$  = erro experimental da subparcela.

### 3.2.5. Cinética de passagem e degradação de partículas

Os ensaios de taxa de passagem e degradabilidade da fibra em detergente neutro foram realizados ao final dos cinco períodos experimentais. A taxa de passagem das partículas foi estimada utilizando-se o cromo como indicador.

Foram infundidos 10 gramas de óxido crômico embrulhados em papel diretamente no rúmen, pela fístula ruminal, uma única vez, antes da primeira alimentação. Após este procedimento, foi iniciada a coleta de fezes, durante um período de cinco dias, obtendo-se 15 amostras nos seguintes horários após a alimentação: 0, 4, 8, 12, 16, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120 e 144 horas.

As fezes foram coletadas diretamente no reto, sendo acondicionadas em bandejas de alumínio devidamente etiquetadas, em seguida, secas em estufa a 65°C. Após, as amostras foram moídas em moinho tipo “Willey”, com peneira de 1 mm, e armazenadas por tratamento, em vidros com tampa de polietileno, para posterior análise do teor de cromo.

A degradabilidade ruminal da FDN do feno foi estimada pela técnica do saco de náilon segundo Ørskov e McDonald (1979).

Foram pesados aproximadamente 0,25 g de feno de *Brachiaria dictyoneura*, que foram colocados em sacos de TNT (tecido-não-tecido) com dimensão de 5 x 5 cm e numerados externamente. Os sacos de TNT foram, anteriormente lavados em água fervente e secos em estufa com circulação de ar forçada a 60±5°C por 48 horas e em seguida em estufa a 105°C por 8 horas, esfriados em dessecador e pesados. Procurou-se manter a relação de 20 mg de MS/cm<sup>2</sup> de área de superfície dos sacos, conforme recomendações de Kirkpatrick e Kennelly (1987).

Os sacos de náilon foram introduzidos de uma só vez no rúmen e retirados nos intervalos de 0; 3; 6; 9; 12; 24; 36; 48; 72 e 96 horas, conforme recomendado por Mertens (1993). Imediatamente após serem removidos, foram colocados em balde com água fria para paralisação da atividade microbiana e, então, lavados em água corrente até que a mesma ficasse clara. Os sacos correspondentes ao tempo 0 h também foram lavados, juntamente com os anteriores. Terminada a lavagem, os mesmos foram secos



em estufa de circulação forçada, com temperatura de  $60\pm 5^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas e em seguida em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  por 8 horas sendo novamente esfriados em dessecador e pesados. Após a pesagem determinou-se a porcentagem de FDN, no resíduo.

A porcentagem de resíduo pós-incubação da FDN em cada tempo de incubação foi calculada pela proporção de alimento residual. Os parâmetros da cinética da degradação da FDN foram estimados utilizando-se o modelo descrito por (Mertens e Loften, 1980):

$$R(t) = [R(0) - U] e^{-k(t-L)} + U + e ; t > L \quad (1);$$

Em que:

R = Resíduo pós-incubação;

U = fração indigestível;

t = tempo de incubação;

L = período de latência discreto;

K = taxa de passagem das partículas no rúmen;

R(0) = resíduo de incubação no tempo zero.

Os parâmetros da cinética de passagem de partículas foram estimados através do modelo bicompartimental, sendo o primeiro compartimento denominado “raft” que é constituído por partículas recém-ingiridas e a parte ventral do rúmen, constituído de partículas pequenas dispersas na fase líquida. As comparações entre os modelos GnG1 que melhor se ajustaram foram obtidos pela seguinte equação (Matis et al., 1972):

$$C(t) = C_0 k_e \left\{ \delta^{N_r} e^{-k_e(t-\tau)} - e^{-\lambda_r(t-\tau)} \sum_{i=1}^{N_r} \delta^i \frac{[\lambda_r(t-\tau)]^{N_r-i}}{(N_r-i)!} \right\} \quad (2);$$

Sendo:

C (t) = concentração do indicador na matéria seca fecal em mg/kg;

$C(0)$  = concentração inicial do indicador no “raft” (mg/kg);  
 $\lambda_r$  ( $h^{-1}$ ) = taxa de transferência das partículas marcadas pelo indicador do “raft” para “pool” de partículas escapáveis;  
 $k_e$  ( $h^{-1}$ ) = taxa de escape do “pool” de partículas escapáveis marcadas com indicador do rúmem para o restante do trato gastrointestinal;  
 $t$  (h) = tempo após o fornecimento do indicador;  
 $\tau$  = tempo de transito do indicador entre sua saída do orifício retículo-omasal e o aparecimento nas fezes;  
 $N_r$  = ordem de dependência do tempo.

$$\delta = \frac{\lambda_r}{\lambda_r + k_e} \quad (3);$$

Sendo:

$\lambda_r$  ( $h^{-1}$ ) = taxa de transferência das partículas marcadas pelo indicador do raft para “pool” de partículas escapáveis;  
 $k_e$  ( $h^{-1}$ ) = taxa de escape do “pool” de partículas escapáveis marcadas com indicador do rúmem para o restante do trato gastrointestinal.

$$T = (t - \tau) \quad (4);$$

Onde:

$t$  (h) = tempo após o fornecimento do indicador;  
 $\tau$  = tempo de transito do indicador entre sua saída do orifício retículo-omasal e o aparecimento nas fezes.

A escolha da melhor versão ajustada para a Equação (2) foi realizada com base no critério Akaike e na probabilidade de verossimilhança (Burnham e Anderson, 2002).

Estes valores foram computados a partir das diferenças entre os valores obtidos para o critério Akaike de cada versão da referida equação para  $N_r$  variando de um a quatro. Como critérios adicionais, foram consideradas versões válidas da Equação (2), aquelas cujas estimativas dos parâmetros não tenham violado nenhuma pressuposição estabelecida para o modelo e que apresentaram estimativas paramétricas significativas (Vieira et al., 2008).

A degradabilidade efetiva (DE) foi calculada segundo a fórmula:

$$DE = k_d \left( \frac{1}{k_d + \bar{k}_r} \right) \left( 1 + \frac{\bar{k}_r}{k_d + k_e} \right) \quad (5);$$

Onde:

$k_d$  = taxa de degradação;

$k_r$  = taxa média de transferência das partículas marcadas pelo indicador do *raft* para “pool” de partículas escapáveis.

$$\bar{k}_r = \frac{\lambda_r}{N_r} \quad (6);$$

Em que:

$\lambda_r$  ( $h^{-1}$ ) = taxa de transferência das partículas marcadas pelo indicador do *raft* para “pool” de partículas escapáveis;

$N_r$  = ordem de dependência do tempo.

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os consumos médios diários de matéria seca de feno e proteinado (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDNcp), carboidratos não-fibrosos (CNF) e nutrientes digestíveis totais (NDT) são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 – Médias e coeficientes de variação (CV) para os consumos diários de matéria seca de feno (CMSF), proteinado (CMSP), proteína bruta (CPB), fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína (CFDNcp), matéria orgânica (CMO), carboidratos não fibrosos (CNF), nutrientes digestíveis totais (CNDT), concentração de NDT na dieta e na digesta do abomaso e digestibilidade total da PB e FDNcp obtida para as dietas experimentais

| Item                   | EE 70S <sup>1</sup> | EE 98S <sup>2</sup> | SC H <sup>3</sup> | SC A <sup>4</sup> | SA <sup>5</sup> | CV(%) |
|------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------|
|                        | g/kg PV             |                     |                   |                   |                 |       |
| CMS Feno               | 17,08               | 17,31               | 16,71             | 17,18             | 17,11           | 4,66  |
| CMS Proteinado         | 1,67                | 1,67                | 1,65              | 1,68              | 1,41            | 19,20 |
|                        | Kg/dia              |                     |                   |                   |                 |       |
| CPB                    | 0,48                | 0,47                | 0,47              | 0,47              | 0,45            | 7,46  |
| CFDNcp                 | 3,76                | 3,76                | 3,60              | 3,74              | 3,79            | 4,90  |
| CMO                    | 4,19                | 4,17                | 4,00              | 4,14              | 4,18            | 5,14  |
| CCNF                   | 0,95                | 0,94                | 0,89              | 0,94              | 0,87            | 10,96 |
| CEE                    | 0,088               | 0,085               | 0,084             | 0,086             | 0,079           | 9,00  |
| CNDT                   | 3,04                | 3,15                | 2,73              | 2,51              | 2,62            | 17,67 |
|                        | g/kg MS             |                     |                   |                   |                 |       |
| [NDT] na dieta         | 579,82              | 611,98              | 552,76            | 512,30            | 515,04          | 13,48 |
| [NDT] na digesta abom. | 345,10              | 355,34              | 348,32            | 323,74            | 247,90          | 42,05 |
|                        | %                   |                     |                   |                   |                 |       |
| Digest. Total da PB    | 55,79               | 58,11               | 52,49             | 47,27             | 49,24           | 12,54 |
| Digest. Total da FDNcp | 59,15               | 61,79               | 56,90             | 51,98             | 56,89           | 12,38 |

<sup>1</sup> EE 70S = Enxofre elementar 70S (74% de enxofre); <sup>2</sup> EE 98S = Enxofre elementar 98S (98% de enxofre); <sup>3</sup> SC H = Sulfato de cálcio di-hidratado (12,75% de enxofre); <sup>4</sup> SC A = Sulfato de cálcio anidro (17,23% de enxofre); <sup>5</sup> SA = Sulfato de amônio (24% de enxofre).

Observa-se que o consumo de MS de feno e de sal proteinado não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, o mesmo ocorreu com o consumo de PB e FDNcp. A ausência do efeito de tratamentos sobre o consumo de matéria seca e o consumo similar dos demais nutrientes nas diferentes dietas pode ser explicado pelas características e composição bromatológica das dietas que foi semelhante, visto que as diferentes fontes de enxofre utilizadas nas dietas foram suficientes para suprir as exigências dos microrganismos, semelhantemente a fonte usual de enxofre, o sulfato de amônio, pois o valor da digestibilidade não foi afetado.

No entanto, é oportuno destacar que segundo Mertens (1992), o consumo não é função somente do alimento, mas também do animal, das condições de alimentação e do clima. O consumo médio de FDNcp para as dietas experimentais de  $1,40 \pm 0,35$  % do PV foi superior aos 1,2% do PV sugerido por Mertens (1992), como controlador da ingestão de MS pelo enchimento. Sendo assim, a ingestão de MS foi controlada pelo enchimento, mostrando que os inconvenientes causados pelas fístulas e procedimentos de coletas interferiram pouco no consumo de FDNcp.

A ausência de efeito ( $P > 0,05$ ) da fonte de enxofre sobre as digestibilidades aparentes totais dos nutrientes indica que, apesar das diferenças entre as disponibilidades relativas das diferentes fontes de enxofre utilizadas, os microrganismos ruminais conseguiram atender suas exigências e conseqüentemente, manter um aproveitamento adequado dos nutrientes.

Os coeficientes positivos de digestibilidade ruminal da PB indicam que houve absorção de amônia no rúmen e, que, provavelmente, as dietas continham excesso de proteína degradável no rúmen, em relação à energia disponível.

É importante destacar também, que a digestibilidade aparente ruminal da FDNcp e da PB cujo os valores médios foram de 52,58 e 57,34%, respectivamente não foram influenciados pelo teor enxofre das dietas. Assim a digestibilidade da fibra exerceu maior influência na fermentação ruminal, no consumo de matéria seca e conseqüentemente na taxa de passagem em relação às fontes de enxofre.

As médias de pH e das concentrações de amônia ruminal, em função de dietas e tempo de coletas, são apresentadas na Tabela 5.

TABELA 5 – Valores médios de pH e amônia ruminal e enxofre fecal em função das diferentes dietas experimentais

| Item                      | EE 70S <sup>1</sup> | EE 98S <sup>2</sup> | SC H <sup>3</sup> | SC A <sup>4</sup> | SA <sup>5</sup> | CV(%) |
|---------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------|
| pH                        | 6,81                | 6,71                | 6,70              | 6,77              | 6,72            | 1,24  |
| N-NH <sub>3</sub> (mg/dL) | 12,10               | 12,82               | 12,58             | 13,53             | 8,43            | 17,44 |
| Enxofre Fecal (g/kg)      | 2,40                | 2,68                | 2,50              | 2,53              | 2,35            | 9,42  |

<sup>1</sup> EE 70S = Enxofre elementar 70S (74% de enxofre); <sup>2</sup> EE 98S = Enxofre elementar 98S (98% de enxofre); <sup>3</sup> SC H = Sulfato de cálcio di-hidratado (12,75% de enxofre); <sup>4</sup> SC A = Sulfato de cálcio anidro (17,23% de enxofre); <sup>5</sup> SA = Sulfato de amônio (24% de enxofre).

Não foi detectado efeito ( $P>0,05$ ) de dieta, de tempo de coletas nem da interação destes fatores para as características pH e amônia ruminal. Os valores médios de pH, que variaram de 6,70 a 6,81, que são considerados adequados para favorecer a atividade das bactérias fibrolíticas, bem como a degradação da fibra, segundo Hoover (1986).

A concentração de N-NH<sub>3</sub> no rúmen é consequência do equilíbrio entre sua produção, absorção e utilização pelos microrganismos. Hoover (1986) sugeriu que, para maximização do crescimento microbiano e digestão da fibra, são necessários 3,3 e 8,0 mg N-NH<sub>3</sub>/dL, respectivamente. Por sua vez, o NRC (2001) considera o valor de 5 mg/100 mL adequado para digestão da matéria orgânica.

Souza et al. (2006) estimaram máxima concentração de amônia ruminal de 13,14 mg/dL, às 2,90 horas após a alimentação, em animais recebendo dietas com pré-secado de capim-tifton 85 e silagem de sorgo. Pereira et al. (2007) estimaram máxima concentração de amônia ruminal de 14,89 mg/dL às 2,39 horas após a alimentação, em bovinos recebendo silagem de sorgo associada a 40% de concentrado.

As concentrações de N-NH<sub>3</sub>, cujos valores médios variaram de 8,43 a 13,53 mg/dL corroboram com os valores acima citados, sendo suficientes

para suportar o crescimento bacteriano, contudo pode-se observar que os valores obtidos são relativamente altos, o que pode ter causado certa perda de amônia e conseqüentemente gasto de energia via ciclo da uréia para sua eliminação. Os valores mais elevados de amônia ruminal podem ter sido causados pela rápida hidrólise da uréia no rúmen, em detrimento da degradação da fibra e utilização dos carboidratos, ocorrendo falta de sincronização na utilização destes nutrientes.

Com relação ao enxofre excretado, este aumenta de acordo com aumento no seu consumo e a principal porção do enxofre fecal é orgânica, oriunda de proteína bacteriana (Bird & Hume, 1971).

É sabido que em casos de intoxicação por excesso de enxofre pode ocorrer falta de motilidade ruminal e inapetência. Preston & Leng (1987) alertaram que níveis mais altos de consumo conduzem à geração de grandes quantidades do gás sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) que, quando eructado, pode entrar no pulmão e causando estresse nervoso e respiratório, contudo esses sintomas não foram observados neste experimento, mostrando que os valores encontrados para o enxofre fecal podem estar dentro de uma faixa adequada para esse nível de consumo, contudo não foram encontrados valores referência na literatura.

TABELA 6 – Fração indigestível (U), período de latência (L) e taxa de degradação das partículas no rúmen (kd) para o modelo de degradação em função das diferentes fontes de enxofre

| Parâmetro           | EE 70S <sup>1</sup> | EE 98S <sup>2</sup> | SC H <sup>3</sup> | SC A <sup>4</sup> | SA <sup>5</sup> |
|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| U                   | 0,2714              | 0,3128              | 0,2546            | 0,3011            | 0,2612          |
| L                   | 4,4442              | 5,794               | 4,647             | 4,057             | 3,6895          |
| kd, h <sup>-1</sup> | 0,0178              | 0,0212              | 0,0138            | 0,018             | 0,0149          |

<sup>1</sup> EE 70S = Enxofre elementar 70S (74% de enxofre); <sup>2</sup> EE 98S = Enxofre elementar 98S (98% de enxofre); <sup>3</sup> SC H = Sulfato de cálcio di-hidratado (12,75% de enxofre); <sup>4</sup> SC A = Sulfato de cálcio anidro (17,23% de enxofre); <sup>5</sup> SA = Sulfato de amônio (24% de enxofre).

TABELA 7 – Valores médios de TMR-TGI<sup>1</sup>, TMR-RR<sup>2</sup>, kp<sup>3</sup>, kd<sup>4</sup>, DE<sup>5</sup>, B<sup>6</sup>, i<sup>7</sup>, ke<sup>8</sup>,  $\tau$ <sup>9</sup>,  $\lambda_r$ <sup>10</sup>, C (0)<sup>11</sup>, Nr<sup>12</sup> e kr<sup>13</sup>

| Item                          | EE 70S <sup>14</sup> | EE 98S <sup>15</sup> | SC H <sup>16</sup> | SC A <sup>17</sup> | SA <sup>18</sup> |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|------------------|
| TMR-TGI, h                    | 69,218               | 91,953               | 83,137             | 81,123             | 83,144           |
| TMR-RR, h                     | 60,037               | 76,733               | 69,667             | 66,143             | 76,435           |
| kp, h <sup>-1</sup>           | 0,0144               | 0,0109               | 0,0120             | 0,0123             | 0,0120           |
| kd, h <sup>-1</sup>           | 0,0178               | 0,0212               | 0,0138             | 0,018              | 0,0149           |
| DE, %                         | 38,73                | 38,06                | 34,06              | 39,07              | 46,29            |
| B, %                          | 65,41                | 71,82                | 66,74              | 71,16              | 70,61            |
| i, %                          | 34,59                | 28,18                | 33,26              | 28,84              | 29,39            |
| ke, h <sup>-1</sup>           | 0,0385               | 0,0173               | 0,0213             | 0,0209             | 0,0285           |
| $\tau$ , h                    | 9,181                | 15,22                | 13,47              | 14,98              | 6,709            |
| $\lambda_r$ , h <sup>-1</sup> | 0,059                | 0,160                | 0,220              | 0,220              | 0,073            |
| C(0), mg/kg                   | 58380                | 56190                | 55920              | 41540              | 35730            |
| Nr, h <sup>-1</sup>           | 2                    | 3                    | 5                  | 4                  | 3                |
| kr, h <sup>-1</sup>           | 0,029                | 0,053                | 0,044              | 0,055              | 0,024            |

<sup>1</sup> tempo médio de retenção no trato gastrointestinal, <sup>2</sup> tempo médio de retenção no rúmen-retículo, <sup>3</sup> taxa de passagem, <sup>4</sup> taxa de degradação, <sup>5</sup> degradabilidade efetiva, <sup>6</sup> fração potencialmente degradável, <sup>7</sup> fração indegradável, <sup>8</sup> taxa de escape do “pool” de partículas escapáveis marcadas com indicador do rúmen orifício pelo retículo-omasal, <sup>9</sup> tempo de transito do indicador entre sua saída do orifício retículo-omasal, <sup>10</sup> taxa de transferência das partículas marcadas pelo indicador do raft para “pool” de partículas escapáveis, <sup>11</sup> concentração inicial do indicador no raft (mg/kg), <sup>12</sup> ordem de dependência do tempo, <sup>13</sup> taxa média de transferência das partículas marcadas pelo indicador do raft para “pool” de partículas escapáveis em função das diferentes fontes de enxofre, <sup>14</sup> EE 70S - Enxofre elementar 70S (74% de enxofre), <sup>15</sup> EE 98S - Enxofre elementar 70S (98% de enxofre), <sup>16</sup> SC H - Sulfato de cálcio di-hidratado (12,75% de enxofre), <sup>17</sup> SC A - Sulfato de cálcio anidro (17,23% de enxofre), <sup>18</sup> SA - Sulfato de amônio (24% de enxofre).

Neste estudo os perfis de degradação da FDN obtidos foram interpretados utilizando o modelo e as estimativas dos parâmetros da cinética de passagem de partículas ajustando os dados a diferentes modelos bicompartimentais (G1G1, G2G1, G3G1, G4G1, G5G1 e G6G1). Os modelos G2G1, G3G1, G5G1, G4G1 e G3G1 mostraram-se mais eficientes na determinação das estimativas dos parâmetros de cinética de passagem de partículas para as os tratamentos: enxofre elementar 70S, enxofre elementar 98S, sulfato de cálcio (Gesso hidratado), sulfato de cálcio (Gesso anidro) e sulfato de amônio, respectivamente.

Segundo Nocek & Russell (1988), os efeitos da fermentação impõem alguns condicionantes. Se a taxa de degradação da proteína exceder a taxa



de fermentação de carboidratos, grande quantidade de nitrogênio pode ser perdida como amônia. Quando a taxa de fermentação dos carboidratos exceder a de proteína, pode haver baixa produção de proteína microbiana. Quando a taxa de degradação do volumoso for muito lenta, ocorre diminuição na ingestão. As Figuras de 1 a 5 representam os perfis de degradação da fibra em função dos tratamentos avaliados e Figura 6, a comparação entre as curvas.

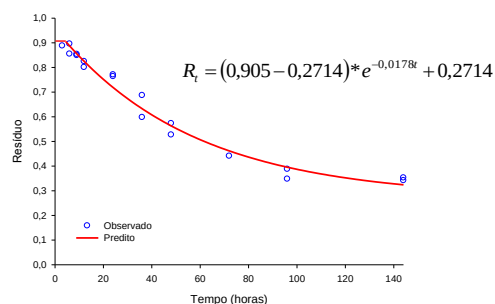


Figura 1 - Curva de degradação da fibra em função do tempo de incubação para a fonte de enxofre: enxofre elementar 70S.

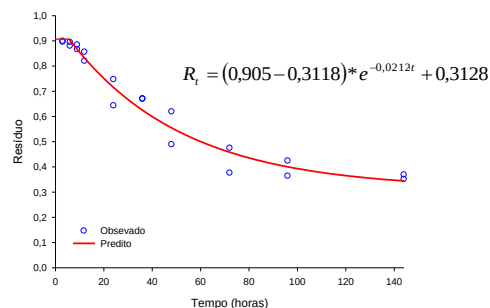


Figura 2 - Curva de degradação da fibra em função do tempo de incubação para a fonte de enxofre: enxofre elementar 98S.

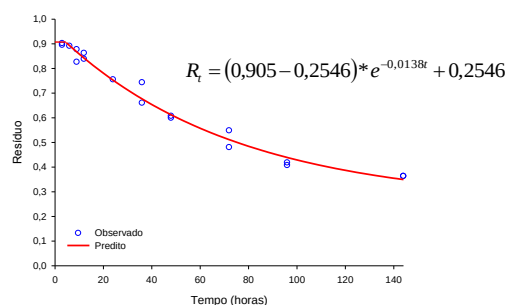


Figura 3 - Curva de degradação da fibra em função do tempo de incubação para a fonte de enxofre: Sulfato de Cálcio Hidratado.

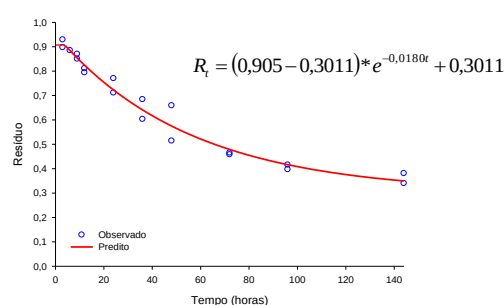


Figura 4 - Curva de degradação da fibra em função do tempo de incubação para a fonte de enxofre: Sulfato de Cálcio Anidro.

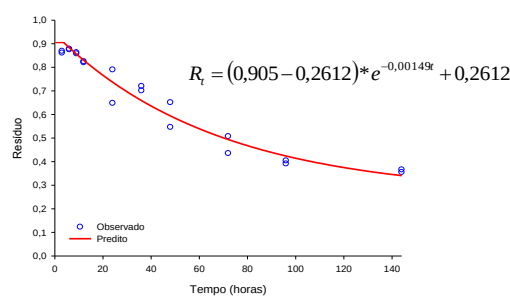


Figura 5 - Curva de degradação da fibra em função do tempo de incubação para a fonte de enxofre: Sulfato de Amônio.

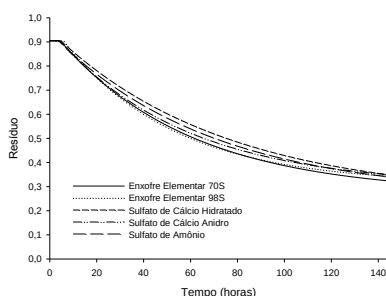


Figura 6 - Comparação entre as curvas de degradação da fibra em função do tempo de incubação para as diferentes fontes de enxofre.

Como pode ser observado, a fonte de enxofre utilizada teve pouca influência no perfil de degradação da fibra, visto que o volumoso utilizado foi o mesmo para todos os tratamentos experimentais, isto pode ser claramente verificado pela Figura 6.

### **3.4. CONCLUSÕES**

A utilização das diferentes fontes de enxofre no suplemento não afetou ( $P>0,05$ ) os consumos de MS do feno e do sal proteinado, PB, FDNcp, MO, CNF, EE e NDT, os coeficientes de digestibilidade da FDNcp e da PB, o pH ruminal, a concentração de amônia no rúmen.

Os modelos G2G1, G3G1, G5G1, G4G1 e G3G1 mostraram-se mais eficientes na determinação das estimativas dos parâmetros de cinética de passagem de partículas para as os tratamentos: enxofre elementar 70S, enxofre elementar 98S, sulfato de cálcio (Gesso hidratado), sulfato de cálcio (Gesso anidro) e sulfato de amônio, respectivamente.

### 3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIRD, P.R.; HUME, I.D. Sulphur metabolism and excretion studies in ruminants. IV Cysteine and sulphate effects upon the flow of sulphur from the rumen and upon sulphur excretion by sheep. **Australian Journal Agricultural Research**, v.22, p. 443-452, 1971.
- BURNHAM, K.P. AND D.R. ANDERSON. **Model selection and multimodel inference: A practical information-theoretic approach**. Second edition. Springer-Verlag, NewYork, USA. 2002.
- CHANEY, A.L., MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-132, 1962.
- CHEN, X.B.; GOMES, M.J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives- an overview of technical details. International Feed Research Unit. Rowett Research Institute. Aberdeen, UK. (occasional publication). 1992, 21p.
- CHURCH, D. C. **The ruminant animal digestive physiology and nutrition**. New Jersey: Prentice Hall. 1988, p.564.
- FUJIHARA, T.; ORSKOV, E.R.; REEDS, P.J. et al. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **Journal of Agricultural Science**, v. 109, n.1, p.7-12, 1987.
- HALL, M.B. **Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen**. Florida: University of Florida, 2000. p.A-25. (Bulletin 339).
- HOOVER, W.H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, v.69, n.10, p.2755-2766, 1986.
- MATIS, J.H. Gamma time-dependency in Blaxter's compartmental model. **Biometrics**, 28(2): p. 597-602. 1972.
- MERTENS, D.R. Análise de fibra e sua utilização na avaliação e formulação de rações. In: Simpósio Internacional de Ruminantes, Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 29, 1992, Lavras. **Anais...** Lavras: S.B.Z., p.188-219, 1992.
- MERTENS, D.R., LOFTEN, J.R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics "in vitro". **Journal of Dairy Science**, 63:1437-1446, 1980.
- MERTENS, D.R. Rate and extent of digestion. In: FORBES, J. M., FRANCE, J. (Eds.) **Quantitative aspects of ruminant digestion and**

- metabolism.** Cambridge, England: Commonwealth Agricultural Bureaux, Cambridge University Press, p.13-51.1993.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle.** 7.ed. Washington, D.C.:National Academy Press, 1996, 242p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle.** 7. ed. Washington, D.C.: 2001, 381p.
- NOCEK, J.E.; RUSSELL, J.B. Protein and energy as a integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.71, n.8, p.2070-2080, 1988.
- ØRSKOV, E. R., McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p.499-503, 1979.
- PEREIRA, D.H.; PEREIRA, O.G.; SILVA, B.C. et al. Intake and total and partial digestibility of nutrients, ruminal pH and ammonia concentration and microbial efficiency in beef cattle fed with diets containing sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) silage and concentrate in different ratios. **Livestock Science**, v.107, p.53-61, 2007
- PERRI, S.H.V.; IEMMA, A.F. Procedimento “MIXED” do SAS para análise de modelos mistos. **Scientia Agricola**, v.56, p.959-967, 1999.
- PRESTON, T.R.; LENG, R.A. Sulphur nutrition of ruminants. In: PRESTON, T.R.; LENG, R.A. (Ed.). **Matching ruminant production systems with available resources in the tropics and sub-tropics.** Armidale: Penambul Books, 1987. p.46-47.
- KIRKPATRICK, B.K.; KENNELLY, J.J. *In situ* degradability of protein and dry matter from single protein sources and from a total diet. **Journal of Animal Science**, v.65, p567- 576, 1987.
- KÖEPPEN, W. Climatologia. Buenos Aires: Panamericana, 1948, 478p.
- RENNÓ, L.N.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Concentração plasmática de uréia e excreções de uréia e creatinina em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v.29, n.4, p.1235-1243, 2000.
- SNIFFEN, C.J.; O’CONNOR, J.D.; Van SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluation cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, n.11, p.3562-3577, 1992.

- STATISTICAL ANALYSES SYSTEM - SAS. **User's guide**: statistics. versão 9.0. Cary: 2007.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de Alimentos (métodos químicos e biológicos)**. 3.ed. Viçosa: Editora UFV – Universidade Federal de Viçosa, 2002. 235p.
- SOUZA, V.G. PEREIRA, O.G.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Efeito da substituição de pré-secado de capim-tifton 85 por silagem de sorgo no consumo e na digestibilidade dos nutrientes e no desempenho de bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.6, p.2479-2486, 2006.
- UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. The mineral nutrition of livestock. 3.ed. London: CABI, 598p,1999.
- VIEIRA, R.A.M.; TEDESCHI, L.O.; CANNAS, A. A generalized compartmental model to estimate the fibre mass in the ruminoreticulum: 1. Estimating parameters of digestion. **Journal of Theoretical Biology**, doi: 10.1016/j.jtbi.2008.08.014, 2008.
- VIEIRA, R. A. M., L. O. TEDESCHI, AND A. CANNAS. A generalized model for describing fiber dynamics in the ruminant gastrointestinal tract. 1. The heterogeneity of the pool of fiber particles in the ruminoreticulum. **Beef Cattle Report in Texas**, Texas A&M University, College Station, TX. p.97-102 p.2007a.
- VIEIRA, R. A. M., L. O. TEDESCHI, AND A. CANNAS. A generalized model for describing fiber dynamics in the ruminant gastrointestinal tract. 2. Accounting for heterogeneous pools in the ruminoreticulum. **Beef Cattle Report in Texas**, Texas A&M University, College Station, TX. p.103-110 p.2007b.
- VERBIC, J.; CHEN, X.B.; MACLEOD, N.A. et al.. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**. v.114, n.3, p.243-248, 1990.
- WILLIAMS, C. H.; DAVID.; IISMAA, O. The determination chromic oxide in feces samples by atomic absorption spectrophotometry. **Journal of Agriculture Science**, v.59, p.381-385, 1962.

## 4. CAPÍTULO 2

### **Avaliação de fontes de enxofre em suplementos proteinados para bovinos: Produção microbiana “*in vitro*” e perfil de aminoácidos no abomaso**

#### **4.1. INTRODUÇÃO**

O enxofre mineral pode ser utilizado pelos mamíferos e pelas aves, em graus variáveis, apresentando principalmente efeito de promotor de crescimento. Os microrganismos do rúmen podem incorporar enxofre inorgânico em compostos orgânicos, como os aminoácidos sulfurados (Burk e Hill, 1994). Dietas com proteína de alta qualidade podem ter seus valores reduzidos pelos microrganismos do rúmen, entretanto, proteínas de baixa qualidade provenientes de gramíneas ou de fontes de nitrogênio não protéico como a uréia, suplementada com adequada quantidade de enxofre, podem ter seu valor aumentado através dos microrganismos do rúmen (Anderson et al., 1975). Embora animais ruminantes requeiram aminoácidos para o adequado crescimento microbiano e metabolismo, formulações baseadas na composição em aminoácidos de dietas são limitadas, em decorrência da necessidade de informações adicionais como o conteúdo de aminoácidos da proteína que chega ao duodeno em relação ao conteúdo de aminoácidos do alimento e as diferenças na absorção e na utilização metabólica de cada aminoácido (Maiga et al., 1996).

A proteína microbiana sintetizada no rúmen fornece, em dietas para bovinos, 50% ou mais dos aminoácidos disponíveis para absorção, portanto, é considerada fonte de alta qualidade e com perfil de aminoácidos relativamente constante. Logo, torna-se difícil a modificação na composição de aminoácidos na digesta duodenal (Stern et al., 1994; Schwab, 1996).

Contudo, em casos de deficiência de alguns minerais como o enxofre, podem ocorrer casos de redução na síntese microbiana e, conseqüentemente a disponibilidade da fonte de enxofre pode influenciar

nesse parâmetro, assim estudos completos de disponibilidade de diferentes fontes minerais e influências destes na degradabilidade ruminal, digestibilidade, composição de aminoácidos no abomaso e de eficiência de absorção e utilização são limitados.

Assim objetivou-se com esse estudo avaliar o perfil de aminoácidos disponíveis na digesta abomasal dos animais em função das diferentes fontes de enxofre utilizadas e a produção de proteína microbiana, *“in vitro”*, em função de diferentes relações de massa de enxofre na forma de sulfato de cálcio e enxofre elementar, para fundamentação de bases para utilização destas duas fontes em conjunto na suplementação mineral de bovinos.

## 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1. Local, animais, tratamentos e coletas

O experimento foi conduzido na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Corte (UEPE-GC) do Departamento de Zootecnia (DZO), e as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

A cidade de Viçosa está localizada na Zona da Mata Mineira, com 649 m de altitude. Geograficamente está definida pelas coordenadas de 20°45'20" de latitude sul e 42°52'40" de longitude oeste. De acordo com dados fornecidos pelo Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, o clima de Viçosa é subtropical, com inverno frio e seco e verão quente e úmido, sendo classificado como Cwa subtropical, segundo a classificação proposta por Köppen. Apresenta precipitação pluviométrica anual média de 1342 mm, sendo que 80% das chuvas caem entre os meses de outubro a março, período chuvoso, e os 20% restantes, entre os meses de abril a setembro, período seco. A temperatura média das máximas é de 26,1°C; a média das mínimas, de 14°C; e a umidade relativa do ar, de 80%

Foram utilizados cinco novilhos mestiços Holandês x Zebu, fistulados no rúmen e no abomaso, com peso inicial de aproximadamente 280 kg, distribuídos em quadrado latino 5 X 5.

O experimento constou de cinco períodos com duração de 16 dias cada um, sendo os dez primeiros para adaptação e os demais para a coleta de dados.

Os animais foram abrigados em baias cobertas e individuais, com acesso a cochos individuais para alimentação volumosa, suplementar (alimentos em teste) e água. Os alimentos foram fornecidos *ad libitum* duas vezes ao dia, às 8:00 e às 15 horas. Diariamente foram feitas pesagens das quantidades das dietas fornecidas e das sobras de cada tratamento para estimativa do consumo. Realizou-se monitoramento diário do consumo a fim de manter as sobras dos alimentos em torno de 10%, com base na matéria



seca. No momento da alimentação, durante o período experimental, foram feitas amostragens das dietas e sobras.

Os animais foram submetidos a cinco tratamentos, variando-se a fonte de enxofre no sal proteinado, sendo: 1 - enxofre elementar 70S; 2 - enxofre elementar 98S; 3 - sulfato de cálcio (Gesso hidratado); 4 - sulfato de cálcio (Gesso anidro) e 5 - sulfato de amônio. O volumoso fornecido foi o feno de capim *Brachiaria dictyoneura*. Foram usados na formulação dos sais proteinados, fubá de milho, farelo de soja, carbonato de cálcio, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de ferro, fosfato bicálcico, iodato de cálcio, óxido magnésio, sulfato de manganês, selenito sódio, sal branco, sulfato de zinco e uréia. Em todos os tratamentos foi mantido o uma relação nitrogênio : enxofre de 11 : 1.

As dietas foram isoprotéicas, com 50% de proteína bruta nas misturas minerais e formuladas para atender as exigências nutricionais, segundo recomendações do NRC (1996) para um ganho médio diário (GMD) de 0,5 kg/dia de peso vivo (PV).

#### **4.2.2. Síntese de proteína microbiana “*in vitro*” sob diferentes relações de sulfato de cálcio: enxofre elementar**

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia/UFV e as análises realizadas no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia/UFV, em Viçosa, MG. Avaliou-se a produção de proteína microbiana “*in vitro*” sob diferentes relações entre as fontes de enxofre: sulfato de cálcio (Gesso hidratado) e enxofre elementar 70S (74% de enxofre).

Os tratamentos foram obtidos por meio da inclusão de enxofre numa proporção de 40 µg/mL de líquido ruminal segundo recomendações de Kalhon et al. 1975, na forma sulfato de cálcio ou enxofre elementar e por relações entre essas duas fontes no líquido ruminal de um novilho fistulado no rúmen alimentado exclusivamente a pasto. Realizou-se também a incubação com líquido de rúmen de uma vaca alimentada com silagem de milho e concentrado numa relação volumoso: concentrado de 60: 40, e

podem ser observados a seguir: 100% do enxofre proveniente do enxofre elementar 70S; 10% sulfato de cálcio e 90% enxofre 70S; 20% sulfato de cálcio e 80% enxofre 70S; 30% sulfato de cálcio e 70% enxofre 70S; 40% sulfato de cálcio e 60% enxofre 70S; 50% sulfato de cálcio e 50% enxofre 70S; 60% sulfato de cálcio e 40% enxofre 70S; 70% sulfato de cálcio e 30% enxofre 70S; 80% sulfato de cálcio e 20% enxofre 70S; 90% sulfato de cálcio e 10% enxofre 70S; 100% do enxofre proveniente do sulfato de cálcio e testemunha sem enxofre inorgânico no suplemento.

O líquido de rúmen foi coletado (700 mL com pH em torno da neutralidade) nas primeiras horas da manhã, no caso do animal em regime em pastejo e duas horas após o arraçãoamento no caso do animal confinado, este foi filtrado em quatro camadas de gaze em garrafas térmicas com capacidade para 1 litro, previamente aquecidas com água a 40°C e transportado anaerobicamente para o laboratório para preparação e montagem do sistema de incubação. O líquido foi transferido para um erlenmayer e mantido a 39°C, sob anaerobiose, para a separação da fase líquida intermediária (inóculo contendo bactérias), dos protozoários e das partículas dos alimentos (fase mais densa) e sobrenadante, respectivamente.

O material foi adicionado em frascos de vidro de 80 mL, em duplicata, saturados com CO<sub>2</sub>, tampados com rolhas de borracha e lacres de alumínio, mantidos em uma sala climatizada, com temperatura constante de 39°C, em mesa de agitação orbital a 44 rpm.

Os frascos continham 40 mL de líquido ruminal isento de partículas alimentares, 2,41 mL de solução de uréia (concentração de 0,28 g/L), 5,78 mL de solução de sacarose (concentração de 27,7 g/L) e 40 µg/mL de enxofre, proveniente das diferentes relações sulfato de cálcio: enxofre 70S.

Ao final de 24 horas, a atividade microbiana foi cessada artificialmente por meio de redução rápida da temperatura, sendo retirado 1,5 mL de solução, esta foi centrifugada (10000 rpm por 10 minutos) descartando-se o sobrenadante, do precipitado formado, determinou-se a concentração de proteína por colorimetria pelo método de Bradford.

O método de Bradford 11 é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250.

Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em comprimento de onda de 595 nm.

Os dados foram analisados estatisticamente por meio recurso MIXED do programa estatístico SAS (SAS, 2007), em esquema fatorial 2x12 onde os animais consistiam nos níveis e as relações entre as fontes de enxofre nos fatores. Os parâmetros foram estimados segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \beta_j + (T\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

onde:  $T_i$  = efeito fixo do animal;  $\beta_j$  = efeito aleatório da fonte de enxofre;  $(T\beta)_{ij}$  é o efeito da interação entre  $T_i$  e  $\beta_j$  e  $e_{ijk}$  = erro experimental.

#### **4.2.3. Determinação do perfil de aminoácidos disponíveis no abomaso**

Durante cinco dias, procedeu-se à coleta de 300 mL de amostras da digesta abomasal dos animais, em intervalos de 26 horas, totalizando quatro amostragens, que foram conservadas a -20 °C.

Ao final do experimento as amostras de digesta abomasal foram descongeladas para formação de uma amostra composta por tratamento, em seguida foram congeladas em ultrafreezer a -80°C, após 24 horas e levadas ao liofilizador para retirada da umidade total, sendo encaminhadas ao laboratório FATEC-SP – Nutrição Animal e Medicamentos Veterinários, para determinação do perfil de aminoácidos por digestão com hidrólise ácida e leitura por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

#### **4.2.4. Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento estatístico utilizado foi o quadrado latino completo 5x5. As diferenças estatísticas dos parâmetros foram determinadas utilizando-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + p_j + a_k + e_{ijk}$$

em que  $\mu$  = média geral;  $T_i$  = efeito fixo da dieta;  $p_j$  = efeito aleatório de período;  $a_k$  = efeito aleatório de animal;  $e_{ijk}$  = erro experimental.

Os dados coletados foram analisados por intermédio o comando MIXED do programa estatístico SAS (SAS, 2007). Este procedimento define as variáveis fixas e aleatórias do modelo e utiliza o método de máxima verossimilhança restrita para estimar os componentes de variância (Perri & lemma, 1999). Foi considerado 5% como nível de significância.

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os valores médios dos aminoácidos metionina, cistina, alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, prolina, serina, treonina e valina em mg por kg de digesta abomasal e na Tabela 2 a produção de proteína microbiana “*in vitro*” sob diferentes relações de sulfato de cálcio e enxofre elementar.

TABELA 1 – Perfil de aminoácidos na digesta abomasal em função dos diferentes tratamentos e seus respectivos coeficientes de variação (CV%)

| Itens              | EE 70S <sup>1</sup> | EE 98S <sup>2</sup> | SC H <sup>3</sup> | SC A <sup>4</sup> | SA <sup>5</sup> | CV(%) |
|--------------------|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------|
| aas essenciais     | mg/kg de MS         |                     |                   |                   |                 |       |
| Arginina           | 18,52               | 18,04               | 18,80             | 18,78             | 19,16           | 10,28 |
| Fenilalanina       | 541,54              | 541,76              | 529,08            | 552,12            | 590,66          | 14,16 |
| Histidina          | 7,22                | 7,02                | 7,12              | 7,42              | 7,56            | 13,24 |
| Isoleucina         | 18,16               | 18,38               | 18,72             | 18,58             | 20,22           | 17,22 |
| Leucina            | 32,04               | 30,68               | 31,86             | 31,74             | 32,46           | 13,68 |
| Lisina             | 34,92               | 33,72               | 34,04             | 35,28             | 36,22           | 14,83 |
| Metionina          | 5,46                | 5,60                | 5,68              | 5,52              | 5,70            | 18,03 |
| Treonina           | 19,52               | 18,80               | 18,64             | 18,96             | 19,40           | 10,65 |
| Valina             | 20,40               | 19,82               | 19,70             | 19,94             | 20,30           | 11,36 |
| aas não essenciais | mg/kg de MS         |                     |                   |                   |                 |       |
| Ác. Aspártico      | 45,34               | 44,06               | 44,30             | 43,80             | 44,96           | 12,08 |
| Ác. Glutâmico      | 45,82               | 46,38               | 45,64             | 45,30             | 46,98           | 15,72 |
| Alanina            | 26,66               | 25,06               | 25,18             | 24,98             | 26,02           | 12,45 |
| Cistina            | 5,58                | 5,44                | 5,00              | 5,24              | 5,54            | 12,66 |
| Glicina            | 21,06               | 19,98               | 20,68             | 19,64             | 19,86           | 15,15 |
| Prolina            | 20,30               | 19,74               | 19,74             | 20,20             | 20,76           | 13,34 |
| Serina             | 100,42              | 101,24              | 107,62            | 149,18            | 114,10          | 32,64 |

<sup>1</sup> EE 70S = Enxofre elementar 70S (74% de enxofre); <sup>2</sup> EE 98S = Enxofre elementar 98S (98% de enxofre); <sup>3</sup> SC H = Sulfato de cálcio di-hidratado (12,75% de enxofre); <sup>4</sup> SC A = Sulfato de cálcio anidro (17,23% de enxofre); <sup>5</sup> SA = Sulfato de amônio (24% de enxofre).

Observa-se na Tabela 1 que não foram encontradas diferenças estatísticas para nenhum dos aminoácidos estudados em função das diferentes fontes de enxofre testadas, provavelmente devido a semelhança entre as fontes de enxofre estudadas e a ausência de diferenças significativas entre o consumo de nutrientes e similaridade entre as dietas, o que mostra que o perfil de aminoácidos disponíveis no abomaso sofreu pouca influência da fonte de enxofre utilizada.

Neste estudo, todos os animais tinham a uréia como principal fonte de proteína, Rossi Júnior et al. (2007), trabalhando com animais alimentados com dieta contendo farelo de algodão como fonte de proteína, encontraram níveis de asparagina, prolina, alanina, valina, lisina e arginina superiores aos obtidos com as dietas com uréia, no mesmo trabalho a quantidade de aminoácidos absorvidos no intestino foi igual para todos os aminoácidos sendo que não foram encontradas diferenças significativas entre dietas quanto à composição em treonina, serina, metionina, leucina, tirosina, fenilalanina, histidina e aminoácidos não-essenciais, confirmando os resultados encontrados neste trabalho, pois a alteração na composição da proteína microbiana é difícil de ser conseguida.

Para todas as fontes de enxofre os aminoácidos essenciais representaram aproximadamente 71,9% dos aminoácidos totais e os não essenciais 28,1%.

Os resultados mostram que a similaridade na composição das dietas e no consumo dos animais pode ter contribuído para os resultados.

As pesquisas nessa área recomendam que os teores de lisina e metionina digestíveis deveriam ser de 6,82 e 2,19%, respectivamente, da proteína metabolizável ou que a relação de lisina digestível: metionina digestível deveria ser de 3,1:1. No caso das dietas utilizadas essa relação é 7:1 aproximadamente, o que mostra que as dietas proveram um excesso de lisina para os animais. Assim, espera-se num futuro próximo que todas as rações para bovinos de corte e principalmente de leite sejam formuladas para atender as exigências de aminoácidos digestíveis. Como as práticas atuais de alimentação recomendam rações que contenham menos que 18%PB para vacas em início de lactação, alguns pesquisadores enfatizam que a otimização do equilíbrio na absorção dos aminoácidos da dieta é mais

importante para melhorar a produção de proteína no leite do que a quantidade de proteína bruta na ração. Pesquisas também relatam que um excesso de determinados aminoácidos, como a leucina, diminui a absorção de outras, por exemplo, a lisina, que é importante na produção de leite.

Mas um dos maiores problemas é que ainda não se sabe quais as exigências ideais de aminoácidos pelos bovinos.

Silva et al. (2002) avaliando as exigências de aminoácidos metabolizáveis para manutenção e para ganho de 1 kg de peso em bovinos Nelore, encontraram relações de lisina:metionina de 5,6 e 4,6:1 respectivamente, sendo esses resultados próximos dos resultados para aminoácidos disponíveis, encontrados neste trabalho para todas as fontes de enxofre utilizadas.

McDowell (1992) relatou que  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Sulfato de Sódio),  $\text{CaSO}_4$  (Sulfato de Cálcio), e uma mistura de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (Sulfato de Potássio) e  $\text{MgSO}_4$  (Sulfato de Magnésio) foram semelhantes para suplementar enxofre para vacas em lactação, sendo recomendado um nível de 0,17 a 0,20% de enxofre na matéria seca. Foram necessários aproximadamente três vezes mais enxofre na forma elementar que orgânica para cordeiros (Johnson; Goodrich; Meiske, 1971). Bull e Vandersall (1973) verificaram aumento de 68% para 81% na absorção aparente de enxofre utilizando DL-metionina quando comparado com enxofre elementar. Ammerman, Baker e Lewis (1995) identificaram  $^{35}\text{S}$  nos aminoácidos da lã, leite, plasma sanguíneo e tecidos, após alimentar os animais com  $^{35}\text{S}$  oriundo de sulfato.

O enxofre é conhecidamente componente dos aminoácidos essenciais: metionina, cistina e cisteína e é encontrado no organismo animal sob a forma de sulfatos. Os microrganismos do rúmen necessitam de enxofre para o desempenho de suas funções normais, sem o qual há uma diminuição da digestibilidade dos alimentos e uma menor retenção de nitrogênio. Eles podem incorporar enxofre inorgânico (das forragens e sais mineralizados) em compostos orgânicos e, este é utilizado para a síntese de aminoácidos sulfurados que são incorporados na proteína microbiana. Assim sendo, há uma relação considerada ótima entre Nitrogênio : Enxofre (N:S) de 15:1 (variando segundo a literatura entre 9 e 16:1) para que os

microrganismos ruminais possam sintetizar os aminoácidos sulfurados, a partir de fontes de nitrogênio não-protéico (NNP).

Em ruminantes torna-se dificultada a determinação exata da contribuição do enxofre para síntese de aminoácidos devido a influência da proteína não degradável no rúmen e endógena.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados para os teores de proteína microbiana “in vitro”, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos avaliados. A utilização do enxofre elementar foi necessária para satisfazer os requerimentos dos microrganismos, apesar de sua provável menor disponibilidade em relação as fontes orgânicas.

TABELA 2 – Produção de proteína microbiana “in vitro” sob diferentes relações de sulfato de cálcio e enxofre elementar

| Relações                                       | (mg/L)  | CV(%) |
|------------------------------------------------|---------|-------|
| 0%S.Ca <sup>1</sup> : 100% EE 70S <sup>2</sup> | 1150,16 | 8,57  |
| 10%S.Ca : 90 % EE 70S                          | 1250,79 |       |
| 20%S.Ca : 80 % EE 70S                          | 1296,61 |       |
| 30%S.Ca : 70 % EE 70S                          | 1210,54 |       |
| 40%S.Ca : 60 % EE 70S                          | 1172,67 |       |
| 50%S.Ca : 50% EE 70S                           | 1219,54 |       |
| 60%S.Ca : 40% EE 70S                           | 1287,34 |       |
| 70%S.Ca : 30% EE 70S                           | 1206,83 |       |
| 80%S.Ca : 20% EE 70S                           | 1224,58 |       |
| 90%S.Ca : 10 % EE 70S                          | 1205,77 |       |
| 100% S.Ca: 0 % EE 70S                          | 1199,15 |       |
| Sem fonte de enxofre                           | 1187,5  |       |

<sup>1</sup> S.Ca = Sulfato de Cálcio; <sup>2</sup>EE 70S = Enxofre elementar 70S.

Os valores de proteína microbiana variaram de 868,64 a 1376,06 mg/L para as incubações em líquido ruminal do animal alimentado com silagem de milho e concentrado e de 1007,42 a 1425,85 mg/mL para o animal alimentado exclusivamente a pasto.

O valor de suplementos minerais como fontes de enxofre para ruminantes dependem completamente da co-disponibilidade de outros



nutrientes necessários para síntese de proteína microbiana, como o nitrogênio principalmente, sendo que provavelmente a ausência de efeitos significativos se deve ao fato da alimentação dos animais utilizados já conterem um aporte adequado de enxofre para suprir adequadas taxas de crescimento microbiano ruminal, o que pôde ser visualizado através dos resultados apresentados, pois em condições de suprimento adequado de energia e proteína não foram verificadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ), ou efeitos de interação entre os níveis dos fatores.

Muitas são as avaliações comparativas sobre diferentes fontes de enxofre, baseando em equilíbrio de enxofre com pequena ou nenhuma indicação da habilidade de uma determinada fonte, para promover síntese microbiana ruminal. Técnicas baseadas em culturas “*in vitro*” de microrganismos ruminais retificaram valor nutricional que simulou eventos ruminais “*in vivo*”, mas os resultados obtidos apresentaram-se incompatíveis (Henry e Ammerman, 1995). Avaliações baseadas em respostas animais em suplementação geralmente são mais consistentes. Por exemplo, o enxofre é tido como um mineral que possui baixo valor nutritivo de 0 a 36% para métodos “*in vitro*”, 28 a 69% e 73 a 100% através de testes com crescimento de ovinos, quando comparados com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ou metionina (Henry e Ammerman, 1995).

#### 4.4. CONCLUSÕES

As concentrações dos aminoácidos avaliados, disponíveis no abomaso (g/kgMS) não diferiram entre as dietas avaliadas e seus valores foram inferiores aos descritos na literatura. À disponibilidade no abomaso dos diferentes aminoácidos não variou conforme as fontes de enxofre utilizadas sendo que o perfil de aminoácidos não dependeu das fontes de enxofre presente nas dietas.

A variação nas relações entre sulfato de cálcio e enxofre elementar não alteram a produção de proteína microbiana ruminal *“in vitro”*, indicando que as duas fontes em conjunto podem ser utilizadas como fontes de enxofre para ruminantes.

#### 4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMERMAN, C.B.; BACKER, D.H.; LEWIS, A.J. **Bioavailability of nutrients for animals: amino acids, minerals, vitamins**. 1.ed. California: Academic Press, 1995.
- ANDERSON, J.O.; WARNICK, R.E.; DALAIC, R.K. Replacing dietary methionine and cystine in sheep diet with sulfate or other sulfur compounds. **New Zealand Journal Science**, Welington, v.54, p.1122-1131, 1975.
- BULL, L.S.; VANDERSALL, J.H. Sulfur sores “in vitro” cellulose digestion and in vivo ration utilization, nitrogen metabolism, and sulfur balance. **Journal of Dairy Science**., Champaign, v.56, p.106-112, 1973.
- BURK, R.F.; HILL, K.E. Selenoprotein P.A selenium-rich extracellular glycoprotein. **Journal of Nutrition** ., Philidelphia, v.124, p.1891-1897, 1994.
- HENRY, P. R.; AMMERMAN, C. B. Selenium bioavailability. In: C. B. Ammerman, D. H. Baker and A. J. Lewis (Eds.) **Bioavailability of nutrients for animal.: amino acids, minerals, and vitamins**. Academic Press, San Diego. 1995.
- JOHNSON, W.H., GOODRICH, R.D.; MEISKE, J.C. Metabolism of radioactive sulfur from elemental sulfur, sodium sulfate and methionine by lambs. **Journal of Animal Science**. Champaign, v.32, p.778-785, 1971.
- KAHLON, T. S., J. C. MEISKE AND R. D. GOODRICH. Sulfur metabolism in ruminants. I. “in vitro” availability of various chemical forms of sulfur. **Journal of Animal Science**, 41:1147, 1975.
- KÖEPPEN, W. Climatologia. Buenos Aires: Panamericana, 1948, 478p.
- MAIGA, H.A.; SCHINGOETHE, D.J.; HENSON, J.E. Ruminal degradation, amino acid composition and intestinal digestibility of the residual components of five protein supplements. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.9, p.1647-53, 1996.
- MCDOWELL, L.R. **Minerals in Animal and Human Nutrition**. New York: Academic Press, 1992.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**, 7.ed. Washington, D.C.:National Academy Press, 1996, 242p.
- RODRIGUEZ, N.M. Exigências em aminoácidos para vacas de alta produção. In: **Simpósio Latino-Americano de Nutrição Animal e Seminário sobre Tecnologia da Produção de Rações**, 1996,

- Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, p.103-137, 1996.
- ROSSI JUNIOR, P.; SAMPAIO, A.A.M.; VIEIRA, P.F. Disponibilidade e absorção de aminoácidos em bovinos alimentados com diferentes fontes de compostos nitrogenados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, p.960-967, 2007.
- SILVA, F.F.; VALADARES FILHO, S. C.; ÍTAVO, L.C.V. ; et al. Exigências líquidas de aminoácidos para ganho de peso de Nelores não-castrados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n.2, p.765-775, 2002.
- SCHWAB, C.G. Rúmen-protected amino acids for dairy cattle: progress towards determining lysine and methionine requirements. **Animal Feed Science and Technology**, v.59, n.1, p.87-101, 1996.
- STATISTICAL ANALYSES SYSTEM - SAS. **User's guide**: statistics. versão 9.0. Cary: 2007.
- STERN, M.D.; CALSAMIGLIA, S.; ENDRES, M.I. Dynamics of ruminal nitrogen metabolism and their impact on intestinal protein supply. In: **Cornell Nutrition Conference For Feed Manufacturers**. ,Ithaca. Ithaca: Cornell University, 1994, p.105-116.
- SLYTER, L.L., CHALUPA, W. AND OLTJEN, R.R. Response to elemental sulphur by calves and sheep fed purified diets. **Journal of Animal Science**, v.66, p.1016-1027.1988.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

A utilização de enxofre elementar 70S; enxofre elementar 98S; sulfato de cálcio (Gesso hidratado); sulfato de cálcio (Gesso anidro) e sulfato de amônio não altera o consumo e os parâmetros ruminais de novilhos mestiços, indicando que as fontes de enxofre estudadas podem ser utilizadas mantendo-se uma relação nitrogênio: enxofre de 11: 1.

Os modelos G2G1, G3G1, G5G1, G4G1 e G3G1 mostraram-se mais eficientes na determinação das estimativas dos parâmetros de cinética de passagem de partículas para as os tratamentos: enxofre elementar 70S, enxofre elementar 98S, sulfato de cálcio (Gesso hidratado), sulfato de cálcio (Gesso anidro) e sulfato de amônio respectivamente.

As concentrações e a disponibilidade dos aminoácidos disponíveis no abomaso (g/kgMS) não diferiram entre as dietas avaliadas e seus valores foram inferiores aos descritos na literatura.

As fontes: sulfato de cálcio e enxofre elementar não alteram a produção de proteína microbiana ruminal “*in vitro*” quando utilizadas nas relações avaliadas indicando que a utilização destas duas fontes em conjunto podem ser uma alternativa para destinação dos excessos destes co-produtos.

## **APÊNDICE**

## APÊNDICE A

Tabela 1A - Animal, tratamento (Trat: EE 70S – enxofre elementar 70S, EE 98S – enxofre elementar 98S, SC H – Sulfato de cálcio hidratado, SC A - sulfato de cálcio anidro e S A – sulfato de amônio) e consumo total de matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína (FDNcp), matéria mineral (MM), carboidratos não-fibrosos (CNF), carboidratos totais (CHO) e matéria seca (MS)

| Animal | Trat   | Consumo (kg/dia) |       |       |       |       |       |       |       |
|--------|--------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|        |        | MS               | MO    | PB    | EE    | FDNcp | MM    | CNF   | CHO   |
| A5     | EE 70S | 3,724            | 2,995 | 0,420 | 0,073 | 2,714 | 0,374 | 0,539 | 3,264 |
| A1     | EE 70S | 5,281            | 4,218 | 0,563 | 0,085 | 3,806 | 0,570 | 0,955 | 4,781 |
| A2     | EE 70S | 4,555            | 3,682 | 0,393 | 0,072 | 3,338 | 0,444 | 0,865 | 4,218 |
| A4     | EE 70S | 4,992            | 4,101 | 0,350 | 0,068 | 3,658 | 0,440 | 0,950 | 4,621 |
| A3     | EE 70S | 7,336            | 5,962 | 0,654 | 0,142 | 5,304 | 0,778 | 1,434 | 6,764 |
| A2     | EE 98S | 4,415            | 3,567 | 0,483 | 0,085 | 3,293 | 0,427 | 0,605 | 3,911 |
| A4     | EE 98S | 4,684            | 3,768 | 0,474 | 0,073 | 3,408 | 0,479 | 0,794 | 4,217 |
| A1     | EE 98S | 5,571            | 4,487 | 0,497 | 0,090 | 4,063 | 0,559 | 1,089 | 5,171 |
| A3     | EE 98S | 7,245            | 5,860 | 0,596 | 0,108 | 5,200 | 0,729 | 1,557 | 6,782 |
| A5     | EE 98S | 3,829            | 3,149 | 0,305 | 0,071 | 2,838 | 0,370 | 0,674 | 3,523 |
| A1     | SC H   | 4,935            | 3,969 | 0,557 | 0,096 | 3,658 | 0,495 | 0,714 | 4,387 |
| A3     | SC H   | 6,419            | 5,108 | 0,703 | 0,105 | 4,603 | 0,712 | 1,202 | 5,829 |
| A5     | SC H   | 3,506            | 2,818 | 0,318 | 0,057 | 2,515 | 0,358 | 0,697 | 3,224 |
| A2     | SC H   | 4,766            | 3,873 | 0,374 | 0,069 | 3,442 | 0,461 | 0,988 | 4,446 |
| A4     | SC H   | 5,119            | 4,246 | 0,374 | 0,091 | 3,804 | 0,460 | 0,832 | 4,647 |
| A4     | SC A   | 4,502            | 3,639 | 0,490 | 0,086 | 3,361 | 0,433 | 0,612 | 3,985 |
| A5     | SC A   | 3,411            | 2,742 | 0,346 | 0,053 | 2,506 | 0,350 | 0,580 | 3,097 |
| A3     | SC A   | 6,694            | 5,401 | 0,588 | 0,107 | 4,892 | 0,663 | 1,291 | 6,206 |
| A1     | SC A   | 6,006            | 4,838 | 0,513 | 0,091 | 4,287 | 0,624 | 1,328 | 5,638 |
| A2     | SC A   | 4,965            | 4,077 | 0,402 | 0,092 | 3,640 | 0,486 | 0,888 | 4,542 |
| A3     | S A    | 7,225            | 5,819 | 0,667 | 0,099 | 5,378 | 0,726 | 1,040 | 6,437 |
| A2     | S A    | 4,474            | 3,600 | 0,452 | 0,069 | 3,257 | 0,457 | 0,756 | 4,027 |
| A4     | S A    | 4,962            | 4,027 | 0,412 | 0,077 | 3,656 | 0,468 | 0,909 | 4,580 |
| A5     | S A    | 3,207            | 2,674 | 0,186 | 0,040 | 2,411 | 0,243 | 0,533 | 2,950 |
| A1     | S A    | 5,851            | 4,768 | 0,510 | 0,112 | 4,246 | 0,608 | 1,119 | 5,384 |

Tabela 2A - Animal, tratamento (Trat: EE 70S – enxofre elementar 70S, EE 98S – enxofre elementar 98S, SC H –Sulfato de cálcio hidratado, SC A - sulfato de cálcio anidro e S A – sulfato de amônio) e consumo de matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína (FDNcp), matéria mineral (MM), carboidratos não-fibrosos (CNF), carboidratos totais (CHO) e matéria seca (MS) do feno de *Brachiaria dictyoneura*

| Animal | Trat   | Consumo (kg/dia) |       |       |       |       |       |       |       |
|--------|--------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|        |        | MS               | MO    | PB    | EE    | FDNcp | MM    | CNF   | CHO   |
| A5     | EE 70S | 3,409            | 2,874 | 0,260 | 0,055 | 2,649 | 0,208 | 0,210 | 2,858 |
| A1     | EE 70S | 4,759            | 4,019 | 0,297 | 0,055 | 3,698 | 0,296 | 0,411 | 4,109 |
| A2     | EE 70S | 4,141            | 3,524 | 0,182 | 0,048 | 3,252 | 0,227 | 0,432 | 3,683 |
| A4     | EE 70S | 4,626            | 3,961 | 0,168 | 0,047 | 3,582 | 0,247 | 0,567 | 4,149 |
| A3     | EE 70S | 6,621            | 5,688 | 0,290 | 0,101 | 5,156 | 0,403 | 0,687 | 5,842 |
| A2     | EE 98S | 4,076            | 3,437 | 0,310 | 0,065 | 3,222 | 0,249 | 0,251 | 3,473 |
| A4     | EE 98S | 4,278            | 3,612 | 0,267 | 0,049 | 3,324 | 0,266 | 0,369 | 3,693 |
| A1     | EE 98S | 5,030            | 4,281 | 0,221 | 0,059 | 3,950 | 0,275 | 0,524 | 4,475 |
| A3     | EE 98S | 6,521            | 5,583 | 0,237 | 0,066 | 5,049 | 0,349 | 0,800 | 5,849 |
| A5     | EE 98S | 3,535            | 3,037 | 0,155 | 0,054 | 2,777 | 0,215 | 0,367 | 3,143 |
| A1     | SC H   | 4,517            | 3,809 | 0,344 | 0,072 | 3,571 | 0,276 | 0,278 | 3,849 |
| A3     | SC H   | 5,743            | 4,850 | 0,359 | 0,066 | 4,463 | 0,357 | 0,496 | 4,958 |
| A5     | SC H   | 3,153            | 2,684 | 0,139 | 0,037 | 2,442 | 0,173 | 0,329 | 2,770 |
| A2     | SC H   | 4,328            | 3,706 | 0,157 | 0,044 | 3,352 | 0,231 | 0,531 | 3,882 |
| A4     | SC H   | 4,799            | 4,123 | 0,211 | 0,073 | 3,737 | 0,292 | 0,498 | 4,235 |
| A4     | SC A   | 4,161            | 3,509 | 0,317 | 0,067 | 3,290 | 0,254 | 0,256 | 3,546 |
| A5     | SC A   | 3,112            | 2,628 | 0,195 | 0,036 | 2,444 | 0,193 | 0,269 | 2,713 |
| A3     | SC A   | 6,062            | 5,159 | 0,267 | 0,071 | 4,761 | 0,332 | 0,632 | 5,393 |
| A1     | SC A   | 5,364            | 4,593 | 0,195 | 0,054 | 4,154 | 0,287 | 0,658 | 4,812 |
| A2     | SC A   | 4,569            | 3,926 | 0,200 | 0,069 | 3,558 | 0,278 | 0,474 | 4,032 |
| A3     | S A    | 6,709            | 5,621 | 0,405 | 0,069 | 5,271 | 0,456 | 0,501 | 5,772 |
| A2     | S A    | 4,089            | 3,452 | 0,256 | 0,047 | 3,177 | 0,254 | 0,353 | 3,530 |
| A4     | S A    | 4,545            | 3,868 | 0,200 | 0,053 | 3,569 | 0,249 | 0,474 | 4,043 |
| A5     | S A    | 3,056            | 2,616 | 0,111 | 0,031 | 2,379 | 0,163 | 0,375 | 2,754 |
| A1     | S A    | 5,307            | 4,560 | 0,233 | 0,081 | 4,133 | 0,323 | 0,550 | 4,683 |



Tabela 3A - Animal, tratamento (Trat: EE 70S – enxofre elementar 70S, EE 98S – enxofre elementar 98S, SC H – sulfato de cálcio hidratado, SC A - Sulfato de cálcio anidro e S A – sulfato de amônio) e consumo de matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína (FDNcp), carboidratos não-fibrosos (CNF), carboidratos totais (CHO) e matéria seca (MS) do suplemento proteinado

| Animal | Tratamento | Consumo (kg/dia) |       |       |       |       |       |       |
|--------|------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|        |            | MS               | MO    | PB    | EE    | FDNcp | CNF   | CHO   |
| A5     | EE 70S     | 0,315            | 0,121 | 0,160 | 0,018 | 0,066 | 0,329 | 0,406 |
| A1     | EE 70S     | 0,521            | 0,200 | 0,265 | 0,030 | 0,108 | 0,545 | 0,672 |
| A2     | EE 70S     | 0,415            | 0,159 | 0,211 | 0,024 | 0,086 | 0,433 | 0,534 |
| A4     | EE 70S     | 0,366            | 0,140 | 0,181 | 0,021 | 0,076 | 0,382 | 0,472 |
| A3     | EE 70S     | 0,715            | 0,274 | 0,364 | 0,041 | 0,149 | 0,747 | 0,921 |
| A2     | EE 98S     | 0,339            | 0,130 | 0,173 | 0,020 | 0,071 | 0,355 | 0,437 |
| A4     | EE 98S     | 0,406            | 0,155 | 0,207 | 0,023 | 0,085 | 0,424 | 0,524 |
| A1     | EE 98S     | 0,540            | 0,207 | 0,275 | 0,031 | 0,112 | 0,565 | 0,697 |
| A3     | EE 98S     | 0,725            | 0,277 | 0,359 | 0,042 | 0,151 | 0,757 | 0,934 |
| A5     | EE 98S     | 0,294            | 0,113 | 0,150 | 0,017 | 0,061 | 0,308 | 0,379 |
| A1     | SC H       | 0,417            | 0,160 | 0,213 | 0,024 | 0,087 | 0,436 | 0,538 |
| A3     | SC H       | 0,676            | 0,259 | 0,344 | 0,039 | 0,141 | 0,706 | 0,871 |
| A5     | SC H       | 0,352            | 0,135 | 0,179 | 0,020 | 0,073 | 0,368 | 0,454 |
| A2     | SC H       | 0,437            | 0,167 | 0,216 | 0,025 | 0,091 | 0,457 | 0,563 |
| A4     | SC H       | 0,320            | 0,123 | 0,163 | 0,019 | 0,067 | 0,334 | 0,413 |
| A4     | SC A       | 0,341            | 0,130 | 0,173 | 0,020 | 0,071 | 0,356 | 0,439 |
| A5     | SC A       | 0,298            | 0,114 | 0,152 | 0,017 | 0,062 | 0,312 | 0,384 |
| A3     | SC A       | 0,631            | 0,242 | 0,321 | 0,036 | 0,131 | 0,660 | 0,814 |
| A1     | SC A       | 0,642            | 0,246 | 0,318 | 0,037 | 0,134 | 0,670 | 0,827 |
| A2     | SC A       | 0,396            | 0,152 | 0,202 | 0,023 | 0,082 | 0,414 | 0,510 |
| A3     | S A        | 0,515            | 0,197 | 0,262 | 0,030 | 0,107 | 0,538 | 0,664 |
| A2     | S A        | 0,386            | 0,148 | 0,196 | 0,022 | 0,080 | 0,403 | 0,497 |
| A4     | S A        | 0,417            | 0,159 | 0,212 | 0,024 | 0,087 | 0,435 | 0,537 |
| A5     | S A        | 0,152            | 0,058 | 0,075 | 0,009 | 0,032 | 0,158 | 0,196 |
| A1     | S A        | 0,544            | 0,208 | 0,277 | 0,031 | 0,113 | 0,568 | 0,701 |

Tabela 4A - Animal, tratamento (Trat: EE 70S – enxofre elementar 70S, EE 98S – enxofre elementar 98S, SC H – sulfato de cálcio hidratado, SC A - sulfato de cálcio anidro e S A – sulfato de amônio) e amônia ruminal em função do tempo e fonte de enxofre

| Animal | Tratamento | Tempo de Coleta (h) |        |        |        |
|--------|------------|---------------------|--------|--------|--------|
|        |            | 0                   | 4      | 8      | 12     |
| A5     | EE 70S     | 66,99               | 274,52 | 302,60 | 167,63 |
| A1     | EE 70S     | 123,11              | 80,51  | 143,78 | 81,66  |
| A2     | EE 70S     | 72,47               | 107,04 | 122,09 | 99,26  |
| A4     | EE 70S     | 55,38               | 153,47 | 59,34  | 56,40  |
| A3     | EE 70S     | 114,69              | 111,49 | 116,54 | 109,23 |
| A2     | EE 98S     | 62,02               | 80,38  | 274,01 | 308,44 |
| A4     | EE 98S     | 47,47               | 75,28  | 56,79  | 92,24  |
| A1     | EE 98S     | 89,82               | 75,79  | 206,79 | 165,08 |
| A3     | EE 98S     | 74,90               | 253,34 | 174,77 | 114,69 |
| A5     | EE 98S     | 70,40               | 122,13 | 81,70  | 137,15 |
| A1     | SC H       | 142,50              | 202,45 | 401,43 | 68,39  |
| A3     | SC H       | 92,24               | 157,81 | 159,59 | 193,65 |
| A5     | SC H       | 60,10               | 39,06  | 176,94 | 101,43 |
| A2     | SC H       | 93,65               | 109,08 | 129,49 | 180,89 |
| A4     | SC H       | 35,96               | 60,16  | 45,66  | 65,48  |
| A4     | SC A       | 56,66               | 219,54 | 348,49 | 224,90 |
| A5     | SC A       | 62,53               | 57,55  | 111,89 | 121,58 |
| A3     | SC A       | 105,51              | 154,62 | 166,35 | 104,49 |
| A1     | SC A       | 185,87              | 180,77 | 162,91 | 89,82  |
| A2     | SC A       | 63,62               | 111,49 | 114,15 | 63,88  |
| A3     | S A        | 73,06               | 90,88  | 53,64  | 164,15 |
| A2     | S A        | 29,62               | 158,83 | 99,39  | 68,65  |
| A4     | S A        | 60,48               | 51,94  | 186,51 | 58,83  |
| A5     | S A        | 45,05               | 89,31  | 46,07  | 32,04  |
| A1     | S A        | 84,63               | 94,34  | 117,61 | 81,57  |

Tabela 5A - Animal, tratamento (Trat: EE 70S – enxofre elementar 70S, EE 98S – enxofre elementar 98S, SC H – sulfato de cálcio hidratado, SC A – sulfato de cálcio anidro e S A – sulfato de amônio) e pH ruminal em função do tempo e fonte de enxofre

| Animal | Tratamento | Tempo de Coleta (h) |      |      |      |
|--------|------------|---------------------|------|------|------|
|        |            | 0                   | 4    | 8    | 12   |
| A5     | EE 70S     | 6,77                | 6,96 | 6,97 | 6,82 |
| A1     | EE 70S     | 6,78                | 7,16 | 6,99 | 6,24 |
| A2     | EE 70S     | 6,76                | 6,87 | 6,91 | 6,85 |
| A4     | EE 70S     | 6,74                | 7,01 | 6,8  | 6,31 |
| A3     | EE 70S     | 6,87                | 6,95 | 6,74 | 6,64 |
| A2     | EE 98S     | 6,52                | 6,69 | 6,84 | 6,76 |
| A4     | EE 98S     | 6,82                | 6,88 | 6,78 | 6,43 |
| A1     | EE 98S     | 6,81                | 6,99 | 6,97 | 6,79 |
| A3     | EE 98S     | 6,33                | 6,96 | 6,64 | 5,74 |
| A5     | EE 98S     | 6,89                | 6,97 | 6,68 | 6,74 |
| A1     | SC H       | 6,93                | 7,05 | 7,1  | 6,83 |
| A3     | SC H       | 5,81                | 6,79 | 6,54 | 6,24 |
| A5     | SC H       | 6,88                | 6,87 | 6,92 | 6,84 |
| A2     | SC H       | 6,7                 | 6,96 | 6,84 | 6,68 |
| A4     | SC H       | 6,62                | 6,27 | 6,59 | 6,55 |
| A4     | SC A       | 6,74                | 7,11 | 7,1  | 6,81 |
| A5     | SC A       | 6,88                | 6,83 | 6,95 | 6,83 |
| A3     | SC A       | 6,65                | 6,73 | 6,53 | 6,22 |
| A1     | SC A       | 6,73                | 7,04 | 6,98 | 6,55 |
| A2     | SC A       | 6,69                | 6,84 | 6,58 | 6,65 |
| A3     | S A        | 6,64                | 6,56 | 6,38 | 6,72 |
| A2     | S A        | 6,52                | 6,96 | 6,78 | 6,42 |
| A4     | S A        | 6,83                | 6,95 | 6,97 | 6,65 |
| A5     | S A        | 6,72                | 6,84 | 6,79 | 6,62 |
| A1     | S A        | 6,85                | 6,93 | 6,6  | 6,61 |

## APÊNDICE B

### Modelo 1 - Modelo utilizado para determinação dos valores de proteína microbiana “in vitro”

| The Mixed Procedure                 |           |             |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
|-------------------------------------|-----------|-------------|--------|----------|----------------|----|---------|----|---|---|----|----|----|--|
| Model Information                   |           |             |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Data Set                            |           | WORK.       |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Dependent Variable                  |           | y           |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Covariance Structure                |           | Diagonal    |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Estimation Method                   |           | REML        |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Residual Variance Method            |           | Profile     |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Fixed Effects SE Method             |           | Model-Based |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Degrees of Freedom Method           |           | Residual    |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Class Level Information             |           |             |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Class                               | Levels    | Values      |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| trat                                | 12        | 1           | 2      | 3        | 4              | 5  | 6       | 7  | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |  |
| substr                              | 2         | 1           | 2      |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Dimensions                          |           |             |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Covariance Parameters               |           | 1           |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Columns in X                        |           | 39          |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Columns in Z                        |           | 0           |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Subjects                            |           | 1           |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Max Obs Per Subject                 |           | 50          |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Observations Used                   |           | 50          |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Observations Not Used               |           | 0           |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Total Observations                  |           | 50          |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Covariance Parameter Estimates      |           |             |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Cov Parm                            |           | Estimate    |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Residual                            |           | 10458       |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Fit Statistics                      |           |             |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| -2 Res Log Likelihood               |           | 331.9       |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| AIC (smaller is better)             |           | 333.9       |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| AICC (smaller is better)            |           | 334.0       |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| BIC (smaller is better)             |           | 335.1       |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Analise . sintese proteina in vitro |           |             |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| The Mixed Procedure                 |           |             |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
| Solution for Fixed Effects          |           |             |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
|                                     | Effect    | trat        | substr | Estimate | Standard Error | DF | t Value | Pr |   |   |    |    |    |  |
| >  t                                |           |             |        |          |                |    |         |    |   |   |    |    |    |  |
|                                     | Intercept |             |        | 1192.80  | 59.0419        | 26 | 20.20   |    |   |   |    |    |    |  |
| <.0001                              | trat      | 1           |        | 23.8347  | 93.3535        | 26 | 0.26    |    |   |   |    |    |    |  |
| 0.8005                              | trat      | 2           |        | 59.8517  | 93.3535        | 26 | 0.64    |    |   |   |    |    |    |  |
| 0.5270                              | trat      | 3           |        | 82.6271  | 93.3535        | 26 | 0.89    |    |   |   |    |    |    |  |
| 0.3842                              | trat      | 4           |        | 197.56   | 93.3535        | 26 | 2.12    |    |   |   |    |    |    |  |

|        |             |    |   |          |         |    |       |
|--------|-------------|----|---|----------|---------|----|-------|
| 0.0441 | trat        | 5  |   | 97.9873  | 93.3535 | 26 | 1.05  |
| 0.3035 | trat        | 6  |   | 8.4746   | 93.3535 | 26 | 0.09  |
| 0.9284 | trat        | 7  |   | 36.5466  | 93.3535 | 26 | 0.39  |
| 0.6986 | trat        | 8  |   | 3.7076   | 93.3535 | 26 | 0.04  |
| 0.9686 | trat        | 9  |   | 51.9068  | 93.3535 | 26 | 0.56  |
| 0.5829 | trat        | 10 |   | 67.2669  | 93.3535 | 26 | 0.72  |
| 0.4776 | trat        | 11 |   | 42.9025  | 93.3535 | 26 | 0.46  |
| 0.6496 | trat        | 12 |   | 0        | .       | .  | .     |
| .      | substr      | 1  |   | -10.5932 | 83.4979 | 26 | -0.13 |
| 0.9000 | substr      | 2  |   | 0        | .       | .  | .     |
| .      | trat*substr | 1  | 1 | -24.3644 | 132.02  | 26 | -0.18 |
| 0.8550 | trat*substr | 1  | 2 | 0        | .       | .  | .     |
| .      | trat*substr | 2  | 1 | 6.8856   | 132.02  | 26 | 0.05  |
| 0.9588 | trat*substr | 2  | 2 | 0        | .       | .  | .     |
| .      | trat*substr | 3  | 1 | 52.9661  | 132.02  | 26 | 0.40  |
| 0.6916 | trat*substr | 3  | 2 | 0        | .       | .  | .     |
| .      | trat*substr | 4  | 1 | -349.05  | 132.02  | 26 | -2.64 |
| 0.0137 | trat*substr | 4  | 2 | 0        | .       | .  | .     |
| .      | trat*substr | 5  | 1 | -225.64  | 132.02  | 26 | -1.71 |
| 0.0993 | trat*substr | 5  | 2 | 0        | .       | .  | .     |
| .      | trat*substr | 6  | 1 | 47.1398  | 132.02  | 26 | 0.36  |
| 0.7239 | trat*substr | 6  | 2 | 0        | .       | .  | .     |
| .      | trat*substr | 7  | 1 | 126.59   | 132.02  | 26 | 0.96  |
| 0.3465 | trat*substr | 7  | 2 | 0        | .       | .  | .     |
| .      | trat*substr | 8  | 1 | 31.2500  | 132.02  | 26 | 0.24  |
| 0.8147 | trat*substr | 8  | 2 | 0        | .       | .  | .     |
| .      | trat*substr | 9  | 1 | -29.6610 | 132.02  | 26 | -0.22 |
| 0.8240 | trat*substr | 9  | 2 | 0        | .       | .  | .     |
| .      | trat*substr | 10 | 1 | -97.9873 | 132.02  | 26 | -0.74 |
| 0.4646 | trat*substr | 10 | 2 | 0        | .       | .  | .     |
| .      | trat*substr | 11 | 1 | -160.49  | 132.02  | 26 | -1.22 |
| 0.2351 | trat*substr | 11 | 2 | 0        | .       | .  | .     |
| .      | trat*substr | 12 | 1 | 0        | .       | .  | .     |
| .      | trat*substr | 12 | 2 | 0        | .       | .  | .     |
| .      |             |    |   |          |         |    |       |

Analise . sintese proteina in vitro

The Mixed Procedure

Type 3 Tests of Fixed Effects

|                     |        |      |        | Num      | Den            |         |         |      |
|---------------------|--------|------|--------|----------|----------------|---------|---------|------|
| Effect              |        |      |        | DF       | DF             | F Value | Pr > F  |      |
| trat                |        |      |        | 11       | 26             | 0.72    | 0.7063  |      |
| substr              |        |      |        | 1        | 26             | 4.60    | 0.0414  |      |
| trat*substr         |        |      |        | 11       | 26             | 1.74    | 0.1185  |      |
| Least Squares Means |        |      |        |          |                |         |         |      |
|                     | Effect | trat | substr | Estimate | Standard Error | DF      | t Value | Pr > |
| t                   |        |      |        |          |                |         |         |      |
|                     | trat   | 1    |        | 1199.15  | 51.1318        | 26      | 23.45   |      |
| <.0001              | trat   | 2    |        | 1250.79  | 51.1318        | 26      | 24.46   |      |
| <.0001              | trat   | 3    |        | 1296.61  | 51.1318        | 26      | 25.36   |      |
| <.0001              | trat   | 4    |        | 1210.54  | 51.1318        | 26      | 23.67   |      |
| <.0001              | trat   | 5    |        | 1172.67  | 51.1318        | 26      | 22.93   |      |
| <.0001              | trat   | 6    |        | 1219.54  | 51.1318        | 26      | 23.85   |      |
| <.0001              | trat   | 7    |        | 1287.34  | 51.1318        | 26      | 25.18   |      |
| <.0001              | trat   | 8    |        | 1206.83  | 51.1318        | 26      | 23.60   |      |
| <.0001              | trat   | 9    |        | 1224.58  | 51.1318        | 26      | 23.95   |      |
| <.0001              | trat   | 10   |        | 1205.77  | 51.1318        | 26      | 23.58   |      |
| <.0001              | trat   | 11   |        | 1150.16  | 51.1318        | 26      | 22.49   |      |
| <.0001              | trat   | 12   |        | 1187.50  | 41.7489        | 26      | 28.44   |      |
| <.0001              | substr |      | 1      | 1186.40  | 20.5825        | 26      | 57.64   |      |
| <.0001              | substr |      | 2      | 1248.85  | 20.5825        | 26      | 60.68   |      |
| <.0001              |        |      |        |          |                |         |         |      |

## Modelo 2 - Modelo utilizado para estimativa dos parâmetros de degradação da fibra

| . Degradacao Fibra    |        |        |        |                   |
|-----------------------|--------|--------|--------|-------------------|
| ----- Periodo=1 ----- |        |        |        |                   |
| -----                 |        |        |        |                   |
| The NLIN Procedure    |        |        |        |                   |
| Dependent Variable y  |        |        |        |                   |
| Grid Search           |        |        |        |                   |
|                       | i      | l      | k      | Sum of<br>Squares |
|                       | 0.3000 | 5.0000 | 0.0200 | 0.0172            |
|                       | 0.3000 | 5.2500 | 0.0200 | 0.0173            |
|                       | 0.3000 | 4.7500 | 0.0200 | 0.0173            |
|                       | 0.3000 | 5.5000 | 0.0200 | 0.0175            |
|                       | 0.3000 | 4.5000 | 0.0200 | 0.0175            |
| . Degradacao Fibra    |        |        |        |                   |
| ----- Periodo=1 ----- |        |        |        |                   |
| -----                 |        |        |        |                   |
| The NLIN Procedure    |        |        |        |                   |
| Dependent Variable y  |        |        |        |                   |
| Method: Marquardt     |        |        |        |                   |
| Iterative Phase       |        |        |        |                   |
| Iter                  | i      | l      | k      | Sum of<br>Squares |

|   |        |        |        |        |
|---|--------|--------|--------|--------|
| 0 | 0.3000 | 5.0000 | 0.0200 | 0.0172 |
| 1 | 0.2704 | 4.3741 | 0.0174 | 0.0166 |
| 2 | 0.2724 | 4.4655 | 0.0178 | 0.0164 |
| 3 | 0.2713 | 4.4413 | 0.0178 | 0.0164 |
| 4 | 0.2714 | 4.4446 | 0.0178 | 0.0164 |
| 5 | 0.2714 | 4.4441 | 0.0178 | 0.0164 |
| 6 | 0.2714 | 4.4442 | 0.0178 | 0.0164 |

NOTE: Convergence criterion met.

#### Estimation Summary

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| Method               | Marquardt |
| Iterations           | 6         |
| R                    | 3.029E-6  |
| PPC(1)               | 2.367E-6  |
| RPC(1)               | 0.000016  |
| Object               | 3.68E-10  |
| Objective            | 0.016416  |
| Observations Read    | 20        |
| Observations Used    | 19        |
| Observations Missing | 1         |

NOTE: An intercept was not specified for this model.

| Source            | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Approx Pr > F |
|-------------------|----|----------------|-------------|---------|---------------|
| Model             | 3  | 9.1990         | 3.0663      | 2988.67 | <.0001        |
| Error             | 16 | 0.0164         | 0.00103     |         |               |
| Uncorrected Total | 19 | 9.2154         |             |         |               |

. Degradacao Fibra

----- Periodo=1 -----

#### The NLIN Procedure

| Parameter | Estimate | Approx Std Error | Approximate 95% Confidence Limits |        |
|-----------|----------|------------------|-----------------------------------|--------|
| i         | 0.2714   | 0.0387           | 0.1893                            | 0.3535 |
| l         | 4.4442   | 1.4477           | 1.3752                            | 7.5132 |
| k         | 0.0178   | 0.00263          | 0.0122                            | 0.0233 |

#### Approximate Correlation Matrix

|   | i         | l         | k         |
|---|-----------|-----------|-----------|
| i | 1.0000000 | 0.3972391 | 0.9050418 |
| l | 0.3972391 | 1.0000000 | 0.5996907 |
| k | 0.9050418 | 0.5996907 | 1.0000000 |

. Degradacao Fibra

----- Periodo=2 -----

#### The NLIN Procedure Dependent Variable y

##### Grid Search

|        | i      | l      | k      | Sum of Squares |
|--------|--------|--------|--------|----------------|
| 0.3000 | 5.5000 | 0.0200 | 0.0303 |                |
| 0.3000 | 5.7500 | 0.0200 | 0.0303 |                |
| 0.3000 | 5.2500 | 0.0200 | 0.0303 |                |
| 0.3000 | 6.0000 | 0.0200 | 0.0305 |                |
| 0.3000 | 5.0000 | 0.0200 | 0.0305 |                |

. Degradacao Fibra

----- Periodo=2 -----  
 -----

The NLIN Procedure  
 Dependent Variable y  
 Method: Marquardt

| Iterative Phase |        |        |        |                |
|-----------------|--------|--------|--------|----------------|
| Iter            | i      | l      | k      | Sum of Squares |
| 0               | 0.3000 | 5.5000 | 0.0200 | 0.0303         |
| 1               | 0.3146 | 5.8298 | 0.0213 | 0.0301         |
| 2               | 0.3127 | 5.7920 | 0.0212 | 0.0300         |
| 3               | 0.3128 | 5.7942 | 0.0212 | 0.0300         |
| 4               | 0.3128 | 5.7940 | 0.0212 | 0.0300         |

NOTE: Convergence criterion met.

#### Estimation Summary

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| Method               | Marquardt |
| Iterations           | 4         |
| R                    | 5.779E-6  |
| PPC (k)              | 4.132E-6  |
| RPC (k)              | 0.000044  |
| Object               | 3.358E-9  |
| Objective            | 0.030047  |
| Observations Read    | 20        |
| Observations Used    | 20        |
| Observations Missing | 0         |

NOTE: An intercept was not specified for this model.

| Source            | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Approx Pr > F |
|-------------------|----|----------------|-------------|---------|---------------|
| Model             | 3  | 9.5231         | 3.1744      | 1796.00 | <.0001        |
| Error             | 17 | 0.0300         | 0.00177     |         |               |
| Uncorrected Total | 20 | 9.5532         |             |         |               |

. Degradacao Fibra  
 ----- Periodo=2 -----  
 -----

#### The NLIN Procedure

| Limits | Parameter | Estimate | Approx    |                            |        |
|--------|-----------|----------|-----------|----------------------------|--------|
|        |           |          | Std Error | Approximate 95% Confidence |        |
|        | i         | 0.3128   | 0.0403    | 0.2278                     | 0.3978 |
|        | l         | 5.7940   | 1.5913    | 2.4366                     | 9.1513 |
|        | k         | 0.0212   | 0.00368   | 0.0134                     | 0.0289 |

#### Approximate Correlation Matrix

|   | i         | l         | k         |
|---|-----------|-----------|-----------|
| i | 1.0000000 | 0.3158153 | 0.8822944 |
| l | 0.3158153 | 1.0000000 | 0.5317532 |
| k | 0.8822944 | 0.5317532 | 1.0000000 |

. Degradacao Fibra  
 ----- Periodo=3 -----  
 -----

The NLIN Procedure  
 Dependent Variable y

#### Grid Search

Sum of



| i      | l      | k      | Squares |
|--------|--------|--------|---------|
| 0.3500 | 6.0000 | 0.0200 | 0.0170  |
| 0.3500 | 5.7500 | 0.0200 | 0.0172  |
| 0.3500 | 5.5000 | 0.0200 | 0.0176  |
| 0.3500 | 5.2500 | 0.0200 | 0.0179  |
| 0.3500 | 5.0000 | 0.0200 | 0.0184  |

. Degradacao Fibra

----- Periodo=3 -----

The NLIN Procedure  
Dependent Variable y  
Method: Marquardt

| Iterative Phase |        |        |        |                |
|-----------------|--------|--------|--------|----------------|
| Iter            | i      | l      | k      | Sum of Squares |
| 0               | 0.3500 | 6.0000 | 0.0200 | 0.0170         |
| 1               | 0.2935 | 5.0892 | 0.0145 | 0.0144         |
| 2               | 0.2557 | 4.6457 | 0.0138 | 0.0113         |
| 3               | 0.2546 | 4.6472 | 0.0138 | 0.0113         |
| 4               | 0.2546 | 4.6470 | 0.0138 | 0.0113         |

NOTE: Convergence criterion met.

#### Estimation Summary

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| Method                | Marquardt |
| Iterations            | 4         |
| Subiterations         | 7         |
| Average Subiterations | 1.75      |
| R                     | 5.277E-6  |
| PPC(1)                | 4.347E-6  |
| RPC(1)                | 0.00005   |
| Object                | 3.973E-9  |
| Objective             | 0.011343  |
| Observations Read     | 20        |
| Observations Used     | 18        |
| Observations Missing  | 2         |

NOTE: An intercept was not specified for this model.

| Source            | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Approx Pr > F |
|-------------------|----|----------------|-------------|---------|---------------|
| Model             | 3  | 8.7134         | 2.9045      | 3840.90 | <.0001        |
| Error             | 15 | 0.0113         | 0.000756    |         |               |
| Uncorrected Total | 18 | 8.7247         |             |         |               |

. Degradacao Fibra

----- Periodo=3 -----

The NLIN Procedure

| Limits | Parameter | Estimate | Approx    |                            |        |
|--------|-----------|----------|-----------|----------------------------|--------|
|        |           |          | Std Error | Approximate 95% Confidence |        |
|        | i         | 0.2546   | 0.0496    | 0.1488                     | 0.3604 |
|        | l         | 4.6470   | 1.6610    | 1.1067                     | 8.1872 |
|        | k         | 0.0138   | 0.00222   | 0.00910                    | 0.0185 |

#### Approximate Correlation Matrix

|   | i         | l         | k         |
|---|-----------|-----------|-----------|
| i | 1.0000000 | 0.4377494 | 0.9475628 |
| l | 0.4377494 | 1.0000000 | 0.5949628 |

k 0.9475628 0.5949628 1.0000000

. Degradacao Fibra

----- Periodo=4 -----

The NLIN Procedure  
Dependent Variable y

Grid Search

| i      | l      | k      | Sum of Squares |
|--------|--------|--------|----------------|
| 0.3000 | 5.5000 | 0.0200 | 0.0236         |
| 0.3000 | 5.7500 | 0.0200 | 0.0236         |
| 0.3000 | 5.2500 | 0.0200 | 0.0237         |
| 0.3000 | 6.0000 | 0.0200 | 0.0238         |
| 0.3000 | 5.0000 | 0.0200 | 0.0239         |

. Degradacao Fibra

----- Periodo=4 -----

The NLIN Procedure  
Dependent Variable y  
Method: Marquardt

Iterative Phase

| Iter | i      | l      | k      | Sum of Squares |
|------|--------|--------|--------|----------------|
| 0    | 0.3000 | 5.5000 | 0.0200 | 0.0236         |
| 1    | 0.3015 | 4.1652 | 0.0179 | 0.0206         |
| 2    | 0.3011 | 4.0585 | 0.0180 | 0.0206         |
| 3    | 0.3011 | 4.0568 | 0.0180 | 0.0206         |
| 4    | 0.3011 | 4.0570 | 0.0180 | 0.0206         |

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| Method               | Marquardt |
| Iterations           | 4         |
| R                    | 1.963E-6  |
| PPC(1)               | 2.374E-6  |
| RPC(1)               | 0.000035  |
| Object               | 7.72E-10  |
| Objective            | 0.020557  |
| Observations Read    | 20        |
| Observations Used    | 19        |
| Observations Missing | 1         |

NOTE: An intercept was not specified for this model.

| Source            | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Approx Pr > F |
|-------------------|----|----------------|-------------|---------|---------------|
| Model             | 3  | 8.8437         | 2.9479      | 2294.40 | <.0001        |
| Error             | 16 | 0.0206         | 0.00128     |         |               |
| Uncorrected Total | 19 | 8.8642         |             |         |               |

. Degradacao Fibra

----- Periodo=4 -----

The NLIN Procedure

| Limits | Parameter | Estimate | Approx    |                            |
|--------|-----------|----------|-----------|----------------------------|
|        |           |          | Std Error | Approximate 95% Confidence |
|        | i         | 0.3011   | 0.0432    | 0.2095 0.3926              |

|   |        |         |         |        |
|---|--------|---------|---------|--------|
| l | 4.0570 | 1.9194  | -0.0120 | 8.1259 |
| k | 0.0180 | 0.00317 | 0.0113  | 0.0247 |

#### Approximate Correlation Matrix

|   | i         | l         | k         |
|---|-----------|-----------|-----------|
| i | 1.0000000 | 0.4338979 | 0.9113305 |
| l | 0.4338979 | 1.0000000 | 0.6388845 |
| k | 0.9113305 | 0.6388845 | 1.0000000 |

. Degradacao Fibra

----- Periodo=5 -----

The NLIN Procedure  
Dependent Variable y

#### Grid Search

|        | i      | l      | k      | Sum of Squares |
|--------|--------|--------|--------|----------------|
| 0.3500 | 4.7500 | 0.0200 | 0.0367 |                |
| 0.3500 | 4.5000 | 0.0200 | 0.0368 |                |
| 0.3500 | 5.0000 | 0.0200 | 0.0368 |                |
| 0.3500 | 4.2500 | 0.0200 | 0.0369 |                |
| 0.3500 | 5.2500 | 0.0200 | 0.0370 |                |

. Degradacao Fibra

----- Periodo=5 -----

The NLIN Procedure  
Dependent Variable y  
Method: Marquardt

#### Iterative Phase

| Iter | i      | l      | k      | Sum of Squares |
|------|--------|--------|--------|----------------|
| 0    | 0.3500 | 4.7500 | 0.0200 | 0.0367         |
| 1    | 0.2735 | 3.6256 | 0.0140 | 0.0360         |
| 2    | 0.2644 | 3.7349 | 0.0150 | 0.0312         |
| 3    | 0.2609 | 3.6834 | 0.0149 | 0.0312         |
| 4    | 0.2612 | 3.6902 | 0.0149 | 0.0312         |
| 5    | 0.2612 | 3.6894 | 0.0149 | 0.0312         |
| 6    | 0.2612 | 3.6895 | 0.0149 | 0.0312         |

NOTE: Convergence criterion met.

#### Estimation Summary

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| Method                | Marquardt |
| Iterations            | 6         |
| Subiterations         | 6         |
| Average Subiterations | 1         |
| R                     | 1.728E-6  |
| PPC(l)                | 2.719E-6  |
| RPC(l)                | 0.000024  |
| Object                | 2.11E-10  |
| Objective             | 0.03122   |
| Observations Read     | 20        |
| Observations Used     | 20        |
| Observations Missing  | 0         |

NOTE: An intercept was not specified for this model.

| Source            | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Approx Pr > F |
|-------------------|----|----------------|-------------|---------|---------------|
| Model             | 3  | 9.6338         | 3.2113      | 1748.60 | <.0001        |
| Error             | 17 | 0.0312         | 0.00184     |         |               |
| Uncorrected Total | 20 | 9.6650         |             |         |               |

. Degradacao Fibra

----- Periodo=5 -----  
 -----

The NLIN Procedure

| Limits | Parameter | Estimate | Approx<br>Std Error | Approximate 95% Confidence |        |
|--------|-----------|----------|---------------------|----------------------------|--------|
|        | i         | 0.2612   | 0.0670              | 0.1199                     | 0.4025 |
|        | l         | 3.6895   | 2.2875              | -1.1367                    | 8.5157 |
|        | k         | 0.0149   | 0.00339             | 0.00777                    | 0.0221 |

Approximate Correlation Matrix

|   | i         | l         | k         |
|---|-----------|-----------|-----------|
| i | 1.0000000 | 0.4467841 | 0.9379155 |
| l | 0.4467841 | 1.0000000 | 0.6155251 |
| k | 0.9379155 | 0.6155251 | 1.0000000 |

. Degradacao Fibra

----- Periodo=6 -----  
 -----

The NLIN Procedure  
 Dependent Variable y

Grid Search

|  | i      | l      | k      | Sum of<br>Squares |
|--|--------|--------|--------|-------------------|
|  | 0.3000 | 4.5000 | 0.0200 | 0.0227            |
|  | 0.3000 | 4.7500 | 0.0200 | 0.0228            |
|  | 0.3000 | 4.2500 | 0.0200 | 0.0228            |
|  | 0.3000 | 5.0000 | 0.0200 | 0.0229            |
|  | 0.3000 | 4.0000 | 0.0200 | 0.0230            |

. Degradacao Fibra

----- Periodo=6 -----  
 -----

The NLIN Procedure  
 Dependent Variable y  
 Method: Marquardt

Iterative Phase

| Iter | i      | l      | k      | Sum of<br>Squares |
|------|--------|--------|--------|-------------------|
| 0    | 0.3000 | 4.5000 | 0.0200 | 0.0227            |
| 1    | 0.2662 | 4.7704 | 0.0187 | 0.0206            |
| 2    | 0.2663 | 4.7956 | 0.0189 | 0.0206            |
| 3    | 0.2662 | 4.7934 | 0.0189 | 0.0206            |
| 4    | 0.2662 | 4.7935 | 0.0189 | 0.0206            |

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| Method               | Marquardt |
| Iterations           | 4         |
| R                    | 1.447E-6  |
| PPC(l)               | 1.034E-6  |
| RPC(l)               | 0.000021  |
| Object               | 8.2E-10   |
| Objective            | 0.020597  |
| Observations Read    | 20        |
| Observations Used    | 20        |
| Observations Missing | 0         |

NOTE: An intercept was not specified for this model.

Sum of Mean Approx

| Source            | DF | Squares | Square  | F Value | Pr > F |
|-------------------|----|---------|---------|---------|--------|
| Model             | 3  | 9.1536  | 3.0512  | 2518.33 | <.0001 |
| Error             | 17 | 0.0206  | 0.00121 |         |        |
| Uncorrected Total | 20 | 9.1742  |         |         |        |

. Degradacao Fibra

----- Periodo=6 -----

The NLIN Procedure

| Limits | Parameter | Estimate | Approx    | Approximate 95% Confidence |        |
|--------|-----------|----------|-----------|----------------------------|--------|
|        |           |          | Std Error |                            |        |
|        | i         | 0.2662   | 0.0388    | 0.1844                     | 0.3480 |
|        | l         | 4.7935   | 1.4396    | 1.7562                     | 7.8309 |
|        | k         | 0.0189   | 0.00279   | 0.0130                     | 0.0247 |

Approximate Correlation Matrix

|   | i         | l         | k         |
|---|-----------|-----------|-----------|
| i | 1.0000000 | 0.3732228 | 0.9035966 |
| l | 0.3732228 | 1.0000000 | 0.5767442 |
| k | 0.9035966 | 0.5767442 | 1.0000000 |