



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**INCUBAÇÃO *IN SITU* EM BOVINOS E OVINOS NA AVALIAÇÃO DE
COMPOSTOS INDIGESTÍVEIS EM ALIMENTOS E FEZES.**

MARIA JOSÉ DA SILVA REIS

**SALVADOR-BAHIA
MAIO-2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**INCUBAÇÃO *IN SITU* EM BOVINOS E OVINOS NA AVALIAÇÃO DE
COMPOSTOS INDIGESTÍVEIS EM ALIMENTOS E FEZES.**

MARIA JOSÉ DA SILVA REIS

Zootecnista

SALVADOR - BAHIA

MAIO - 2016

MARIA JOSÉ DA SILVA REIS

**INCUBAÇÃO IN SITU EM BOVINOS E OVINOS NA AVALIAÇÃO
DE COMPOSTOS INDIGESTÍVEIS EM ALIMENTOS E FEZES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Zootecnia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Nutrição de Ruminantes.

Orientadora: Prof. Dra. Stefanie Alvarenga Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Gleidson Giordano Pinto de Carvalho

SALVADOR- BAHIA

MAIO-2016

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

REIS, MARIA JOSÉ DA SILVA
Incubação in situ em bovinos e ovinos na avaliação de
compostos indigestíveis em alimentos e fezes. / MARIA
JOSÉ DA SILVA REIS. -- Salvador - BA, 2016.
61 f.

Orientadora: STEFANIE ALVARENGA SANTOS.
Coorientador: GLEIDSON GIORDANO P. DE CARVALHO.
Dissertação (Mestrado - Zootecnia) -- Universidade
Federal da Bahia, UFBA, 2016.

1. Degradabilidade Ruminal. 2. Frações indigestíveis.
3. Alimentos. 4. Nutrição de Ruminantes. I. SANTOS,
STEFANIE ALVARENGA. II. CARVALHO, GLEIDSON GIORDANO P.
DE. III. Título.

MARIA JOSÉ DA SILVA REIS

**INCUBAÇÃO IN SITU EM BOVINOS E OVINOS NA AVALIAÇÃO
DE COMPOSTOS INDIGESTÍVEIS EM ALIMENTOS E FEZES.**

Dissertação defendida e aprovada pela comissão examinadora para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Salvador, 25 de maio de 2016.

Comissão Examinadora:

Dra. Stefanie Alvarenga Santos
Universidade Federal de Viçosa - MG
Presidente

Dr. Cláudio Vaz Di Mambro Ribeiro
Universidade Federal da Bahia-UFBA

Dra. Luana Marta de Almeida Rufino
Universidade Federal de Viçosa - MG

É PRECISO NÃO ESQUECER NADA

Cecília Meireles (2014)

É preciso não esquecer nada:
Nem a torneira aberta nem o fogo aceso,
Nem o sorriso para os infelizes
Nem a oração de cada instante.
É preciso não esquecer de ver a nova borboleta
Nem o céu de sempre.
O que é preciso é esquecer o nosso rosto,
O nosso nome, o som da nossa voz,
O ritmo do nosso pulso.

O que é preciso esquecer é o dia carregado de atos,
A ideia de recompensa e de glória.
O que é preciso é ser como se já não fôssemos,
Vigiados pelos próprios olhos
Severos conosco, pois o resto não nos pertence.

Particularmente, acrescento: é preciso não se esquecer de agradecer aos que se fizeram presentes, cada um a seu modo, por vezes, me acolhendo, me apoiando, me incentivando, me reanimando, indicando caminhos, estabelecendo diálogos, me orientando na trajetória desta caminhada.

DEDICATÓRIA

À Deus, por me conceder sabedoria, paciência e discernimento, para concluir mais uma etapa dessa caminhada, sempre atribuindo força e fé nos momentos de desânimo, me presenteando com pessoas que foram meu suporte e abrigo durante todo esse tempo.

Aos meus pais, José Raimundo Reis e Terezinha Maria da Silva Reis, que são a razão da minha existência, o motivo pelo qual sigo em frente, que nunca mediram esforços para priorizar acima de tudo a Educação em nosso lar. Às minhas irmãs que são minhas duas metades, que nunca me deixaram desanimar e são exemplos verdadeiros do quanto a Educação pode transformar o ser humano.

Em especial a minha irmã Aline (*in memoriam*), que mesmo não estando mais presente em nosso dia a dia, sempre será um exemplo de coragem, superação e amor incondicional, foi por você e pra você Line.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo mistério de sentir o universo conspirando a meu favor, provendo-me saúde, proteção, ânimo, serenidade e perseverança durante a realização desta etapa de meu processo de formação.

A meu pai, José Raimundo e a minha mãe, Terezinha, por acreditarem no poder transformador da Educação e – com seus exemplos de amor, de coragem e de superação – ensinar que devemos nos dedicar com afinco a nossas tarefas e seguir otimistas e perseverantes, acreditando sempre em nossa capacidade de realizar sonhos e de colaborar na construção de um mundo melhor.

A minhas irmãs Alessandra e Aline (*in memoriam*) por sempre demonstrarem confiança em minha capacidade de concretizar essa tarefa. Obrigada pela alegria e leveza, pelas brincadeiras e conversas descontraídas nos momentos de tensão; elas me energizavam para seguir em frente.

À Marcos que é um presente especial enviado por Deus, obrigada pelas palavras de incentivo, pelos gestos de amor, por acreditar em meu potencial e me fazer lembrar dele a todo instante. Mais que um namorado, tem sido um amigo, que, durante essa fase da minha vida, me conduziu ao equilíbrio entre as teorias e *o mundo da vida*.

À Professora Stefanie por conduzir o processo de orientação de maneira competente e humana. Foi providencial encontrar em você um modo paciente e respeitoso a meu jeito todo particular de ser. Agradeço por sua paciência e dedicação, pelas orientações teóricas e metodológicas, pelo incentivo e pelos estímulos constantes.

Ao Professor Gleidson, primeiro contato de incentivo em um lugar novo e desconhecido, obrigada pelas palavras, apoio e ensinamentos, tem todo o meu respeito e admiração pelo profissional competente e pessoa exemplar que é.

À Gizelle (Pi) pelo presente da sua amizade e sua dedicação de irmã, a Gabi (Gabriella Almeida) por ser um doce nos dias difíceis de convivência diária. Obrigada pela acolhida, por toda a atenção, pela proteção e cuidado a mim dispensados. Sou muito grata pela oportunidade de conhecer pessoas tão especiais.

À Gabrieli Romano (Gabizita) pela amizade construída com tanto carinho e respeito, por todo apoio incondicional nos momentos de carência e desespero longe de casa. À Cali e Maycon, amigos de longas datas que não me deixaram desanimar,

obrigada pelas palavras nos momentos de insegurança.

Aos demais amigos e familiares, que de forma especial fazem partes dos meus momentos, e que sempre estiveram torcendo e acreditando que meus esforços seriam recompensados.

Aos mais que colegas, amigos que tive o imenso prazer de conviver e ter momentos inesquecíveis de alegria, descontração e muito trabalho. Antônio, Dalysson, Ana Caroline, Gildênia, Cintía, Paula, Lucas, Henry, Maria Leonor, Tamires, Priscila, Fleming, Perazzo, Thomaz, Tarcisó, Felipe, Ingird, Juliana e todos os estagiários do LANA que de alguma forma contribuíram para concretização dessa pesquisa, aos funcionários da Fazenda Experimental da UFBA, muito obrigada.

À Universidade Federal da Bahia – especialmente a Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – pela liberação de minhas atividades profissionais para que fosse possível dedicação exclusiva aos estudos do mestrado. Aos colegas de profissão da UFBA pelas vibrações positivas e pelo incentivo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, em especial aos professores das disciplinas cursadas José Esler, Vanessa, Cláudio, Ronaldo, Luiz Fernando e Aureliano, obrigada pela amizade, paciência, e todo ensinamento.

Ah! *É preciso não esquecer nada.* E como haveria de esquecer? Que alegria conviver esse tempo com vocês! Cada um a sua maneira deixou marcas em mim: um riso descontraído, um jeito tímido, outro todo elegante, uma expressão, uma palavra, uma história contada, uma atitude, uma emoção, um olhar, um abraço.

Enfim, agradeço pela presença de cada um de vocês durante estajornada.

A todos, muito obrigada!

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Composição química das amostras avaliadas	35
Tabela 2 Estimativas para a fração potencialmente degradável (B) da matéria seca (MS), taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal (kd) obtida a partir de bovinos e ovinos, fração indigestível da MS (MSi), limite superior do intervalo de confiança assintótico com 95% de probabilidade para a fração indigestível (LS) e tempo crítico (tc) para o alcance da fração MSi nas diferentes espécies	40
Tabela 3 Estimativas para a fração potencialmente degradável (B) da fibra em detergente neutro (FDN), taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal (kd) obtida a partir de bovinos e ovinos, fração indigestível da FDN (FDNi), limite superior do intervalo de confiança assintótico com 95% de probabilidade para a fração indigestível (LS) e tempo crítico (tc) para o alcance da fração FDNi nas diferentes espécies	42
Tabela 4 Estimativas para a fração potencialmente degradável (B) da fibra em detergente ácido (FDA), taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal (kd) obtida a partir de bovinos e ovinos, fração indigestível da FDA (FDAi), limite superior do intervalo de confiança assintótico com 95% de probabilidade para a fração indigestível (LS) e tempo crítico (tc) para o alcance da fração FDAi nas diferentes espécies	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Descrição dos grupos de alimentos incubados em uma mesma unidade experimental em função dos tempos de avaliação.....	33
Figura 2 Representação esquemática do procedimento de incubação de 12 alimentos e 4 fezes divididos em 4 grupos	34
Figura 3 Representação gráfica de perfil ajustado para descrever o resíduo não-degradado em função do tempo (As linhas tracejadas indicam os limites do intervalo de confiança assintótico para a fração indigestível).	38
Figura 4 Representação gráfica dos tempos críticos (horas) entre bovinos e ovinos para indigestibilidade da MS dos alimentos e fezes	45
Figura 5 Representação gráfica dos tempos críticos (horas) entre bovinos e ovinos para indigestibilidade da FDN dos alimentos e fezes	46
Figura 6 Representação gráfica dos tempos críticos (horas) entre bovinos e ovinos para indigestibilidade da FDA dos alimentos e fezes	46

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	12
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Diferenças entre a degradabilidade de alimentos em bovinos e ovinos	18
2.2 Indicadores internos para determinação da excreção fecal em ruminantes	18
2.2.1 Matéria Seca indigestível	19
2.2.2 Fibra em detergente neutro indigestível	20
2.2.3 Fibra em detergente ácido indigestível.....	22
2.3 Métodos para determinação das frações indigestíveis utilizadas como indicador interno	23
2.3.1 Método in vivo	23
2.3.2 Métodos in vitro	24
2.3.3 Método in situ.....	25
2.4 Importância dos tempos críticos na determinação de frações indigestíveis dos alimentos.....	28
2.5 Modelos matemáticos para determinação da degradabilidade ruminal de alimentos	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4 RESULTADOS.....	39
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

REIS, Maria José da Silva. *Incubação in situ em bovinos e ovinos na avaliação de compostos indigestíveis em alimentos e fezes*. Salvador, Bahia, 2016. 61p. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, 2016.

RESUMO

Objetivou-se determinar uma metodologia de incubação ruminal *in situ* em bovinos para obtenção de indicadores internos, com base em frações indegradáveis aplicadas aos ensaios de digestibilidade com ovinos, e ainda, determinar e comparar os tempos críticos para obtenção de frações indegradáveis de alimentos volumosos, concentrados e fezes de bovinos e ovinos obtidos por meio da incubação *in situ* em bovinos e ovinos. O experimento foi conduzido na fazenda experimental da Universidade Federal da Bahia, localizada em São Gonçalo dos Campos, Bahia. Foram utilizados oito animais machos castrados e não castrados, fistulados no rúmen (4 bovinos mestiços e 4 ovinos mestiços). O procedimento de incubação foi realizado utilizando-se 2 quadrados latinos 4 x 4, sendo um quadrado latino para cada espécie. Os animais permaneceram em baias individuais durante todo o período experimental, de 66 dias, sendo 10 para adaptação e outros 56 dias para realização dos períodos experimentais de 14 dias cada. Todos os animais foram alimentados com silagem de sorgo e concentrado na proporção 80:20, com base na MS. Amostras de 12 alimentos (capim braquiária, capim- elefante, feno de tifton, cana-de-açúcar, silagem, silagem de sorgo, silagem de milho, feno de alfafa, farelo de soja, farelo de trigo, fubá de milho, torta de algodão) e 4 fezes de bovinos e ovinos alimentados com alto ou baixo concentrado foram utilizadas neste estudo. Os tempos 0, 12, 24, 48, 96, 144, 192, 240, 288, 336 horas de incubação foram avaliados, sendo que o tempo 0 não foi inserido no rúmen, apenas lavado em água corrente. Foram avaliadas as estimativas para a fração potencialmente degradável (B), taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal (kd) obtida a partir de bovinos e ovinos e frações indigestíveis (I) da matéria seca (MS), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), limite superior do intervalo de confiança assintótico com 95% de probabilidade para a fração indegradável (LS) e tempo crítico (tc) para o alcance dessas frações nas diferentes espécies. Os resultados indicaram que para a maioria dos alimentos volumoso estudados, foram observadas diferenças no kd ($P < 0,05$) entre bovinos e ovinos, exceto para MS e FDN do feno de alfafa, FDN da silagem de milho e FDA do capim-elefante. Para os concentrados o kd não diferiu ($P > 0,05$) entre bovinos e ovinos para MS do farelo de trigo e FDN e FDA do fubá de milho. Para fezes, não foram observadas diferenças no kd ($P < 0,05$) em nenhuma das amostras analisadas para MS. Apenas as fezes de ovinos-baixo concentrado não apresentaram diferença no kd para FDN ($P > 0,05$), porém, houve diferenças no kd ($P < 0,05$) para fezes de ovinos-alto concentrado e bovinos-baixo concentrado no estudo da FDA. Nas amostras onde ocorreram diferenças ($P < 0,05$) para os valores do kd entre bovinos e ovinos, foi observada uma relação inversamente proporcional entre o kd e o tempo crítico (tc). Para as amostras em que o kd entre bovinos e ovinos são semelhantes ($P > 0,05$), a relação entre os tc entre bovinos e ovinos é de igualdade. Para maioria dos alimentos e fezes avaliados, os tc observados para obtenção tanto de FDNi quanto FDAi foram superiores a 288 horas de incubação em ovinos, e essas mesmas amostras quando incubados no

bovinos obtiveram um t_c inferior aos dos ovinos. Assim, recomenda-se que não se utilize a espécie ovina para obtenção de indicadores internos com base em ensaios de degradação *in situ* em razão do elevado tempo de incubação para obtenção da fração indegradável dos alimentos e fezes. Por outro lado, os indicadores internos MSi podem ser obtido a partir de 264 horas de incubação *in situ* em bovinos, com exceção da silagem de milho, que deve ser obtida a partir de 336 horas. Por sua vez a $FDAi$ pode ser obtida a partir de 288 horas de incubação *in situ*.

Palavras-chave: Degradabilidade ruminal. Frações indigestíveis. Alimentos. Nutrição de ruminantes.

REIS, Maria José da Silva. *Incubação in situ em bovinos e ovinos na avaliação de compostos indigestíveis em alimentos e fezes*. Salvador, Bahia, 2016. 61p. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, 2016.

ABSTRACT

Objective to determine a methodology of in situ ruminal incubation in cattle for obtaining internal indicators, based on fractions undigestibles applied to tests of digestibility with sheep, and also determine and compare the critical times for obtaining undigestibles fractions of bulky food, concentrated and feces from cattle and sheep obtained by in situ incubation in cattle and sheep. The experiment was conducted on the experimental farm of the Universidade Federal of Bahia, located in São Gonçalo dos Campos, Bahia. It was used eight males animals castrated and non-castrated, fistulated in the rumen (4 cattle crossbreed and 4 crossbred sheep). The incubation procedure was performed using 2 4 x 4 latin square, being a latin square for each species. The animals remained in individual pens throughout the experimental period, of 66 days, being 10 for adaptation and other 56 days for completion of the trial periods of 14 days each period. All animals were fed silage of sorghum and concentrated in proportion to 80:20, based on MS. Samples of 12 types of food (braquiária grass, elephant grass, hay of tifton, sugar cane, silage, silage sorghum, millet silage, alfalfa hay, soybean meal, wheat bran, ground corn, cotton) and 4 stool of animals fed with high or low concentrated were used in this study reviewed in times 0, 12, 24, 48, 96, 144, 192, 240, 288, 336 hours of incubation, and the time 0 was not inserted in the rumen, just washed. Estimates have been assessed for the potentially degradable fraction (B), on the dynamics of rumen degradation (kd) obtained from cattle and sheep, undigestibles fractions of MS, FDN and FDA, upper limit of the confidence interval 95% probability with asymptotic to the indigestible fraction (LS) and time critical (tc) for the range of these fractions in different species. The results indicated that for most bulky foods studied, differences were observed in the Kd ($P < 0.05$) among cattle and sheep, except the alfalfa hay on MSi and FDNi, corn silage on FDNi and elephant grass on FDAi. For the concentrates did not differ the kd ($P > 0.05$) among cattle and sheep for wheat bran on MSi and ground corn in FDNi and FDAi. For stool, no differences were found in the kd ($P < 0.05$) in any of the samples analysed for MSi. In FDNi only in short-sheep the feces focused no difference in kd ($P > 0.05$), however, there were differences in the kd ($P < 0.05$) in feces of tall sheep concentrated and low-concentrate cattle FDAi. In samples where there were differences ($P < 0.05$), kd values between cattle and sheep, were observed a relationship between the inversely proportional kd and the critical time (tc). The higher the kd value, the lower the tc needed to estimate the indigestible fraction of MS, NDF and FDA. For the samples in which the kd between bovine and ovine no differences were found ($P > 0.05$), the relation between kd and the tc is equal, therefore the tc in both species will be the same. For most food and faeces evaluated, the tc observed in FDNi and FDAi were superior to 288 hours of incubation in sheep, and these same samples when incubated in a tc bovine animals less than the sheep. So the rate on the dynamics of rumen degradation, along with the tc of incubation for some food and feces, differ between cattle and sheep, and the faecal waste originating in

digestibility in sheep trials, can be incubated in the rumen of cattle, depending on the type of food and feces, the example of alfalfa hay.

Key words:Ruminal Degradability, undigestibles fractions, foods, nutrition of ruminants

1INTRODUÇÃO

Uma prática que diverge opiniões entre pesquisadores da área de nutrição de ruminantes é a incubação *in situ* de material fecal obtido em ensaios de digestibilidade em ovinos no rúmen de bovinos. A incubação ruminal em bovinos permite a utilização de maior número de saquinhos por unidade de tempo devido ao maior volume ruminal; além disso, já estão disponíveis protocolos bem definidos sobre o método e período de incubação para obtenção das frações indigestíveis dos alimentos. Em tese, esta prática apresenta embasamento teórico consistente uma vez que o conteúdo indegradável é característica inerente ao alimento e independente da espécie que o receberá. Ainda, uma vez que o resíduo indegradado no rúmen apresenta comportamento assintótico, ou seja, o valor real da fração somente poderá ser verdadeiramente mensurado em procedimentos conduzidos em escala de tempo infinita, apenas haverá interferência do tempo de incubação aplicado, ou seja, da taxa de degradação(kd) (Casali et al., 2008).

Assim, resta ao pesquisador conhecer o tempo necessário para o alcance da assíntota, que pode vir a apresentar um valor coincidente tanto para grandes como pequenos ruminantes. Entretanto, pertinentemente, na ausência de protocolos adequados para tempo de incubação de fezes de pequenos ruminantes e alimentos diversos, existe uma dúvida quanto à possíveis diferenças na população microbiana, volume ruminal, ou de qualquer outra natureza, que conduzam à diferenças no tempo de exposição ou atividade dos microrganismos fibrolíticos. Isto conduziria à diferenças nas perdas de parede celular potencialmente degradável nas fezes incubadas ao longo do tempo, o que por si só constituiria uma limitação ao uso de incubação ruminal de resíduos fecais de ovinos no rúmen de bovinos, inviabilizando a prática.

Cochran et al., (1986) e Valente et al., (2011) trabalharam com incubação ruminal *in situ* avaliando taxas de degradação ruminal de forragens temperadas e de clima tropical, e recomendaram tempos de incubação de 144 e 288 horas, respectivamente. No entanto, estes ensaios foram realizados apenas em bovinos. Assim, torna-se necessário investigar e recomendar protocolos para determinação destes indicadores para ensaios de digestibilidade com ovinos; e se amostras provenientes destes estudos podem ser incubadas no rúmen de bovinos, o que representaria otimização do tempo despendido na incubação de amostras devido ao maior volume

ruminal disponível. A hipótese deste trabalho trata-se da possibilidade de se obter indicadores internos em alimentos e fezes provenientes de ensaios de digestibilidade com ovinos a partir de incubação ruminal *in situ* em bovinos.

Assim, o objetivo deste trabalho foi recomendar um protocolo de incubação *in situ* em bovinos para obtenção de indicadores internos, com base em frações indigestíveis aplicada aos ensaios de digestibilidade com ovinos, bem como determinar e comparar os tempos críticos para obtenção de frações indigestíveis de alimentos volumosos, concentrados e fezes de bovinos e ovinos obtidos por meio da incubação ruminal *in situ* em bovinos e ovinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diferenças entre a degradabilidade de alimentos em bovinos e ovinos

Apesar de semelhanças fisiológicas entre bovinos e ovinos, estudos em diversas áreas na nutrição animal vêm demonstrando amplas diferenças entre essas espécies. Blaxter et al. (1962) observaram que ovinos foram mais eficientes na utilização de forragens de baixa qualidade do que bovinos. Ovelhas também poderiam ser mais eficientes que bovinos na utilização de uréia reciclada para fins anabólicos, uma vez que a uréia que retorna ao TGI representa em média de 30 a 40% do N digerido em bovinos e mais que 80% em ovelhas (Lapierre e Lobley, 2001).

Considerando-se que variações na recuperação de indicadores internos poderiam ser decorrentes de variações do substrato a ser fermentado (Lippke et al., 1986), e que a fração potencialmente degradável de um material é pouco influenciada pela espécie animal ou tamanho da partícula do material incubado (Campos et al., 2006), é possível inferir que estudos de degradabilidade envolvendo ovinos poderiam ser realizados incubando-se os materiais no rúmen de bovinos, desde que um horário representativo para as duas espécies seja determinado. Ainda, deve-se considerar que a fração indigestível da parede celular é característica inerente ao alimento, e que o tempo necessário para determiná-la, durante incubação ruminal, pode ser variável a depender da espécie e características fermentativas do ambiente ruminal em estudo. Assim, pode-se inferir que mesmo encontrando-se diferentes taxas de degradação (kd) nas diferentes espécies ruminantes para o mesmo substrato, deve-se encontrar o mesmo valor de fração indigestível independentemente do tempo a ser despendido no ensaio.

2.2 Indicadores internos para determinação da excreção fecal em ruminantes

A digestibilidade constitui um dos principais parâmetros para avaliação do valor nutritivo de alimentos consumidos por ruminantes (Casali et al., 2008). Convencionalmente, a digestibilidade dos alimentos é determinada através da mensuração acurada do alimento consumido e da produção fecal (Huhtanen et al., 1994). Entretanto, a mensuração direta da produção fecal através da coleta total pode

configurar difícil determinação, uma vez que a coleta total de fezes é um método laborioso e oneroso. Devido a essa limitação, um método indireto para estimar a digestibilidade das dietas poderia ser empregado a partir do conteúdo dos constituintes indigestíveis, também denominados indicadores internos (Detmann et al., 2007).

A utilização dos indicadores internos na estimativa da excreção fecal baseia-se no aumento progressivo da concentração do indicador pela remoção de outros componentes à medida que o alimento transita o trato gastrointestinal como consequência dos diferentes eventos digestivos, digestão e absorção, aos quais a digesta é submetida (Van Soest, 1994; Astigarraga, 1997).

Embora o emprego de indicadores esteja intrinsecamente associado a características naturais do próprio indicador, deve-se ressaltar a inexistência de um indicador ideal a todas as situações experimentais (Detmann et al., 2007). Dessa forma, estudos (Cochran et al., 1986; Judkins et al., 1990; Detmann et al., 2001; Detmann et al., 2004; Detmann et al., 2007) foram realizados buscando-se determinar indicadores internos que melhor poderiam ser empregados nas estimativas de consumo e digestibilidade. Atualmente, os indicadores mais comumente empregados em ensaios com ruminantes são a fração física da matéria seca indigestível (MSi) (Huhtanen et al., 1994; Detmann et al., 2001), a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e a fibra em detergente ácido indigestível (FDAi) (Lippke et al., 1986; Detmann et al., 2001).

2.2.1 Matéria Seca indigestível

A MSi é um dos indicadores internos utilizados em ensaios de digestibilidade com ruminantes (Huhtanen et al., 1994; Detmann et al., 2001; Casali et al., 2008) que pode ser ainda utilizado na determinação de consumo. Além disso, apresenta componentes insolúveis similares às frações químicas de FDNi e FDAi (Casali et al., 2006). Detmann et al. (2001), avaliando o consumo de MS com o uso de indicadores, observaram que MSi, juntamente com a FDNi, constituíram melhor alternativa para determinação indireta da digestibilidade da dieta e do consumo de MS em animais sob pastejo. Esses autores ainda sugeriram que a utilização da MSi representaria uma vantagem adicional, devido ao baixo custo analítico, uma vez que sua quantificação dispensa o sistema detergente.

O procedimento *in situ* consiste no alojamento de amostras em sacos específicos, que por sua vez são introduzidos no rúmen de animais canulados. Devido às características dos sacos e aos objetivos do método, os microrganismos ruminais colonizam o substrato para degradá-lo. O procedimento usual de lavagem com água corrente após incubação poderia não ser eficiente na remoção de algum contaminante, sendo possível considerar que os resíduos de contaminação microbiana podem estar diretamente relacionada com adesão dos microrganismos às partículas de proteínas não degradáveis, e a natureza dos tecidos vegetais (Machado et al., 2013), a aplicação do detergente neutro pode anular essa contaminação.

Huntington e Givens (1997), avaliando o efeito de diferentes procedimentos de lavagem sobre a degradação de alimentos em métodos *in situ*, observaram elevada perda de partículas quando o material foi lavado com água quente no tempo zero de incubação. Essa perda subestimaria o valor de MSi pela remoção de substâncias insolúveis em água fria (temperatura não especificada) como lipídeos e algumas proteínas (Huntington e Givens, 1997).

Valente et al. (2011), avaliando as estimativas da concentração de MSi em amostras de alimentos e de fezes bovinas acondicionadas em sacos de diferentes tipos de tecidos em procedimentos de avaliação *in situ*, observaram alta variabilidade dos resultados para MSi em decorrência da presença de contaminantes microbianos e não-microbianos, não sugerindo a utilização de MSi como um marcador interno. Contudo, Casali et al. (2008) sugeriram que a estimativa de teores de MSi *in situ* poderia ser obtida a partir de amostras com tamanho de partículas de 2 mm e tempo de incubação de 240 horas.

2.2.2 Fibra em detergente neutroindigestível

Os carboidratos presentes nos alimentos para ruminantes podem ser fracionados em componentes estruturais e não-estruturais, sendo que as taxas de degradação ruminal de cada uma destas frações pode ser estimada. De acordo com a taxa de degradação, as frações que podem constituir os carboidratos são: fração *a*, que é solúvel e instantaneamente degradada, constituída pelos açúcares simples; fração *b1*, insolúvel e potencialmente degradável, cuja taxa de degradação é intermediária, a exemplo do

amido e da pectina; a fração *b2*, que possui taxa de degradação lenta, a exemplo de celulose e hemicelulose; e fração *c*, que é a fração insolúvel e não degradada, onde estão presentes os carboidratos associados à lignina (Sniffen et al., 1992). Esta última fração é equivalente à fibra em detergente neutro indigestível.

A fibra em detergente neutro (FDN) é uma fração baseada no método de recuperação do resíduo fibroso insolúvel em meio neutro, empregando-se a extração em meio aquoso mediante ao calor e à ação de um detergente catiônico (Detman et al., 2012). Os componentes da FDN incluem celulose, hemicelulose e lignina (Sniffen et al., 1992), sendo que a fração indigestível da fibra em detergente neutro (FDNi) representa um componente indigestível dos alimentos e sua recuperação nas fezes não é consideravelmente alterada ao longo dos dias (Lippke et al., 1986; Ítavo et al., 2000).

A FDNi é uma fração funcional da fibra que influencia a efetividade física, o enchimento ruminal e a dinâmica de digestão e passagem das forragens, além de possuir importância biológica por ser utilizada para estimar a FDN potencialmente digestível, mensurar pools e taxa de digestão de FDN e prever a qualidade da forragem (Van Amburgh et al., 2015). Adicionalmente, a ampla utilização da FDNi como indicador interno é decorrente de sua completa recuperação após trânsito ao longo do TGI (Zeoula et al., 2002; Detmann et al., 2007). Apesar da recuperação constituir características inerentes ao alimento em estudo, influências indiretas na metodologia utilizada para estimar a sua concentração podem causar viés nessa recuperação (Detman et al., 2012). Valente et al. (2011) observaram que a recuperação da FDNi para farelo de trigo, caroço de algodão, sorgo grão, cana de açúcar e silagem de milho foi similar quando os alimentos foram incubados em sacos de tecido não-tecido e Ankom[®] F57, mas apresentaram menor conteúdo da fração indigestível em sacos de nylon.

Cabral et al. (2008) correlacionaram valores de digestibilidade estimados a partir da FDNi com valores obtidos pelo método da coleta total de fezes, sem obtenção de diferença significativa para nenhum nutriente avaliado, concluindo que esse indicador estimou de forma acurada a digestibilidade das dietas. De acordo Ellis et al. (1999) a determinação da FDNi deve ser incluída basicamente em todas as avaliações de dietas, por ter uma digestibilidade previsível. Kriszane et al. (2010) afirmaram que a relação FDNi:FDN indica o potencial de digestibilidade da FDN e está relacionada com o tipo de alimento ou maturidade da forragem. Segundo Reffrenato e Van Amburgh (2010),

para uma maior exatidão nas estimativas da FDNi sugere-se um tempo de incubação mais longo, até 240 horas, devido à características de indigestibilidade encontradas principalmente em forrageiras de baixa qualidade.

2.2.3 Fibra em detergente ácidoindigestível

A fibra em detergente ácido (FDA) é uma fração da parede celular vegetal baseada no método de recuperação do resíduo fibroso insolúvel em detergente ácido mediada por calor e ação de um detergente catiônico, sendo um método utilizado para quantificação de celulose, lignina, nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), cinza insolúvel em ácido (CIA) e sílica (Van Soestet al., 1991; Detmann et al., 2012). Devido a algumas características da FDA, sua fração indigestível (FDAi) vem sendo utilizada como indicador interno em ensaios de consumo e digestibilidade (Valente et al., 2011). Uma grande quantidade ou mesmo a totalidade do consumo de volumosos é composta por fonte de carboidratos fibrosos, contendo em sua maior parte fração indigestível, podendo optar tanto pela FDNi quanto pela FDAi para determinação da digestibilidade, sugerindo que os dois indicadores sejam sempre utilizados conjuntamente na estimativa desses coeficientes (Watanabe et al., 2010).

Saliba et al. (1999) estudando a composição de indicadores internos e seus potenciais para estimar a excreção fecal, concluíram que os resultados médios obtidos pela FDAi foram semelhantes ao da coleta total de fezes. Conclusões similares também foram observados por Ítavo et al. (2002). Ferreira et al. (2009) observaram que a FDAi pode ser utilizada como indicador interno para estimativa da digestibilidade dos nutrientes em experimentos com vacas leiteiras alimentadas com silagem de milho como volumoso. Entretanto outros estudos vêm demonstrando falhas na utilização da FDAi como indicador interno para ensaios de digestibilidade em ruminantes confinados ou à pasto, devido a sua incompleta recuperação nas fezes (Detmann et al., 2001; Detmann et al., 2007). Em concordância com esses dados, Carvalho et al. (2013) observaram valores negativos para o viés a longo prazo na recuperação fecal da FDAi de 9,12% e -3,02% para ovelhas e cabras, respectivamente.

Huhtanen et al., (1994) observaram que os valores para FDNi e FDAi foram mais elevados quando determinados por incubação *in vitro* comparados com os valores

obtidos com a 288 horas de incubação ruminal, e associaram os resultados a perdas de partículas de alimentos e amostras fecais dos sacos de náilon durante a incubação ruminal. Ferret et al., (1999) rejeitaram a FDAi como um indicador interno confiável, devido aos resultados variáveis e suas recuperações incompletas na extração da fibra indigestível. Lippke et al. (1986), assumiu que as variações no tamanho de partícula da amostra poderia explicar o viés de recuperação das fibras indigestíveis. Entretanto, trabalhos demonstram a utilização favorável dos resíduos de fibras não degradáveis como indicador interno para determinadas dietas (Kryslet et al., 1988; Tamminga et al., 1989; Dove e Coombe, 1992).

2.3 Métodos para determinação das frações indigestíveis utilizadas como indicadores interno

O desempenho animal está diretamente relacionado à qualidade do alimento ingerido bem como sua degradação e aproveitamento dos nutrientes pelos microrganismos ruminais (Campos et al., 2006). Considerando-se que a digestibilidade é um dos principais parâmetros para avaliação dos valores nutritivos de um alimento na nutrição de ruminantes (Casali et al., 2008; Krizan et al., 2015) torna-se imprescindível a busca por métodos acurados, simples e rotineiros que possam ser empregados na experimentação animal (Campos et al., 2006). Atualmente os ensaios de digestão *in vivo*, *in vitro* e *in situ* são comumente utilizados para esta finalidade. Nocek (1988) comparou os três métodos e relata que a metodologia *in vivo* é considerada padrão em relação a outras técnicas, por oferecer potencial fisiológico para prever a disponibilidade de nutrientes, em contrapartida a técnica *in vitro* tem como vantagem a capacidade de manipulação do ambiente ruminal e o autor destaca o procedimento *in situ* como metodologia base para a previsão da digestão em vários sistemas de alimentação.

2.3.1 Método *in vivo*

Os ensaios de digestão *in vivo* são utilizados para a determinação da digestibilidade aparente dos alimentos nos quais o valor nutritivo dos alimentos obtido é utilizado como valor padrão para comparação com os outros métodos empregados

(Beecheret al., 2015). O ensaio *in vivo* promove maior acurácia na determinação do componente indigestível do alimento, uma vez que a concentração fecal é função dos diferentes eventos digestivos aos quais a digesta é submetida (Detmann et al., 2001).

Apesar de constituir a melhor forma para estimar o valor nutritivo dos alimentos, sua difícil aplicabilidade, como elevado tempo despendido, elevado custo com animais e alimentação, limitam a utilização dessa técnica (Campos et al., 2006). Adicionalmente, é uma técnica que não fornece diferenciação entre a degradação ruminal e a digestão dos alimentos após o rúmen (Huntington & Givens, 1995).

Kriszan et al. (2015) em nova recomendação para utilização da FDN_i com base na matéria orgânica (FDN_{imo}), relatou benefício da utilização de amostras nas quais a digestibilidade da FDN_{imo} corrigida para cinzas tenha sido determinada *in vivo*, o que permitiria comparar resultados de digestibilidade *in vivo* e da taxa de digestão da FDN potencialmente degradada.

2.3.2 Métodos *in vitro*

Um dos primeiros estudos de digestão *in vitro* foi realizado por Little et al. (1963) com o objetivo de se estimar a taxa de degradação proteica no rúmen, e estimar a digestibilidade dos demais nutrientes de alimentos e fezes. Desenvolvida por TILLEY & TERRY (1963), a técnica de digestibilidade *in vitro*, que ocorre em duas fases, consiste na exposição das amostras a um período de digestão por 48 h ao fluido ruminal para estimativa da digestão, seguido por um segundo período de digestão também de 48 h, utilizando pepsina e ácido fraco para simular a pós-digestão (Nocek, 1988). Segundo Pott et al, (1978) a técnica *in vitro* apresenta uma correlação com a técnica *in vivo* quando utilizada na avaliação de forragens de alta qualidade. No entanto, quando direcionada para alimentos de baixa qualidade não apresenta esta correlação (Fay et al 1986), pois Tilley & Terry (1963) relataram ter desenvolvido a técnica especificamente para avaliação de forrageiras de média e alta qualidade.

A técnica de digestão *in vitro* baseia-se em mimetizar as condições ruminais, como pH, temperatura e anaerobiose, utilizando-se o líquido ruminal como inóculo principal. Essa técnica normalmente é a mais utilizada devido a sua conveniência e praticidade ou quando existe a necessidade de um ensaio com grande quantidade de

diferentes alimentos (Uden, 1992). Adicionalmente, é possível atribuir sua ampla utilização ao menor custo analítico (Harter et al, 2009). O método *in vitro* é normalmente utilizado por causa da sua conveniência e praticidade. Entretanto, a quantidade do indicador nas amostras incubadas pode ser superestimada caso o material analisado permaneça aderido à parede ou à tampa sem contato com o inóculoruminal de maneira a não sofrer o processo de digestão (Casali et al., 2008). Além disso, o método não simula as alterações na digestibilidade decorrentes do efeito associativo, nível de consumo e taxa de passagem, observado *in vivo* (Detmann et al., 2001).

Outro fator que poderia ser considerado limitante para o uso da técnica *in vitro* é o tempo de incubação, uma vez que tempos curtos de incubação podem não promover a completa digestão do material, com isso a fração indigestível torna-se subestimada (Huhtanen et al., 1994). Contudo, o tempo de incubação poderia estar associado ao tamanho de partícula mesmo que o material seja moído adequadamente, pois nesses casos, deve haver homogeneidade entre as partículas das amostras (Lippke et al., 1986).

A adequada determinação do tempo para a completa degradação *in vitro* é um dos fatores que garante sua ampla aplicabilidade em ensaios de digestibilidade com maior número de alimentos. Berchielli et al. (2000) observaram que a digestibilidade de MS, PB, EE, FDN, nutrientes digestíveis totais (NDT) e energia bruta (EB) foram adequadamente estimados através dos teores de FDN, FDA e lignina incubados *in vitro* durante seis dias. Entretanto, Lopez et al., (1998) avaliando diferentes métodos *in vitro* e *in situ* para a determinação da cinética de digestão de forrageiras, utilizando tempos de incubação de 6, 24, 48 e 72 h, concluíram que a taxa de produção de gás quando as forragens são incubadas em técnica *in vitro* está relacionado com a taxa de degradação fracionada estimada pela técnica *in situ*, constatando assim, ser viável um tempo maior de incubação *in vitro* a depender da forrageira estudada.

2.3.3 Método *in situ*

O método *in situ*, proposto por Mehrez e Ørskov (1977), é o mais amplamente utilizado nos estudos de degradabilidade das frações dos carboidratos e proteínas para utilização em sistemas de predição de exigências nutricionais em ruminantes (NRC, 1996; AFRC, 1992). Quando comparado com o método *in vivo*, considera-se uma

técnica de fácil e rápida execução, necessitando de pouca quantidade de alimento, e possibilita o acompanhamento da degradação ao longo do tempo.

Essa técnica permite rápida estimativa da taxa e extensão da degradação ruminal dos alimentos sem a necessidade de procedimentos sofisticados, possibilitando o estudo da cinética da digestão dos alimentos (Ørskov et al., 1980; Mertens, 1993). Embora seja uma das técnicas que melhor determine a degradabilidade ruminal dos alimentos (Huntington & Givens, 1995), uma vez que as amostras encontram-se submetidas às condições reais do ambiente ruminal, elas não estão sujeitas à mastigação, à ruminação ou à passagem para os demais compartimentos do sistema digestivo dos ruminantes (Campos et al., 2006), o que inviabiliza conhecer todos os processos inerentes a digestão completa do material incubado.

Discute-se sobre a padronização do procedimento *in situ* para sua correta aplicação, sendo considerada uma das limitações para desenvolver o processo de incubação (Vanzant et al., 1998; Broderick & Cochran, 2000). O tamanho das partículas das amostras utilizadas neste método, por exemplo, levantou controvérsias entre alguns pesquisadores (Bowman & Firkins, 1993; Nocek e Kohn, 1988), com variações sugeridas para preparação das amostras moídas com peneiras de tela 2 mm a 5 mm. As partículas grandes podem comprometer o acesso microbiano ao substrato (Nozière & Michalet-Doreau, 2000), não sendo recomendada a utilização de partículas de 5 mm para avaliação de forragem (Hvelplund & Weisbjerg, 2000; NRC, 2001), e demais amostras que vierem a ser utilizadas no procedimento *in situ*. Considera-se atualmente que 2 mm é o tamanho padrão para processamento de amostras para incubações *in situ* por propiciar um ponto de equilíbrio entre o controle de perda de partículas e uma superfície específica adequada para degradação microbiana (Vanzant et al., 1998; & Nozière Michalet-Doreau, 2000; NRC, 2001).

Outro foco de grande relevância sobre a técnica *in situ* está diretamente associado à padronização do tempo de incubação necessário para determinação da sua fração indigestível e se o mesmo tempo de incubação *in situ* utilizado para bovinos é aplicado em ensaios de digestibilidade de ovinos e caprinos. Casali et al. (2008) propuseram 240 horas de incubação de MS e FDN para estimar MSi e FDNi e de 264 horas para estimar a FDAi em novilhas mestiças.

O Procedimento *in situ* pode ser executado utilizando-se diferentes tecidos,

como os sacos confeccionados com nylon ou, os do sistema Ankon® conhecidos como F57. Porém, Uma das alternativas é a utilização do saco de TNT (Valente et al., 2011), por ser considerado pelos pesquisadores, mais eficientes e de menor custo. Nesta técnica, o procedimento consiste em adicionar uma pequena quantidade (0,5-0,6 gramas) de amostra do alimento a ser estudado em sacos de TNT (tecido-não-tecido) seguindo com a imersão destes no rúmen de animais castrados (bovinos, ovinos ou caprinos). Os poros do TNT devem ser pequenos o bastante para que não haja perda de partículas e em um tamanho considerável para permitir o acesso dos microrganismos ao alimento. Mesmo a quantidade de amostra incubada sendo muito pequena, esta não interfere no processo de fermentação ruminal, e admite-se que as condições no interior dos sacos são semelhantes às ruminais. (Broderick & Cochran, 2000).

Considera-se uma desvantagem do método *in situ* a contaminação do resíduo da incubação pelos microrganismos aderidos as partículas após a incubação, que poderia ser uma das maiores fontes de erro para a estimativa da taxa de degradação ruminal da proteína (NOCEK, 1988; VANZANT et al., 1998). Uma das limitações da MSi, em relação à FDN_i e FDA_i como indicador interno ocorre devido à presença de contaminantes como os microrganismos ruminais, uma vez que o material após incubação não é submetido a ação de nenhum detergente, comprometendo os resultados (Casali et al., 2008).

Geralmente a técnica “*in situ*” tem sido preferida com relação à metodologia *in vivo* por ser menos laboriosa, menor quantidade de alimento e com menor demanda de recursos financeiros e por descrever a participação da degradação ruminal na digestibilidade total dos alimentos (Nocek, 1988; Huntington e Givens, 1995). Entretanto, quando o número de amostra é demasiadamente elevado, o método *in vitro* ainda tem sido amplamente utilizado (Uden, 1992).

Segundo Broderick e Merchen (1992), os indicadores internos se destacam como marcadores microbianos e na identificação do fluxo e digestibilidade ruminal, sendo ideais por considerar a população de microrganismos associados ao fluido e as fases das partículas do substrato. Rotta et al. (2013) reafirmaram a favorável aplicabilidade dos indicadores para ensaios de digestibilidade *in situ*, pois não observaram diferenças na digestibilidade ruminal da FDN.

2.4 Importância dos tempos críticos na determinação de frações indigestíveis dos alimentos

A degradação da parede celular depende da interação complexa entre enzimas microbianas e substrato, que vão determinar a eficácia do processo de degradação, sendo o tempo de incubação uma das variáveis de maior influência sobre a representatividade das frações indigestíveis obtidas através da digestão *in situ* (Casali et al., 2008; Detmann et al., 2009). Conceitualmente, a fração indigestível só poderia ser mensurada mediante escala de tempo infinita. Contudo, os procedimentos *in situ* são baseados em escalas finitas de tempo, considerando-se um intervalo temporal elevado de maneira que as estimativas obtidas se aproximem do conceito assintótico (Casali et al., 2008).

Segundo Cocran et al. (1986), o tempo de incubação *in situ* de 144 horas é considerado suficiente para avaliar FDNi em forrageiras de clima temperado. Contudo, Ferreira et al. (2009), avaliando o uso de FDNi e FDAi como indicadores internos em ensaios de digestibilidade com bovinos, observaram que a FDNi foi pouco precisa quando a silagem de milho foi utilizada como volumoso e, assim como a FDAi não apresentou resultado esperado para um indicador interno quando cana-de-açúcar foi o volumoso ofertado aos animais. Deve-se ressaltar que as forragens tropicais, devido a seu perfil de parede celular lignificada do tipo C4, podem apresentar limitação na degradação em tempos de degradação limitados, uma vez que reduzida taxa de degradação destas forragens pode elevar os tempos críticos necessários para estimativa da fração indegradável.

Zeoula et al. (2000), avaliando a recuperação fecal dos indicadores internos, FDNi, FDAi, CIA (cinza insolúvel em ácido) e CIDA (cinza insolúvel em detergente ácido), em ensaio de digestibilidade de ovinos, incubaram alimentos, sobras e fezes no rúmen de bovinos por 192 horas, observaram 101,6% de recuperação fecal para FDNi, entretanto apenas 89,76% para FDAi, o que superestimou a produção de fezes.

Huhtanen et al. (1994) sugeriram que tempos de incubação inferiores a 288 horas não fornecem a estimativas da fração indigestível adequadamente. Considerando-se que potencial de degradação é característica inerente e exclusiva ao alimento (Campos et al., 2006), a variabilidade do material poderia demandar protocolos distintos para a estimativa da fração indigestível da MS, FDN e FNA (Casali et al., 2008).

Sobretudo, torna-se desejável a padronização de protocolos adotando-se um tempo único para todas as amostras incubadas na obtenção da estimativa de indicadores internos independente do material incubado. Nesse contexto, Casali et al. (2008) propuseram tempo de incubação *in situ* de 240 horas para estimar os teores de MS_i e FDN_i e de 264 para os de FDA_i. Esses resultados concordam com Clipes et al. (2006), que, ao estudarem a fração indigestível dos compostos nitrogenados associados à parede celular em gramíneas tropicais, sugeriram tempo de incubação *in situ* de 240 horas. Entretanto, estudos ainda são necessários para garantir que esse protocolo seja utilizado em ensaios de digestibilidade em ovinos.

2.5 Modelos matemáticos para determinação da degradabilidade ruminal de alimentos

Após a realização de um procedimento *in situ*, pelo menos três frações dos carboidratos podem ser determinadas (*A*, *B* e *C*). A fração *A* consiste da fração que deixa o saco de incubação durante o processo de lavagem com água corrente, ou seja, representa a fração imediatamente solúvel da matéria seca. A fração *B* seria determinada como percentual da amostra que desaparece após a exposição ruminal, representando os carboidratos insolúveis porém degradáveis ao longo do tempo de incubação. A fração *C* seria representada pela quantidade de amostra que permanece constante após um longo período de incubação ruminal (Vanzant et al., 1998), sendo por isso denominada de fração indegradável. De forma geral o perfil de degradação dos nutrientes ao longo do tempo de incubação apresenta comportamento exponencial ou até mesmo sigmoide, e podem ser descritos matematicamente por meio de modelos não lineares pré-estabelecidos.

Dessa maneira, os modelos matemáticos são geralmente empregados com o intuito de melhor descrever os eventos que ocorrem durante a degradação de um

material ao longo do tempo e, assim, transformar dados de taxas de desaparecimento ruminal em valores de degradabilidade efetiva, modelos estes que foram aperfeiçoados ao longo do tempo (Van Milgen et al., 1991; Hvelplund&Weisbjerg, 2000).

Ørskov e McDonald (1979) propuseram um modelo que assume que o substrato degradado em qualquer tempo é proporcional à quantidade de resíduo potencialmente degradável em qualquer tempo, à uma taxa fracional de degradação constante. Este modelo é amplamente utilizado devido à sua simplicidade. Os resíduos de incubação da matéria seca obtida através dos ensaios *in vitro* ou *in situ* em função do tempo podem ser avaliados utilizando-se o modelo matemático proposto por Ørskov&McDonald(1979):

$$(1) \text{Deg}(t) = a + b \times (1 - e^{-kd \times t})$$

Em que: Deg (t) representa o desaparecimento da matéria seca expressa em porcentagem; a representa a fração solúvel em água no tempo zero; b representa a fração insolúvel em água, mas potencialmente degradável no rúmen em determinado tempo; kd é a taxa de degradação da fração b; e t é o tempo de incubação (horas).

McDonald (1981) ajustou o modelo de Ørskov&McDonald (1979) e acrescentou o valor de *lag time* ou tempo de latência ao modelo, a fim de aumentar a precisão na determinação da degradabilidade efetiva. O *lag time* é definido como o tempo de colonização microbiana, no qual a derivada da equação para o conjunto de dados iguale-se à verdadeira fração potencialmente degradável no tempo zero (Mertens, 1993).

$$(2) \text{Deg}(t) = a + b \times (1 - e^{-kd \times (t - \text{lag})})$$

A adição do *lag time* no modelo tem pouco efeito na degradabilidade efetiva (Petit et al., 1995), e os valores das frações A e B e do kd sofrem poucas diferenças com a utilização ou não do *lag time* no modelo.

Mertens&Loften (1980) compararam métodos para estimar os parâmetros dos modelos através da avaliação do resíduo. Esses autores observaram que a cinética da digestão da fibra poderia ser adequadamente estimada através da equação:

$$(2) \text{Res}(t) = b \times e^{-kd \times (t - \text{lag})} + I$$

Em que Res é o resíduo do material no tempo após incubação, lag é a fase de latência discreta, I é a fração indegradável do material e demais variáveis estão descritas acima. Esse modelo permite derivar sequencialmente as estimativas a partir da primeira estimativa da fração I originada do resíduo remanescente em um tempo específico (Mertens&Loften, 1980). A fase lag refere-se ao período em que não ocorre digestão do material ou ocorre em uma taxa reduzida (Van Milgen et al., 1991). A utilização de modelos não-lineares possibilita que todos os parâmetros sejam estimados ao mesmo tempo e todos os dados pontuais possam ser utilizados (Van Milgen et al., 1991). Adicionalmente, o modelo proposto por Mertens&Loften (1980) pode ser considerado uma ferramenta adequada para avaliar o tempo de fermentação necessário para mensurar o resíduo indigestível (Lipke et al., 1986).

Alguns modelos de degradação baseados na cinética do crescimento microbiano são de natureza sigmoideal, indicando solução alternativa aos modelos de minimização dos retornos ou exponenciais simples, como é o caso do modelo proposto por Van Milgen et al.(1991):

$$(2) \text{Deg}(t) = b \times [(1 + c \times t) \times (e^{-c \times t})] + I$$

Em que: Deg (t) representa o desaparecimento da matéria seca ou FDN ou FDA expressa em porcentagem; b representa a fração insolúvel em água, mas potencialmente degradável no rúmen em determinado tempo; c representa a taxa fracional conjunta de latência e degradação (h^{-1}); I representa a fração indegradável; e t é o tempo de incubação (horas).

Mesmo havendo recentes estudos acerca de propostas de avaliação das equações estabelecidas por alguns sistemas como o Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) e o National Research Council (NRC, 2001), em condições nacionais (Malafai et al., 1998; Vieira et al., 2000; Rocha Jr. et al., 2003), o potencial preditivo dessas equações para gramíneas produzidas em regiões tropicais são pouco conhecidas (Detmann, 2004); e a equação de predição da fração indigestível da fibra em detergente neutro adotada pelo sistema nutricional NRC (2001) gera estimativas viesadas positivamente deste parâmetro em gramíneas tropicais.

3 MATERIAL EMÉTODOS

Local, animais e dieta

O experimento foi conduzido na fazenda experimental da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, localizada no município de São Gonçalo dos Campos, Bahia. Os procedimentos de manejo humanitário e coletas realizados com os animais neste estudo foram realizados após avaliação do comitê de ética em pesquisa com animais desta mesma instituição, sob número de protocolo 22/2015.

Foram utilizados oito animais fistulados no rúmen, totalizando quatro bovinos mestiços (machos castrados) com peso médio de 400 ± 25 kg, e quatro ovinos mestiços (machos não castrados) com peso médio de $45 \text{ kg} \pm 3$ kg. Os animais permaneceram em baias individuais durante todo o período experimental. Durante os procedimentos de incubação os ovinos foram manejados nas próprias baias em que foram mantidos, já os bovinos foram contidos utilizando-se brete. Todos os animais foram alimentados com silagem de sorgo e concentrado na proporção 80:20, com base na matéria seca (MS). O concentrado foi composto de 379,3 g/kg milho moído, 586,7 g/kg farelo de soja e 34,0 g/kg de núcleo mineral para ovinos ou bovinos em crescimento, conforme espécie a ser suplementada, com base na matéria seca (MS) da dieta, totalizando 120 g de proteína bruta (PB) por kg de MS na dietatotal.

Delineamento experimental e procedimento de incubação

Amostras de 12 tipos de alimentos e 4 fezes de animais alimentados com dietas de alto ou baixo concentrado (Figura 1) foram utilizadas neste estudo. Forragens úmidas e fezes foram secas em estufa com ventilação forçada (60°C por 72 horas) e, juntamente com as demais, foram processadas em moinho de facas com peneiras de porosidade de 2 mm (Casali et al., 2008).

As amostras utilizadas foram separadas em quatro grupos distintos (Figura 1), sendo dois grupos de forragens, um grupo de concentrados e um grupo de fezes. O procedimento de incubação foi realizado utilizando-se 2 quadrados latinos 4 x 4, sendo um quadrado latino composto por 4 ovinos e outro composto por 4 bovinos. Cada grupo de forragem foi incubado no rúmen de um bovino e um ovino em cada período

experimental, sendo então o mesmo alimento incubado por 4 vezes em diferentes animais ao final do procedimento (Figura 2). O período experimental foi compreendido por 66 dias, sendo 10 para adaptação a dieta, manejo e instalações e outros 56 dias para realização de períodos experimentais de 14 dias. Em cada período de coleta foi realizada uma rodada de incubação em cada animal, utilizando-se os tempos 0, 12, 24, 48, 96, 144, 192, 240, 288, 336 horas.

Figura 1 - Descrição dos grupos de alimentos incubados em uma mesma unidade experimental em função dos tempos de avaliação

Forragens Grupo 1	Forragens Grupo 2	Concentrados	Fezes
<ul style="list-style-type: none"> • Braquiária Brizanta Stapf • Capim-elefante • Feno de capim tifton 85 • Cana-de-açúcar 	<ul style="list-style-type: none"> • Silagem de milho • Silagem de sorgo • Silagem de milheto • Feno de Alfafa 	<ul style="list-style-type: none"> • Farelo de soja • Fubá de milho • Farelo de trigo • Torta de algodão 	<ul style="list-style-type: none"> • Ovinos AC¹ • Ovinos BC¹ • Bovinos AC² • Bovinos BC²

¹AC: 100% de concentrado na dieta com base na matéria seca; BC: 50% de concentrado na dieta com base na matéria seca;

²AC: 70% de concentrado na dieta com base na matéria seca; ²BC: 40% de concentrado na dieta com base na matéria seca.

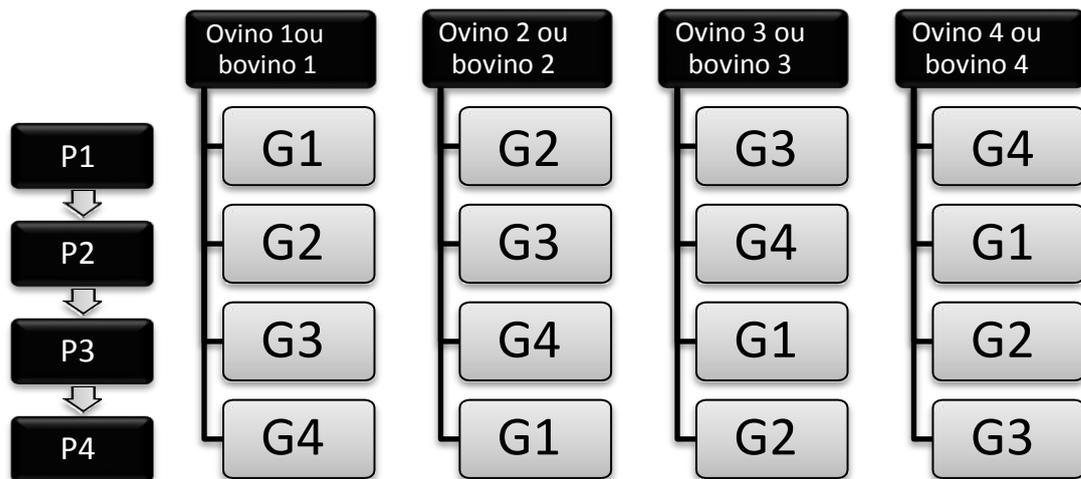
Cada amostra de alimento ou fezes foi incubada utilizando-se sacos de tecido não tecido (TNT) com densidade de 100 g/m², (Casali et al., 2009) cortados com dimensão de 4 x 5 cm, e preenchidos com 20 mg de amostra por cm² de superfície de saco (Nocek, 1988). Os sacos de TNT antes de receber as amostras foram lavados em solução detergente neutro (Mertens, 2002) a 100° C por 15 minutos, depois lavados com água quente e acetona para evitar contaminação dos resíduos. Para secagem utilizou-se a estufa de ventilação forçada a 60° C por 24 horas e em seguida os sacos foram colocados em estufa não ventilada a 105° C por 1 hora para pesagem e identificação.

Foram avaliados 40 sacos por animal e por período (Figura 2), correspondendo a 10 tempos para cada grupo de alimentos. Destes 40 sacos, 36 sacos foram incubados em ordem reversa no rúmen de cada ovino ou bovino, de modo a serem retirados simultaneamente ao final de cada período. Os sacos foram incubados aderidos a uma corrente metálica com peso, permitindo assim a imersão total das amostras no líquido ruminal. Os demais 4 sacos referentes a cada um dos alimentos de cada grupo no tempo

0 não foram submetidos à incubação ruminal. Os sacos no tempo 0 foram lavados apenas em água corrente. Sendo assim, um total de 320 saquinhos foram avaliados por período (8 animais × 40 sacos) e ao final do ensaio totalizou-se 1280 sacos (320 sacos × 4 períodos).

Após remoção do rúmen, os sacos foram lavados com água corrente até o total clareamento e imediatamente transferidos para estufa de ventilação forçada (60 °C), onde foram mantidos por 72 horas. Sequencialmente os sacos foram colocados em estufa de 105 °C por 1 hora, retirados e acondicionados no dessecador (20 sacos/dessecador) para posterior pesagem (Detmann et al. 2001), obtendo-se a MSi (matéria seca indigestível).

Figura 2 - Representação esquemática do procedimento de incubação de 12 alimentos e 4 fezes divididos em 4 grupos.



Análises químicas

Para as análises de composição química as amostras úmidas como fezes, silagens e forragens verdes, foram submetidas à pré-secagem em estufa de ventilação forçada a 60° C por 72 horas. Todas as amostras foram moídas em moinho de facas tipo “Willey” com peneira de 1 mm para posteriores análises químicas (Tabela 1). Estas amostras foram armazenadas em recipientes plásticos para condução da etapa analítica.

Amostras de alimentos e fezes foram submetidas às análises de matéria seca (MS; método 934.01) e matéria mineral (MM; método 924.05) de acordo com as

técnicas descritas pelo AOAC (2005). A fibra em detergente neutro (FDNcp) foi corrigida para cinzas (Mertens, 2002) sem adição de sulfito de sódio, e corrigida para proteína conforme Licitra et al. (1996). Ao detergente neutro foi acrescida a alfa-amilase termoestável (Ankon Tech. Corp., Fairport, NY). O extrato etéreo (EE) foi obtido com extrator Goldfish em éter de petróleo (AOAC2005; método 920.39), a proteína bruta (PB) pela técnica de micro Kjeldal (AOAC, 2005; método 968.06), lignina extraída com ácido sulfúrico 72% (Robertson e Van Soest et al., 1994; AOAC 2005; método 973.18), e proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN) de acordo com Licitra et al. (1996). A determinação da Fibra em detergente ácido (FDA; Method 973.18) seguiu protocolo do AOAC(2005).

Os resíduos dos sacos retirados do rúmen tanto dos ovinos quanto dos bovinos após lavados, secos e pesados para determinação da MSi, foram destinados à análises sequenciais de FDN e FDA para determinação da FDN indigestível (FDNi) e FDA indigestível (FDAi) seguindo-se a mesma metodologia citada anteriormente.

Tabela1- Composição química das amostras avaliadas.

Amostras	Composição							
	MS ¹	MO ²	EE ²	PB ²	CNF ²	FDNcp ²	FDAp ²	Lignina ²
Braquiária brizantha (60d)	89,15	93,7	2,1	9,4	15,6	66,6	29,2	3,1
Capim-elefante (60d)	89,87	94,2	2,5	15,2	6,9	67,6	28,3	2,0
Feno de Tifton-85	82,22	93,2	1,6	12,1	7,9	71,6	32,0	5,0
Cana-de-açúcar	86,65	97,6	1,7	2,9	55,7	37,3	21,9	4,1
Silagem de milho	87,79	96,6	2	6,9	35,5	52,2	23,5	3,6
Silagem de sorgo	88,55	95,7	2,4	9,9	22,1	61,3	31,5	6,5
Silagem de milheto	89,31	92,6	2,4	9,1	17,3	63,8	39,1	10,0
Feno de alfafa	88,37	92	0,6	16,2	25,7	49,5	32,0	9,1
Farelo de soja	89,34	93,6	2,2	50,3	32,1	9,0	6,8	0,2
Farelo de trigo	89,75	94,6	3,5	25,4	30,4	35,3	11,6	3,9
Fubá de milho	91,14	98,5	3,6	10,9	74,7	9,3	0,8	0,1
Torta de algodão	91,78	96	9,3	29,1	4,9	52,7	27,3	7,0
Fezes ovino (AC3)	89,48	90,6	2,8	20,5	34,6	32,7	17,0	5,6
Fezes ovino (BC3)	89,29	90	2,4	14,4	20,4	52,8	27,6	7,3
Fezes bovino (AC4)	88,65	93,2	1,6	14,1	50,9	26,6	12,7	3,7
Fezes bovino (BC4)	89,47	88,2	1,8	14,5	33,3	38,6	23,5	5,5

¹% Matéria natural;

²% Matéria seca;

³AC: alto concentrado (0:100); BC: baixo concentrado (50:50);

⁴AC: alto concentrado (30:70); BC: baixo concentrado (60:40).

Análises estatísticas

Os perfis dos resíduos de MS, FDN e FDA foram estudados utilizando-se o modelo assintótico adaptado de Lippke et al. (1986), que foi utilizado para comparar as taxas conjuntas de degradação e latência obtida em incubação com bovinos e ovinos. O seguinte modelo foi utilizado para estimar os parâmetros das curvas de degradação:

$$R_t = D_1 \times (B \times e^{-kd_1 \times t} + I) + D_2 \times (B \times e^{-kd_2 \times t} + I)$$

Em que: R_t = resíduo não-degradado de MS, FDN ou FDA (%) em determinado tempo de incubação; D_1 e D_2 são variáveis binárias correspondentes às espécies ovina e bovina: $D_1 = 0$ e $D_2 = 1$ correspondendo aos resíduos de degradação obtidos em bovinos, e $D_1 = 1$ e $D_2 = 0$ correspondendo aos resíduos de degradação obtidos em ovinos; B = fração insolúvel potencialmente degradável da MS, FDN ou FDA (%); I = fração indegradável (%), a qual representa os teores de MS_i , FDN_i e FDA_i ; kd_1 e kd_2 correspondem as taxas de degradação ruminal das espécies ovina e bovina; t = tempo de permanência no rumen.

O modelo foi adaptado de forma a permitir a comparação entre as taxas de degradação obtidas nas duas espécies. O parâmetro I utilizado para estimar os indicadores internos obtidos a partir de determinado tempo crítico de incubação não foi decomposto por espécies. Utilizou-se como premissa que o conteúdo indegradável de um alimento é característica inerente ao próprio alimento, independentemente da espécie que o receberá. Assim, buscou-se encontrar o tempo de incubação necessário em cada espécie para se estimar o parâmetro I .

Os procedimentos estatísticos foram realizados por meio do teste de identidade dos modelos de regressão não-linear, descrito por Regazzi (2003). A partir do modelo descrito, dois diferentes ajustes foram realizados para cada amostra estudada. Primeiramente assumiu-se que as dimensões das taxas de degradação (kd) entre bovinos e ovinos foram similares, assim foi ajustado o “modelo restrito” desconsiderando a variável binária descrita no modelo. Em um segundo ajuste, utilizou-se o pressuposto que este mesmo parâmetro apresentou diferença entre bovino e ovinos, sendo assim chamado de “modelo completo”, em que considerou-se a variável binária

descrita no modelo. A partir desta informação, a comparação estatística foi realizada utilizando-se a distribuição de χ^2 , como se segue:

$$\chi^2_{calc.} = -n \times \ln\left(\frac{RSSc}{RSSr}\right)$$

$$d.f. = p(c) - p(r)$$

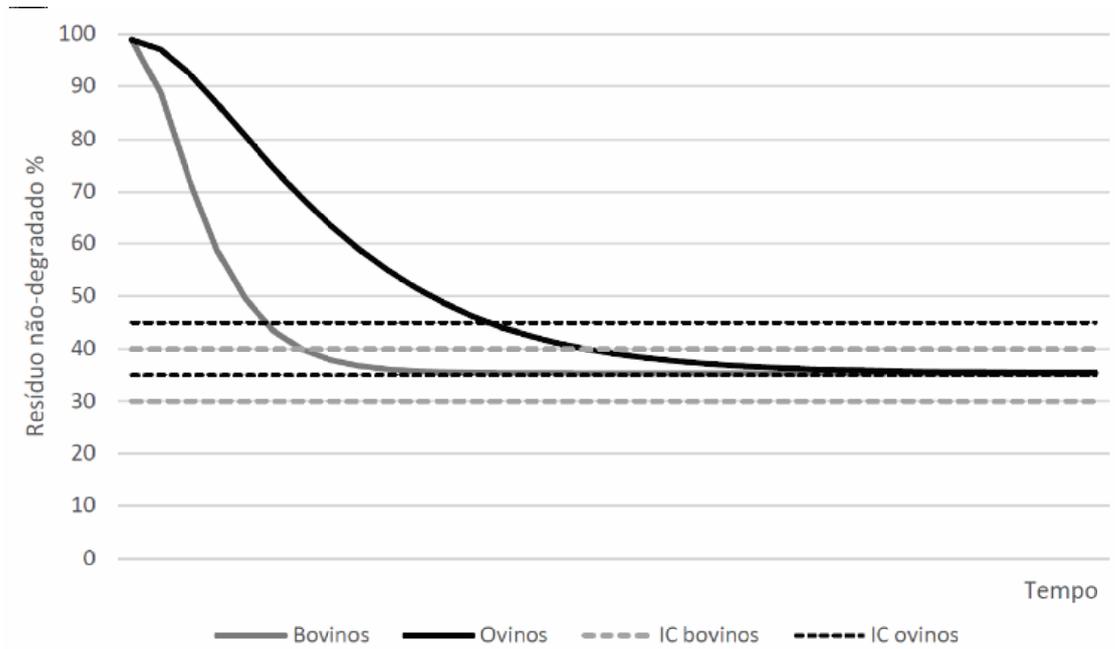
Em que $\chi^2_{calc.}$ é calculado para χ^2 , n é o número de observações utilizadas em cada ajuste para os alimentos, $RSSc$ é a soma de quadrados do resíduo do modelo completo, $RSSr$ é a soma de quadrados do resíduo do modelo restrito, d.f. é o número de graus liberdade utilizado para realizar o teste, $p(c)$ é o número de parâmetros considerado no ajuste do modelo completo, e $p(r)$ é o número de parâmetros considerado no ajuste do modelo restrito. Para todos os alimentos foi considerado $p(c)=4$, $p(r)=3$, então d.f.=1.

Para obtenção do ajuste não-linear, foi utilizado o processo iterativo do algoritmo de Marquardt, e estatística t para construção dos intervalos de confiança para os parâmetros ($1 - \alpha = 0,95$). Para cálculo do desvio-padrão assintótico foi utilizado o método da máxima verossimilhança. Os procedimentos foram realizados utilizando-se o PROC NLIN dos SAS (versão 9.2).

Para cada indicador interno obtido, foi realizada a comparação entre os modelos ajustados para verificar os efeitos das espécies estudadas (bovinos ou ovinos) sobre as estimativas das frações indigestíveis (MSi, FDNi e FDAi). A quantificação dos tempos necessários para estimativa dos resíduos indegradáveis (tempo crítico) foi realizada com base nas propriedades dos intervalos de confiança assintóticos para o parâmetro I da equação citada acima. A descrição dos tempos foi condicionada ao resultado obtido pelo teste de identidade de modelos, pois poderá haver modelos distintos por espécie ou um único modelo por alimento para as duas espécies conjuntamente. As estimativas dos tempos críticos por alimentos e por espécie (caso haja significância) foram obtidas por procedimento iterativo e consideradas equivalentes ao tempo em que as estimativas do resíduo não degradável se tornaram numericamente idênticas ao limite superior do intervalo de confiança assintótico ($1 - \alpha = 0,95$) para o parâmetro I , conforme protocolo proposto por Casali et al (2008)

(Figura 3).

Figura3- Representação gráfica de perfil ajustado para descrever o resíduo não-degradado em função do tempo (As linhas tracejadas indicam os limites do intervalo de confiança assintótico para a fração indigestível).



4 RESULTADOS

Em relação à degradabilidade da MS, diferenças do kd entre bovinos e ovinos foram observadas ($P < 0,05$) para os volumosos capim-braquiária, capim-elefante, feno de Tifton 85 e cana-de-açúcar. Nos volumosos do grupo 2 (silagem de milho, silagem de sorgo, silagem de milho e feno de alfafa), foram observadas diferenças do kd entre bovinos e ovinos ($P < 0,05$), exceto para o feno de alfafa (Tabela 2).

Diferenças nos valores do kd entre bovinos e ovinos, foram observadas ($P < 0,05$) nos alimentos concentrados farelo de soja, fubá de milho e torta de algodão. Para o farelo de trigo, essa diferença não foi observada ($P > 0,05$). No grupo das fezes, ocorreram diferenças ($P < 0,05$) nos valores do kd entre bovinos e ovinos para fezes de ovinos AC (alto concentrado), fezes de bovinos AC e fezes de bovinos BC (baixo concentrado). Para as fezes de ovinos BC não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre espécies (Tabela 2).

Para a degradabilidade da FDN, em todos os volumosos do grupo 1, ocorreram diferenças ($P < 0,05$) nos valores do kd entre bovinos e ovinos. Nos volumosos do grupo 2, os valores para o kd entre bovinos e ovinos foram diferentes ($P < 0,05$) para silagem de sorgo e silagem de milho e semelhantes para feno de alfafa e silagem de milho, que não apresentaram o kd diferente ($P > 0,05$) para bovinos e ovinos (Tabela 3).

No farelo de soja, farelo de trigo e torta de algodão, os valores para o kd entre bovinos e ovinos foram diferentes ($P < 0,05$). Contudo, para o fubá de milho, o kd não diferiu ($P > 0,05$) entre as duas espécies (Tabela 3).

No grupo das fezes, apenas para as fezes de ovino BC os valores para o kd entre bovinos e ovinos foram diferentes ($P < 0,05$). Para as demais fezes analisadas (fezes de ovinos AC, fezes de bovinos AC e BC) não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) nos valores para o kd (Tabela 3).

Referente a degradabilidade da FDA (Tabela 4), os valores do kd entre bovinos e ovinos para os volumosos do grupo 1 (capim-braquiária, feno de tifton e cana-de-açúcar), foram diferentes ($P < 0,05$). Enquanto, os valores do kd entre bovinos e ovinos para o capim-elefante, não diferiram ($P > 0,05$).

Tabela2- Estimativas para a fração potencialmente degradável (B) da matéria seca (MS), taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal (kd) obtida a partir de bovinos e ovinos, fração indigestível da MS (MSi), limite superior do intervalo de confiança assintótico com 95% de probabilidade para a fração indigestível (LS) e tempo crítico (tc) para o alcance da fração MSi nas diferentes espécies.

	B (%)	kd ¹			MSi(%)	LS ²	Tc (horas) ³	
		Bovino	Ovino	P-valor ⁴			Bovino	Ovino
<i>Forragens Grupo 1</i>								
Capim-Braquiária	53,01	0,0339	0,0132	<0,001	38,18	41,39	133,1	341,6
Capim-elefante	55,45	0,0329	0,0152	<0,001	40,31	42,77	148,6	321,5
Feno de Tifton	49,04	0,0316	0,0134	<0,001	47,03	49,71	97,6	345,9
Cana-de-açúcar	22,01	0,058	0,0272	0,044	44,69	46,49	71,4	152,2
<i>Forragens Grupo 2</i>								
Silagem de milho	49,61	0,0272	0,0157	<0,001	38,28	40,45	180,3	312,3
Silagem de sorgo	46,37	0,0258	0,0121	<0,001	46,18	48,88	176,7	376,6
Silagem de milheto	36,47	0,00968	0,00489	<0,001	56,15	62,85	320,9	635,2
Feno de alfafa	43,65	0,0819	0,0819	0,061	50,21	52,3	58,5	58,5
<i>Alimentos concentrados</i>								
Farelo de soja	69,25	0,037	0,0195	<0,001	12,49	15,12	137,1	260,2
Farelo de trigo	65,02	0,0853	0,0853	0,076	28,1	29,96	63,4	63,4
Fubá de milho	70,45	0,0608	0,0429	<0,001	16,33	18,6	86,7	122,9
Torta de algodão	50,37	0,0156	0,008	<0,001	40,84	45,34	258,4	503,7
<i>Fezes</i>								
Ovinos - alto concentrado	52,41	0,0313	0,0201	0,003	40,28	42,36	160,3	249,8
Ovinos - baixo concentrado	26,93	0,0218	0,0218	0,137	68,1	70,24	191,5	191,5
Bovinos - alto concentrado	51,31	0,0296	0,021	0,014	36,88	38,88	170,3	240,1
Bovinos - baixo concentrado	31,09	0,0545	0,0327	0,045	58,1	60,57	76,6	127,7

¹kd – taxa de degradação

²LS – limite superior do intervalo de confiança assintótico a 95%

³Tc – tempo crítico

⁴Teste Identidade dos modelos

Nos volumosos do grupo 2 (silagem de milho, silagem de sorgo, silagem de milheto e feno de alfafa), os valores do kd entre bovino e ovinos não foram diferentes apenas para silagem de milho. Para o farelo de soja, farelo de trigo e a torta de algodão, os valores do kd diferiram ($P < 0,05$) entre bovinos e ovinos. Entretanto, não houve

diferença ($P>0,05$) nos valores do kd para o fubá de milho (Tabela 4). Os valores do kd entre bovinos e ovinos no grupo das fezes foram diferentes ($P<0,05$) para as fezes ovinos BC e fezes de bovinos AC. Para as fezes dos ovinos AC e dos bovinos BC não foram observadas diferenças ($P>0,05$) (Tabela 4).

Nas amostras onde ocorreram diferenças ($P<0,05$), para os valores do kd entre bovinos e ovinos, foram observadas uma relação inversamente proporcional, entre o kd e o tempo crítico (tc). Quanto maior o valor do kd, menor será o tc necessário para estimar a fração indigestível da MS, FDN e FDA (Tabelas 2, 3 e 4). Para as amostras em que no kd entre bovinos e ovinos não foram observadas diferenças ($P>0,05$), a relação entre o kd e o tc é de igualdade.

Relacionado ao tc estimado para obtenção da MSi, nos volumosos do grupo 1 e 2, foram necessários um tc superior à 180 horas de incubação *in situ* nos bovinos para se conhecer a MSi de todos os volumosos, com exceção da silagem de milho que necessitou de 320 horas ao total. Para os ovinos foram observados tc 370 horas (Tabela 2) para determinação da MSi. Com exceção do feno de alfafa, onde foram necessários um tc iguais para ambas as espécies (58,5 horas). A silagem de milho necessitou de 635 horas para determinação da MSi em ovinos.

Para obtenção da MSi no farelo de soja, fubá de milho e torta de algodão, foram necessários tc de 137,1, 86,7 e 258,4 horas de incubação em bovinos, respectivamente (Tabela 2). No farelo de trigo houve igualdade no tc (63,4 horas) entre as duas espécies.

Foram necessários um tc de 503,7 horas de incubação *in situ* em ovinos, para estimar a fração MSi da torta de algodão, sendo este tc maior do que para incubação em bovinos (258,4 horas). Considerou-se uma variação mínima entre os tempos críticos para obtenção da MSi nas das fezes de ovinos AC, bovinos AC e bovinos BC (aproximadamente 76 horas de incubação *in situ*) em bovinos. Enquanto, o tc para a MSi das fezes de ovinos BC foram iguais entre espécies (191,5 horas).

Estimativas para as frações indigestíveis na FDN, em todos os volumosos do grupo 1 e, nos volumosos silagem de sorgo e silagem de milho referentes ao grupo 2 observou-se tc superiores à 336 horas de incubação *in situ* em ovinos (Tabela 3).

Tabela3 - Estimativas para a fração potencialmente degradável (B) da fibra em detergente neutro (FDN), taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal (kd) obtida a partir de bovinos e ovinos, fração indigestível da FDN (FDNi), limite superior do intervalo de confiança assintótico com 95% de probabilidade para a fração indigestível (LS) e tempo crítico (tc) para o alcance da fração FDNi nas diferentes espécies

	B (%)	kd ¹			FDNi (%)	LS ²	Tc (horas) ³	
		Bovino	Ovino	P-valor ⁴			Bovino	Ovino
<i>Forragens Grupo 1</i>								
Capim-Braquiária	67,9	0,0325	0,01177	<0,01	33,56	36,96	145,9	405,2
Capim-elefante	68,18	0,025	0,01322	<0,01	33,89	36,59	201,0	380,5
Feno de Tifton	57,5	0,0231	0,00977	<0,01	39,95	42,87	204,5	483,5
Cana-de-açúcar	33,77	0,0232	0,00743	<0,01	64,24	67,67	166,8	520,7
<i>Forragens Grupo 2</i>								
Silagem de milho	56,71	0,0221	0,02211	0,99	42,85	45,86	211,6	211,6
Silagem de sorgo	56,52	0,018	0,00761	<0,01	43,24	47,02	243,8	576,6
Silagem de milheto	47,36	0,0096	0,00551	<0,01	53,94	62,23	328,9	575,4
Feno de alfafa	33,35	0,0313	0,03133	0,361	67,21	69,93	132,4	132,4
<i>Alimentos concentrados</i>								
Farelo de soja	85,61	0,0346	0,01633	<0,01	19,25	24,02	133,3	282,9
Farelo de trigo	51,28	0,0318	0,00895	<0,01	35,14	39,25	131,0	465,4
Fubá de milho	61,18	0,0215	0,02155	0,18	26,94	33,16	190,1	190,1
Torta de algodão	51,86	0,0152	0,00599	<0,01	29,74	36,21	237,5	611,7
<i>Fezes</i>								
Ovinos - alto concentrado	45,77	0,0167	0,01677	0,357	53,54	58,01	234,7	234,7
Ovinos - baixo concentrado	27,5	0,0163	0,00435	<0,01	70,03	76,33	172,5	646,2
Bovinos - alto concentrado	32,22	0,0227	0,02277	0,99	66,38	72,02	139,7	139,7
Bovinos - baixo concentrado	22,83	0,0335	0,03355	0,811	76,16	80,28	93,5	93,5

¹kd – taxa de degradação

²LS – limite superior do intervalo de confiança assintótico a 95%

³Tc – tempo crítico

⁴Teste Identidade dos modelos

Nos bovinos apenas na silagem de milheto foi observado tc superior a 336 horas de incubação. O tc para obtenção da FDNi na silagem de milho e feno de alfafa, em ovinos e bovinos foram inferiores ao tc aos demais volumosos estudados e iguais entre as espécies. Para FDNi da fubá de milho o tc foi de 190,1 horas para ambas espécies. Observou-se para a torta de algodão, quando incubada em ovinos, o maior tc (611,7

horas) para estimativa da FDN_i, entre os alimentos concentrados.

Para o grupo das fezes, o material com maior tc de incubação em ovinos, foram as fezes de ovinos BC (646,2 horas), obtendo-se para este mesmo material um tc (172,5 horas) inferior, quando incubado em bovinos.

Nos volumosos (grupo 1 e 2), os tempos críticos maiores que 192 horas para atingir a degradabilidade da FDA, foram observados em bovinos (Tabela 4), com exceção do feno de alfafa, onde o tc foi de 84,9 horas de incubação em bovinos. Os volumosos capim-braquiária, feno de Tifton, silagem de milho, silagem de sorgo e silagem de milheto, quando incubados nos ovinos, alcançaram a fração indigestível da FDA com tc maiores que 336 horas de incubação, exceto o capim-elefante com tc inferior (193 horas) para ambas as espécies, assim como o feno de alfafa com tc inferior a 336 horas.

Tempos críticos superiores à 96 horas em bovinos foram observados para farelo de trigo, fubá de milho e torta de algodão quando estimadas as frações indigestíveis da FDA. Entretanto, para o farelo de soja, em bovinos, o tc foi inferior (37,5 horas) que os demais alimentos concentrados. Para a degradabilidade da FDA no farelo de trigo e na torta de algodão, incubados em ovinos, foram observados tc superiores à 336 horas, necessárias para alcançar estimativas das FDA_i. O tc necessário para obtenção da FDA_i no fubá de milho foram iguais para ambas as espécies. Para o grupo de fezes, em bovinos, foram observados tc superiores à 192 horas de incubação, nas fezes de ovinos BC e fezes de bovinos AC. Nos ovinos, para essas mesmas fezes analisadas, foram observados tc superiores à 336 horas de incubação (Tabela 4).

Tabela4 - Estimativas para a fração potencialmente degradável (B) da fibra em detergente ácido (FDA), taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal (kd) obtida a partir de bovinos e ovinos, fração indigestível da FDA (FDAi), limite superior do intervalo de confiança assintótico com 95% de probabilidade para a fração indigestível (LS) e tempo crítico (tc) para o alcance da fração FDAi nas diferentes espécies

	B (%)	kd ¹			FDAi (%)	LS ²	Tc (horas) ³	
		Bovino	Ovino	P-valor ⁴			Bovino	Ovino
<i>Forragens Grupo 1</i>								
Capim-Braquiária	69,08	0,02244	0,00833	<0,001	28,8	32,41	209,4	562,9
Capim-elefante	62	0,02488	0,02488	0,99	36,81	39,8	193,0	193,0
Feno de Tifton	60,97	0,01599	0,00908	<0,001	41,16	45,7	267,7	468,7
Cana-de-açúcar	40,05	0,02088	0,00867	<0,001	60,07	62,77	210,5	504,9
<i>Forragens Grupo 2</i>								
Silagem de milho	65,12	0,01166	0,01166	0,284	34,77	39,78	363,4	363,4
Silagem de sorgo	58,32	0,01677	0,00894	<0,001	44,86	48,8	262,0	489,5
Silagem de milheto	47,71	0,00966	0,00512	<0,001	51,7	60,12	299,6	617,1
Feno de alfafa	31,51	0,04255	0,01444	0,026	61,27	65,2	84,9	250,6
<i>Alimentos concentrados</i>								
Farelo de soja	60,2	0,09888	0,04077	0,032	18,15	23,28	37,5	100,5
Farelo de trigo	42,09	0,01366	0,00621	<0,001	49,03	56,11	237,0	518,9
Fubá de milho	45,55	0,02222	0,02222	0,053	46,54	56,59	143,1	143,1
Torta de algodão	36,96	0,03499	0,00754	<0,001	45,86	49,41	103,9	522,4
<i>Fezes</i>								
Ovinos - alto concentrado	27,26	0,02455	0,02455	0,99	70,77	75,79	126,7	126,7
Ovinos - baixo concentrado	26,85	0,01344	0,00631	0,014	66,63	72,12	221,2	469,7
Bovinos - alto concentrado	34,08	0,00886	0,00487	0,017	63,58	74,44	265,6	457,2
Bovinos - baixo concentrado	24,93	0,02633	0,02633	0,651	74,02	77,82	127,5	127,5

¹kd – taxa de degradação

²LS – limite superior do intervalo de confiança assintótico a 95%

³Tc – tempo crítico

⁴Teste Identidade dos modelos

A silagem de milheto obteve o maior tempo de incubação para estimativas da fração indigestível da MS tanto em ovinos quanto em bovinos (Figura 4). Com exceção deste volumoso, o tempo de incubação em bovinos que contempla todos os alimentos e fezes é o de 288 horas. Nota-se que os elevados tempos observados para incubação em bovinos indica a impossibilidade operacional no uso desta espécie para estimação de

indicadores internos via incubação in situ. Observou-se que para obtenção da FDNi nas fezes de ovinos BC e na torta de algodão os tempos críticos encontrados foram superiores as demais amostras (Figura 5) e que o tempo de incubação de 240 horas em bovinos contempla a estimação de indicadores internos para a maioria dos alimentos, com exceção da silagem de milho que requereu 336 horas. Tempos superiores a 500 horas foram estimados para incubação de indicadores internos em ovinos Para a FDAi foram observados tempos críticos superiores para braquiária brizanta e silagem de milho (Figura 6), e tempos mínimos de 336 horas para avaliação de todos os alimentos em incubação in situ embovinos.

Figura4 - Representação gráfica dos tempos críticos (horas) entre bovinos e ovinos para indigestibilidade da MS dos alimentos e fezes

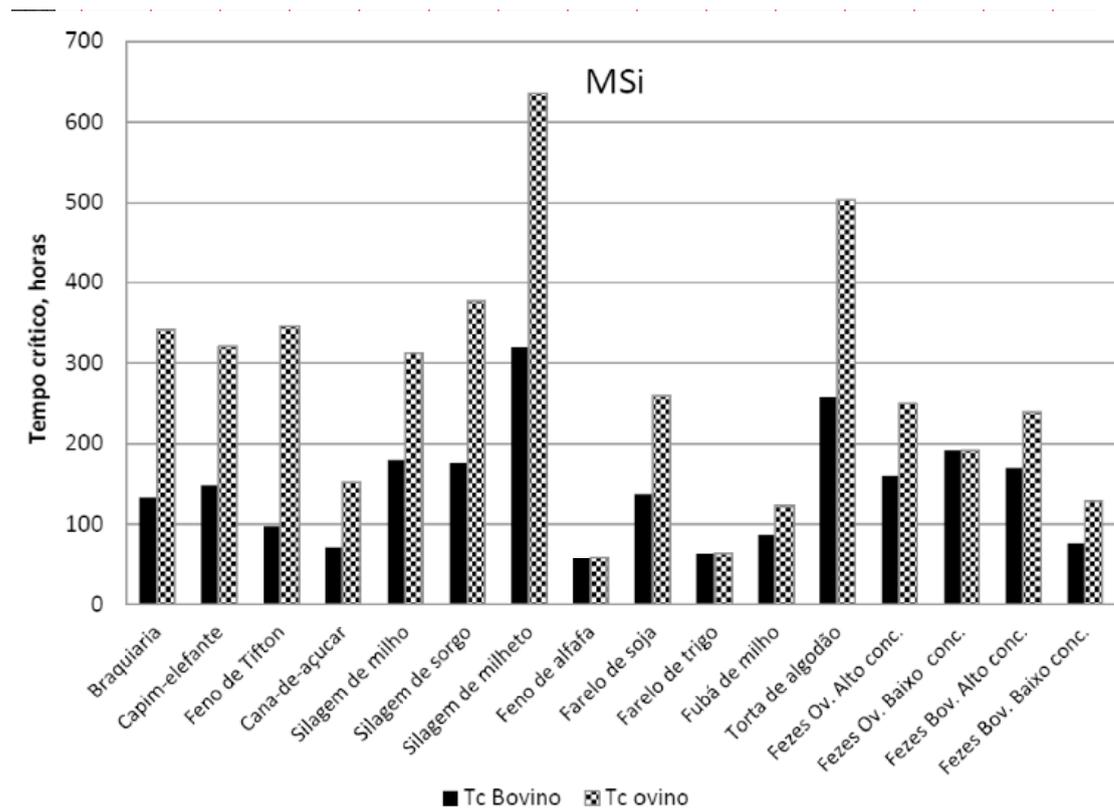


Figura5- Representação gráfica dos tempos críticos (horas) entre bovinos e ovinos para indigestibilidade da FDN dos alimentos e fezes

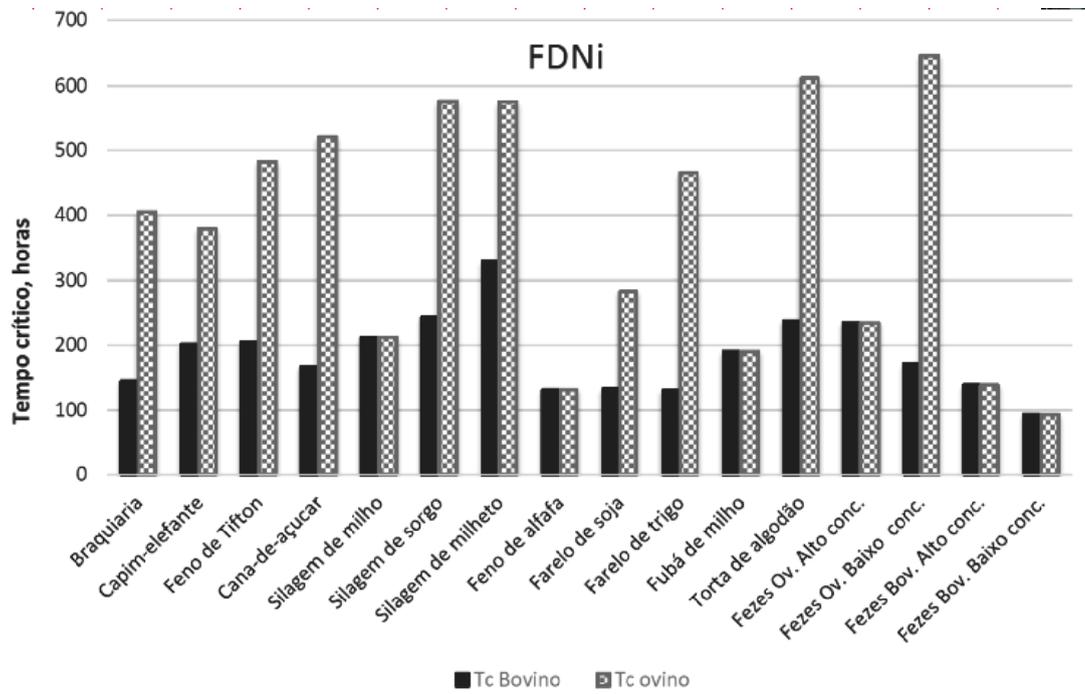
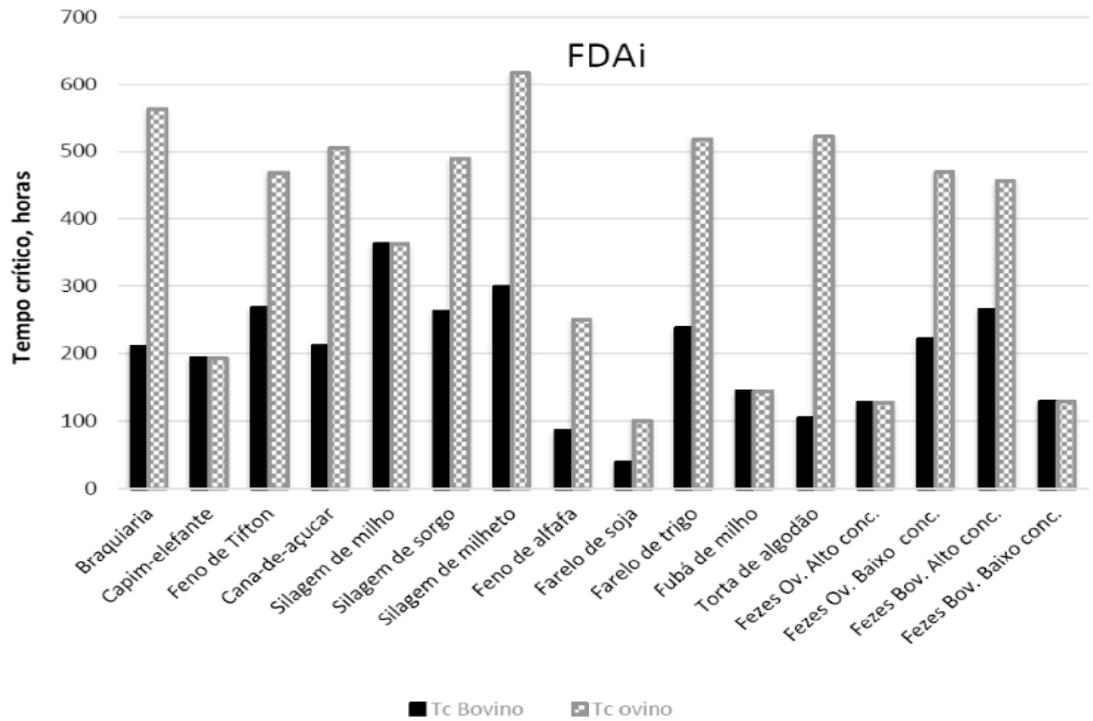


Figura6 - Representação gráfica dos tempos críticos (horas) entre bovinos e ovinos para indigestibilidade da FDA dos alimentos e fezes



5 DISCUSSÃO

Partindo do pressuposto que a fração indigestível é uma característica inerente ao substrato (Ørskov, 2000), e que essa fração não é influenciada por características físicas ou dos componentes dos alimentos e fezes incubados, é sabido que as diferenças no kd e tc entre ovinos e bovinos podem estar aliadas às características fisiológicas ruminais entre as duas espécies. Segundo Huntington e Givens (1997), os efeitos da espécie animal na degradação *in situ* da matéria seca de feno, utilizando-se vacas da raça Holandesa e ovinos da raça Suffolk, diferiu o kd entre as espécies, implicando em valores maiores de degradação efetiva da MS em ovinos.

Por tanto, quanto ao estudo sobre as frações indigestíveis considera-se que o tc para degradar as frações de alimentos e fezes é superior nos ovinos em relação aos bovinos, contudo para o kd essa relação é inversa. Também o kd pode ser similar para alguns alimentos e fezes, concordando com valores encontrados por Campos et al. (2006), que avaliando os valores de kd estimados em dois tempos de incubação (tempos 6 e 24h ou 6 e 36h), verificou que, quando o kd comparados com os valores obtidos em vários tempos de incubação mostraram-se similares.

Os alimentos e fezes quando incubados em bovinos apresentam maior taxa de degradação ruminal. Essa disparidade entre as espécies pode ser atribuída ao ambiente ruminal, considerando que estes animais apresentam volume ruminal distintos, proporcionando assim diferenças na diluição do saco imerso no rúmen, quantidade e perfil de microorganismos presentes no sítio de degradação. Foram observadas diferenças ($P < 0,05$) do kd entre bovinos e ovinos para a maioria dos volumosos dos grupos 1 e 2 na degradabilidade da MS, exceto para cana-de-açúcar e feno de alfafa, podendo ser explicado pela grande quantidade de carboidratos solúveis presentes nesses volumosos, fazendo com que os mesmos tenham uma taxa de degradação mais rápida e similares (Tabela 2). Santos et al. (2012), justificou estudo similar, considerando que a fração indigestível da cana-de-açúcar apresenta elevados teores de lignina, concordando com o comportamento do tempo crítico desse volumoso para estimar a FDNi e FDAi (Tabela 3 e 4).

No grupo dos concentrados, o farelo de trigo não diferiu o kd entre bovinos e ovinos, quando estimada a degradabilidade da MS, bem como obteve o menor tc em

relação aos demais concentrados avaliados, isso se deve ao elevado teor de amido contido no farelo de trigo, acarretando uma rápida degradação ruminal (Tabela 2). Houve diferença no kd para as fezes analisadas, podendo ser explicada pela superioridade dos bovinos em envolver as amostras no rúmen, com intervenção de seu volume da fração líquida da digesta e motilidade ruminal, fatores estes que podem interferir positivamente no tempo de colonização dos microrganismos ruminais (Tabela2).

Segundo Casali et al. (2008), as fezes apesar de uma maior lignificação, constituem material reincidente ao ambiente ruminal, o que implica características que diferem dos demais alimentos fibrosos, comparadas a cana-de-açúcar, justificando o seu comportamento diferente em relação a esses materiais.

Quanto a degradabilidade da FDN, nos volumosos do grupo 2, para silagem de sorgo e silagem de milho o kd e o tc diferiram entre as espécies, sendo observados tc superiores a 336 horas de incubação nos ovinos. A degradabilidade da FDN do milho relatada por Brunette et al. (2014) para a silagem do milho foi de 32,5%, valor que se aproxima ao valor encontrado neste estudo. A baixa taxa de degradação da silagem de milho pode ser atribuída a características físicas e estruturais da sua parede celular, que podem dificultar o acesso microbiano (VAN SOEST, 1994), assim como ocorre também com a silagem de sorgo.

O feno de alfafa, diferiu o kd e tc entre ovinos e bovinos na degradabilidade da MS, FDN e FDA, com um menor tempo de incubação para as duas espécies quando comparados aos demais volumosos. Esse fato pode ser explicado já que a leguminosa possui teores mais baixos de fibra fermentável, com isso a fermentação ocorre mais rapidamente e, como sua taxa de passagem é acelerada, acarreta um menor tc para sua degradação.

Considerando as diferenças existentes no rúmen dos ovinos e bovinos, constatamos variações nos tempos de incubação para estimar as frações indigestíveis dos alimentos e fezes, entre essas espécies. Concordando com Casali et al. (2008), que relatou ser o tempo de incubação ruminal uma das variáveis de maior influência para representar os resíduos indigestíveis na técnica de incubação *in situ*.

Na obtenção da MS_i, nos volumosos do grupo 1 e 2, foram necessários um tc superior à 48 horas de incubação *in situ* nos bovinos. Para os ovinos foram observados

tc superiores à 144 horas (Tabela 2). Diferente do tempo de incubação proposto por Cochran et al. (1986), de até 144 horas de incubação.

Para estimar a fração MSi da torta de algodão, foram necessários um tc de 503,7 horas de incubação *in situ* em ovinos, sendo este tc maior do que para incubação em bovinos (258,4 horas). Essa diferença confirma a ideia de que alimentos e fezes oriundos de ensaios de digestibilidade em ovinos podem ser incubados em bovinos.

Tempo crítico superior a 336 horas foram observados para silagem de sorgo e silagem de milho na estimativa da FDNi, quando incubados em ovinos. Esse tc contradiz o tc de 288 horas proposto por Valente et al. (2011), sendo que 288 horas pode sim ser utilizado na estimativa de frações indigestíveis, com exceção de alguns alimentos.

6 CONCLUSÃO

Recomenda-se que não se utilize a espécie ovina para obtenção de indicadores internos com base em ensaios de degradação *in situ* em razão do elevado tempo de incubação para obtenção da fração indegradável dos alimentos e fezes. Por outro lado, os indicadores internos MSi e FDNi podem ser obtidos a partir de 264 horas de incubação *in situ* em bovinos, com exceção da silagem de milho, que deve ser obtida a partir de 336 horas. Por sua vez, a FDAi pode ser obtida a partir de 288 horas de incubação *in situ*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFRC, 1992. Nutritive requirements of ruminant animals: protein. **Agricultural and Food Research Council**, Technical committee on responses to nutrients. Nut, Abs. Rev., Series B, Report, n. 9, p. 65-71.
- AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY). Official Methods of Analysis. 17 ed., Washington: AOAC 2000.
- AOAC.(ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). Official methods of analysis. 15 ed., Washington: AOAC, 1990.
- ASTIGARRAGA, L. Técnicas para la medición del consumo de rumiantes en pastoreo. In: SIMPÓSIO SOBRE AVALIAÇÃO DE PASTAGENS COM ANIMAIS, 1997, Maringá. **Anais de evento**. Maringá: UEM, 1997. p.1-23.
- BEECHER M.; BAUMONT R.; AUFRERE J. A comparison of two enzymatic *in vitro* methods to predict *in vivo* organic matter digestibility of perennial ryegrass. **Livestock Science**.v. 177, July 2015, p.33–42.
- BERCHIELLI, T.T.; ANDRADE, P.; FURLAN, C.L. et al. Avaliação de indicadores internos em ensaios de digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.830-833. 2000.
- BLAXTER, K.L.; MARTIN, A.K. The utilization of protein as a source of energy in fattening sheep. **British Journal of Nutrition**, v.16, p.397–407, 1962.
- BOWMAN J.G.P.; FIRKINS J.L. Effects of forage species and particle size on bacterial cellulolytic activity and colonization in situ. **J. Anim. Sci.** 71, 1623–1633. 1993.
- BRODERICK, G. A. COCHRAN, R. C. In vitro and In situ methods for estimating digestibility with reference to protein degradability. In: THEODOROU, M. K. and FRANCE, J. **Feeding Systems and Feed Evaluation Models**. CAB International. p. 53-85, 2000.
- BRODERICK, G.A, MERCHEN, N.R. 1992. Markers for quantifying microbial protein

synthesis in the rumen. **J. Dairy Sci.** 75:2618.

BRUNETTE T.; BAURHOO B.; MUSTAFA A. F. Replacing corn silage with different forage millet silage cultivars: effects on milk yield, nutrient digestion, and ruminal fermentation of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.97, n.10, p.6440-6449, 2014.

CABRAL, L.S.; VALADARES FILHO, S.C.; DETMANN, E.; ZERVOUDAKIS, J.T.; SOUZA, A.L.; VELOSO, R.G. Avaliação de indicadores na estimação da excreção fecal e da digestibilidade em ruminantes. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.1, p.29-34, 2008.

CAMPOSP.R.S.S.; VALADARES S.C.; CECON P.R.; DETMANN E.; LEÃO M. I.; SOUZA S. M.; LUCCHI B. B.; VALADARES R. F. D. Estudo comparativo da cinética de degradação ruminal de forragens tropicais em bovinos e ovinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 58, n.6, p.1181-1191, 2006.

CARVALHO G. P.; GARCIA R.; PIRES A. J. V.; SILVA R. R.; DETMANN E.; OLIVEIRA L. R.; RIBEIRO L. S. O. Long-term Bias of Internal Markers in Sheep and Goat Digestion Trials. **Asian-Australas J AnimSci.** 2013; 26(1): 65–71.

CASALI A. O. Procedimentos metodológicos in situ na avaliação do teor de compostos indigestíveis em alimentos e fezes de bovinos. **Dissertação de Mestrado em Zootecnia**, UFV. 58p. 2006.

CASALI, A. O.; DETMANN, E.; FILHO, S. C. V.; PEREIRA, J. C.; CUNHA M.; K DETMANN S. C.; PAULINO M. F. Estimação de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v. 38, n.1, 2009, p.130-138.

CASALI, A. O.; DETMANN, E.; FILHO, S. C. V.; PEREIRA, J. C.; HENRIQUES, L. T.; FREITAS, S. G.; PAULINO, M. F. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidas por procedimentos in situ. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v. 37, n. 2, p. 335-342, 2008.

CHEN, X.B.; GOMES, M.J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – An overview of technical details. **International Feed Research Unit**. Rowett Research Institute, Aberdeen, UK. (Occasional publication). p.21, 1992.

CLIPES, R.C.; DETMANN, E.; COELHO DA SILVA, J.F. et al. Evaluation of acid detergent insoluble protein as an estimator of rumen non-degradable protein in tropical grass forages. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.694-697, 2006.

COCHRAN, R.C.; ADAMS, D. C.; WALLACE, J. D.; GALYEAN, M. L. Predicting digestibility of different diets with internal markers: evaluation of four potential markers. **Journal of Animal Science**, v. 63, p. 1476-1483, 1986.

DETMANN E.; PAULINO M. F.; MANTOVANI H. C.; VALADARES FILHO S. C.; SAMPAIO A. B.; SOUZA M. A.; LAZZARINI I.; KSC DETMANN. Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis–Menten kinetics. **Livestock Science**. 126 (2009) 136–146.

DETMANN E.; ZERVOUDAKIS J. T.; CABRAL L. S.; JUNIOR ROCHA V. R.; VALADARES FILHO S. C.; QUEIROZ A. C.; PONCIANO N. J.; FERNANDES A. M. Validação de Equações Preditivas da Fração Indigestível da Fibra em Detergente Neutro em Gramíneas Tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.33, n.6, p.1866-1875, 2004.

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T.; FILHO, S. C. V.; EUCLYDES R. F.; LANA R. P.; QUEIROZ D. S. Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 30, p.1600-1609, 2001.

DETMANN, E.; SOUZA, A.L.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S.C.; CABRAL, L.S.; ZERVOUDAKIS, J.T. Avaliação do vício de “tempo longo” de indicadores internos em ensaio de digestão com ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, p.182-188, 2007.

DETMANN, E.; SOUZA, M. A.; VALADARES FILHO, S. C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T. T.; SALIBA, E. O. S.; CABRAL, L. S.; PINA, D. S.; LADEIRA, M. M.; AZEVEDO, J. A. G. Métodos para análise de alimentos - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal, INCT. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2012. p. 214.

DOVE H.; COOMBE J. B. Comparison of methods for estimating supplement intake and diet digestibility in sheep. **Proceedings of the Australian Society of Animal Production**. 19, 239 – 241. 1992.

ELLIS W. C. D. P.; POPPI J. H.; MATIS H.; LIPPKE T. M.; HILL AND F. M. ROQUETTE. Dietary-digestive-metabolic interactions determining the nutritive potential of ruminant diets. **Nutritional Ecology of Herbivores**. 423-481. 1999.

FAY J. P; OVEJERO F. M. A. Effect of lactate on the in vitro digestion of *Agropyronelongatum* by rumen microorganisms. **Anim. FeedSci. Technol.** v.16, p.161-167. 1986.

FERREIRA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; MARCONDES, M.I.; PAIXÃO, M.L; PAULINO, M.F.; VALADARES, R.F.D. Avaliação de indicadores em estudos com ruminantes: digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.8, p.1568-1573, 2009.

FERRET A.; PLAIXATS J.; CAJA G.; PRIÓ P. Using markers to estimate apparent dry matter digestibility, faecal output and dry matter intake in dairy ewes fed Italian ryegrass hay or alfalfa hay. **Small Ruminant Research**. 33 (1999) 145-152.

HARTER C. J. 2009. Desenvolvimento e avaliação de um método in vitro para estimar a degradabilidade das proteínas no rúmen. Dissertação de Mestrado em Zootecnia, UFSM, RS. 96 p.

HUHTANEN P.; KAUSTELL K.; JAAKKOLA S. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Animal Feed Science and Technology**. v.48, p.211-227, 1994.

HUNTINGTON J. A.; GIVENS D. I. Studies on in situ degradation of feeds in the men: 2. The effect of bag numbers incubated and post-incubation processing of residues. **Animal Feed Science Technology**. v. 68, p. 115-129, 1997.

HUNTINGTON J. A.; GIVENS D. I. The in situ technique for studying rumen degradation of feeds: a review of the procedure. **Nutr. Abst. Rev. (Series B)**. v.65, p.63-95, 1995.

HVELPLUND, T. and WEISBJERG, M.R. In Situ techniques for the estimation of protein degradability and postruminal availability. In: GIVENS, D. I., OWEN, E., AXFORD, R.F.E. and OMED H.M. **Forage Evaluation in Ruminant Nutrition**. CAB International. p. 233- 257, 2000.

ÍTAVO L. C. V.; SILVA F. F.; VALADARES FILHO S. C. et al. Digestibilidade de feno de gramíneas do Gênero Cynodon através de indicadores internos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 2000, Viçosa, MG. **Anais de evento**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2000. p.401.

ÍTAVO L. C. V.; VALADARES FILHO S. C.; SILVA F. F.; VALADARES R. F. D.; PAULIN M. F.; ÍTAVO FERREIRA C. C. B.; MORAES E. H.B. K. Comparação de Indicadores e Metodologia de Coleta para Estimativas de Produção Fecal e Fluxo de Digesta em Bovinos. **R. Bras. Zootec**. v.31, n.4, p.1833-1839, 2002.

JUDKINS, M.B.; KRYSL, L.J.; BARTON, R.K. Estimating diet digestibility: a comparison of 11 techniques across six different diets fed to rams. **Journal of Animal Science**. V.68, n.5, p.1405-1415, 1990.

KRISZAN S. J.; AHVENJARVI S.; HUHTANEN P. A meta-analysis of passage rate estimated by rumen evacuation with cattle and evaluation of passage rate prediction models. **Journal of Dairy Science**. v. 93 n. 12, 2010.

KRISZAN S. J.; RINNE M.; NYHOLM L.; HUHTANEN P. New recommendations for the ruminal in situ determination of indigestible neutral detergent fibre. **Animal Feed Science and Technology**. 205 (2015) 31–41.

KRYSL L.J.; GALYEAN M.L.; ESTELL, R.E. et al. Estimating digestibility and faecal output in lambs using internal and external markers. **Journal of Agricultural Science**.v.111, n.1, p.19-25,1988.

LAPIERRE H.; LOBLEY G. E. Nitrogen recycling in ruminants: a review. **J. Dairy Sci.** 84: E223-236. 2001.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminants feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 57, n. 4, 1996, p. 347-358.

LIPPKE, H.; ELLIS, W.C.; JACOBS, B.F.; Recovery of indigestible fiber from feces of sheep and cattle on forage diets. **Journal of Dairy Science**.v.69, n.2, p.403-412, 1986.

LITTLE C. O.; BURROUGHS W.; WOODS W. Nutritional Significance of Soluble Nitrogen in Dietary Proteins for Ruminants.**Journal of Animal Science**. v. 22 n. 2, p. 358-363. 1963.

LOPEZ S.; CARRO M. D.; GONZALES J. S.; OVEJERO F. J. Comparison of different *in vitro* and *in situ* methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen, **Animal Feed Science and Technology**. v.73: 99-113. 1998.

MACHADO P. A. S.; VALADARES FILHO S. C.; DETMANN E.; SANTOS S. A.; VALADARES R. F. D.; DUCATTI C.; ROTTA P. P.; COSTA E SILVA L. F. Development of equations to estimate microbial contamination in ruminal incubation residues of forage produced under tropical conditions using ^{15}N as a label. **Journal of Animal Science**.91:3836-3846. 2013.

MALAFAIA, P.A.M.; VALADARES FILHO, S.C.; VIEIRA, R.A.M. et al. Determinação das frações que constituem os carboidratos totais e da cinética ruminal da fibra em detergente neutro de alguns alimentos para ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.4, p.790-796, 1998.

MCDONALD I.A revised model for the estimation of protein degradability in the

rumen. **Journal of Agricultural Science**, v. 96, p. 251–252, 1981.

MEHREZ A.Z.; ØRSKOV, E.R. The use of a Dacron bag technique to determine rate of degradation of protein and energy in the rumen. **J. Agric. Sci. (Camb.)** 88, 645–650. 1977.

MERTENS, D.R. Rate and extent of digestion. In: FORBES, J.M. AND FRANCE, J. **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. CAB International. 1993.

MERTENS, D.R.; LOFTEN, J.R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics in vitro. **Journal of Dairy Science**. v.63, p.1437-1446, 1980.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirement of beef cattle. 7.ed. Washington, DC.: National Academy Press, 1996. 242p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. 7 ed. Whashington, D.C. National Academic Press, 2001. p. 381.

NOCEK, J.E. 1988. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: A review. **J. Dairy Sci.**

NOZIÈRE, P.; MICHALET-DOREAU, B. *In sacco* methods. In: D´MELLO, J.P.F. (Ed.) **Farm animal metabolism and nutrition**. London: CAB International, 2000. p.233-253.

ØRSKOV, E. R., HOVELL, F. D.DeB; MOULD, F. The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. **Tropical Animal Production**, v. 5, n. 3, p. 195-213, 1980.

ØRSKOV, E.R. e MCDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v. 92, p. 499–503, 1979.

PETIT, H.V.; RIOUX, R.; TREMBLAY, G.F. Evaluation of forages and concentrates by the “in situ” degradability technique. In : **SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE**

NUTRIÇÃO DE RUMINANTES. Maringá, 1995, p. 119 –133.

POTT E.B.; PRATES E.R.; LEBOUTE E.M. 1978. Correlações entre os coeficientes de digestibilidade da matéria seca e entre os da matéria orgânica determinados com animais e por técnica “*in vitro*”. **R. Soc. Bras. Zootec.**7 (1):26-42.

RAFFRENATO, E. & VAN AMBURGH, M. E. Development of a mathematical model to predict sizes and rates of digestion of a fast and slow degrading pool and the indigestible NDF fraction. **Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers Proceedings**, Syracuse, N.Y., USA. 2010.

REGAZZI, A.J. Teste para verificar a igualdade de parâmetros e a identidade de modelos de regressão não linear. **Revista Ceres**, v.50, p.9-26, 2003.

ROCHA JR., V.R.; VALADARES FILHO, S.C.; BORGES, A.M. et al. Estimativa do valor energético dos alimentos e validação das equações propostas pelo NRC (2001). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v., 32, n.2, p.480-490, 2003.

ROTTA P. P; VALADARES FILHO S. C.; DETMANN E.; COSTA E SILVA L. F.; PAULINO M. F.; MARCONDES M. I.; LOBO A. A. G.; VILLADIEGO F. A. C. Digesta sampling sites and marker methods for estimation of ruminal outflow in bulls fed different proportions of corn silage or sugarcane. **Journal of Animal Science**. v. 92 n. 7, p. 2996- 3006. 2013.

SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; PILÓ-VELOSO, D.; GONÇALVES, L. C.; BORGES, I. Utilização da lignina isolada da palha de milho como indicador de digestibilidade. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 36., 1999, Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999. p. 145-147.

SAS Institute. SAS/STAT User's guide, Version 9.2. **SAS Institute Inc.**, Cary, NC. 2008.

SNIFFEN, C. J.; CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J. A net carbohydrate and protein system for evaluation cattle diets. II Carbohydrate and protein availability. **Journal of**

Animal Scienc.Savoy, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, 1992.

SUNVOLD G. D.; COCHRAN R. C. Technical note: evaluation of acid detergent lignin, alkaline peroxide lignin, acid insoluble ash, and indigestible acid detergent fiber as internal markers for prediction of alfalfa, bromegrass, and prairie hay digestibility by beef steers. **Journal of Animal Science.**v. 69, 12, p. 4951-4955. 1991.

TAMMINGA, S., P. H.ROBINSON,M. VOGT, AND H.BOER. 1989. Rumen ingesta kinetics of cell wall components in dairy cows. **Anim. Feed Sci. Technol.** 25:89–98.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops.**Journal of British Grassland Society**, v.18, p.104-111, 1963.

UDEN P. The influence of leaf and stem particle size in vitro and of sample size in sacco on neutral detergent fibre fermentation kinetics. **Anim. Feed Sci. Technol.** 37, 85–97. 1992.

VALENTE, T.N.P.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. In situ estimation of indigestible compounds contents in cattle feed and feces using bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.666-675, 2011.

VAN AMBURGH M. E.; GRANT R. J.; COTANCH K. W. et al. NDF - Making something old, new again. In: Health and Nutrition Conference Manada. **Anais de evento.PRO-DAIRY** Program in the College of Agriculture and Life Sciences.Cornell University - 2015.

VAN MILGEN, J.; MURPHY,L.L.; BERGER, L.L. A compartmental model to analyze ruminal digestion.**Journal of Dairy Science.**v.74, p.2515-2529, 1991.

VAN SOEST P.J. **Nutrional ecology of the ruminant.**2.ed. Ithaca: Cornell University Press, p. 476, 1994.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarchpolyssacharides in relation to animal nutrition.**Journal of Dairy Science.**[S.l.], 1991, v. 74, n. 10, p.3583-3597.

VANZANT, E. S.; COCHRAN R. C.; TITGEMEYER, E. C. Standardization of In Situ Techniques for Ruminant Feedstuff Evaluation. **Journal of Animal Science**, v. 76: p. 2717– 2729, 1998.

VIEIRA, R.A.M.; PEREIRA, J.C.; MALAFAIA, P.A.M. et al. Simulação da dinâmica de nutrientes no trato gastrintestinal: aplicação e validação de um modelo matemático para bovinos a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.3, p.898-909, 2000.

WATANABE P. H.; EZEQUIEL J. M. B.; GALATI R. L.; BIAGIOLI B.; SILVA O. G. C. Indicadores internos indigestíveis para a estimativa das digestibilidades de dietas à base de coprodutos. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** v.11, n.3, p.849-857, 2010.

YAHAGHI M.; LIANG J. B.; BALCELLS J.; VALIZADEH R.; JAHROMI M. F.; ALIMON R.; HO Y. W. Extrusion of sorghum starch enhances ruminal and intestinal digestibility, rumen microbial yield and growth in lambs fed on high-concentrate diets. **Animal Feed Science and Technology**.v. 189, p. 30– 40, 2014.

ZEOULA, L.M.; KASSIES, M.P.; FREGADOLLI, F.L. et al. Uso de marcadores na determinação da digestibilidade parcial e total em bovinos. **Acta Scientiarum**, v.22, n.3, p.771-777, 2000.

ZEOULA, L.M.; PRADO, I.N.; MOURA, D.P.H.; GERON, L.J.V.; CALDAS NETO, S.F.; MAEDA, E.M.; PERON, P.D.P.; ARAUJO, M.J.; FALCÃO, A.J.S. Recuperação fecal de indicadores internos avaliados em ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 31, n.4, p.1865-1874, 2002.