

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE FOSFATOS BICÁLCICOS E
NÍVEIS DE FÓSFORO DIETÉTICOS USADOS PARA
BOVINOS NO BRASIL

Autor: Raoni Romero Beni Cristovam
Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro - 2019

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE FOSFATOS BICÁLCICOS E
NÍVEIS DE FÓSFORO DIETÉTICOS USADOS PARA
BOVINOS NO BRASIL

Autor: Raoni Romero Beni Cristovam
Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

“Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá- área de Concentração: Produção Animal”.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro - 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

C933a Cristovam, Raoni Romero Beni
Avaliação *in vitro* de fosfatos bicálcicos e níveis de fósforo dietéticos usados para bovinos no Brasil / Raoni Romero Beni Cristovam. - Maringá, 2019.
67 f. : il., figs., tabs.

Orientador (a): Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, 2019.

1. Nutrição animal - Bovinos. 2. Fosfato bicálcico. 3. Fósforo. 4. Digestibilidade. 5. Liberação ruminal e intestinal. 6. Fermentação ruminal. I. Daniel, João Luiz Pratti, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDD 21.ed. 636.0285

MAS-CRB 9/1094



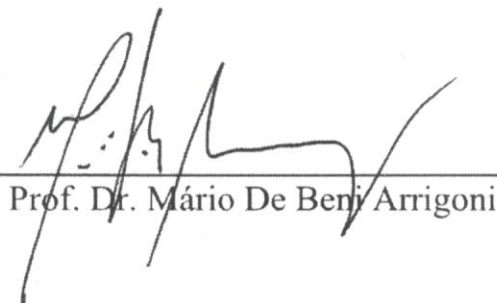
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE FOSFATOS BICÁLCICOS E
NÍVEIS DE FÓSFORO DIETÉTICOS USADOS PARA
BOVINOS NO BRASIL

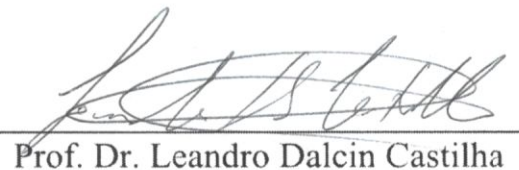
Autor: Raoni Romero Beni Cristovam
Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADO em 25 de fevereiro de 2019.



Prof. Dr. Mário De Beni Arrigoni



Prof. Dr. Leandro Dalcin Castilha



Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel
Orientador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus através do meu Senhor Jesus Cristo, por me dar a vida. Também força e sabedoria, visto que foram muito necessárias desde o meu ingresso no Programa e no decorrer dele.

A todo brasileiro contribuinte, que me financiou através de seus impostos para que eu pudesse receber a bolsa de mestrado para a minha manutenção durante os estudos, através do CNPq.

Gostaria de agradecer ao Professor Antonio Ferriani Branco, por ter me orientado e contribuído grandemente com os seus conhecimentos para a minha formação.

À professora Eliane Gasparino, coordenadora do programa, por toda atenção, dedicação, preocupação, disponibilidade, justiça, dadas a mim desde o meu ingresso no programa e durante ele, para que essa dissertação pudesse ser realizada.

À doutora Tatiana Garcia Díaz, por toda ajuda, dedicação, profissionalismo e compreensão na execução de todo o projeto, desde as análises laboratoriais, até as análises estatísticas, sendo essencial para a realização do projeto.

Ao meu coorientador professor João Luiz Pratti Daniel, pelos ensinamentos e ajuda na realização dos trabalhos.

Aos meus amigos de mesmo orientador que auxiliaram durante a realização do projeto, Diego Cordeiro de Paula e Karoline Guimarães, em especial ao Diego por ter me cedido um pequeno espaço em sua casa para eu morar durante todo o tempo.

A todo o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, representado pelos seus docentes, funcionários administrativos, funcionários laboratoriais e de campo através da FEI - Fazenda Experimental Iguatemi.

Ao meu grande amigo André Luiz Nagatani Rigueiro, do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Unesp – campus de Botucatu/SP, por todos os conselhos com relação a escrita da dissertação e estatística.

Também gostaria de agradecer ao meu amigo de pós-graduação Renan Sanches, que me acolheu na cidade de Maringá desde o primeiro dia que cheguei como aluno especial, me proporcionando todo o necessário até que eu pudesse me fixar em algum lugar, como também dando uma contribuição valiosa durante a elaboração da dissertação.

A todos os amigos que fiz durante o Programa e que de alguma forma me ajudaram e tornaram os dias melhores: Diogo Rodrigues, Márcio Gregório Rojas dos Santos, Tânia Zóia Miltenburg, Mayara Uana, Priscila, Natália Sitanaka.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto.

BIOGRAFIA

RAONI ROMERO BENI CRISTOVAM, filho de Eugênio Cristovam e Ana Lúcia Beni Cristovam, nascido na cidade de Dracena/SP – Brasil, em 02 de dezembro de 1986.

Cursou os ensinamentos fundamental e médio na escola Eng. Isac Pereira Garcez em Dracena/SP, concluindo em 2004.

Em agosto de 2006 iniciou a graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, campus de Dracena/SP, finalizando em agosto de 2011. Em março de 2016 ingressou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração: Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Nutrição de Ruminantes.

Em fevereiro de 2019, submeteu a banca examinadora para a defesa da dissertação.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Fósforo: o interesse de produção e uso.....	14
1.2 Descobrimto do P e histórico de uso.....	14
1.3 Importância do P no organismo animal.....	15
1.5 Fermentação ruminal.....	23
1.6 O fosfato bicálcico.....	24
REFERÊNCIAS.....	26
2. OBJETIVOS GERAIS.....	31
3. ARTIGO 1.....	32
Introdução.....	34
Materiais e Métodos.....	35
Análises da composição química.....	35
Solubilidades.....	35
Liberação ruminal.....	36
Análise estatística.....	37
Resultados.....	38
Composição química das fontes de fósforo.....	38
Solubilidade.....	38
Taxa de liberação ruminal e intestinal de fósforo.....	41
Discussão.....	42

Composição química dos fosfatos	42
Solubilidades	43
Taxa de liberação ruminal e intestinal de fósforo	45
Conclusões	47
REFERÊNCIAS.....	48
4. ARTIGO 2	50
Introdução	52
Materiais e Métodos	53
Fermentação ruminal e intestinal.....	53
Digestibilidade <i>in vitro</i> (DIVMS)	54
Análise estatística	56
Resultados	56
Discussão	62
Taxa de fermentação ruminal (amônia e pH)	62
Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS).....	65
Conclusões	66
REFERÊNCIAS	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Teor de P em alimentos para bovinos.....	18
Tabela 2 - Solubilidade de P em água.....	39
Tabela 3 - Solubilidade de P em ácido cítrico a 2% (1:100)	40
Tabela 4 - Solubilidade de P em citrato neutro de amônio (CNA).....	41
Tabela 5 - Liberação ruminal e intestinal de P	42
Tabela 6 - Valores médios de concentração de amônia (mg dL ⁻¹) e pH <i>in vitro</i> usando como substrato dietas com níveis de P e diferentes fontes de fosfatos bicálcicos.....	57
Tabela 7 - Desdobramento da interação Fosfato × Nível para os valores de amônia (mg dL ⁻¹) <i>in vitro</i> usando como substrato dietas com níveis de P e de diferentes fontes de fosfatos bicálcicos.....	58
Tabela 8 - Desdobramento da interação Fosfato × Hora e Nível × Hora para os valores de amônia (mg dL ⁻¹) usando como substrato dietas com níveis de P e de diferentes fontes de fosfatos bicálcicos.	59
Tabela 9 - Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS) de dietas com níveis de diferentes fontes de fosfato (g kg ⁻¹).	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Variação na concentração amônia (NH_3) no líquido ruminal durante 48 h de incubação *in vitro*. a) Adição de 1.3 g kg^{-1} de P na dieta de diferentes fosfatos. b) Adição de 1.6 g kg^{-1} de P na dieta de diferentes fosfatos c) Adição de 1.9 g kg^{-1} de P na dieta de diferentes fosfatos.....60
- Figura 2 - Variação do pH no líquido ruminal durante 48 h de incubação *in vitro*. a) Adição de 1.3 g kg^{-1} de P na dieta de diferentes fosfatos b) Adição de 1.6 g kg^{-1} de P na dieta de diferentes fosfatos c) Adição de 1.9 g kg^{-1} de P na dieta de diferentes fosfatos.....61

RESUMO

O fósforo é um dos principais elementos minerais estudados na nutrição animal devido as suas inúmeras funções no organismo animal. Dentre as fontes de P para os animais destacam-se as fontes orgânicas (forragens e concentrados) e as fontes inorgânicas (fosfatos supertriplos, monoamônicos, bicálcicos entre outros), sendo estes últimos utilizados quando à alimentação não supre a quantidade necessária, principalmente em sistemas de produção em pastagens, sobretudo em regiões com solos deficientes nesse mineral. Apesar de a legislação brasileira permitir o uso de outras fontes, o fosfato bicálcico é a principal fonte de fósforo suplementar utilizada no Brasil. Contudo, a fonte de matéria-prima e os processos adotados pela indústria interferem diretamente na qualidade dos fosfatos bicálcicos. Objetivou-se com este trabalho avaliar 8 fosfatos bicálcicos utilizados no Brasil, com relação à composição química, solubilidade (água, ácido cítrico 2% e citrato de amônio), liberação ruminal e intestinal, bem como os efeitos destas fontes e doses de P na fermentação ruminal *in vitro*. Para isto, foram realizados 25 tratamentos em arranjo fatorial $8 \times 3 + 1$, sendo 24 tratamentos resultantes da combinação de 8 fontes de fosfatos bicálcicos em 3 níveis de P na dieta (0,13; 0,16 e 0,19% da matéria seca) e 1 tratamento controle (sem suplementação de fosfato bicálcico). Foi confeccionada uma dieta laboratorial composta de 70% de amido solúvel, 27,5% de celulose microcristalina e 2,5% de ureia, que se aproxima da composição de dietas de bovinos de corte em terminação (confinamento). Foi observado como melhores resultados o seguinte: solubilidade (fosfato 1 e 2); liberação total (5,6 e 8), fermentação ruminal (amônia não houve diferença do controle e pH somente os fosfatos 6 e 8 diferiram do controle) e a digestibilidade da matéria seca teve o fosfato 1 como único que diferiu do controle. Os níveis de P adotados estão superestimados ou até não há necessidade do uso de fósforo e caso haja a necessidade de suplementação

fosfórica, o fosfato 5 deve ser o escolhido, porém deve-se observar a relação custo/benefício da fonte.

Palavras-chave: digestibilidade, liberação, fermentação ruminal, fósforo.

ABSTRACT

Phosphorus is one of the main mineral elements studied in animal nutrition because of its numerous functions in the animal organism. Among the P sources for animals are the organic sources (forages and concentrates) and the inorganic sources (triples superphosphates, monoammonium, dicalcium and others), the latter being used when feed do not provide the necessary amount, mainly in grazing systems, especially in regions with soil deficient in this mineral. Although Brazilian legislation allows the use of other sources, dicalcium phosphate is the main phosphorus source used in Brazil. However, the raw material source and the processes adopted by the industry directly interfere with the dicalcium phosphates quality. The objective of this work was to evaluate eight dicalcium phosphates used in Brazil, with respect to their chemical composition, solubility (water, citric acid 2% and ammonium citrate), ruminal and intestinal release, as well as the effects of these sources and P doses on *in vitro* ruminal fermentation. For this, 25 treatments were compared in a factorial arrangement $8 \times 3 + 1$, with 24 treatments resulting from the combination 8 of dicalcium phosphates sources at 3 P levels in diet (0.13, 0.16 and 0.19% of DM) and 1 control treatment (without dicalcium phosphate supplementation). A laboratory diet consisting of 70% soluble starch, 27.5% microcrystalline cellulose and 2.5% urea was prepared, which approximates the composition of finishing beef diets (feedlot). The best results were observed as follow: solubility (phosphate 1 and 2) total release; (5,6 and 8), ruminal fermentation (ammonia had no difference of control and pH, only phosphates 6 and 8 differed from control) and the *in vitro* DM (only phosphate 1 differed from control). The P levels adopted are overestimated or there is no need for the use of phosphorus and if there is a need for phosphate supplementation, phosphate 5 should be chosen, but the cost / benefit ratio of the source should be observed.

Key words: digestibility, phosphor, release, ruminal fermentation.

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento o efetivo de bovinos foi de 217.749 milhões de cabeças no ano de 2017 (MAPA, 2017), valor este considerado o segundo maior rebanho mundial de bovinos, atrás apenas da Índia, sendo o maior exportador e o segundo maior produtor de carne bovina, de acordo com os dados de 2018 do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2018)

O Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio alcançou R\$1,26 trilhão, representando 21% do PIB total brasileiro. Já o PIB da pecuária chegou a R\$400,7 bilhões, 30% do agronegócio brasileiro (ABIEC, 2016). Portanto, pode-se notar a relativa importância da produção e conseqüentemente as tecnologias adotadas.

Entre os técnicos do setor, são amplamente conhecidos os baixos índices de produtividade animal e por conseqüência, baixos índices de retorno econômico, acarretando grande número de produtores que saem da atividade, migrando para outras mais lucrativas, em que na maioria dos casos são devidas a não adoção de tecnologias de produção, ou adoção de tecnologias inadequadas.

A nutrição em sistemas de produção pecuária, seja ela fornecida através de pastagens ou animais confinados, é considerada a mais impactante sobre esse tipo de atividade, visto o seu real papel sobre a lucratividade. Particularmente, o uso de minerais é de suma importância para programas nutricionais bem feitos, pois participa efetivamente do desempenho em diversas fases do rebanho (Silva et al., 2017). Considerar estratégias tanto do ponto de vista do produtor, quanto da indústria que fornece esse tipo de insumo é essencial para a sustentabilidade desses processos.

Portanto, faz-se necessário o estudo constante no desenvolvimento e aprimoramento de técnicas capazes de atender mais especificamente os sistemas

pecuários produtivos, aportando este setor tão importante ao país, e por fim mantendo toda esta cadeia de forma geral fortalecida economicamente.

1.1 Fósforo: o interesse de produção e uso

Dentre os nutrientes essenciais para os animais estão os minerais, e um dos principais elementos estudados é o fósforo (P). Além da sua importância no organismo animal, deve-se considerar a importância econômica. O fosfato bicálcico, que é um dos mais comuns utilizado na alimentação animal, representa aproximadamente de 50 a 70% do custo de produção de um suplemento mineral (Coneglian, 2006).

1.2 Descobrimto do P e histórico de uso

O P foi isolado pela primeira vez na Alemanha, por Brandt, em 1669, que coletou urina de seres humanos e reportou a presença deste elemento. Em 1769, na Suécia, Gahn, descreveu que o fósforo é essencial na composição dos ossos e, em 1771, na Alemanha, Scheele ainda estudando ossos encontrou grande quantidade de P nas cinzas desse material. Porém, somente em 1920, Bertrand, na França, e McHargue, nos Estados Unidos, iniciam o uso de minerais específicos nas dietas para bovinos, sendo o fósforo, previsto inicialmente somente para evitar o raquitismo, conforme provou McCollum, em 1922 (Carvalho et al., 2003).

Um dos primeiros diagnósticos clínicos ligados à deficiência de fósforo no Brasil foram feitos por Gióvine (1943) e Menicucci Sobrinho (1943) deu continuidade através da avaliação da concentração de P em amostras de sangue.

Após 1960, diversas pesquisas tiveram o objetivo de elucidar o metabolismo do cálcio e do fósforo bem como suas relações com a vitamina D. Atualmente, com o aprimoramento das técnicas laboratoriais, há grande vertente do conhecimento interessada em elucidar níveis ótimos de P na alimentação, processos específicos de absorção no organismo animal, quase sempre com o apelo reducionista por ser um elemento considerado caro, e se usado em demasia danoso ao meio ambiente (Trevizan, 2003).

1.3 Importância do P no organismo animal

O P é um componente dos ossos e desempenha importantes funções bioquímicas e fisiológicas, estando envolvido em quase todas as vias metabólicas (Lopes e Pereira, 1986; Boin, 1985). Além da função estrutural, o P participa na formação de membranas celulares, utilização e transferência de energia na forma de ATP, entre outros (Lehninger, 1994).

O P é o segundo mineral mais abundante na composição dos tecidos de animais, em que aproximadamente 1% do peso corporal é composto de P, dos quais 80% estão nos ossos e nos dentes, e os 20% restantes ficam distribuídos no tecidos moles, envolvidos com metabolismo de modo geral, principalmente nas células vermelhas do sangue, músculos e sistema nervoso (Signoretti et al., 1999; Underwood, 1981; Suttie, 1980).

Tem sido mostrado frequentemente que dietas deficientes em P podem levar a um decréscimo no consumo voluntário de alimentos (Coombe et al., 1971; Preston e Pfander, 1964; Smith, 1984), com efeitos consequentes no desempenho dos animais (Hemingway, 1967). Estes efeitos podem ser ao menos em parte um resultado da função ruminal prejudicada (Fishwick et al., 1977; Bass et al., 1981; Durand et al., 1982; Breves e Holler, 1983).

O P é essencial ao desenvolvimento e metabolismo da microbiota ruminal (Breves e Schroder, 1991). Assim, a digestibilidade da matéria orgânica pode ser afetada pela baixa concentração de P no fluido ruminal (Hungate, 1966).

O P é um mineral essencial ao crescimento microbiano e as taxas mínimas de crescimento microbiano são obtidas quando a concentração no meio de incubação está entre 40 e 80 mg/L (Hall et al., 1961; Chico et al., 1965). Dados de experimentos “*in vitro*” sugerem que um valor médio de 100 mg/L de P disponível é adequado para as bactérias e para a atividade celulolítica (Durand e Kawashima, 1980). Já Komisarczuk et al. (1987) trabalhando com líquido ruminal de ovinos em cultura contínua *in vitro*, encontraram valores adequados de P entre 30 a 50 mg/L. Segundo Witt e Owens (1983) a concentração de P no líquido ruminal fica em torno de 200 mg/L, chegando a mais de 434 mg/L em bovinos adultos bem alimentados (dieta à base de casca de algodão, melaço, ureia e minerais), em que 50 a 70% do P chega via saliva.

Os ruminantes conseguem reciclar o P endógeno de forma eficiente, secretando através da saliva concentrações entre 496 - 1240 mg/L, contribuindo para a alta

concentração de fósforo no rúmen (Rosol and Capen, 1997). Porém deve-se ter cautela em usar valores médios para a determinação do P via salivar, uma vez que em bovinos adultos, por exemplo, a produção de saliva pode variar de 2 L/d no jejum a 15 L/kg de MS ingerida (Symonds and Forbes, 1993). Ainda segundo Feeding (1991), grandes quantidades de P são secretadas pela saliva e subsequentemente reabsorvidas no trato gastrointestinal.

As células microbianas também têm papel importante no aporte de P no organismo dos ruminantes, essas podem apresentar de 20 a 60 g P por kg de matéria seca, presente principalmente em ácidos nucleicos (80%) e fosfolipídeos (10%) (Hungate, 1966). Fox et al. (2004) trabalhando com bovinos machos inteiros Nelore de 450 kg em confinamento, com simulação dada pelo programa LRNS, usando uma dieta com proporção concentrado: volumoso de 86:14, estimou a chegada de aproximadamente 1.200 g/d de bactérias ruminais no duodeno (24 g de P, levando-se em consideração o menor valor de Hungate, 1966, citado acima). Enquanto Barreto (2006), fornecendo fosfato bicálcico a 0,20% da dieta e com consumo de 2,5% do peso vivo (6,95 kg), encontrou 686 g/d de bactérias ruminais que chegaram ao duodeno de bovinos machos inteiros holandeses com 280 kg.

Um fato curioso é observado se utilizar o conjunto de dados obtidos pelos autores acima. Segundo Hungate (1966), teria teoricamente 13,72 gramas de P proveniente das bactérias ruminais chegando diariamente ao duodeno dos mesmos bovinos machos inteiros holandeses com 280 kg utilizados por Barreto (2006), e segundo Symonds e Forbes (1993) e Rosol e Capen (1997) 51,71 gramas de P são reciclados diariamente via saliva desses animais. Cabe ressaltar que a ingestão diária via dieta foi somente de 14,15 gramas de P por dia. Assim, esses cálculos sugerem que grande parte da necessidade de P no organismo dos ruminantes é atendida via essas duas funções. Barnard (1969) em estudo com várias espécies de animais relatou que nos herbívoros o teor da enzima RNA-nuclease (que digere ácidos nucleicos) no conteúdo pancreático é 1200 vezes maior que os seres humanos e muitas vezes maior que a maioria dos outros animais não ruminantes como aves e suínos, sendo sua concentração de 1200 ug/g nos bovinos. Assim, como a maior parte do P contido na massa microbiana está na forma de ácidos nucleicos, a alta atividade de RNA-nuclease poderia justificar a alta eficiência de reciclagem de P em ruminantes.

O P é encontrado na dieta dos animais na forma de mono, di e trifosfato inorgânico e na forma orgânica como fitatos, fosfolipídeos e fosfoproteínas. Após a

ação da secreção abomasal, atinge o intestino delgado em que é absorvido (Barcellos, 1998). Pouco é conhecido sobre os locais exatos, os mecanismos e o seu controle, mas o local principal de absorção de P é a porção inicial do intestino delgado (Breves e Schröder, 1991). O processo de absorção ocorre em sua maior parte na porção cranial do duodeno, tanto em ruminantes como em não ruminantes (Rosol and Capen, 1997), em que o pH é suficientemente baixo para permitir a formação de fosfato solúvel (Ben-Ghedalia et al., 1975). Carvalho et al. (2003) afirma que cerca de 70 a 80% do P contido na dieta, é absorvido pelos bovinos no intestino delgado, e este P é transportado, de forma ativa, pela parede intestinal contra um gradiente eletroquímico que envolve o sódio e a vitamina D [1,25(OH)₂D]. Segundo o NRC (2016), o coeficiente de absorção de P varia entre 64% em forragens e 70% em concentrados.

Nel e Moir (1964) e Durand e Kawashima (1980), afirmam que os microrganismos do rúmen são menos sensíveis que o hospedeiro às diferentes fontes de P e suas respectivas biodisponibilidades. Isto pode ser pela eficiente reciclagem do elemento por meio da saliva, que é uma fonte mais assimilável pelos mesmos (Coneglian, 2006). Barnard (1969) propõe uma versão modificada do ciclo do nitrogênio do ruminante, colocando em contexto o papel da nuclease pancreática. Isto inclui o ciclo do P. Franzolin (1996) em revisão de literatura sobre o assunto observou que há ainda pouca evidência para sugerir que o crescimento microbiano é limitado pela suplementação de P em condições normais.

No Brasil, a produção de carne bovina ocorre em sistemas a pasto (com ou sem suplementação com concentrados), bem como em confinamento. A concentração de P nas principais forragens e ingredientes utilizados no Brasil encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1- Teor de P em alimentos para bovinos

Alimento	Porcentagem %
Forragens verdes	
<i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst.) Stapf. “Marandu”.	0,24
<i>Brachiaria brizantha</i> (Hochst.) Stapf., folha. “Marandu”.	0,28
<i>Brachiaria decumbens</i> Stapf., 0 a 30 d. “Brachiarinha”.	0,42
<i>Brachiaria decumbens</i> Stapf., folha. “Brachiarinha”.	0,20
<i>Brachiaria humidicola</i> (Rendle) Schw. “Humidicola”.	0,30
<i>Brachiaria ruzizienses</i> Germain., 0 a 30 d. “Ruzizienses”.	0,26
<i>Cynodon dactylon</i> L., 0 a 30 d. “Coast-cross”.	0,41
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum., 31 a 45 d. “Capim-elefante”.	0,27
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum., folha. “Capim-elefante”.	0,18
<i>Melinis minutiflora</i> Beauv., 30 d. “Capim-gordura”.	0,27
<i>Melinis minutiflora</i> Beauv., folha. “Capim-gordura”.	0,33
<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça, 30 d. “Capim-Mombaça”.	0,37
<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça, folha. “Capim-Mombaça”.	0,27
<i>Panicum maximum</i> spp., folha.	0,47
<i>Cynodon</i> spp, Folha 30 d	0,93
<i>Panicum maximum</i> Jacq., 30 d	0,26
<i>Saccharum officinarum</i> L. “Cana-de-açúcar”	0,06
<i>Trifolium repens</i> L. “Trevo branco”	0,36
Silagens	
<i>Saccharum officinarum</i> L. “Cana-de-açúcar”	0,03
<i>Pennisetum typhoides</i> . “Milheto”	0,21
<i>Zea mays</i> L. “Milho”	0,19
<i>Sorghum vulgare</i> Pers. “Sorgo”	0,18
Concentrados energéticos	
<i>Oryza sativa</i> , farelo. “Arroz”.	1,65
<i>Zea mays</i> L., gérmen. “Milho”.	0,31
<i>Zea mays</i> L., grão. “Milho”.	0,25
<i>Zea mays</i> L., grão úmido. “Milho”.	0,23
<i>Glycine Max</i> (L.) Merr., casca . “Soja”.	0,21
<i>Sorghum vulgare</i> Pers., grão. “Sorgo”.	0,28
<i>Triticum aestivum</i> , farelo. “Trigo”.	1,00

Concentrados proteicos

<i>Gossypium hirsutum</i> , 38% farelo. “Algodão”.	1,00
<i>Gossypium hirsutum</i> , torta. “Algodão”.	0,10
<i>Arachis hypogaea</i> L., farelo. “Amendoim”.	0,71
<i>Helianthus annun</i> , farelo. “Girassol”.	0,92
<i>Glycine max</i> (L.) Merr., farelo. “Soja”.	0,58

Fonte: Valadares Filho et al. (2006).

Call et al. (1978) trabalhando com bezerras Hereford com 7 meses e aproximadamente 165 kg, por 2 anos, não encontraram diferenças entre 0,14 e 0,36% de P na dieta, o que corresponde a 66% e 174% do que o *National Research Council – NRC* (1976) recomenda para os seguintes parâmetros: consumo de matéria seca, ganho de peso, conversão alimentar, concentração no plasma e sangue, concentração nos ossos e músculo, histologia óssea, níveis de progesterona até os 12 meses, taxa de concepção, nº de partos, bezerros nascidos vivos e intervalos entre partos. Os autores afirmam que o nível de 0,14% de P foi aparentemente adequado para reprodução e crescimento normais.

Witt e Owens (1983) trabalhando com bovinos afirmam que quando uma fonte de P de baixa solubilidade no fluido ruminal é fornecida, a solubilização na secreção abomasal (pH ácido) poderia torná-la disponível para uso pelos animais e para crescimento microbiano por meio da reciclagem via saliva. Os mesmos autores afirmam que para manter a concentração ruminal de P em níveis adequados, os ruminantes adultos podem reciclar o P endógeno via saliva mantendo perto de 200 mg/L quando a ingestão de P é temporariamente ou sazonalmente baixa, sendo desconhecida se a reciclagem é adequada com todos tipos de dietas, com longos tempos de deficiência e com animais em crescimento.

Erickson et al. (1999) trabalhando com novilhos de 385 kg em confinamento por 105 dias, com 5 níveis de P (0,14, 0,19, 0,24, 0,29 e 0,34%), em que no nível 0,14% de P foi oriundo somente dos ingredientes dieta sem suplementação mineral com fosfato monossódico, não encontraram diferenças para: ganho de peso (1,76 kg/d), consumo de MS, peso de carcaça quente, conversão alimentar, escore de marmoreio, espessura de gordura e densidade óssea. Embora o NRC (1996) sugira níveis ao redor de 0,20% da MS, os autores sugerem que a exigência pode ser menor que 0,14% de P, sendo este

nível correspondente a 70% do recomendado pelo NRC (1996) e, mesmo para animais de alto desempenho.

Em outro trabalho Erickson et al. (2002), usando novilhos com 265 kg por 204 dias em confinamento com 5 níveis de P (0,16, 0,22, 0,28, 0,34 e 0,40%), em que no nível 0,16% de P foi fornecido via ingredientes da dieta e o restante suplementado com fosfato monossódico, não encontraram diferenças para: ganho de peso, consumo de matéria seca, eficiência alimentar, espessura de gordura na carcaça, área de olho de lombo, marmoreio, total de cinzas dos osso da falange e metacarpo e concentração no plasma sanguíneo, obtendo um ganho de peso de 1,52 kg/d (nível 0,16%). Para os autores as exigências são menores que 0,16%, ou seja, 76% do recomendado na dieta pelo NRC (1996). Com base nestas informações os autores sugerem que uma dieta de confinamento com alto teor de grãos não requer suplementação mineral inorgânica de P, representando um custo desnecessário que pode levar a problemas ao meio ambiente, devendo os produtores de carne em confinamento serem aconselhados a descontinuar esta prática.

Para os autores existem 3 razões para essa discordância com o NRC sendo elas: 1) as exigências de manutenção foram superestimadas pelo NRC (1996); 2) o referido guia de exigências cita somente um estudo estimando os requerimentos para o ganho, trabalho de Ellenberger et al. (1950) com 132 animais leiteiros que variavam de recém-nascidos até 12 anos de idade usados para determinar a retenção de P durante o crescimento e desenvolvimento, e os animais também foram amplamente diferentes em raça, peso corporal, idade e potencial genético; 3) o coeficiente de absorção de P dietético foi assumido como 68% (NRC, 1996), sendo que a absorção aparente é relacionada com a ingestão de P (Challa et al., 1989), pela mudanças no fluxo salivar de P (Wadsworth and Cohen, 1976), aonde baixos níveis de suplementação podem aumentar a eficiência de absorção para além de 68%. Em dietas de alto grão o fitato é hidrolisado podendo a absorção verdadeira ser maior que 68% (Morse et al., 1992; Ternouth et al., 1996)

Segundo Geisert et al. (2014), trabalhando com novilhas de grande porte de 278 kg, com 5 níveis de P na dieta (0,10, 0,17, 0,24, 0,31 e 0,38%) por 180 dias, e no nível 0,10% de P, foi fornecido via ingredientes da dieta e o restante suplementado com fosfato monossódico, afirmam que as exigências para animais em terminação são menores que as concentrações típicas de dietas americanas (0,30 a 0,50%) e sugeridas

pelo NRC (2016), sendo a exigência menor que 0,17% de P na MS da dieta (67% das recomendações do NRC, 2016).

Uma estratégia prática que pode auxiliar os nutricionistas e os produtores no manejo alimentar é monitorar o teor de P nas fezes. São considerados indicadores de deficiência por pesquisadores australianos, níveis de P em amostras de fezes colhidas do reto inferiores a 0,12% na MS (Resorce Consulting Services, 1986). No caso de níveis baixos, a deficiência de P pode ser prevenida por suplementação de P na dieta quer seja pelo uso de sal mineral, pela adição dos minerais à água ou indiretamente por meio da fertilização (Conrad et al., 1984).

1.4 Solubilidade

Segundo Underwood (1981) e Suttie (1980), existe relação positiva entre a biodisponibilidade de determinado mineral na forma inorgânica e sua solubilidade em água ou ácidos diluídos. Biodisponibilidade de um nutriente é a proporção ou porcentagem do nutriente consumido que pode ser absorvida pelo intestino, tornando-se disponível para uso no metabolismo ou para estocagem nos tecidos animais (Duarte et al., 2003). Moreira et al. (1988) verificaram que a solubilidade em ácido cítrico a 2% apresenta relação mais estreita com os valores de disponibilidade biológica para fontes de P.

Em, 2003, Duarte e colaboradores, avaliando a solubilidade de P presente em seis fontes por meio da utilização de sete extratores (água, diferentes concentrações de ácido cítrico, ácido clorídrico e citrato neutro de amônio), verificaram que o ácido cítrico na proporção de 10% é o extrator mais indicado, pois solubilizou acima de 80% de P das fontes de média a alta biodisponibilidade (fosfato bicálcico, monoamônico, supertriplo, farinha de ossos autoclavada e farinha de ossos calcinada) e menos de 50% da fonte cujo P é reconhecidamente de baixo valor biológico, como fosfato de rocha de Araxá.

Segundo Guerreiro (2004), a solubilidade em água influencia o valor biológico, e geralmente, quanto mais hidrossolúvel, maior o valor biológico da fonte de P, visto que em meio aquoso, todos os fosfatos condensados sofrem degradação hidrolítica em um processo que termina com a conversão em ortofosfato (que é a forma mais assimilável).

Hall e Lee Jr. (1978), avaliando o efeito da fonte de P e tempo de incubação na solubilidade de P em ácido cítrico a 2% e em fluido de rúmen, constataram que a proporção de P solubilizada aumentou com a maior duração da incubação e que as fontes comerciais de P e farinha de osso diferiram significativamente entre si. Nesse mesmo experimento foi detectada interação entre fontes de P e solução aplicada para determinação da solubilidade do elemento.

Nicodemo e Barrocas (1995) compararam as solubilidades ruminal, abomasal, em ácido cítrico a 0,5% (método oficial) e a 2% (método francês) e digestibilidade *in vitro* de nove fosfatos e cinco misturas minerais como fonte fósforo destinadas a bovinos. Foi verificado que as técnicas *in vitro* não foram apropriadas para a avaliação de diferentes fosfatos alimentares e que dos testes avaliados, o ácido cítrico mostrou-se o mais promissor. Além disso, afirmaram que existem dificuldades no estabelecimento de valores mínimos de solubilidade (alta, média e baixa) para a indicação de fosfatos adequados à alimentação animal.

Guerreiro (2004) encontrou diferenças pequenas entre 8 fosfatos bicálcicos que avaliou por técnicas diferentes (ácido cítrico a 2% em 3 tempos diferentes e líquidos ruminal e abomasal), porém houve diferenças entre as técnicas. Witt e Owens (1983) avaliaram a solubilidade *in vitro* de quatro fontes de P (fosfato mono-dicálcico com 21 % de P, fosfato mono-dicálcico com 18,5% de P; fosfato de rocha defluorada e fosfato de sódio) em fluido ruminal e abomasal, concluindo serem os resultados obtidos no fluido abomasal mais indicativo da disponibilidade total da fonte de P para ruminantes. Os autores também sugeriram que o P solúvel no pH gástrico poderia ser considerado como um parâmetro do P disponível para absorção e reciclagem em ruminantes.

Rosa et al. (1986) afirmaram que a quantidade absorvida de um elemento inorgânico depende diretamente da liberação deste elemento no rúmen ou abomaso. Esses autores avaliaram a solubilidade abomasal e ruminal de fontes inorgânicas de P em bovinos e bubalinos. Os autores reportaram que a técnica de solubilização de P no fluido abomasal foi mais indicada para a avaliação de fontes de P, quando comparada à solubilização no líquido ruminal. Porém a solubilidade de P no fluido ruminal também tem importância, pois fornece dados sobre o teor de P disponível para o crescimento microbiano.

1.5 Fermentação ruminal

Para Breves et al. (1987), a deficiência de P no rúmen leva a redução da digestibilidade da matéria orgânica, promovendo efeitos sobre a fermentação, tanto no rúmen quanto no intestino, sugerindo que os micro-organismos sejam afetados pela deficiência do mineral independente do seguimento do TGI. Esta informação concorda com a obtida por Raun et al. (1956), que encontraram aumento da digestibilidade *in vitro* com adição de P orgânico ou inorgânico no meio de incubação.

Komisarczuk et al. (1987) avaliaram os efeitos de diferentes níveis de P na fermentação ruminal *in vitro* utilizando líquido ruminal de ovinos, e verificaram que com a diminuição da concentração de P de 4 e <1 mg/L no meio de cultura ocorreram: a diminuição de produção de ácidos graxos voláteis totais, o aumento de pH (6,5 para 7,3) e o aumento da concentração de nitrogênio amoniacal (≤ 4 mg/L).

Hoover e Stokes (1991), afirmam que a diminuição de pH reduz a degradabilidade de proteína, celulose, hemicelulose e pectina, embora seus efeitos sejam menores sobre a digestão de amido. Houve diminuição da eficiência de síntese microbiana com a redução do pH de 6,5 para 5,5.

O abaixamento do pH ruminal ocorre, principalmente, após a ingestão rápida de alimento, no caso de grãos de cereais moídos, por secreção salivar insuficiente para a manutenção do pH entre 6 e 7, e a inadequada estrutura física, para estimular a motilidade ruminal e a ruminação (Ørskov, 1986).

Segundo Satter e Slyter (1974) a concentração de 50 mg de amônia/L é suficiente para suportar taxa de crescimento máximo de bactéria ruminal.

A concentração de amônia ruminal varia normalmente com o tempo decorrido da alimentação, o local de amostragem no rúmen, o balanço entre proteína e energia na dieta, solubilidade e o nível de proteína da ração (Eardman et al., 1986).

Portanto, pode-se concluir que independentemente do nível de fósforo utilizado, nunca o pH e a concentração de amônia atingirão um nível danoso para digestão dos nutrientes citados acima, visto que os níveis experimentais de P no meio de cultura utilizados, foram muito abaixo dos valores encontrados em muitos experimentos com animais.

1.6 O fosfato bicálcico

O fosfato bicálcico é resultante da acidificação do concentrado apatítico, proveniente da flotação da rocha finamente moída, normalmente, com ácido sulfúrico, resultando em ácido fosfórico, que é desfluorizado e desulfatado. A reação entre o rejeito carbonatítico e o ácido fosfórico resulta no fosfato bicálcico, produto com baixos níveis de flúor e de outros contaminantes (Lima et al., 1995). O fosfato bicálcico possui no mínimo 18% de P e razão Ca/P máxima de 1,38/1 (Andif, 1997).

Lima et al. (1999) afirmam que os fosfatos inorgânicos são sais de ácido fosfórico e apresentam diferentes propriedades dependentes de sua estrutura química, cristalinidade, tamanho da partícula, pH e concentração de elementos contaminantes. Segundo Guerreiro (2004), os principais processos de industrialização do ácido fosfórico são por via úmida e via seca. No processamento por via úmida, a rocha fosfática é tratada com ácidos, podendo ser utilizados os ácidos sulfúrico, nítrico, clorídrico ou fosfórico. No Brasil, preconiza-se a utilização do ácido sulfúrico para a produção de ácido fosfórico via úmida, como também há o processo térmico (via seca). No último caso, a rocha fosfática é reduzida a P elementar em forno elétrico a altas temperaturas, sendo oxidado pelo ar a pentóxido de P. Os vapores quentes são hidratados e resfriados por reação com a água, produzindo o ácido fosfórico, que é tratado para redução dos traços de impurezas a níveis aceitáveis (Guerreiro, 2004).

Dependendo das fontes de cálcio utilizadas como bases neutralizantes, sendo elas (óxido de cálcio (CaO), cal hidratada (Ca(OH)₂) ou calcário (CaCO₃), têm-se três maneiras básicas de produção do fosfato bicálcico. Na reação do ácido fosfórico com cal virgem, obtém-se um produto quase que 100% composto de fosfato bicálcico, com pH variando do neutro para o básico, apresentando acidez residual instantânea baixa, reduzindo a zero, conforme resfriamento e cura do produto. Já na reação com cal hidratada, o produto formado é composto de 90% de fosfato bicálcico e 10% de fosfato monocálcico, com pH próximo ao neutro e, no terceiro caso, reagindo com o calcário, forma-se um produto composto de 85% de fosfato bicálcico e 15% de fosfato monocálcico, com pH ácido, próximo a 6 (Cardoso, 1991).

A composição do fosfato bicálcico comercial pode variar em função das proporções de fosfato monocálcico e bicálcico, ácido fosfórico, carbonato de cálcio e impurezas, dependendo da origem da matéria-prima e do processamento indústria aplicado para sua obtenção, refletindo na qualidade do produto (Lima et al., 1995; Gill,

1997). Lima et al. (1999), em trabalho com fosfatos bicálcicos, encontraram variações significativas nos valores de cálcio (16,5 a 25,7%) e fósforo (17,4 a 21,2%).

REFERÊNCIAS

- Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne – ABIEC. 2016. Perfil da Pecuária no Brasil. Relatório anual. Associação Nacional para Difusão de Fontes de Fósforo na Alimentação- ANDIF. 1997. O Fósforo na alimentação animal. Séries Técnicas, São Paulo.
- Barcellos, J. O. J. 1998. O papel de fósforo na nutrição de bovinos de corte. p. 23-72. In: Nutrição mineral em ruminantes. 2 ed. Porto Alegre, Ed. da UFRGS.
- Barnard, E. A. 1969. Biological function of pancreatic ribonuclease. *Nature* 221:340-344.
- Barreto, J. C. 2006. Avaliação de diferentes fontes de fósforo na nutrição de ruminantes. Dissertação (M.Sc.) Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.
- Bass, J. M.; Fishwick, G.; Hemingway, R. G.; Parkins, J. J e Ritchie, N. S. 1981. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 97:365-372.
- Ben-Ghedalia, D.; Zaqari H.; Zomwell S. e Bondi, A. 1975. Solubility and net exchange of calcium, magnesium and phosphorus in digesta flowing along the gut of the sheep. *British Journal of Nutrition* 33:87-94.
- Boin, C. 1985. Exigências de minerais pelas categorias de rebanho bovino e funções desses nutrientes. p. 15-46. In: Anais do 3º Simpósio sobre Nutrição de Bovinos. FEALQ, Piracicaba, SP, Brasil.
- Breves, G.; Holler, H.; Lessmann, H. W. 1985. Turnover of microbial nitrogen in the rumen of phosphorus-depleted sheep. *Proceedings of the Nutrition Society* 44:145A
- Breves, G.; Rosenhagen, C.; Holler, H. 1987. Saliva secretion of inorganic phosphorus in phosphorus-depleted sheep. *Journal of Veterinary Medicine Series A – Physiology Pathology Clinical Medicine* 4:42-47.
- Breves, G.; Schroder, B. 1991. Comparative aspects of gastrointestinal phosphorus metabolism. *Nutrition Research Reviews* 4:125-140.
- Call, J. W.; Butcher, J. E.; Blake, J. T.; Smart, R. A.; Shupe, J. L. 1978. Phosphorus influence on growth and reproduction of beef cattle. *Journal of Animal Science* 47:216-225.
- Cardoso, J. L. A. 1991. Produção, processamento e perspectivas do fosfato na alimentação animal. In: Anais do 6º Mini Simpósio do Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. CBNS, Campinas, SP, Brasil.
- Carvalho, F. A. N.; Barbosa, F. A.; McDowell, L. R. 2003. Nutrição de Bovinos a pasto. 1st ed, Papel Form, Belo Horizonte, MG, Brasil.
- Challa, J.; Braithwaite, G. D.; Dhanoa, M. S. 1989. Phosphorus homeostasis in growing calves. *The Journal of Agricultural Science* 112:217-226.
- Chicco, C. F., Ammerman, C. B., Moore, J. E., Van Wallegghem, P. A., Arrington, L. R., & Shirley, R. L. 1965. Utilization of inorganic ortho-, meta- and pyrophosphates by

- lambs and by cellulolytic rumen microorganisms in vitro. Florida Agricultural Experiment Stations Journal 1929:355-363.
- Coneglian, S. M. 2006. Diferentes proporções de fosfato bicálcico e fosfato de rocha em dieta de bovinos. Dissertação (M.Sc.). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.
- Coombe, J. B.; Christian, K. R.; Holgate, M. D. 1971. Journal of Agricultural Science, Cambridge 77:159-174.
- Conrad, J. H.; Mcdowell, L. R.; Ellis, G. L., J. K. Loosli. 1985. Minerais para ruminantes em pastejo em regiões tropicais. Boletim n. 84-72136. CNPQC/EMBRAPA, Campo Grande, MS., Brasil.
- Duarte, H. C.; Graça D. S.; Borges F. M. O.; Di Paula, O. J. 2003. Comparação de métodos "in vitro" para determinação da biodisponibilidade de fósforo. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 55:80-84.
- Durand, M.; Bertier, B.; Hannequart, G.; Gueguen, I. 1982. Reproduction, Nutrition, Developement 22:865-879.
- Durand, M.; Kawashima, R. 1980. Influence of minerals in rumen microbial digestion. p.374-408. In: Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants. Eds. Y. Ruckebush and P. Thivend. Lancaster, UK, MTP Press Ltd.
- Eardman, R. A.; Proctor, G. H.; Vandersall, J. H. 1986. Effect of rumen ammonia concentration on "in situ" rate and extent of digestion of foodstuffs. Journal of Dairy Science 69:2312-2320.
- Ellenberger, H. B.; Newlander, J. A.; Jones, C. H. 1950. Composition of the bodies of dairy cattle. Vermont Agricultural Experiment Station, University of Vermont 558.
- Erickson, G.; Klopfenstein T.; Milton, C. T.; Hanson, D.; Calkins C. 1999. Effect of Dietary Phosphorus on Finishing Steer Performance, Bone Status, and Carcass Maturity. Faculty Papers and Publications in Animal Science 461.
- Feeding standards of Australian livestock. Ruminants. East Melbourne: CSIRO, 1991.
- Fishwick, G.; Fraser, J.; Hemingway, R. G.; Parkins, J. J.; Fitchie, N. S. 1977. Journal of Agricultural Science, Cambridge 88:143-150.
- Fox, D. G.; Tedeschi L. O.; Tylutki, T. P.; Russell, J. B.; Van Amburgh, M. E.; Chase, L. E.; Pell, A. N.; Overton, T. R. 2004. The cornell net carbohydrate and protein system model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. Animal Feed Science and Technology 112:29-78.
- Franzolin, R. 1996. Características fisiológicas do sistema digestivo e da digestão microbiana em ruminantes. In: Curso de Atualização em Nutrição Mineral de Bovinos, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.
- Geisert, B. G.; Erickson, G. E.; Klopfenstein, T. J.; Macken C. N.; Luebbe, M. K.; MacDonald, J. 2014. Phosphorus requirement and excretion of finishing beef cattle fed different concentrations of phosphorus. Department of Animal Science, University of Nebraska.
- Gill, C. 1997. Phosphorus, be careful white cheap P. Feed International, 19-26.
- Gióvine, N. 1943. Estudo clínico da deficiência de fósforo nos bovinos de Minas Gerais. Arquivos da Escola Superior de Veterinária do Estado de Minas Gerais 1:17-25.
- Guerreiro, J. S. D. 2004. Comparação de métodos "in vitro" para determinação da biodisponibilidade de fósforo. Dissertação (M.Sc.) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS, Brasil.

- Hall, O. G.; Baxter, H. D.; Hobbs, C. S. 1961. Effect of Phosphorus in different chemical forms on in vitro cellulose digestion by rumen microorganisms. University of Tennessee, Knoxville.
- Hall, G. A. B.; Lee Jr, D. D. 1978. Efeito da fonte de fósforo e tempo de incubação na solubilidade do fósforo em ácido a 2%, e em fluido de rumen. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia* 7:14-25.
- Hemingway, R. G. 1967. *Outlook on Agriculture* 5:172-175.
- Hoover, W. H.; Stokes, S. R. 1991. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *Journal of Dairy Science* 74:3630-3644.
- Hungate, R. E. 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, New York. 346-347.
- Komisarczuk, S.; Merry, R. J.; McAllan, A. B. 1987. Effect of different levels of phosphorus on rumen microbial fermentation and synthesis determined using a continuous culture technique. *British Journal of Nutrition* 51:279-290.
- Lehninger, A. L. 1994. *Princípios de Bioquímica*. Sarvie, São Paulo, SP, Brasil.
- Lima, F. R. Fernandes, J. I., Oliveira, E., Fronzaglia, G. C., e Kahn, H. 1999. Laboratory Evaluations of feed-grade and agricultural grade phosphates. *Poultry Science* 78:1717-1728.
- Lopes, H. O. S.; Pereira, E. A. 1986. Fontes alternativas de fosfatos na suplementação alimentar de animais. p. 435-450. In: *Anais do 3º Encontro Nacional de Rocha Fosfática*. IBRAFOS, Brasília, DF, Brasil.
- Mcgillvray, J. J. 1980. Biological availability of phosphorus sources. p.73-86. Em: *Proceedings of 1ª Annual International Minerals Conference*. International Minerals & Chemical Corporation, St. Petersburg Beach, Florida.
- Meniccuci Sobrinho, L. 1943. Carência de fósforo e cálcio nos bovinos. *Arquivos da Escola Superior de Veterinária do Estado de Minas Gerais* 1:9-15.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. 2017. Dados de rebanho bovino e bubalino no Brasil - 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude_animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/documentos-febre_aftosa/DadosderebanhobovinoebubalinodoBrasil2017.pdf> Acessado em: 23 de dezembro, 2018.
- Moreira, V. da R.; Prates, E. R.; Lebouté, E. M. 1988. Rentabilidade de várias fontes de fósforo inorgânico para ruminantes avaliada por técnicas "in vitro". In: *Anais da 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. Sociedade Brasileira de Zootecnia, Viçosa, MG, Brasil.
- Morse, D.; Head, H. H.; Wilcox, C. J. 1992. Disappearance of phosphorus from concentrates in vitro and from rations fed to lactating dairy cows. *Journal Dairy Science*. 75:1979-1986.
- National Research Council - NRC. 1976. Nutrient requirements of beef cattle. National Academy of Sciences. Washington, DC.
- National Research Council - NRC. 1996. Nutrient Requirements of Beef Cattle 7th ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Nel, J. W.; Moir, R. J. 1974. The effect of ruminal and duodenal application of different levels of calcium and phosphorus to sheep on semi-purified diets. *South African Journal of Animal Science* 4:1-20.
- Nicodemo, M. L. F; Barrocas, G. E. G. 1995. Métodos in vitro para avaliação de fontes de fósforo destinadas a bovinos. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia* 24: 49-61.
- Ørskov, E. R. Starch digestion and utilization in ruminants. 1986. *Journal of Animal Science*, 63:1624-1633.

- Petri, A.; Muschen, H.; Breves, G., Richter, O. e Pfeffer, E. 1988. Response of lactating goats to low phosphorus intake 2. Nitrogen transfer from the rumen ammonia to rumen microbes and proportion of milk protein derived from microbial amino acids. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 111:265-271.
- Preston, R. L.; Pfander, W. H. 1964. Phosphorus Metabolism in Lambs Fed Varying Phosphorus Intakes. *Journal of Nutrition* 83:369-378.
- Raun, A. E.; Cheng E. W.; Burroughs, D. 1956. Pyrate phosphorus hydrolysis and availability to rumen microorganisms. *Agricultural and Food Chemical* 4:869-871.
- Resorce Consulting Services (Australian). 1986. A review of phosphorus requirements of grazing cattle in North Australia. Darwin.
- Rosa, L. C. A.; Silva, J. F. C. D.; Andrade e A. T. D. e Leão, M. I. 1986. Solubilidade abomasal e ruminal de fontes inorgânicas de fósforo em bovinos e bubalinos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 15:364-371.
- Rosol, T. J.; Capen, C. C. 1997. Calcium-regulating hormones and diseases of abnormal mineral (Calcium, Phosphorus, Magnesium) Metabolism. 5th ed. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Academic Press.
- Satter, L. D.; Slyter, L. L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *British Journal of Nutrition* 32:199-208.
- Signoretti, R. D.; Silva, J. F. C.; Valdares Filho, S. C. 1999. Composição corporal e exigências líquidas e dietéticas de microelementos inorgânicos (Ca, P, Mg, K e Na) de bezerros da raça Holandesa alimentados com dietas contendo diferentes níveis de volumoso. *Revista Brasileira de Zootecnia* 28:205-213.
- Silva, D. J. 1990. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 2 ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.
- Silva, A. G.; Paulino, M. F.; Amorim, L. S.; Detmann, E.; Rennó, L. N.; Duarte, M. S.; Moura, F. H.; Melo, L. P.; Paiva, P. H. S.; Manso. M. R.; Carvalho V. V. 2017. Weight, body condition, milk production, and metabolism of Nellore cows when their calves are submitted to different supplementation levels. *Tropical animal health and production* 49:383-387.
- Smith, R. H. 1984. *Nuclear Techniques in Tropical Animal Diseases and Nutritional Disorders*, International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Suttie, J. W. 1980. Nutritional aspects of fluoride toxicosis. *Journal Animal Science*, 51:759-766.
- Symonds, H. W.; Forbes, J. M. 1993. Mineral metabolism In: *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. Wallingford, CAB Intemational: 363-379.
- Ternouth, J. H.; G. Bortolussi; D. B. Coates; R. E. Hendricksen; R. W. McLean. 1996. The phosphorus requirements of growing cattle consuming forage diets. *J. Agric. Sci.* 126:503-510.
- Trevizan, L. 2003. O fósforo no organismo animal: importância e deficiência. p.19 Em: *Reunião de Bioquímica do tecido animal. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS, Rio Grande do Sul*.
- Underwood, E. J. 1981. *The mineral nutrition of livestock*. Commonwealth Agricultural Bureaux, London.
- Valadares Filho, S. de C; Magalhães, K. A.; Rocha Júnior, V. R. e Capelle, E. R (Ed.). 2006. *Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos*. 2 ed. UFV, Viçosa, MG, Brasil.
- Wadsworth, J. C.; Cohen, R. D. H. 1976. Phosphorus utilization by ruminants. In: *Prospects for improving efficiency of phosphorus utilization. Reviews in rural Science*: 143-153. University of New England Press, Australia.

- Witt, K. E.; Owens, F. N. 1983. Phosphorus: ruminal availability and effects on digestion. *Journal of Animal Science* 56:930-937.
- United States Department of Agriculture – USDA. 2018. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf> Acessado em: 11 de outubro, 2018.

2. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar oito fontes de fosfatos bicálcicos comercializados no Brasil, quanto à:

- a) composição química;
- b) solubilidade;
- c) liberação ruminal e intestinal de P por técnicas *in vitro*;
- d) digestibilidade *in vitro* da matéria seca de dietas contendo diferentes concentrações e fontes de P;
- e) taxa de fermentação *in vitro* de dietas contendo diferentes concentrações e fontes de P.

3. ARTIGO 1

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE FOSFATOS BICÁLCICOS USADOS PARA BOVINOS NO BRASIL: COMPOSIÇÃO, SOLUBILIDADE E LIBERAÇÃO RUMINAL E INTESTINAL

Resumo - O objetivo deste trabalho foi avaliar oito diferentes fosfatos bicálcicos utilizados no Brasil, quanto à composição, solubilidade, liberação ruminal e intestinal. Para a solubilidade, três testes foram realizados em três solventes inorgânicos mais comumente utilizados (água, ácido cítrico a 2% e citrato de amônio neutro) e para liberação ruminal e intestinal foram realizados pela técnica *in vitro*. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Todos os fosfatos foram seguros em relação aos níveis de cálcio, fósforo e suas relações ótimas estabelecidas na literatura. Houve diferenças entre todos os testes realizados, principalmente na liberação ruminal e intestinal. Levando em consideração todos os aspectos técnicos avaliados, o fosfato 5 obteve o melhor resultado.

Palavras-chave: Composição mineral, liberação intestinal, liberação ruminal, solubilidade.

***IN VITRO* EVALUATION OF DICALCIUM PHOSPHATES USED FOR BOVINE IN BRAZIL: COMPOSITION, SOLUBILITY AND RUMINAL AND INTESTINAL RELEASE**

Abstract – The objective of this work was to evaluate eight different dicalcium phosphates used in Brazil, with respect to composition, solubility, ruminal and ruminal and intestinal release. For solubility, three tests were performed using three inorganic solvents (water, 2% citric acid and neutral ammonium citrate) whereas the ruminal and intestinal releases, were evaluated by in vitro techniques. The experimental design was completely randomized. All the phosphates were safe in relation to fluoride, calcium, phosphorus levels and their optimal relationships established in the literature. All the tests carried out showed differences among the phosphates, mainly in terms of ruminal and intestinal releases. Taking into account all the technical aspects evaluated, phosphate 5 had the best result.

Key words: Composition, intestinal release, ruminal release, solubility.

Introdução

Existem situações de campo em que o fósforo precisa ser suplementado com fontes inorgânicas, especialmente quando os alimentos utilizados para compor as dietas contêm baixa concentração e não suprem as quantidades adequadas de P para os animais. A principal fonte de P utilizada no Brasil é o fosfato bicálcico. Porém cada empresa tem sua jazida e suas matérias-primas, diferentes processamentos para obtenção do produto final, além da própria diferenciação entre as composições, o que afeta diretamente a disponibilidade do P para os animais.

Existem diferentes técnicas para avaliar as diferentes fontes de fósforo, relacionadas à disponibilidade, sendo as já existentes a solubilização em fluídos biológicos e alguns solventes inorgânicos: ácido cítrico (Yoshida, 1979; Guéguen 1995), citrato neutro de amônio (Guerreiro 2004), água (Rosa, 1991; Duarte et al., 2003; Guerreiro 2004), e ácido clorídrico (Duarte et al., 2003), assim como o teste de liberação ruminal e intestinal de fósforo (Gargallo et al., 2006).

Nicodemo e Barrocas (1995) afirmam que materiais biológicos, em virtude de sua maior complexidade, tornam a padronização da técnica mais difícil, comparativamente aos solventes inorgânicos. Há dificuldade em se estabelecer uma taxa mínima de solubilização para indicar fosfatos de boa qualidade. Com a técnica *in vitro* sugerida por Calsamiglia e Stern (1995), adaptada por Gargallo et al. (2006), consegue-se uma padronização total do processo, além de expor o material testado com as condições similares ao trato digestório do ruminante, principalmente com relação aos valores de pH nos respectivos compartimentos (rúmen, abomaso e intestino), em que este fator tem relação direta com a solubilização de fosfatos e consequente absorção posterior no duodeno.

Desta forma objetivou-se com este trabalho avaliar oito fosfatos bicálcicos utilizados no Brasil, com relação a composição química, solubilidade e a liberação ruminal e intestinal.

Materiais e Métodos

O experimento foi realizado na cidade de Maringá, Estado do Paraná, Brasil, nas seguintes coordenadas geográficas (23°21'13''S – 52°04' 27''O; 550 m de altitude). Foram avaliados oito fosfatos bicálcicos, sendo denominados: Fosfato 1, Fosfato 2, Fosfato 3, Fosfato 4, Fosfato 5, Fosfato 6, Fosfato 7 e Fosfato 8 em 3 repetições por tratamento.

Análises da composição química

Para as análises referentes à composição química, a solução mineral foi preparada por via seca. A concentração de fósforo foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 725 nm e as concentrações de cálcio, magnésio, manganês e ferro foram determinadas por absorção atômica (Silva, 1990).

Solubilidades

A solubilidade em água foi determinada após uma adaptação do método de Yoshida (1979) da seguinte maneira: pesou-se 1 g de amostra de fosfato em Béquer de 250 mL e adicionou-se 100 mL de água deionizada. O Béquer foi agitado durante 1 h (30 a 40 rpm), após foi realizada filtração e recuperação do resíduo em papel filtro quantitativo (livre de cinzas). Logo após o resíduo foi seco em estufa a 105°C por 12 h e realizada a análise de fósforo.

A solubilidade em ácido cítrico 2% foi realizada da seguinte maneira: pesou-se 1 g de amostra de fosfato em Béquer de 250 mL, adicionou-se 100 mL de uma solução de ácido cítrico a 2%, agitado durante 1 h (30 a 40 rpm), após, foi realizada filtragem e recuperação do resíduo em papel filtro quantitativo, livre de cinzas, logo após, o resíduo foi seco em estufa a 105°C por 12 h e realizada a análise de fósforo em espectrofotômetro (Yoshida, 1979).

O teste de solubilidade em citrato neutro de amônio da seguinte maneira: pesou-se 1 g de amostra de fosfato em Béquer de 250 mL, adicionou-se 100 mL de uma solução de citrato neutro de amônio, agitado durante 1 h (30 a 40 rpm). Em seguida, foi realizada filtragem e recuperação do resíduo em papel filtro quantitativo (livre de cinzas), logo após o resíduo foi seco em estufa a 105°C por 12 h e realizada a análise de fósforo em espectrofotômetro (Yoshida, 1979).

Liberação ruminal

A taxa de liberação ruminal e intestinal foi determinada pela técnica de três estágios *in vitro* desenvolvida por Calsamiglia e Stern (1995), adaptada por Gargallo et al. (2006). Foram pesadas aproximadamente 5 g de amostra de cada fosfato em duplicata incluindo um branco (papel filtro picado) para correção dos dados, dentro de saquinhos de nylon (5 × 10 cm, poro de 50 µm; Ankom R510, Ankom, Fairport, NY), amarrados com borracha e uma argola (seis sacos por amostra, incluindo o branco) e suspensos no rúmen (vaca holandesa adulta fistulada) por 12 h. Em seguida procedeu-se o enxágue dos saquinhos por 5 minutos por três vezes até o escoamento sair limpo. Após este período, o material foi dividido em duas frações, uma parte do resíduo recuperado foi destinado a realização de análise de P e a outra metade foi seca a 55°C por 48 h. Em seguida foi pesado de 0,5 a 5 g do resíduo da fermentação ruminal dentro de saquinhos de nylon novos, não foi possível padronizar essa quantidade devido alguns

fosfatos serem muito finos e passarem facilmente pelos poros dos saquinhos, assim os resíduos da fermentação ruminal de menor massa foram de 0,5 g. Posteriormente, os saquinhos foram alocados no jarro de incubação da Daisy (Ankom) (27 saquinhos por jarro, sendo três brancos). Adicionou-se 2 L de solução 0,1 N HCl (pH 1,9) contendo 1 g/L de pepsina (P-7000, Sigma, St. Louis, MO) e foi incubada com rotação constante a 39°C por 1 h.

Depois da incubação, foi drenado todo o líquido e os saquinhos foram lavados com água de torneira até a água obtida após a lavagem apresentar-se límpida. Em seguida os saquinhos foram introduzidos nos potes de incubação e adicionou-se 2 L de uma solução de pancreatina (0,5 M KH_2PO_4 tampão, pH 7,75, contendo 50 ppm de timol e 3 g L^{-1} de pancreatina; Sigma P-7545) e então foram mantidos por 24 h no incubador Daisy com rotação constante a 39°C.

Depois desta última incubação, drenado todo o líquido e lavado os saquinhos com água da torneira até a água obtida após a lavagem se apresentar límpida, os saquinhos foram drenados e desidratados em estufa a 55°C por 48 h. O peso seco foi registrado e o teor de P do resíduo foi analisado por espectrofotometria (Silva, 1990).

Análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso. Os dados obtidos para solubilidade do fósforo em água, em ácido cítrico a 2%, em citrato neutro de amônio e os dados da liberação ruminal, liberação intestinal e total de fósforo, foram analisados por análise de variância, adotando-se $\alpha=0,05$. As diferenças entre as médias de tratamento foram testadas utilizando o teste de Tukey. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System, versão 9.1).

Resultados

Composição química das fontes de fósforo

O fosfato 5 apresentou uma das menores concentrações de P e Ca, porém apresentou a menor razão Ca:P (0,630).

Tabela 1 – Composição química dos fosfatos estudados quanto a teores de P (g kg^{-1} MS), Ca (g kg^{-1} MS), Mg (g kg^{-1} MS), Mn (mg kg^{-1} MS), Fe (mg kg^{-1} MS) e razão Ca:P

Fosfato	P	Ca	Mg	Mn	Fe	Ca:P
1	25,3	21,6	3,10	25,6	1,35	0,850
2	26,0	25,5	15,1	42,1	3,38	0,980
3	19,1	16,5	2,00	21,9	3,46	0,860
4	23,9	23,7	19,4	43,8	3,95	0,990
5	19,6	12,4	12,5	31,7	2,94	0,630
6	25,4	24,2	1,30	17,5	294	0,950
7	24,9	17,6	1,40	51,8	6,71	0,710
8	25,2	23,3	2,30	61,4	7,67	0,920
Média	23,7	20,6	7,10	32,1	3,72	0,870

Solubilidade

A solubilidade em água variou consideravelmente, de 21,9% a 60,8%. O fosfato 2 apresentou maior solubilidade em água (60,8%), enquanto os fosfatos 8 (26,7%) e 6 (21,9%) apresentaram menor solubilidade em água. Os fosfatos de número 5 (54,7%), 4 (51,5%), 3 (46,8%), 7 (44,3%), e 1 (42,8%) tiveram solubilidades intermediárias (Tabela 2).

Tabela 2 - Solubilidade de P em água

Fosfato	P solubilizado (g kg ⁻¹)	P solubilizado (% P total)
1	10,8 ^{bc}	42,8 ^d
2	15,8 ^a	60,8 ^a
3	8,92 ^c	46,8 ^{bcd}
4	12,3 ^b	51,5 ^{bc}
5	10,7 ^{bc}	54,7 ^{ab}
6	5,56 ^d	21,9 ^e
7	11,0 ^b	44,3 ^{cd}
8	6,71 ^c	26,7 ^e
EPM	0,559	2,31

^{a,b,c,d,e} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A solubilidade em ácido cítrico variou de 89,9% a 97,0% (Tabela 3). Os fosfatos que apresentaram a maior solubilidade foram o 1 (97,0%), 5 (96,8%) e 2 (96,2%). Os fosfatos 2 (96,2%) e 4 (94,9%) não diferiram entre si. Os fosfatos 7 (93,2%), 6 (92,7%) e 8 (92,6%) não diferiram entre si. O fosfato que apresentou a menor solubilidade em ácido cítrico foi o de número 3 com 89,9%.

Tabela 3 - Solubilidade de P em ácido cítrico a 2% (1:100)

Fosfato	P solubilizado (g kg ⁻¹)	P solubilizado (% P total)
1	24,6 ^b	97,0 ^a
2	25,1 ^a	96,2 ^{ab}
3	17,2 ^f	89,9 ^d
4	22,8 ^d	94,9 ^b
5	19,1 ^e	96,8 ^a
6	23,7 ^c	92,7 ^c
7	23,2 ^d	93,2 ^c
8	23,3 ^d	92,6 ^c
EPM	0,466	0,431

^{a,b,c,d,e,f} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A solubilidade em citrato neutro de amônio variou de 91,1% a 97,5% (Tabela 4). Os fosfatos que apresentaram as maiores solubilidades foram o 1 (97,0%) e o 2 (97,2%). Os fosfatos 5 (95,9%), 4 (95,1%) e 8 (94,5%) não diferiram entre si. Os fosfatos 4 (95,1%), 8 (94,5%) e 7 (94,1%) apresentaram solubilidade similares. Os fosfatos que tiveram as menores solubilidades foram os de número 3 (91,7%) e 6 (91,1%).

Tabela 4 - Solubilidade de P em citrato neutro de amônio (CNA).

Fosfato	P solubilizado (g kg ⁻¹)	P solubilizado (% P total)
1	24,6 ^b	97,5 ^a
2	25,3 ^a	97,2 ^a
3	17,5 ^g	91,7 ^d
4	22,7 ^e	95,1 ^{bc}
5	18,8 ^f	95,9 ^{ab}
6	23,2 ^d	91,1 ^d
7	23,4 ^d	94,1 ^c
8	23,8 ^c	94,5 ^{bc}
EPM	0,467	0,403

^{a,b,c,d,e,f,g} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Taxa de liberação ruminal e intestinal de fósforo

O fosfato que apresentou maior liberação ruminal (Tabela 5) foi o fosfato 6 diferindo de todos os outros. Na sequência os fosfatos em ordem decrescente de desempenho foram: fosfato 1 e fosfato 2. Os fosfatos 4 e 7 não diferiram entre si. Os piores resultados foram observados para os fosfatos 8, 5 e 3.

Quanto a liberação intestinal houve diferenças significativas (Tabela 5), em que os melhores resultados foram observados para os fosfatos 5 e 8 em relação aos fosfatos 1, 2, 4 e 6, os quais foram observados os piores resultados. Já nos resultados de liberação total têm-se os fosfatos 5, 6 e 8 com os melhores resultados em relação aos fosfatos 3 e 4 como piores resultados.

Tabela 5 - Liberação ruminal e intestinal de P

Fosfatos	Liberação ruminal (12 h)		Liberação intestinal (24 h)		Liberação total %
	P		P		
	P solubilizado (g kg ⁻¹)	% Total	solubilizado (g kg ⁻¹)	% Total	
1	8,27 ^b	32,7 ^b	5,34 ^{ed}	31,1 ^{de}	53,2 ^{bc}
2	7,27 ^c	27,9 ^c	6,64 ^c	35,1 ^{de}	52,8 ^{bc}
3	2,07 ^f	10,9 ^e	6,95 ^c	40,5 ^b	46,4 ^d
4	5,49 ^d	22,9 ^d	5,71 ^d	30,7 ^{de}	46,1 ^d
5	2,71 ^{ef}	13,8 ^e	8,62 ^b	50,5 ^a	57,0 ^a
6	9,65 ^a	38,0 ^a	4,78 ^e	30,0 ^e	56,1 ^{ab}
7	5,90 ^d	23,7 ^d	7,22 ^c	37,8 ^{bc}	52,1 ^c
8	31,3 ^e	12,4 ^e	10,6 ^a	47,7 ^a	53,9 ^{abc}
EPM ¹	0,466	1,68	0,324	1,348	0,716
<i>P</i>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

^{a,b,c,d,e,f} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ¹Erro Padrão da Média

Discussão

Composição química dos fosfatos

Segundo a Andif (1997) todos os fosfatos estão dentro dos padrões para porcentagem de P mínima (180 g kg⁻¹) e razão máxima de Ca/P de 1,38:1.

Para os teores de P e Ca, os resultados corroboram com Lima et al. (1999), que avaliaram fosfatos bicálcicos e encontraram valores de Ca que variaram de 165 a 257 g kg⁻¹ e os resultados do presente trabalho variaram de 124 (fosfato 5) a 255 g kg⁻¹ (fosfato 2). Para o P, os autores encontraram valores de 174 a 212 g kg⁻¹, enquanto os resultados do presente trabalho variaram de 191 (fosfato 3) a 260 g kg⁻¹ (fosfato 2). Os

resultados encontrados por Guerreiro (2004) apresentam divergências ao presente trabalho, em que foram encontrados de 293 a 387 g kg⁻¹ de Ca e 152 a 206 g kg⁻¹ de P.

A biodisponibilidade do P varia principalmente com a forma da molécula de fosfato, mas, fatores como a razão de Ca:P e interação com outros elementos também podem afetá-la. Assim, dois fosfatos equivalentes em teor de fósforo podem diferir em disponibilidade (Vitti et al., 1991). Também McGillvray (1978) afirma que existem formas menos absorvíveis de P (piro e metafosfato) e formas mais absorvíveis (ortofosfatos) e como são empregadas altas temperaturas para eliminação do flúor, o P vai ficando menos disponível a medida que se eleva a temperatura, transformando o fosfato orto nas formas menos disponíveis, como descrito anteriormente. Contudo o aquecimento necessário varia com o teor de cálcio e também em função do fosfato-base, que, por exemplo, o ortofosfato monocálcico sofre conversão a pirofosfato a temperatura de (120°C) e o ortofosfato tricálcico sofre a mesma conversão a temperatura bem mais elevada (1600°C). Portanto, está claro que para cada empresa produtora são obtidos produtos de qualidade variáveis, pelas diferentes jazidas com diferentes concentrações minerais e processamento das matérias-primas.

Solubilidades

Na solubilidade em água comparando com os resultados encontrados por Duarte (2003), foi encontrada solubilidade de 33,9%, diferindo muito dos resultados encontrados no presente estudo, que se aproximaria apenas do fosfato (fosfato 8) com diferença de 7,2%, porém com o dobro do tempo, o que pode ter influenciado na solubilização (30 minutos estudo do autor), porém sem a padronização granulométrica realizada pelo autor. A solubilidade em água, que não é necessária para absorção, não é

aceita como indicador da disponibilidade dos fosfatos, uma vez que muitos fosfatos insolúveis em água são disponíveis aos animais (Rosa, 1991).

Na solubilidade em ácido cítrico foi verificada alta correlação entre este teste e o valor biológico por Sullivan et al. (1992), em aves. Segundo Guéguen (1995), a solubilidade em ácido cítrico a 2% é maior que 85% para todos os fosfatos com disponibilidade biológica alta. Portanto todas as fontes testadas são adequadas quanto a esta característica.

Os resultados do estudo diferem dos valores encontrados por Guerreiro (2004) trabalhando com tempos diferentes de incubação (20 minutos, 6 e 20 h mantidas a 39°C), encontrou solubilidades de 70,33 a 89,04% ambos no tempo de 20 h, porém sem agitação (presente estudo), o que aceleraria o processo de solubilização de qualquer soluto, apesar de no presente estudo também não ter sido utilizada a temperatura mais elevada, que também influenciaria positivamente na solubilização pela maior agitação de moléculas.

Em contrapartida não pode ser explicado pela relação fósforo e ácido cítrico que segundo Guéguen (1970), afirmou que normalmente a solubilização dos fosfatos são aumentadas com a redução desta razão, e no presente estudo essa relação variou de 1,908 a 2,604 mg L⁻¹, comparado com Guerreiro (2004) em que essa relação foi de 1 mg L⁻¹. A solubilidade apresentada pelo autor deveria ter sido maior que a do presente estudo, o que não ocorreu, reforçando as possibilidades citadas no parágrafo anterior.

Com relação ao resultado encontrado por Nicodemo e Barrocas (1995) de solubilidade de 92%, o presente estudo encontrou valores bem próximos, em que somente o fosfato 3 não atingiu esse valor, mas também esteve muito próximo (89,9%). Duarte (2003) também encontrou valor bem próximo ao deste estudo, e foi reportado o

valor de 97,7%, apesar de ter sido com metade do tempo, com padronização de granulometria.

Para solubilidade em citrato neutro de amônio, segundo Duarte (2003) o fosfato bicálcico é considerado de alta biodisponibilidade, comparado ao fosfato monoamônico e o supertríplo que tiveram solubilidades de 97,6 e 95,6%, respectivamente, e os mesmos são altamente solúveis neste meio obtendo correlação positiva com biodisponibilidade e o autor encontrou solubilidade de 97,6%, que se situa bem próximo aos resultados do presente estudo, variando de 91,1 a 97,5%, apesar de o tempo no presente estudo ter sido 2 vezes maior, porém sem padronização de granulometria realizada pelo autor.

A solubilidade em citrato neutro de amônio também tem correlação positiva com o ganho de peso e parâmetros ósseos em aves segundo Rostagno – (1990, 1995). Chicco et al. (1965) também encontraram valores bem próximos ao presente estudo de 97,7%. Todos os fosfatos apresentaram valores de 90% ou mais de solubilidade com os dois extratores utilizados, mostrando-se de excelente qualidade conforme resultados mencionados e recomendados acima.

Taxa de liberação ruminal e intestinal de fósforo

As taxas de liberação ruminal e intestinal de P são informações importantes porque mostram a proporção de P que ficará disponível para uso pelos animais. É importante separar em liberação ruminal e intestinal por causa das solubilidades das fontes de fósforo nesses compartimentos. E, finalmente, a somatória dessas duas taxas indica o total de P passível de utilização pelos animais e microbiota ruminal.

Na solubilidade ruminal, o melhor resultado foi de 38% (fosfato 6) e o pior foi de 10,85 % (fosfato 3). Tais resultados se aproximam com o encontrado por Witt e Owens

(1983) que encontram solubilidade (liberação) *in vitro* de 29,7%, utilizando solubilidade *in vitro* com duração de 3 h e não 12 h *in situ* como o presente estudo. Contudo os referidos autores realizaram também estudo medindo a disponibilidade ruminal através da mensuração de concentração de P no rúmen (mg L^{-1}) de vários fosfatos e puderam constatar que em ordem de magnitude, seguiram as mesmas diferenças entre solubilidade e disponibilidade, sugerindo que a solubilidade de fontes de P em tampão ruminal poderia ser empregada para indicar a classificação de disponibilidade ruminal dessas fontes para ruminantes.

Em líquido ruminal *in vitro* por 20 h, Guerreiro (2004) encontrou solubilidades que variaram de 70,26 a 78,81% em fosfatos bicálcicos. Já Nicodemo e Barrocas (1995) encontraram resultados muito diferentes de solubilidade com valor de 8%.

Na liberação intestinal e total é interessante notar que o fosfato 5 na liberação ruminal ocupava uma das piores classificações, situando-se em antepenúltimo lugar e estando igualado estatisticamente aos dois últimos, em que também se faz necessário registrar que este fosfato tem a razão Ca:P menor de todos (0,63), estando bem abaixo de algumas fontes. McGillvray (1980) menciona queda progressiva no valor biológico a medida que a razão Ca:P aumenta, relacionando-a solubilidade.

Segundo Rosa et al. (1986) a quantidade de um elemento inorgânico disponível para absorção depende diretamente da fração que é liberada no rúmen e no abomaso. Witt e Owens (1983) afirmam que a liberação de P no rúmen pode ser menos importante que a liberação no trato digestório total, para determinar a disponibilidade do P dietético para ruminantes. Pouco é conhecido sobre os locais exatos, os mecanismos e o seu controle, mas o local principal de absorção de P é o intestino delgado (Breves and Schröder, 1991).

Como se observa na literatura, a liberação intestinal é o fator mais importante por ser o principal local de absorção do elemento, possibilitando a reciclagem para o rúmen via saliva, sendo esta via a principal fornecedora do elemento para o ambiente ruminal e não o elemento proveniente da dieta. Pode ser observado também no presente trabalho que ainda não se conseguiu estabelecer uma metodologia padronizada para a predição do valor biológico de fosfatos, dentro das metodologias testadas na literatura (por causa dos variados tempos, concentrações dos solventes, agitação, temperatura, relação solvente: soluto, entre outras).

No presente estudo a técnica *in vitro* de liberação ruminal e intestinal se mostrou promissora e com resultados coerentes, além de ser uma metodologia mais padronizada, porém de difícil execução por parte da indústria, pela necessidade de incubação ruminal, sendo também a técnica em que houve maior diferença entre as fontes.

Conclusões

Conclui-se que os fosfatos bicálcicos comercializados no Brasil têm diferentes taxas de liberação ruminal e intestinal, bem como diferentes solubilidades na escolha do melhor fosfato, deve ser preconizado o fosfato bicálcicos 5 como fonte de P, pois apresentou o melhor conjunto de resultados. A técnica *in vitro* de liberação ruminal e intestinal, mostrou-se uma boa ferramenta para avaliação da disponibilidade de P em fosfatos bicálcicos.

REFERÊNCIAS

- Associação Nacional para Difusão de Fontes de Fósforo na Alimentação- Andif. 1997. O Fósforo na alimentação animal. Séries Técnicas, São Paulo.
- Breves, G.; Schroder, B. 1991. Comparative aspects of gastrointestinal phosphorus metabolism. *Nutrition Research Reviews* 4:125-140.
- Calsamiglia, S.; Stern, M. D. 1995. A three-step in vitro procedure for estimating intestinal digestion of proteins in ruminants. *Journal Anim Science* 73:1459-1465.
- Chicco, C. F., et al. 1965. Utilization of inorganic ortho-, meta- and pyrophosphates by lambs and by cellulolytic rumen microorganisms in vitro. *Florida Agricultural Experiment Stations Journal* 24:355-363. Series 1929.
- Duarte, H. C.; Graça, D. S.; Borges F. M. O.; Di Paula, O. J. 2003. Comparação de métodos "in vitro" para determinação da biodisponibilidade de fósforo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 55:80-84.
- Gargallo, S.; Calsamiglia, S.; Ferret, A. 2006. Technical note: A modified threestep in vitro procedure to determine intestinal digestion of proteins. *Journal of Animal Science* 84: 2163-2167.
- Guéguen, L. 1970. Les critères de qualité nutritionnelle des compléments minéraux en alimentation animale. *Bull Soc Scient Hyg Aliment* 58: 115-129.
- Guéguen, L. 1995. Determination of availability. *Feed mix*, ed esp:12-15.
- Guerreiro, J S. D. 2004. Comparação de métodos "in vitro" para determinação da biodisponibilidade de fósforo. Dissertação (M.Sc.). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS, Brasil.
- Lima, F. R. et al. 1999. Laboratory Evaluations of feed-grade and agricultural grade phosphates. *Poultry Science* 78:1717-1728.
- Mcgillvray, J. J. 1980. Biological availability of phosphorus sources. In: *Proceedings of 1st Annual International Minerals Conference*. International Minerals & Chemical Corporation, St. Petersburg Beach, Florida.
- Nicodemo, M. L. F; Barrocas, G. E. G. 1995. Métodos in vitro para avaliação de fontes de fósforo destinadas a bovinos. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia* 24:49-51(1).
- Rosa, I. V. 1991. Emprego de fontes de fósforo de diferentes solubilidades para bovinos. In: *Anais do 6^o Mini- Simpósio do Colégio Brasileiro de Nutrição Animal* Campinas, SP, Brasil.
- Rosa, L. C. A. et al. 1986. Solubilidade abomasal e ruminal de fontes inorgânicas de fósforo em bovinos e bubalinos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 15(4):364-371.
- Rostagno, H. S. 1990. Disponibilidade de fósforo em ingredientes de ração. p. 61-71 . In: *Anais do 3^o Colégio Brasileiro de Nutrição Animal*. Campinas, SP, Brasil.
- Rostagno, H. S. 1995. Avaliação da disponibilidade do fósforo em ingredientes de rações. p.35-45. In: *Anais do Simpósio Latino Americano de Nutrição de Suínos e Aves*. Campinas, SP, Brasil.
- Silva, D. J. 1990. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 2 ed. Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil.
- Sullivan, T. W.; Douglas, J. H.; Gonzalez, N. J.; et al. 1992. Correlation of biological value of feed phosphates with their solubility in water, dilute hydrogen chloride, dilute citric acid, and neutral ammonium citrate. *Poultry Science* 71:2065-2074.
- Vitti, D. M. S.; Abdalla, A. L.; Silva Filho, J. C. 1991. Avaliação da disponibilidade biológica do fósforo do fosfato de rocha para ovinos com uso de rádio fósforo (P32) como traçador. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 26(8):113-118.

- Witt, K. E.; Owens, F. N. 1983. Phosphorus: ruminal availability and effects on digestion. *Journal of Animal Science* 56:930-937.(4).
- Yoshida, M. et al. 1979. Solubility of phosphorus in citric acid solution as an Index of biological availability. *Japanese Poultry Science* 16(5):209-292.

4. ARTIGO 2

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE FOSFATOS BICÁLCICOS E NÍVEIS DE P USADOS PARA BOVINOS NO BRASIL: FERMENTAÇÃO RUMINAL E DIGESTIBILIDADE *IN VITRO*.

Resumo - O objetivo deste trabalho foi avaliar oito diferentes fosfatos bicálcicos utilizados no Brasil, no que diz respeito aos parâmetros de fermentação ruminal (concentração de amônia e pH), digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e encontrar a concentração de fósforo (P) na dieta para maximizar a fermentação ruminal e a digestibilidade da matéria seca. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. O trabalho foi realizado com 25 tratamentos em arranjo fatorial $8 \times 3 + 1$, dos quais oito fosfatos bicálcicos em três níveis dietéticos (1,3; 1,6 e 1,9 g kg⁻¹ de P na matéria seca) mais um tratamento sem P suplementar. Observou-se interação para a concentração ruminal de amônia (NH₃), entre fosfatos e níveis de P (fosfato 5 e nível 1,9 g kg⁻¹), fosfato e hora (diferença entre fosfatos apenas às 6 horas) e nível e tempo (diferença entre os níveis apenas às 8 horas). O fosfato 1 foi único que diferiu do controle sobre a DIVMS e entre fosfatos (1 e 8) do fosfato 4 (pior resultado). Não houve diferença entre os níveis em nenhum fosfato. Concluí-se que o nível ótimo de fósforo pode ser inferior a 1,3 g kg⁻¹ na dieta, reforçando a não necessidade de suplementação fosfórica para bovinos no Brasil, salvo poucas exceções.

Palavras-chave: Digestibilidade, fermentação ruminal, níveis de fósforo.

***IN VITRO* EVALUATION OF DICALCIUM PHOSPHATES USED
FOR BOVINE IN BRAZIL: *IN VITRO* RUMINAL
FERMENTATION.**

Abstract – The objective of this work was to evaluate eight different dicalcium phosphates used in Brazil, with respect to ruminal fermentation parameters (ammonia concentration and pH), *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) and find the phosphorus concentration (P) in diet to maximize ruminal fermentation and dry matter digestibility. The experimental design was completely randomized. A total of 25 treatments were performed in a factorial arrangement $8 \times 3 + 1$, with eight dicalcium phosphates in three P dietary levels (1.3, 1.6 and 1.9 g kg⁻¹ DM) plus one treatment without P supplementation. Interaction was observed for ruminal ammonia (NH₃) concentration among phosphates and P levels (phosphate 5 and level 1.9 g kg⁻¹), phosphate and hour (difference between phosphates only at 6 hour) and P level and time (difference between levels only at 8 hour). The phosphate 1 was the one that differed from control in DMIVD and among phosphates (1 and 8) of phosphate 4 (worst result). There was no difference among any phosphate levels. It was concluded that the optimum phosphorus level can be less than 1.3 g kg⁻¹ in the diet.

Key words: Digestibility, phosphorus levels, ruminal fermentation.

Introdução

O sistema produtivo de bovino no Brasil é principalmente à base de pasto, sendo este alimento muitas vezes deficiente em P, pela baixa concentração deste elemento no solo. Segundo Tokarnia et al. (1988) a deficiência de P é a mais importante entre os macroelementos em bovinos e é generalizada nas pastagens do Brasil. Dentre as principais exigências minerais dos bovinos o elemento P também está entre os mais estudados, visto sua importância no organismo animal, bem como para os microrganismos ruminais (NRC, 2016).

Do ponto de vista agrônômico a maioria dos solos brasileiros são limitantes em P. Mas, para a produção forrageira, isso não pode ser generalizado. Ao contrário, nossas pastagens, mesmo as dos solos de cerrado, podem atender mais que 80% das exigências de P dos bovinos de corte. Portanto, diferentemente do propagandeado, não são todos os solos brasileiros que podem produzir forragens realmente capazes de gerar deficiência de P (Malafaia et al. 2014).

Contudo existem situações em que o P precisa ser suplementado, sendo o fosfato bicálcico a principal fonte utilizada no Brasil. Entretanto, cada empresa tem sua jazida e suas matérias-primas, que necessitam de diferentes processamentos para obtenção do produto final, além da própria diferenciação entre as composições, afetando diretamente a composição e a disponibilidade dos elementos para os animais.

Desta forma objetivou-se com este trabalho avaliar oito fosfatos bicálcicos utilizados no Brasil, com relação aos parâmetros de fermentação ruminal *in vitro* (concentração de amônia e pH), digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e a concentração ótima de fósforo na dieta para maximizar a fermentação ruminal e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca.

Materiais e Métodos

O experimento foi realizado na cidade de Maringá, Estado do Paraná, Brasil, nas seguintes coordenadas geográficas (23°21'13''S – 52°04' 27''O; 550 m de altitude). Foram avaliadas oito fontes de fosfato bicálcico, sendo denominadas: Fosfato 1, Fosfato 2, Fosfato 3, Fosfato 4, Fosfato 5, Fosfato 6, Fosfato 7 e Fosfato 8.

Fermentação ruminal e intestinal

Para a avaliação do efeito de diferentes concentrações de P na dieta sobre a fermentação ruminal, as mesmas foram formuladas com celulose microcristalina (275 g kg⁻¹), amido solúvel (700 g kg⁻¹) e ureia (25 g kg⁻¹ de MS). Foram formuladas dietas com 4 níveis de fósforo suplementar: 0 (controle); 1,3; 1,6 e 1,9 g kg⁻¹ MS).

Foram pesados 500 mg de cada dieta em duplicata, dentro de 52 seringas de 60 mL. As quantidades de P para atingir as concentrações definidas foram obtidas pela diluição dos fosfatos em água e em agitação até ficar homogênea de cada fonte de P, retirando o volume de 1 mL compatível com a concentração de fósforo em cada fonte adicionada à dieta, juntamente com 40 mL de solução tampão contendo os seguintes reagentes: solução A composta por (g/L): 10,0 g KH₂P₀₄; 0,5 g MgSO₄7H₂O; 0,5 g NaCl; 0,1 g CaCl₂2H₂O; 0,5 g ureia, e a solução B (g/100 mL): 15,0 g Na₂CO₃; 1,0 g Na₂S.9H₂O. As soluções foram misturadas na razão 1:5 atingindo o pH de 6,8 na temperatura constante de 39°C e por final 10 mL de inóculo ruminal, proveniente de vaca fistulada. A vaca utilizada para coleta do inóculo ruminal foi mantida em pastagem de capim-Tifton 85 (*Cynodon dactylon*) e suplementada com 15 kg de silagem de milho

(matéria natural) e 2 kg de concentrado à base de milho, farelo de soja, farelo de trigo e mistura vitamínica mineral

Os tempos de incubação foram de 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 e 48 h. As seringas foram mantidas em estufas à temperatura de 39°C com agitação manual periódica cada hora até as 12 h.

As coletas foram realizadas da seguinte forma: 2 mL em tubo eppendorf contendo 0,2 mL de ácido tricloroacético mantidas em refrigeração até o momento da análise posterior de amônia (NH₃), como também 4 mL para a leitura do pH em pHmetro digital.

Os parâmetros da fermentação ruminal avaliados foram o pH e a concentração de NH₃. Para análise de amônia (NH₃), o fluido ruminal foi centrifugado a 1000 × g por 10 minutos. A concentração de amônia foi determinada no sobrenadante pela técnica de Ferner (1965) modificada por Vieira (1980). Brevemente, uma alíquota de 5 a 25 µL do líquido ruminal tamponado foi transferido para um tubo de 5 mL. Em cada tubo foi adicionado 1,5 mL do reagente fenol e 1,5 mL do reagente hipoclorito de sódio. Os tubos foram fechados e agitados em vortex e colocados em banho-maria durante 15 minutos. Após os 15 minutos, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 630 nm e para a determinação da concentração de amônia foi preparada utilizando uma solução padrão com cloreto de amônio (NH₄Cl) de 0, 5, 10, 15, 20 e 25 µL para obter as concentrações 0, 4, 8, 12, 16 e 24 mg dL⁻¹.

Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS)

A (DIVMS) das dietas foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Tilley e Terry (1963) modificada por Holden et al. (1999), utilizando o rúmen artificial

(Daisy Fermenter®, Ankom). Para isto, 0,5 g de amostra foi alocada em saquinhos F57 da Ankon®, previamente lavados com acetona para retirar o *surfactante* (que pode inibir a digestão microbiana) e secos na estufa de 55°C durante 2 h e em estufa de 105°C por 12 h. Os saquinhos vazios foram pesados e identificados conforme Casali et al. (2008), sendo utilizados dois saquinhos sem amostra (brancos) em cada jarro para correção dos dados. Os saquinhos com amostra e com os três níveis de P (1,3; 1,6 e 1,9 g kg⁻¹ MS) foram selados e colocados nos jarros, distribuídos equitativamente (24 com amostra e 2 brancos), totalizando 104 saquinhos (em quadruplicata). Em seguida, foi adicionado 1600 mL da solução tampão (descrita acima) e 400 mL de inócuo ruminal e acrescentado CO₂ para manter as condições anaeróbias. Após este procedimento, os jarros permaneceram a 39°C durante 48 horas com agitação contínua (Daisy Fermenter®, Ankom).

A incubação foi interrompida após 48 h, iniciando o segundo estágio do método da digestibilidade *in vitro*, quando foram adicionados 40 mL de ácido clorídrico 6 N e 8 g de pepsina (Sigma 1:10000) em cada jarro. A pepsina foi previamente dissolvida em 34 mL de água destilada a 39°C durante 5 minutos, mantendo o pH da solução entre 2,0 a 3,5 (Holden, 1999). A incubação foi mantida por mais 24 h a 39°C sob agitação contínua. Após 24 h de incubação os jarros foram drenados e lavados com água da torneira entre 5 a 6 vezes até a água sair limpa. Em seguida os saquinhos foram secos em estufas de circulação forçada a 55°C por 12 h e, posteriormente, levados a estufa de 105°C durante 24 horas, e em seguida foram pesados.

A DIVMS (g kg⁻¹) foi calculada utilizando o resíduo após a incubação, através da fórmula:

$$\text{DIVMS} = 100 - \left(\frac{W3 - (W1 \times W4)}{W2} \right) \times 100$$

Em que, W1 é o peso da tara do filtro; W2 é o peso da amostra; W3 é o peso final do final do filtro e W4 é a correção com filtro em branco.

Análise estatística

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System, versão 9.1). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso em um arranjo fatorial $8 \times 3 + 1$, sendo oito fosfatos bicálcicos em três níveis de P na dieta (1,3; 1,6 e 1,9 g kg⁻¹ de MS) e 1 tratamento controle (sem suplementar). Os dados foram desdobrados em polinômios ortogonais de forma a permitir a análise de variância e regressão. Os dados foram comparados com o controle utilizando-se o teste de Dunnett e adotou-se $\alpha = 0,05$ de probabilidade. As interações quando significativas foram desdobradas e analisadas mediante o teste de Tukey.

Resultados

Fermentação ruminal (amônia e pH)

Na Tabela 6 são mostrados os resultados para a concentração ruminal de amônia, decorrentes do uso de diferentes fosfatos, diferentes níveis de P na dieta e em diferentes tempos de fermentação. Numa primeira análise foi comparada a média obtida com os diferentes fosfatos e o controle (sem P suplementar). Observa-se que não houve diferença entre a média dos fosfatos e o controle (teste de Dunnett). Os fosfatos de número 4, 8 e 1 produziram concentrações de amônia ruminal superiores ao fosfato 5 ($P < 0,05$). As outras comparações não mostraram diferenças significativas. Também

ocorreram diferenças entre níveis, com o nível de 1.3 g kg⁻¹ de P na dieta produzindo a maior concentração. Também foi observado interação entre fosfato × nível, fosfato × hora e nível × hora.

Tabela 6 - Valores médios de concentração de amônia (mg dL⁻¹) e pH *in vitro* usando como substrato dietas com níveis de P e diferentes fontes de fosfatos bicálcicos.

Item	Amônia	pH
Fosfatos		
Controle (sem fosfato)	11,7	6,30
1	12,6 ^a	6,31 ^{ab}
2	12,5 ^{ab}	6,32 ^a
3	12,2 ^{ab}	6,25 ^{abc}
4	12,8 ^a	6,22 ^c
5	11,6 ^b	6,23 ^{bc}
6	12,4 ^{ab}	6,20 ^{c*}
7	12,6 ^{ab}	6,22 ^c
8	12,7 ^a	6,17 ^{c*}
Níveis (g kg ⁻¹)		
Controle (0)	11,7	6,30
1.3	12,7 ^a	6,24
1.6	12,4 ^{ab}	6,25
1.9	12,1 ^b	6,23
Horas de coleta		
1	5,43 ^f	6,79 ^b
2	9,45 ^e	6,81 ^{ab}
4	20,6 ^b	6,88 ^a
6	26,6 ^a	6,77 ^b
8	14,9 ^c	6,55 ^c
12	11,3 ^d	5,99 ^d
24	5,16 ^f	5,11 ^e
48	5,86 ^f	5,01 ^f
EPM ¹	0,278	0,037
Anova	-----P- valor-----	
Fosfato	0,011	0,001
Nível	0,001	0,621
Hora	0,020	0,001
Fosfato × Nível	0,001	0,955
Fosfato × Hora	0,001	0,108
Nível × Hora	0,026	0,098

^{a,b,c,d,f} Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Difere do Controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. ¹EPM: erro-padrão da média

No desdobramento da interação fosfato \times nível na Tabela 7, observa-se que as diferenças entre os fosfatos ocorreram apenas quando foi utilizado o nível de 1.9 g kg⁻¹ de P na dieta, sendo os fosfatos 1, 3, 4, 6 e 7 diferentes do fosfato 5 neste nível. Já entre os fosfatos, somente o fosfato 5 diferiu entre os níveis, sendo diferentes entre o nível 1.3 e 1.9 g kg⁻¹.

Tabela 7 - Desdobramento da interação Fosfato \times Nível para os valores de amônia (mg dL⁻¹) *in vitro* usando como substrato dietas com níveis de P e de diferentes fontes de fosfatos bicálcicos.

Fosfato	Nível (g kg ⁻¹)			
	0	1.3	1.6	1.9
Controle	11,7	-	-	-
1	-	12,6	12,5	12,8 ^a
2	-	12,5	13,1	11,9 ^{ab}
3	-	12,6	11,2	12,8 ^a
4	-	13,5	12,4	12,3 ^a
5	-	12,7 ^A	12,0 ^{AB}	10,2 ^{bB}
6	-	12,1	12,8	12,2 ^a
7	-	12,1	12,5	13,0 ^a
8	-	12,3	12,9	11,9 ^{ab}
EPM ¹		0,492	0,476	0,479

^{a,b} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ^{A,B} Médias seguidas de letras maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ¹EPM: erro padrão da média.

No desdobramento fosfato \times hora (Tabela 8), observa-se que só houve diferenças entre os fosfatos na hora 6, sendo os fosfatos 1 e 6 diferentes dos fosfatos 4, 5 e 7. No desdobramento hora \times nível, observa-se que só houve diferenças na hora 8, sendo diferentes entre os níveis 1.6 e 1.9 g kg⁻¹.

Tabela 8 - Desdobramento da interação Fosfato \times Hora e Nível \times Hora para os valores de amônia (mg dL⁻¹) usando como substrato dietas com níveis de P e de diferentes fontes de fosfatos bicálcicos.

Item	Horas de coleta							
	1	2	4	6	8	12	24	48
Fosfato								
1	5,14	8,69	21,2	29,5 ^a	14,3	10,9	4,60	6,87
2	5,03	9,68	18,4	27,3 ^{ab}	16,8	13,1	4,94	4,80
3	4,99	8,85	18,8	26,8 ^{ab}	14,8	12,5	4,60	6,11
4	5,44	9,92	21,2	25,7 ^b	16,1	11,8	5,77	6,62
5	5,78	9,33	19,7	25,1 ^b	13,1	10,2	5,56	4,17
6	5,18	9,85	21,7	26,2 ^a	13,6	10,7	5,67	5,96
7	6,41	9,23	21,3	25,3 ^b	14,5	10,6	5,87	7,36
8	5,50	10,1	22,6	27,0 ^{ab}	15,8	10,8	4,29	5,38
Nível								
1.3	5,33	9,38	21,2	26,9	15,0 ^{ab}	12,2	5,14	6,19
1.6	5,55	9,71	20,0	26,4	15,9 ^a	11,2	5,16	5,49
1.9	5,42	9,26	20,5	26,6	13,7 ^b	10,5	5,19	5,90
EPM ¹	0,127	0,153	0,343	0,279	0,336	0,258	0,165	0,241

^{a,b} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ¹EPM: erro padrão da média.

Na Tabela 1 também são mostrados os valores de pH ao longo da fermentação ruminal. Apenas os fosfatos 6 e 8 diferiram da dieta controle, sem fósforo. A única diferença encontrada foi entre o fosfato 2 (6,32) e os fosfatos 4, 5, 6, 7 e 8. Nas Figuras 1 e 2, são mostradas as curvas da concentração de amônia no rúmen e do pH para os três níveis de P na dieta com os oito fosfatos utilizados. Apesar de ter ocorrido diferenças entre os fosfatos, verifica-se um padrão muito semelhante de comportamento entre as curvas.

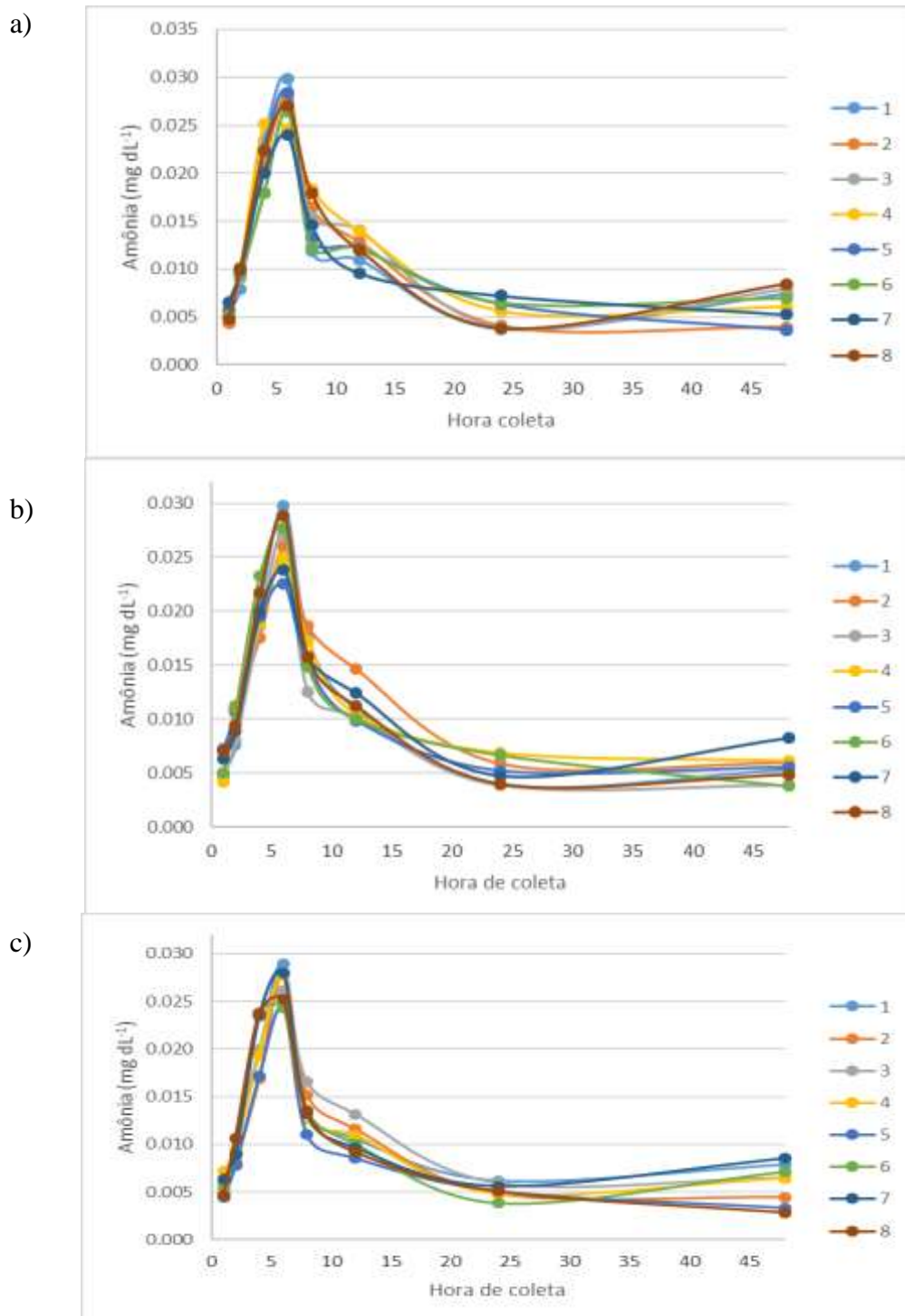
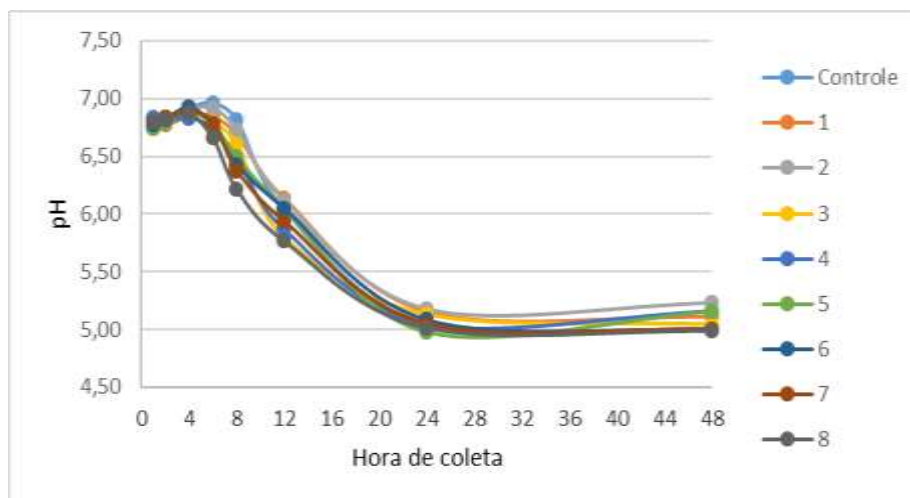
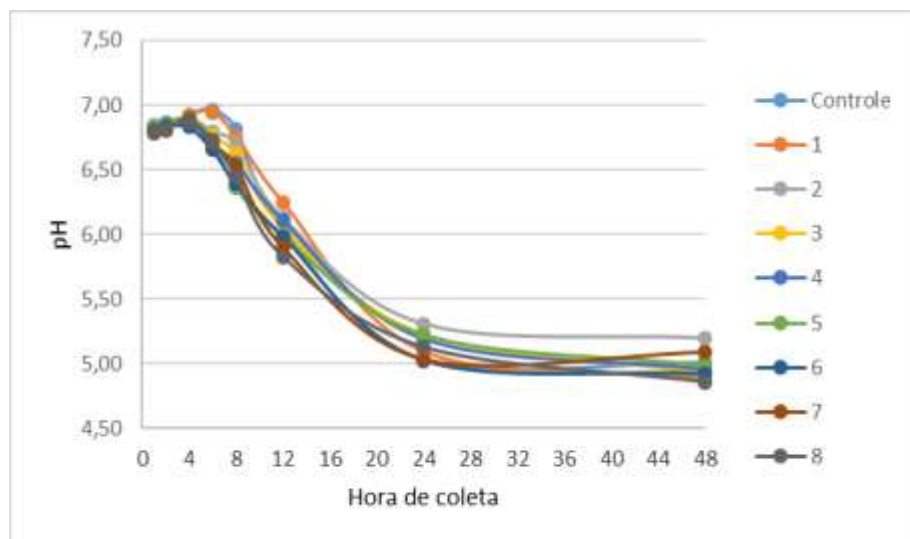


Figura 1- Variação na concentração amônia (NH_3) no líquido ruminal durante 48 h de incubação *in vitro*. a) Adição de 1.3 g kg^{-1} de P na dieta de diferentes fosfatos b) Adição de 1.6 g kg^{-1} de P na dieta de diferentes fosfatos c) Adição de 1.9 g kg^{-1} de P na dieta de diferentes fosfatos.

a)



b)



c)

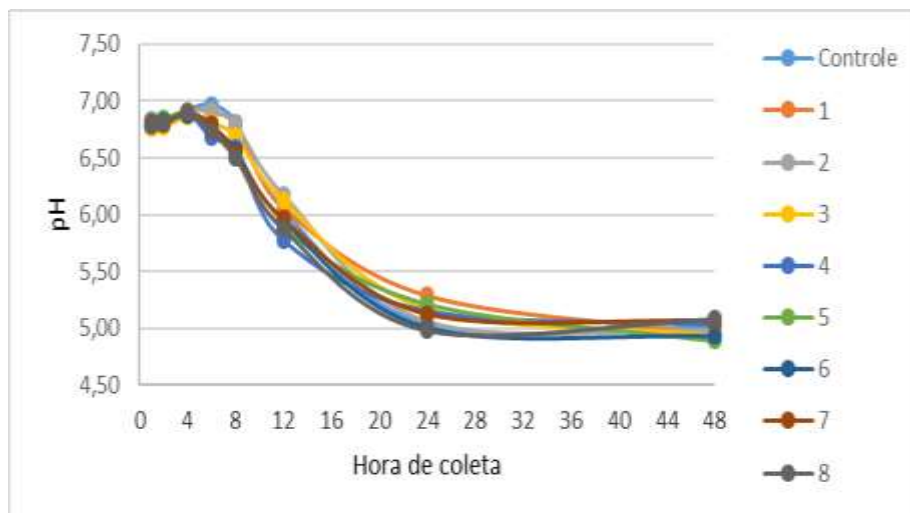


Figura 2- Variação do pH no líquido ruminal durante 48 h de incubação *in vitro*. a) Adição de 1.3 g kg⁻¹ de P na dieta de diferentes fosfatos b) Adição de 1.6 g kg⁻¹ de P na dieta de diferentes fosfatos c) Adição de 1.9 g kg⁻¹ de P na dieta de diferentes fosfatos.

Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS)

Dentre todos os fosfatos o número 1 foi o que apresentou melhor resultado, sendo o único que diferiu do controle. A única diferença que houve foi entre os fosfatos 1 e 8 (melhores resultados) e o fosfato 4 (pior resultado), sendo o restante das comparações sem diferença significativa (Tabela 9).

Tabela 9 - Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de dietas com níveis de diferentes fontes de fosfato (g kg^{-1}).

Fosfatos	Níveis dos fosfatos (g kg^{-1})				Media (g kg^{-1})	EPM ¹
	0	1.3	1.6	1.9		
Controle	712	-	-	-	712	0,810
1	-	757	734	764	751 ^{a*}	0,947
2	-	703	734	744	727 ^{ab}	0,784
3	-	755	738	727	740 ^{ab}	0,616
4	-	712	707	714	711 ^b	0,807
5	-	744	715	744	734 ^{ab}	0,738
6	-	736	735	740	737 ^{ab}	0,766
7	-	737	738	718	731 ^{ab}	0,493
8	-	733	730	768	744 ^a	0,808
Media	712	737	729	740		
EPM ¹	0,460	0,531	0,405	0,516		
Fosfato				0,008		
Nível				0,432		
Fosfato×Nível				0,107		

^{a,b}Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ¹EPM: erro padrão da média. *Difere do Controle pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Discussão

Fermentação ruminal (amônia e pH)

A concentração ruminal de amônia e o pH são dois parâmetros importantes para avaliar o padrão de fermentação ruminal. A liberação de amônia é fundamental para promover o crescimento microbiano, otimizar a digestão de carboidratos e maximizar a

produção de proteína microbiana (Zeoula et al. 2002), como também o pH interfere diretamente nas condições ótimas de atuação dos microrganismos, sendo variável conforme a fermentação dos substratos no rúmen (Grant & Mertenz, 1992). Ao avaliar esses parâmetros com diferentes fontes de fósforo é possível detectar se essas fontes interferem no processo de fermentação.

Os valores de amônia encontrados variaram de 4,60 (fosfato 1 na hora 24) a 29,50 mg dL⁻¹ (fosfato 1 na hora 6), onde segundo Leng (1990) o valor ideal para maximização do consumo voluntário em condições tropicais seria de 20 mg dL⁻¹. Portanto considerando as interações, pode-se observar que apenas na hora 6 e 4 dentro de todos níveis, foram alcançados estes valores, exceto os fosfatos 2 e 3 na hora 4, porém com valores muito próximos.

Díaz (2013) encontrou os maiores valores de amônia trabalhando com níveis de óleos funcionais e concentrados entre 4 e 6 horas, encontrando valor de 21,74 mg dL⁻¹, encontrando também efeito quadrático para tempo de incubação e produção amônia.

Também foi encontrada valor máximo de 29,41 mg dL⁻¹ em bezerros que receberam dietas ricas em concentrado, 4 h após a alimentação (Ribeiro et al., 2009), sendo este e todos trabalhos acima citados, corroborando com os resultados do presente estudo, principalmente relacionando hora após a alimentação.

Já para Satter e Slyter (1974) em experimento *in vitro*, os valores encontrados estariam dentro de valores suficientes para suportar máxima taxa de crescimento de bactérias do rúmen, que seria de 5 mg dL⁻¹, sendo o valor limite de 2 mg dL⁻¹. Os autores também sugerem que quando a amônia começa a acumular no rúmen e excede 5 mg dL⁻¹ no fluído ruminal, nada é ganho através da suplementação com nitrogênio não proteico.

Komisarczuk et al. (1987), com técnica de meio de cultura contínua *in vitro* por período de 5 dias observaram que a medida que se diminuiu o nível de P, a concentração de amônia aumentou, variando de 13,1 mg dL⁻¹ com concentração de P no meio de cultura de 51 a 24 mg dL⁻¹ quando a concentração de P foi menor que 1 mg dL⁻¹. No presente estudo as concentrações foram: 10.83, 13.33 e 15.83 mg P dL⁻¹, para os tratamentos 1.3, 1.6 e 1.9 g kg⁻¹ de P respectivamente, e pode ser comparado no presente estudo nos respectivos níveis, em que houve diferença significativa entre o nível 1.3 e 1.9 g kg⁻¹, aumentando a concentração conforme a diminuição dos níveis. O autor sugere que a atividade ureolítica e proteolítica não é afetada pela depleção de P, atividades essas que liberam amônia no meio.

Pode-se considerar que todos os valores de pH encontrados são compatíveis com boas condições de ambiente ruminal para adequado crescimento microbiano, que é de 6,2 segundo Ørskov (1986), exceto nas quatro últimas coletas, em que é reconhecido que o pH diminui conforme a intensificação da fermentação ruminal, conseqüente do acúmulo de ácidos graxos voláteis no decorrer do tempo após alimentação (início da incubação com a dieta). Apenas os fosfatos 6 e 8 diferiram da dieta controle. A única diferença encontrada foi entre o fosfato 2 (6,32) e os fosfatos 4, 5, 6, 7 e 8.

Os resultados do presente estudo são corroborados pelos resultados encontrados por Dehority (1993) trabalhando com diversos alimentos, em que foi determinada a faixa de pH entre 5 e 7. Também os valores deste estudo estiveram acima do limite mínimo adequado para fermentação da fibra recomendado por Ørskov (1986), que é de 6,2, em que somente o fosfato 8 esteve abaixo, mas ainda assim bem próximo do recomendado pelo autor, como também nos quatro últimos horários de coleta.

Barreto (2006), em estudo *in vivo*, encontrou valor mínimo de pH de 6,43 trabalhando com fosfato bicálcico com 2,0 g kg⁻¹ de MS de P na dieta e Coneglian

(2006) trabalhando com o mesmo fosfato na dose $2,7 \text{ g kg}^{-1}$ de MS encontrou pH mínimo de 6,44, valores estes bem próximos aos encontrados no presente estudo.

Witt e Owens (1983) trabalhando com novilhos canulados de 700 kg com níveis dietéticos de P de 1,2 e $2,2 \text{ g kg}^{-1}$ de MS, não observaram diferença nos valores de pH ruminal (6,5). Komisarczuk et al. (1987) trabalhando em meio de cultura contínua *in vitro* com concentrações de P que variaram de 48 a $< 1 \text{ mg L}^{-1}$, encontraram resultado de pH de 6,5 e só variou significativamente após a concentração chegar ao menor nível, em que o pH passou de 7,0. No presente estudo as concentrações de P foram de 10,83, 13,33 e $15,83 \text{ mg L}^{-1}$ nos níveis 1,3, 1,6 e $1,9 \text{ g kg}^{-1}$, respectivamente.

No presente estudo, independentemente dos fosfatos e níveis de P utilizados, os resultados de pH e amônia encontrados estão dentro dos valores adequados encontrados na literatura, em que só houve declínio prejudicial após 12 horas de alimentação, e que na prática não ocorre, visto que os animais estão em constante alimentação, (principalmente em sistemas pastoris de produção), e a composição do bolo alimentar é modificada a todo momento e também existe a atividade de ruminação (salivação), o que dilui e modifica totalmente a questão do pH, salvas algumas exceções em que o sistema de produção é o confinamento, e realiza-se o trato 1 vez ao dia, mesmo assim ainda existe o efeito ruminação, composição e processamento da dieta, entre outros.

Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS)

No presente estudo em que se utilizou níveis de 1,3, 1,6 e $1,9 \text{ g de P kg}^{-1}$ observa-se que os valores de 735, 729 e 740 g kg^{-1} ficaram próximos aos valores encontrados por Coneglian (2006), que obteve coeficiente de digestibilidade aparente total de 692 g kg^{-1} trabalhando com fosfato bicálcico numa concentração de P de $2,7 \text{ g kg}^{-1}$ de MS em dieta com bovinos fistulados, bem como de Barreto (2006) que obteve

digestibilidade de 692 g kg^{-1} trabalhando também com bovinos fistulados e uma concentração de P de 2.0 g kg^{-1} de MS usando fosfato bicálcico.

Witt e Owens (1983) trabalhando com novilhos canulados de 700 kg com níveis dietéticos de P de 1.2 e 2.2 g kg^{-1} na matéria seca, tendo como fonte de P o fosfato de sódio, também não encontraram diferenças em digestibilidade *in situ* para: matéria seca, matéria orgânica e digestibilidade da fibra (FDA e FDN), usando milho moído, rejeito de algodão e casca de semente de algodão, afirmando que a concentração de 1.2 g kg^{-1} de MS pareceu adequada para digestão tanto no rúmen quanto no intestino.

Na avaliação dos fosfatos, dentre as médias de todos os níveis, somente o fosfato 1 foi superior e diferiu do controle sendo o valor de 751 e o controle foi de 712, já para os demais não houve diferença alguma, mostrando que não há relevância da fonte utilizada.

Conclusões

Dentre os fosfatos e os níveis testados, apesar de algumas poucas diferenças entre os mesmos e suas interações, todos os valores estão dentro de valores ótimos encontrados na literatura, sugerindo que o nível P ótimo possa ser menor que 1.3 g kg^{-1} de matéria seca, ficando claro observar que na maioria das condições brasileiras, não se faz necessário o uso da suplementação fosfórica, visto que os alimentos utilizados no Brasil contêm concentrações de P bem acima das utilizadas em grande número de trabalhos, trabalhos estes com desempenhos totalmente satisfatórios.

REFERÊNCIAS

- Barreto, J. C. 2006. Avaliação de diferentes fontes de fósforo na nutrição de ruminantes. Dissertação (M.Sc.) Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.
- Casali, A. O., Detmann, E., Valadares Filho, S. D. C., Pereira, J. C., Henriques, L. T., FREITAS, S. D., e Paulino, M. F. Casali, A.O.; Detmann, E.; Valadares Filho, S.C. et al. 2008. Influência do tempo de 1171 incubações e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e 1172 fezes bovinas obtidos por procedimentos in situ. *Revista Brasileira de Zootecnia* 37:335-1173.
- Dehority, B. A. 1993. Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa. CRC Press Inc., Florida.
- Grant, R.J.; Mertens, D.R. 1992. Influence of buffer pH and raw corn starch addition on in vitro fiber digestion kinetics. *Journal of Dairy Science* 75:2762-2768.
- Holden, L. A. 1999. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *Journal Animal Science* 82:1791-1794.
- Ørskov, E. R. 1986. Starch digestion and utilization in ruminants. *Journal of Animal Science* 63(5):1624-1633.
- Ribeiro, M. D.; Pereira, J. C.; Bettero, V. P. et al. 2009. Níveis de concentrado na dieta de bezerros. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38:1133-1141.
- Rosati, A. F. R. 2009. Efeito do fosfato bicálcico ou monoamônico sobre a digestibilidade ruminal do feno de coast-cross. Dissertação (M.Sc.). Universidade de São Paulo. Pirassununga, São Paulo, Brasil.
- Satter, L. D.; Slyter, L. L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *British Journal of Nutrition* 32:199-208.
- Tilley, J. M. A.; Terry, R. A. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society* 18(2):104-111.
- Tokarnia, C. H.; Dobereiner, J.; Moraes, S. 1988. Situação atual e perspectivas da investigação sobre nutrição mineral em bovinos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 8(1):1-16.
- Vieira, P. F. 1980. Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídeos em rações para ruminantes. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa. MG, Brasil.
- Witt, K. E.; Owens, F. N. 1983. Phosphorus: ruminal availability and effects on digestion. *Journal of Animal Science* 56:930-937.(4).
- Zeoula, L. M.; Neto, S. F. C.; Branco, A. F.; Prado, I. N.; Dalponte, A. O.; Kassies, M.; Fregadolli, F. L. 2002. Mandioca e resíduos das farinhas na alimentação de ruminantes: pH, concentração de N-NH₃ e eficiência microbiana. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31:1582-1593.