

PEDRO HENRIQUE REZENDE DE ALCÂNTARA

**PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS PARA ISOLAMENTO *IN SITU* DE
COMPONENTES FIBROSOS INDIGESTÍVEIS EM OVINOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A347p
2012

Alcântara, Pedro Henrique Rezende de, 1988-
Procedimentos metodológicos para isolamento *in situ* de
de componentes fibrosos indigestíveis em ovinos / Pedro
Henrique Rezende de Alcântara. – Viçosa, MG, 2012.
ix, 50f. : il. ; 29cm.

Orientador: Cristina Mattos Veloso.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Fibras na nutrição animal. 2. Indicadores biológicos.
3. Ovino - Alimentação e rações. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.39085

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	8
CAPÍTULO 1 - Avaliação do período de incubação <i>in situ</i> em ovinos e investigação da contaminação mineral no isolamento da fibra insolúvel em detergente neutro indigestível (FDNi) de diferentes materiais	12
Resumo.....	12
Abstract.....	13
Introdução.....	14
Material e Métodos.....	16
Resultados e Discussão.....	21
Conclusões.....	25
Referências Bibliográficas.....	26
CAPÍTULO 2 - Influência da dieta sobre os tempos de incubação em ovinos para o isolamento <i>in situ</i> da fibra insolúvel em detergente neutro indigestível (FDNi) e da fibra insolúvel em detergente ácido indigestível (FDAi) de diferentes volumosos	29
Resumo.....	29
Abstract.....	30
Introdução.....	31
Material e Métodos.....	32
Resultados e Discussão.....	37
Conclusões.....	42
Referências Bibliográficas.....	42

RESUMO

ALCÂNTARA, Pedro Henrique Rezende de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2012. **Procedimentos metodológicos para isolamento *in situ* de componentes fibrosos indigestíveis em ovinos.** Orientador: Cristina Mattos Veloso. Coorientadores: Edenio Detmann e Rogério de Paula Lana.

Esta dissertação foi elaborada a partir de dados gerados em dois experimentos com procedimentos para o isolamento da fibra insolúvel em detergente neutro indigestível (FDNi) e fibra insolúvel em detergente ácido indigestível (FDAi) em procedimentos *in situ* em ovinos. No primeiro experimento, objetivou-se determinar o tempo de incubação *in situ*, necessário para o isolamento da FDNi e, investigar a ocorrência de contaminação mineral em amostras incubadas no rúmen de ovinos por longos períodos. Foram utilizadas amostras de alimentos concentrados, volumosos e fezes. Todas as amostras foram processadas em moinho de facas utilizando peneira com poros de 2 mm de diâmetro. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em sacos de tecido não tecido (TNT, gramatura 100g/m²) de dimensão igual a 4 x 5 cm, na proporção de 20 mg de matéria seca(MS)/cm² de superfície exposta e incubados no rúmen de quatro ovinos machos, sem raça definida, fistulados no rúmen. Tal procedimento foi repetido por quatro vezes, incubando-se a cada período os grupos em animais distintos. Utilizaram-se os tempos de incubação: 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 e 312 horas. Após a retirada dos sacos, foram determinados os teores de FDN e cinzas insolúveis em detergente neutro (CIDN). Os perfis de degradação da FDN foram interpretados de forma independente para cada material por meio de modelo logístico não linear. Os perfis de disponibilização da CIDN foram interpretados por meio de modelo assintótico de primeira ordem. Recomenda-se tempo de incubação *in situ* em de 168 horas para isolamento da FDNi em ovinos. Os teores de CIDN dos resíduos não degradados estabilizaram-se em média 28,9 horas após a incubação, demonstrando que as amostras não apresentaram contaminação mineral além daquela naturalmente associada à FDN. No segundo experimento, objetivou-se avaliar a influência do nível de concentrado da dieta sobre as estimativas da FDNi e FDAi de alimentos volumosos e os tempos de incubação *in situ* necessários para o isolamento destas frações em

ovinos. Foram utilizadas para os procedimentos *in situ* amostras dos alimentos: cana-de-açúcar *in natura*, feno de tifton 85, palha de milho e silagem de milho. O processamento e acondicionamento das amostras foram realizados seguindo os procedimentos utilizados no primeiro experimento. Os tratamentos constituíram-se de dietas com diferentes relações volumoso(V):concentrado(C): 100V:0C; 80V:20C; 60V:40C e 40V:60C. Os tratamentos foram designados a quatro ovinos machos, sem raça definida, fistulados no rúmen por meio de um delineamento quadrado latino 4 x 4. Utilizou-se os mesmos tempos de incubação utilizados no primeiro experimento. Após a retirada dos sacos, estes tiveram seus teores de FDN e FDA analisados de forma sequencial. Os perfis de degradação foram inicialmente interpretados de forma individual para cada alimento em cada tratamento através de modelo logístico não linear. Procedeu-se, para cada alimento incubado, a comparação entre os modelos ajustados, de modo a verificar o efeito dos tratamentos sobre as estimativas das frações indigestíveis (FDNi e FDAi) e taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal. Observou-se efeito de tratamento ($P < 0,05$) sobre a estimativa da FDNi e FDAi da cana-de-açúcar e silagem de milho. Para todos os alimentos foi observada influência dos tratamentos ($P < 0,05$) sobre as taxas de degradação da FDN e FDA. Recomenda-se, para procedimentos *in situ*, em ovinos alimentados com até 20% de concentrado, a utilização de incubações de 120 e 144 horas, para isolamento da FDNi e FDAi, respectivamente.

ABSTRACT

ALCÂNTARA, Pedro Henrique Rezende de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2012. **Methodological procedures for *in situ* isolation of indigestible fiber components using sheep.** Advisor: Cristina Mattos Veloso. Co-Advisors: Edenio Detmann and Rogério de Paula Lana.

This dissertation was prepared from data generated in two experiments with procedures for the *in situ* isolation of indigestible neutral detergent fiber (iNDF) and indigestible acid detergent fiber (iADF) using sheep. The first experiment aimed to determine the *in situ* incubation time needed for the isolation of iNDF, and investigate the occurrence of mineral contamination in long term incubations in sheep. Samples concentrates, roughages and faeces were used. All samples were ground through in a cutting mill utilizing sieve with pores of 2mm diameter. Subsequently, the samples were placed in 4 x 5 cm non-woven textile fabric (NWT - 100g / m²) bags at the rate of 20 mg of dry matter (DM) / cm² of exposed area and incubated in the rumen of four male sheep. This procedure was repeated four times, and incubated at every period groups among animals. The following incubation times were used: 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 and 312 hours. After the bags had been removed, the contents of neutral detergent fiber (NDF) and neutral detergent insoluble ash (NDIA) of the residues were analyzed. The NDF degradation profiles were interpreted independently for each material by a non-linear logistic model. The profiles of availability of mineral associated with undegraded NDF were interpreted by a asymptotic model of the first order. Incubation times in sheep of 168 hours are recommended for isolation of NDF_i. The content of mineral associated with undegraded NDF stabilized on average 28,9 hours after incubation, showing that samples were not contaminated by mineral, beyond that naturally associated with NDF. In the second experiment, the objective was to evaluate the influence of concentrate level in the diet on the estimates of roughages iNDF and iADF, and, incubation time needed for the *in situ* isolation of these fractions in sheep. The following forages were used for *in situ* procedures: *in natura* sugarcane, Tifton 85 hay, corn straw and corn silage. The samples processing and packaging were carried out following the procedures used in the first experiment. The treatments consisted on diets with different

roughage (R): concentrate (C) proportions: 100V: 0C; 80V: 20C, 60V: 40C, 40F: 60C. Treatments were assigned to four male sheep breed, rumen using a Latin square design 4 x 4. The same incubation times used in the first experiment were applied in this experiment. After removal of the bags, they had their NDF and ADF contents analyzed sequentially. The degradation profiles were initially interpreted individually for each forage in each treatment using a non-linear logistic model. For each incubated roughage, the adjusted models were compared to check the effect of treatments on the indigestible fractions (iNDF and iADF) estimates and the fiber degradation rate. It was observed treatment effect ($P < 0.05$) on the iNDFi and iADF estimates for *in natura* sugarcane and corn silage. It was observed influence of the treatments ($P < 0.05$) on the degradation rates of NDF and ADF to the four roughages. It is recommended that for *in situ* procedures using sheep fed up to 20% concentrate, incubation times of 120 and 144 hours be used for isolation of iNDF and iADF, respectively.

Introdução Geral

A avaliação do valor nutricional de alimentos tem sido tema central de diversas investigações científicas no âmbito da nutrição de ruminantes. O dimensionamento de sistemas de produção, no que se refere à alimentação animal, depende diretamente do conhecimento existente acerca dos parâmetros nutricionais das dietas. A composição química dos alimentos possui forte influência sobre o desempenho animal. No entanto, sabe-se que tal resultando depende, ainda, de fatores físicos e biológicos, uma vez que a digestão dos alimentos está condicionada à ação microbiológica e enzimática ao longo do trato gastrintestinal do animal ruminante. Por tal razão, métodos químicos são incapazes de, isoladamente, explicar o fenômeno da digestão, bem como de prever o desempenho animal obtido com a utilização de um alimento ou dieta (Van Soest, 1994).

De acordo com Mertens (1994), entre 10 e 40% do desempenho animal são explicados pela digestibilidade da dieta. Portanto, a determinação deste parâmetro apresenta grande relevância no processo de avaliação de alimentos ou dietas. Grosso modo, a digestibilidade representa a fração do alimento ingerido que é absorvida durante sua passagem pelo trato gastrintestinal. Em termos práticos, a fração digestível de um alimento é obtida através da mensuração de seu complemento, a fração indigestível (Detmann et al., 2004). Em ensaios *in vivo*, a fração indigestível está contida nas fezes do animal. No entanto, estas contêm, além desta fração, componentes endógenos provenientes de contaminação por microrganismos e secreções e descamações do epitélio gastrintestinal. Por esta razão, a digestibilidade determinada em ensaios *in vivo* é denominada digestibilidade aparente. Segundo Minson (1990), as perdas endógenas secretadas nas fezes são da ordem de 0,098 a 0,129 g/g de matéria seca ingerida. Entretanto, a porção fibrosa dos alimentos apresenta digestibilidade aparente igual à digestibilidade verdadeira, uma vez que não existe produção endógena deste componente no trato gastrintestinal dos animais (Coelho da Silva & Leão, 1979).

A digestibilidade de um alimento pode ser determinada pelos métodos *in vitro*, *in situ* ou *in vivo*. A escolha do método dependerá do objetivo do ensaio, bem como dos recursos físicos e humanos disponíveis para a realização deste.

Para a determinação da digestibilidade total de uma dieta ou alimento, considera-se o método *in vivo* o mais confiável (Berchielli et al., 2011), uma vez que somente ele é capaz de considerar os efeitos de nível de consumo, taxa de passagem e efeitos associativos dos alimentos da dieta (Cochran et al., 1986).

A determinação da digestibilidade pelo método *in vivo* pode ser realizada por meio do controle total da excreção fecal. Entretanto, este método é altamente laborioso e oneroso, exigindo controle rigoroso da ingestão de matéria seca e da excreção fecal diárias, além de adaptação de animais a gaiolas e bolsas coletoras de fezes (Casali et al., 2008). Esta dificuldade é ainda mais marcante em experimento com animais em pastejo. Por tais motivos, é constante a busca por métodos alternativos que demandem menos recursos humanos e financeiros e, ainda, que não causem diminuição significativa da acurácia e precisão das estimativas de consumo alimentar, excreção fecal e digestibilidade. Neste sentido, a utilização de indicadores tem se consolidado como método de avaliação da digestibilidade, sendo amplamente utilizado nas situações em que não existe a possibilidade de mensurar diretamente a ingestão de matéria seca e a excreção fecal.

A utilização de indicadores está baseada no fato de que a excreção fecal relaciona-se com a digestibilidade de forma inversamente proporcional, sendo ainda, diretamente proporcional ao consumo alimentar (Saliba & Rodriguez, 2009). Portanto, ao se avaliar a concentração do indicador nas fezes e alimentos tais relações podem ser quantificadas. Quando o indicador utilizado é um componente da dieta do animal, este é denominado indicador interno. Por sua vez, quando se trata de um composto exógeno à dieta, o qual é misturado ao alimento ou, ainda, administrado de forma oral ou ruminal, é denominado indicador externo.

Owens & Hanson (1992) afirmam que o indicador ideal deve apresentar como características: manutenção de sua integridade durante a passagem pelo rúmen e exposição à população microbiana presente neste; não interferir sobre a ação dos sistemas digestivos animal e microbiano sobre os componentes da dieta; não ser absorvido durante sua passagem pelo trato; acompanhar o fluxo do alimento ou ligação íntima a este; ser facilmente isolável e quantificável. Ainda segundo estes autores, nenhum indicador preenche completamente tais

requisitos. No entanto, o grau de tolerância de erro associado ao uso de indicadores dependerá da variável a ser mensurada.

O uso de indicadores internos, em experimentação com ruminantes, é discutido e estudado há décadas, existindo, na literatura, relatos da utilização de diversos indicadores internos como: cinza insolúvel em ácido (CIA), cinza insolúvel em detergente ácido (CIDA), lignina em detergente ácido (LDA), lignina em detergente ácido indigestível (LDAi), matéria seca indigestível (MSi), fibra insolúvel em detergente neutro indigestível (FDNi), fibra insolúvel em detergente ácido indigestível (FDAi) e n-alcanos (Waller et al., 1980; Lippke et al., 1986; Tamminga et al., 1989; Van Soest, 1994; Zeoula et al., 2002; Torres et al., 2009; Rodrigues et al., 2010; Berchielli et al., 2011).

A FDNi e a FDAi destacam-se como porções químicas da fibra mais utilizadas e estudadas como indicadores internos em experimentos com ruminantes na atualidade (Barros et al., 2007; Brito et al., 2007; Detmann et al., 2007; Dias et al., 2007; Paixão et al., 2007; Barros et al., 2009; Ferreira et al., 2009; Kozloski et al., 2009; Torres et al., 2009; Sampaio et al., 2011).

A fibra é uma entidade nutricional constituída por substâncias insolúveis, sendo parte destas digestíveis e parte totalmente indigestíveis (Van Soest, 1994). Portanto, a fração indigestível da fibra apresenta características desejáveis para um indicador, uma vez que atravessa todo o trato digestório sem sofrer alterações em sua composição, não é absorvida ao longo do trato e, ainda, não apresenta efeito negativo sobre a ação dos sistemas digestivos animal e microbiano.

Por definição, a indigestibilidade é um conceito assintótico, ou seja, esta fração seria obtida apenas em uma escala infinita de tempo de exposição do material a um determinado sistema enzimático (Detmann, 2010). Todavia, em termos práticos, os procedimentos de isolamento da fração indigestível são realizados em escalas finitas de tempo. Para tal, busca-se a utilização de elevados períodos de exposição do substrato aos sistemas enzimáticos, de modo que os resíduos obtidos (indigeridos) aproximem-se ao máximo do conceito assintótico (indigestível) (Casali et al., 2008).

As frações FDNi e FDAi podem ser isoladas de duas formas: *in vitro* e *in situ*. Freitas et al. (2002) afirmaram que a incubação *in vitro* superestima a fração indigestível. Estes autores ponderam que a aderência de partículas à

borda dos tubos, em decorrência da agitação destes, protege o substrato da ação do inóculo ruminal, elevando a massa final do resíduo. Por sua vez, o método *in situ* pode apresentar problemas, como a perda de partículas. Tal perda pode ocorrer em decorrência do tecido utilizado na confecção dos sacos e, também, do tamanho de partícula utilizado nos procedimentos *in situ* (Berchielli et al., 2005).

Muitas investigações científicas são realizadas no sentido de avaliar qual indicador interno possui maior acurácia e precisão para utilização em ensaios com ruminantes. Detmann et al. (2007) avaliaram o vício de tempo longo associado à recuperação fecal de indicadores internos. Neste estudo, os autores verificaram que a FDNi não apresentou vício de tempo longo, tendo sido plenamente recuperada nas fezes, levando os autores a recomendarem este indicador para uso em ensaios de digestibilidade com ruminantes. A FDAi, por sua vez, apresentou vício de tempo longo positivo, o que em termos práticos, significa que a aplicação deste indicador em ensaios de digestibilidade, pode provocar uma subestimação da excreção fecal e, por consequência, uma superestimação da digestibilidade da dieta em avaliação.

Em estudo similar, Barros et al. (2009) avaliaram os vícios inerentes à recuperação fecal dos indicadores óxido crômico, MSi, FDNi e FDAi. Estes autores constataram a ocorrência de vício de tempo longo positivo para os três indicadores internos. De acordo com os autores, os indicadores internos subestimam a produção fecal. Contudo, a FDNi apresentou menor vício em relação à MSi e FDAi.

Ao avaliarem a acurácia e precisão da estimativa da digestibilidade da matéria seca com o uso de indicadores internos, Rodrigues et al. (2010) observaram que a FDAi apresentou maior acurácia em relação à FDNi, o que levou os autores a concluírem que a FDAi deveria ser um indicador preferencialmente utilizado para determinação da digestibilidade, em ensaios experimentais em que se busque alcançar um valor próximo ao real.

Sampaio et al. (2011) compararam a utilização dos indicadores externos óxido crômico e dióxido de titânio com os indicadores internos MSi, FDNi e FDAi. Estes autores concluíram que todos os indicadores utilizados produzem resultados acurados. No entanto, os indicadores internos apresentaram maior precisão. Dentre os indicadores internos, a FDNi apresentou maior precisão

quando comparada à MSi e FDAi. A contaminação microbiana apresentada pela MSi foi apontada como fator preponderante para a baixa precisão obtida com a utilização deste indicador. A menor precisão da FDAi em relação à FDNi, por sua vez, foi atribuída ao fato desta estar mais sujeita a erros de pesagem por apresentar menor massa em comparação à FDNi e, ainda, apresentar necessidade de mais passos em seu processo analítico, conforme relatado por Detmann et al. (2007).

Observa-se que não existe um consenso quanto ao indicador interno mais adequado para utilização em ensaios de digestibilidade com ruminantes. Todavia, a falta de padronização metodológica para o isolamento de resíduos fibrosos indigestíveis, como é o caso da FDNi e FDAi, pode explicar os resultados controversos observados na literatura nas últimas décadas.

Ressalta-se que a precisão e acurácia das estimativas de digestibilidade por meio da utilização de indicadores dependem fortemente da recuperação destes (Van Soest, 1994). A falta de acurácia e precisão, ora observada em ensaios de digestibilidade com utilização de indicadores internos, tem sido atribuída ao processo de isolamento dos mesmos (Berchielli et al., 2005; Rodrigues et al., 2010; Berchielli et al., 2011), ou seja, falhas metodológicas na obtenção das frações fibrosas indigestíveis podem produzir vieses na estimação da digestibilidade em ensaios com ruminantes.

Os estudos realizados ao longo das últimas décadas apresentam elevada despadronização com relação às metodologias de isolamento dos indicadores FDNi e FDAi, especialmente no que se refere ao tempo de incubação, tamanho de partículas e tipo de tecido dos recipientes utilizados para incubação *in situ* (Casali et al., 2008).

Diversas pesquisas utilizaram metodologias diferentes quanto ao período de incubação para isolamento de componentes fibrosos indigestíveis em bovinos, observando-se períodos como: 72 horas (Berchielli et al. 2000); 144 horas (Barros et al., 2009); 168 horas (Ferret et al., 1999); 192 horas (Zeoula et al., 2002); 240 horas (Dias et al., 2007); 264 horas (Sampaio et al., 2011); 720 horas (Tamminga et al., 1989).

O tipo de tecido dos recipientes utilizados no acondicionamento das amostras para incubação *in situ* é também um quesito que apresenta certa variabilidade, sendo observado principalmente o uso do náilon (Barros et al.,

2007; Barros et al., 2009; Kozloski et al., 2009), do F57 (Ankom[®]) (Pina et al., 2006; Dias et al., 2007; Paixão et al., 2007) e mais recentemente o tecido não tecido (TNT) gramatura 100 g/m² (Carvalho et al., 2010; Sampaio et al., 2011).

Valente et al. (2011) avaliaram a utilização de diferentes tecidos e tamanhos de partículas no isolamento *in situ* da FDNi e FDAi utilizando bovinos fistulados. Estes autores constataram que a utilização do (TNT) gramatura 100 g/m² para a confecção dos sacos utilizados para acondicionamento das amostras produz resultados equivalentes ao tecido F57 (Ankom[®]), utilizado para análise de fibras no sistema Ankom[®]. Tal sistema dispensa a transferência do material incubado para vidrarias, dando grande agilidade à análise e diminuindo a possibilidade de erros decorrentes deste procedimento. A utilização do TNT em substituição ao F57 (Ankom[®]) incorre em redução de custo da análise sendo, portanto, recomendada. Valente et al. (2011) sugerem, ainda, que o tamanho de partícula de 2 mm é o mais adequado para a avaliação *in situ* de compostos indigestíveis, corroborando os resultados encontrados por Casali et al. (2008).

Casali et al. (2008) determinaram que o período de incubação em bovinos, necessário para o isolamento *in situ* das frações FDNi e FDAi, é de 240 e 264 horas, respectivamente. Todavia, Van Milgen et al. (1992) constataram a ocorrência de deposição de minerais nos sacos utilizados em procedimentos *in situ*. Os autores constaram que a contaminação mineral ocorre tanto sobre os sacos como em seu interior, junto às amostras, e torna-se bastante representativa em incubações acima de 240 horas. Ainda de acordo com Van Milgen et al. (1992), a simples lavagem com água não é capaz de eliminar as contaminações provenientes da exposição ao ambiente ruminal. Baseado em tais recomendações, Vieira et al. (2012) sugerem que o período de incubação *in situ* deve se limitar a 240 horas, mesmo que a amostra seja submetida ao tratamento com detergente neutro após a retirada do rúmen.

Os estudos realizados por Casali et al (2008) e Valente et al. (2011) fundamentaram o estabelecimento de uma metodologia padrão para isolamento da FDNi e FDAi pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal (Detmann et al., 2012). Espera-se com tal padronização o aumento da confiabilidade dos dados gerados a partir da utilização destes indicadores isolados pelo método *in situ* em bovinos. Todavia, para isolamento

da FDNi e FDAi em outras espécies a falta de padronização metodológica persiste.

Conforme previamente discutido, a indigestibilidade constitui um conceito assintótico, ou seja, para a determinação da fração indigestível de um substrato seria necessária a exposição deste a um sistema enzimático sem limitação temporal (Detmann, 2010). Detmann et al. (2008) afirmam que a dimensão da fração digestível da fibra, e por consequência a fração indigestível, é dependente apenas das características inerentes ao substrato, não sendo afetada pelo sistema enzimático atuante sobre este, uma vez que diferenças nas características deste sistema são suplantadas pela exposição prolongada ao mesmo.

Desta forma pode-se inferir que, apesar de não apresentarem influência sobre a potencialidade da fibra, diferentes sistemas enzimáticos podem exigir diferentes tempos de atuação sobre um determinado substrato para o alcance da assíntota (estimação da fração indigestível), uma vez que podem alterar a taxa de degradação do substrato a depender de sua eficiência.

Portanto, fatores que promovam alterações no ambiente ruminal, como incubação em diferentes espécies de ruminantes, bem como a dieta fornecida, podem alterar a taxa de degradação da fibra e, por conseguinte, o tempo de incubação necessário para o alcance da assíntota.

Considerando os pontos discutidos, e ainda a inexistência de metodologia padronizada para isolamento de compostos fibrosos indigestíveis com outras espécies que não a bovina, na presente dissertação objetiva-se: 1- determinar o período de incubação, em ovinos, necessário para o isolamento da FDNi e FDAi, utilizando diferentes materiais, pelo método *in situ*; 2- investigar a ocorrência de contaminação mineral associada à FDN, em longos períodos de incubação em ovinos; 3- avaliar a influência da dieta de ovinos sobre o tempo necessário para isolamento da FDNi e FDAi de diferentes volumosos em procedimentos *in situ* em ovinos; 4- elaborar uma proposta metodológica para isolamento de FDNi e FDAi, a partir da incubação em ovinos.

Referências Bibliográficas

- BARROS, E.E.L.; FONTES, C.A.A.; DETMANN, E. et al. Avaliação do perfil nictemeral de excreção de indicadores internos e óxido crômico em ensaios de digestão em ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.2102-2108, 2007.
- BARROS, E.E.L.; FONTES, C.A.A.; DETMANN, E. et al. Vícios na estimação da excreção fecal utilizando indicadores internos e óxido crômico em ensaios de digestão com ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.10, p.2015-2020, 2009.
- BERCHIELLI, T.T.; ANDRADE, P.; FURLAN, C.L. Avaliação de indicadores internos em ensaios de digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.3, p.830-833, 2000.
- BERCHIELLI, T.T.; OLIVEIRA, S.G.; CARRILHO, E.N.V. et al. Comparação de marcadores para estimativas de produção fecal e fluxo de digesta em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.987-996, 2005.
- BERCHIELLI, T.T.; VEGA-GARCIA, A; OLIVEIRA, S.G. Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudos de nutrição. In: BERCHIELLI, TT.; VAZ PIRES; A.; OLIVEIRA S.G. (Org). **Nutrição de Ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p.415-436.
- BRITO, R.M.; SAMPAIO, A.A.M.; RESENDE, K.T. et al. Avaliação de indicadores para estimativa das digestibilidades parciais e total de dietas em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.445-451, 2007.
- CARVALHO, G.G.P.; GARCIA, R.; PIRES, A.J.V. et al. Consumo e digestibilidade aparente em novilhas alimentadas com dietas contendo cana-de-açúcar tratada com óxido de cálcio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.12, p.2703-2713, 2010.
- CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p.335-342, 2008.
- COCHRAN, R.C.; ADAMS, D.C.; WALLACE, J.D. et al. Predicting digestibility of different diets with internal markers: evaluation of four potential markers. **Journal of Animal Science**, v.63, p.1476-1483, 1986.
- COELHO DA SILVA, J.F., LEÃO, M.I. 1979. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Livrocetes. 380p.

- DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F. et al. Avaliação da técnica dos indicadores na estimação do consumo por ruminantes em pastejo. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, n.45, p.40-57, 2004.
- DETMANN, E.; SOUZA, A.L.; GARCIA, R. et al. Avaliação do vício de “tempo longo” de indicadores internos em ensaio de digestão de 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. et al. **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214p.
- DIAS, M.; DETMANN, E.; LEÃO, M.I. et al. Indicadores para estimativa da digestibilidade parcial em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.3, p.689-697, 2007.
- FERREIRA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; MARCONDES, M.I. et al. 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. et al. 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**, v. 33, p.145-152, 1999.
- FREITAS, D.; BERCHIELLI, T.T.; SILVEIRA, R.N. et al. Produção fecal e fluxo duodenal de matéria seca e matéria orgânica estimados através de indicadores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1521-1530, 2002.
- KOZLOSKI, G.V.; MESQUITA, F.R.; ALVES, T.P. et al. Avaliação do uso de frações indigestíveis do alimento como indicadores internos de digestibilidade em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.9, p.1819-1823, 2009.
- 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, p.403-412, 1986.
- MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: FAHEY JR., C. **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p.450-493.
- MINSON, D.J. **Forage in ruminant nutrition**. New York: Academic Press. 483p., 1990.
- OWENS, F.N.; HANSON, C.F. External and internal markers appraising site and extent of digestion in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v.75, p. 2605-2617, 1992.

- PAIXÃO, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; LEÃO, M.I. et al. Variação diária na excreção de indicadores interno (FDAi) e externo (Cr_2O_3), digestibilidade e parâmetros ruminais em bovinos alimentados com dietas contendo uréia e farelo de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.3, p.739-747, 2007.
- PINA, D.S.; VALADARES FILHO, S.C.; DETMANN, E. et al. Efeitos de indicadores e dias de coleta na digestibilidade dos nutrientes e nas estimativas do valor energético de alimentos para vacas alimentadas com diferentes fontes de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.6, p.2461-2468, 2006.
- RODRIGUES, P.H.M.; GOMES, R.C.; SIQUEIRA, R.F. et al. Acurácia, precisão e robustez das estimativas da digestibilidade aparente da matéria seca determinada com uso de indicadores em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.5, p.1118-1126, 2010.
- SALIBA, E.O.S.; RODRIGUEZ, N.M. Uso de indicadores na avaliação da digestibilidade em ruminantes - Lipe[®] Lignina Purificada e Enriquecida. In: Simpósio Internacional Avanços em Técnicas de Pesquisa em Nutrição de Ruminantes, 2, 2009. Pirassununga. **Anais...** Pirassununga, p.50-67, 2009.
- SAMPAIO, C.B.; DETMANN, E.; VALENTE, T.N.P. et al. Evaluation of fecal recovering and long term bias of internal and external markers in a digestion assay with cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.1, p.174-182, 2011.
- TAMMINGA, S.; ROBINSON, P.H.; MEIJS, S. et al. Feed components as internal markers in digestion studies with dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.27, p.49-57, 1989.
- TORRES, L.C.L.; FERREIRA, M.A.; DUIM, A. et al. Substituição da palma-gigante por palma-miúda em dietas para bovinos em crescimento e avaliação de indicadores internos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.11, p.2264-2269, 2009.
- 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, n.3, p.666-675, 2011.
- Van MILGEN, J.; ROACH, M.L.; BERGER, L.L. et al. Technical note: mineral deposits on Dracon bags during ruminal incubation. **Journal of Animal Science**, v.70, p.2551-2555, 1992.
- Van SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- VIEIRA, R.A.M.; CAMPOS, P.R.S.S.; SILVA, J.F.C. et al. Heterogeneity of digestible insoluble fiber of selected forages *in situ*. **Animal Feed Science and Technology**, v.171, p.154-166, 2012.

WALLER, J.; MERCHEN, N.; HANSON, T. et al. Effect of sampling intervals and digesta markers on abomasal flow determinations. **Journal of Animal Science**, v.50, n.6, p.1222-1226, 1980.

Capítulo 1

Período de incubação *in situ* e contaminação mineral no isolamento da fibra insolúvel em detergente neutro indigestível (FDNi) em ovinos

Resumo - Objetivou-se determinar o tempo de incubação *in situ*, necessário para o isolamento da FDNi e, investigar a ocorrência de contaminação mineral em amostras incubadas no rúmen de ovinos por longos períodos. Foram utilizadas amostras de alimentos concentrados, volumosos e fezes. Todas as amostras foram processadas em moinho de facas utilizando peneira com poros de 2 mm de diâmetro. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em sacos de tecido não tecido (TNT, gramatura 100g/m²) de dimensão igual a 4 x 5 cm, na proporção de 20 mg de matéria seca(MS)/cm² de superfície exposta e incubados no rúmen de quatro ovinos machos, sem raça definida, fistulados no rúmen. Tal procedimento foi repetido por quatro vezes, incubando-se a cada período os grupos em animais distintos. Utilizaram-se os tempos de incubação: 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 e 312 horas. Após a retirada dos sacos, foram determinados os teores de FDN e cinzas insolúveis em detergente neutro (CIDN). Os perfis de degradação da FDN foram interpretados de forma independente para cada material por meio de modelo logístico não linear. Os perfis de disponibilização da CIDN foram interpretados por meio de modelo assintótico de primeira ordem. Recomenda-se tempo de incubação *in situ* em de 168 horas para isolamento da FDNi em ovinos. Os teores de CIDN dos resíduos não degradados estabilizaram-se em média 28,9 horas após a incubação, demonstrando que as amostras não apresentaram contaminação mineral além daquela naturalmente associada à FDN.

***In situ* incubation period and mineral contamination on isolation of indigestible neutral detergent insoluble fiber (iNDF) in sheep**

Abstract – The objective was to determine the *in situ* incubation time needed for the isolation of iNDF, and investigate the occurrence of mineral contamination in long term incubations in sheep. Samples concentrates, roughages and faeces were used. All samples were ground through in a cutting mill utilizing sieve with pores of 2mm diameter. Subsequently, the samples were placed in 4 x 5 cm non-woven textile fabric (NWT - 100g / m²) bags at the rate of 20 mg of dry matter (DM) / cm² of exposed area and incubated in the rumen of four male sheep. This procedure was repeated four times, and incubated at every period groups among animals. The following incubation times were used: 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 and 312 hours. After the bags had been removed, the contents of neutral detergent fiber (NDF) and neutral detergent insoluble ash (NDIA) of the residues were analyzed. The NDF degradation profiles were interpreted independently for each material by a non-linear logistic model. The profiles of availability of mineral associated with undegraded NDF were interpreted by a asymptotic model of the first order. Incubation times in sheep of 168 hours are recommended for isolation of NDFi. The content of mineral associated with undegraded NDF stabilized on average 28,9 hours after incubation, showing that samples were not contaminated by mineral, beyond that naturally associated with NDF.

Introdução

A avaliação do valor nutricional de alimentos tem sido tema central de diversas investigações científicas no âmbito da nutrição de ruminantes. O dimensionamento de sistemas de produção, no que se refere à alimentação animal, depende diretamente do conhecimento existente dos parâmetros nutricionais das dietas. De acordo com Mertens (1994), até 40% do desempenho animal são explicados pela digestibilidade da dieta. Portanto, a determinação deste parâmetro apresenta grande relevância no processo de avaliação de alimentos ou dietas.

A digestibilidade é determinada por meio de métodos *in vitro*, *in situ* ou *in vivo*. Os métodos *in vitro* e *in situ* são mais facilmente aplicáveis, demandando menor uso de recursos físicos, humanos e financeiros sendo muito utilizados para o estudo de frações, taxas e extensões de degradação de alimentos (Ezequiel & Galati, 2007). Todavia, o método *in vivo* é considerado como de maior acurácia na determinação da digestibilidade (Allen & Linton, 2007).

A determinação da digestibilidade pelo método *in vivo* é realizada de forma direta por intermédio da coleta total, ou de forma indireta fazendo uso de indicadores. De acordo com Owens & Hanson (1992), indicadores são substâncias de referência que podem ser utilizadas para o monitoramento de aspectos químicos e físicos da digestão. O uso de indicadores em ensaios de digestibilidade é extremamente interessante para a redução de custos e diminuição de demanda de mão-de-obra. Além disso, em condições em que a coleta total é extremamente complicada, como no caso de experimentos com animais em pastejo, o uso de indicadores é uma forma de viabilizar a realização do ensaio de digestibilidade (Saliba & Rodriguez, 2009). Valadares-Filho & Marcondes (2009) consideram que o uso de indicadores externos e internos é também a melhor forma de determinar o consumo de pasto.

Os indicadores são classificados como internos, quando estão presentes na composição natural dos alimentos, ou externos quando são exógenos aos alimentos ou dietas fornecidos aos animais em ensaios de digestibilidade.

Dentre os indicadores internos mais utilizados encontra-se a fibra insolúvel em detergente neutro indigestível (FDNi). No entanto, alguns autores têm relatado problemas na utilização deste indicador com relação à falta de

acurácia e precisão fazendo com que por vezes os parâmetros estimados a partir da utilização da FDNi sejam sub ou superestimados. Tais problemas tem sido atribuídos ao processo de isolamento dos mesmos (Berchielli et al., 2005; Rodrigues et al., 2010; Berchielli et al., 2011). Ressalta-se que a precisão e acurácia das estimativas de digestibilidade utilizando-se indicadores dependem fortemente da recuperação destes (Van Soest, 1994).

Casali et al. (2008) trabalhando com incubação em bovinos para o isolamento da matéria seca indigestível (MSi), fibra insolúvel em detergente ácido indigestível (FDAi) e FDNi, buscaram uma padronização metodológica. Os autores concluíram que, para os procedimentos *in situ*, as amostras devem ser moídas utilizando-se peneira de 2 mm. Para o isolamento da FDNi e FDAi os autores sugeriram incubação ruminal em bovinos pelo período de 240 e 264 horas, respectivamente. Os resultados encontrados por estes autores embasaram parte da metodologia proposta pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal (INCT-CA) (Detmann et al., 2012).

Uma restrição às incubações em longos períodos de tempo foi apontada por Van Milgen et al. (1992). De acordo com estes autores a ocorrência de deposição de minerais nos sacos utilizados em procedimentos *in situ* torna-se bastante representativa em incubações acima de 240 horas, tanto sobre os sacos como no interior dos mesmos. Ainda de acordo com Van Milgen et al. (1992), a simples lavagem com água não é capaz de eliminar as contaminações provenientes da exposição ao ambiente ruminal. No mesmo sentido, Huhtanen et al. (2006) relatam que a precipitação mineral sobre os sacos pode obstruir os poros do mesmo dificultando o fluxo de digesta e microrganismos. Baseado em tais recomendações, Vieira et al. (2012) sugerem que o período de incubação *in situ* deve se limitar a 240 horas mesmo que a amostra seja submetida ao tratamento com detergente neutro após a retirada do rúmen.

Verifica-se na literatura escassez de trabalhos com outras espécies que não a bovina para incubação *in situ* visando o isolamento de frações indigestíveis. A utilização de ovinos para tal finalidade se apresenta como alternativa, considerando o menor custo associado à fistulação e manutenção de tais animais, além da facilidade de manejo apresentada pela espécie. Além

disso, verifica-se a necessidade de investigação da contaminação mineral sobre a FDNi em longos tempos de incubação.

Neste sentido, objetivou-se avaliar o tempo de incubação necessário para obtenção da FDNi em ovinos para doze materiais e, ainda, investigar a ocorrência de contaminação mineral da FDNi em longos tempos de incubação.

Material e Métodos

O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal (LNA) do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG.

Foram coletadas, em Viçosa-MG, amostras de doze materiais distintos, entre alimentos concentrados energéticos, concentrados proteicos, volumosos e fezes (Tabela 1), sendo estas utilizadas para a realização deste ensaio experimental.

As amostras tiveram seus teores de umidade diminuídos com uso de estufa de ventilação forçada utilizando-se o binômio temperatura tempo de 60°C/72 horas. Posteriormente as amostras foram moídas utilizando-se peneira de 2 mm. O tamanho de partículas utilizado nos procedimentos de incubação *in situ* baseou-se nas recomendações de Casali et al. (2008).

Para permitir a realização de análises químicas do material original, foram retiradas subamostras de cada material e moídas utilizando-se peneira de 1 mm, também em moinho de facas tipo Willey. As amostras foram então analisadas quanto aos seus teores de matéria seca (MS) (INCT-CA G-003/1), matéria mineral (MM) (INCT-CA M-001/1), proteína bruta (PB) (INCT-CA N-001/1), extrato etéreo (EE) pelo método de Randall (INCT-CA G-005/1) e fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) em aparelho analisador de fibras Ankom[®] (INCT-CA F 001/1), conforme descrito por Detmann et al. (2012) (Tabela 2).

A fim de obter os teores dos resíduos não digeridos dos materiais utilizados, estes foram acondicionados em sacos de tecido não tecido (TNT) com gramatura de 100 g/m². Os sacos foram confeccionados de modo a apresentarem dimensão livre de 4 x 5 cm. Portanto possuíam área exposta de 40 cm² considerando as duas faces dos mesmos. Uma vez confeccionados, os

sacos foram mantidos em ebulição por 15 minutos em solução de detergente neutro comercial. Posteriormente, os sacos foram secos em estufa ventilada a 60 °C por 48 horas e, sequencialmente, levados à estufa não ventilada a 105 °C por duas horas e, então, pesados, obtendo-se as taras. As amostras foram inseridas nos sacos na proporção de 20 mg de MS/cm² de superfície exposta (Nocek, 1988).

Tabela 1 – Materiais utilizados no ensaio experimental

Classificação	Material
Concentrados energéticos	Farelo de trigo
	Fubá de milho
	Sorgo moído
Concentrados protéicos	Farelo de algodão 38%
	Farelo de soja
Volumosos	Cana-de-açúcar in natura
	Feno de capim braquiária
	Feno de Tifton 85
	Silagem de milho
Fezes	Fezes de bovinos
	Fezes de ovinos alto concentrado ¹
	Fezes de ovinos baixo concentrado ²

^{1/} Coletadas diretamente na ampola retal de ovinos alimentados com dieta à base de silagem de milho e concentrado na proporção 60:40. ^{2/} Coletadas diretamente na ampola retal de ovinos alimentados com dieta à base de capim elefante e concentrado na proporção 90:10.

Para a obtenção dos dados de campo utilizou-se um delineamento quadrado latino 4 x 4. Os materiais foram divididos em quatro grupos, compostos por três materiais cada. Posteriormente cada um desses grupos foi incubado no rúmen de um ovino macho adulto sem raça definida, fistulado no rúmen. Assim sendo, foram utilizados quatro animais para incubação. A incubação foi realizada em diferentes tempos, dentro de cada período. Durante os períodos de incubação os animais receberam a mesma dieta, constituída por capim elefante (70% da MS) e concentrado à base de milho e farelo de soja (30% da MS). Os animais tiveram à sua disposição água e mistura mineral para

consumo *ad libitum*. O procedimento de incubação foi repetido quatro vezes, sendo em cada período os grupos de materiais incubados em animais distintos, com ordem definida mediante sorteio. Desta forma, ao final dos procedimentos de incubação obtiveram-se quatro alíquotas de cada material em cada tempo de incubação.

Tabela 2 – Composição química dos materiais utilizados no ensaio experimental

Material	Componente				
	MS	MO	PB	EE	FDN
Farelo de trigo	87,58	94,33	15,73	1,52	43,59
Fubá de milho	90,53	98,95	8,77	3,93	11,16
Sorgo moído	88,24	98,86	9,95	2,22	18,79
Farelo de algodão	89,21	94,50	39,18	1,45	36,15
Farelo de soja	88,56	93,76	46,72	1,43	15,82
Cana-de-açúcar <i>in natura</i>	24,99	96,26	3,55	0,78	60,81
Feno de capim braquiária	88,60	94,04	9,45	1,05	79,46
Feno de Tifton 85	88,55	93,56	10,94	2,20	74,08
Silagem de milho	32,54	93,80	6,46	3,18	49,31
Fezes de bovinos	15,03	91,84	7,68	1,46	73,28
Fezes de ovinos AC	38,32	89,20	18,05	3,09	57,37
Fezes de ovinos BC	36,54	74,33	9,54	1,34	53,53

* AC = alto concentrado; BC = baixo concentrado.

Os tempos de incubação utilizados seguiram metodologia utilizada por Casali et al. (2008): 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 e 312 horas. Os sacos foram incubados em ordem reversa de tempo, desta forma, a retirada dos mesmos foi realizada de forma simultânea ao final de cada período.

Após a retirada do rúmen os sacos foram lavados em água corrente, até que esta se encontrasse totalmente clara. Na sequência os sacos foram imediatamente colocados em estufa com ventilação forçada a 60°C por 72 horas para redução do teor de umidade, sendo então acondicionados em sacos plásticos e armazenados para posteriores análises.

Os sacos foram, então, submetidos à extração em detergente neutro, por 60 minutos em aparelho analisador de fibras Ankom®. Após a extração dos compostos não FDN, os sacos foram lavados com água destilada quente e

acetona, de modo a eliminar os resíduos de detergente. Posteriormente, os sacos foram mantidos em estufa ventilada a 60 °C, por 48 horas, sendo sequencialmente levados à estufa não ventilada a 105 °C, por duas horas. Após os procedimentos de secagem, os sacos foram acondicionados em dessecadores (15 sacos/dessecador) sendo, então, pesados em balança analítica com precisão de 0,0001 g, obtendo-se a FDN não degradada.

Uma vez determinada a massa dos resíduos não degradados, os sacos foram acondicionados em cadinhos de porcelana e levados à mufla a 550°C por duas horas. Após a retirada dos cadinhos, estes foram acondicionados em dessecadores e, após resfriados, pesados para determinação do teor de cinzas insolúveis em detergente neutro (CIDN) dos resíduos não degradados. Sacos de TNT previamente lavados com detergente neutro e de massa conhecida foram incinerados seguindo o mesmo procedimento, de modo a se obter o teor de cinzas médio dos mesmos. O teor de cinza dos saquinhos foi então descontado do valor final de CIDN obtido.

Para a interpretação individual do perfil de degradação de cada material incubado foi utilizado o modelo proposto por Van Milgen et al. (1991):

$$R_t = B \cdot (1 + k \cdot t) \exp(-k \cdot t) + I$$

em que: R_t = resíduo não digerido da FDN (%); B = fração insolúvel potencialmente degradável da FDN (%); k = taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal da fração insolúvel potencialmente degradável (h^{-1}); t = tempo de permanência no ambiente ruminal (h); I = fração indegradável (%), a qual representa o teor de FDNi.

A estimação dos tempos necessários para a obtenção da FDNi, aqui denominado tempo crítico (t_c), seguiu procedimento adotado por Casali et al. (2008), fazendo uso das propriedades de intervalo de confiança assintótico. Para cada material incubado, foram utilizados procedimentos iterativos para gerar a estimativa dos tempos críticos. Estes foram considerados equivalentes ao tempo em que a estimativa do resíduo não degradado igualou-se numericamente ao limite superior do intervalo de confiança assintótico ($1 - \alpha = 0,95$) para o parâmetro I (Figura 1).

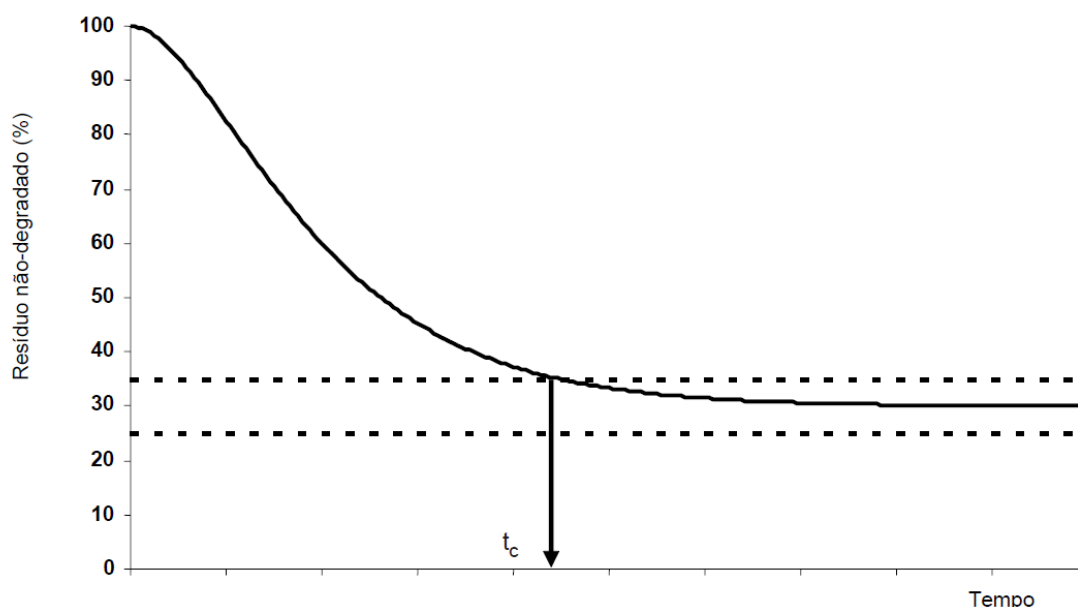


Figura 1 – Perfil hipotético de degradação ruminal em função do tempo. O tempo crítico (t_c) corresponde ao ponto em que o resíduo não degradado se iguala ao limite superior do intervalo de confiança assintótico, indicado pelas linhas tracejadas. Extraído de Casali et al. (2008).

A investigação quanto à ocorrência de contaminação mineral em sacos de TNT gramatura 100 g/m², neste trabalho, foi realizada a partir da análise do perfil de disponibilização da matéria mineral associada à FDN, conhecida por cinza insolúvel em detergente neutro (CIDN). Para tal, assumiu-se que, no caso da não ocorrência de contaminação mineral, os teores relativos de CIDN deveriam se estabilizar ao longo do tempo. O desaparecimento da CIDN foi interpretado por meio do modelo de degradação proposto por Waldo et al. (1972):

$$R(t) = D(e^{-ct}) + I,$$

em que: $R(t)$ representa o resíduo de incubação no tempo t (horas); D é a fração mineral associada à fibra potencialmente disponível; c é a taxa de disponibilização da fração D ; I é a fração indisponível.

Para os dois modelos os ajustamentos não lineares seguiram os protocolos do algoritmo de Gauss-Newton (Souza, 1998).

Adianta-se que o método gravimétrico utilizado para a mensuração da matéria mineral dos resíduos não degradados não apresentou sensibilidade suficiente para os alimentos que apresentam baixos teores de FDN e matéria mineral associada a esta. Por tal motivo, a contaminação mineral não será discutida para o fubá de milho, sorgo moído, farelo de soja, farelo de trigo e silagem de milho.

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o utilizando o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

Resultados e Discussão

O tempo médio de incubação necessário para o isolamento da FDNi dos 12 materiais foi de 88,4 horas (Tabela 3). Observou-se tempos de incubação para isolamento da FDNi variáveis entre os diferentes materiais, situados entre 34,6 horas e 154,7 horas, valores estes correspondentes às fezes de bovinos e fubá de milho, respectivamente. A pequena extensão da fração FDNpd das fezes de bovinos associada à elevada taxa de degradação ruminal (k) levaram ao rápido desaparecimento desta fração, sendo a relação inversa válida para o fubá de milho.

Atribui-se a alta variabilidade nos tempos críticos ($CV = 46,3\%$) à diferente natureza dos materiais utilizados neste ensaio, considerando que foram utilizados alimentos volumosos, concentrados proteicos e energéticos e fezes os quais apresentam diferentes teores de FDN (Tabela 2), bem como, na extensão da fração indigestível desta (Tabela 3).

Casali et al. (2008) encontraram tempo crítico médio de 176,3 horas para o isolamento da FDNi, utilizando bovinos alimentados com uma relação volumoso:concentrado de 90:10. Estes autores utilizaram alguns materiais comuns a este estudo: feno de capim-braquiária, cana-de-açúcar, silagem de milho, farelo de trigo, fubá de milho e fezes de bovinos. De uma forma geral, os tempos críticos observados por Casali et al (2008), foram superiores aos encontrados no presente estudo, confirmando a hipótese de que diferentes espécies necessitam protocolos de incubação específicos. Considerando apenas os alimentos comuns aos dois experimentos, o isolamento da FDNi

realizado em bovinos e ovinos ocorreu em média após 163,98 e 90,58 horas, respectivamente.

Tabela 3 – Estimativas da taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal (k) e da fibra insolúvel em detergente neutro indigestível (FDNi - %FDN), limite superior do intervalo de confiança assintótico ($1 - \alpha = 0,95$) e tempo crítico (h) necessário para obtenção da FDNi

Material	Parâmetro			
	k	FDNi	LS	tc
Farelo de trigo	0,0811	43,00	46,07	57,3
Fubá de milho	0,0300	14,69	19,33	154,7
Sorgo moído	0,0868	15,72	19,56	56,0
Farelo de algodão	0,0378	40,48	43,14	129,1
Farelo de soja	0,0642	7,02	9,12	88,6
Cana-de-açúcar <i>in natura</i>	0,0576	48,62	50,75	86,3
Feno de capim braquiária	0,0732	38,37	40,19	73,4
Feno de Tifton 85	0,0776	28,21	30,18	70,4
Silagem de milho	0,0365	32,34	35,07	137,2
Fezes de bovinos	0,1390	66,53	68,12	34,6
Fezes de ovinos AC*	0,0399	54,82	58,08	107,5
Fezes de ovinos BC*	0,0685	63,11	65,29	66,3
Média	-	-	-	84,6
Máximo	-	-	-	154,7
Mínimo	-	-	-	34,6
CV%	-	-	-	46,3

* AC = alto concentrado; BC = baixo concentrado.

Apesar da fração indigestível de um material ser uma característica intrínseca, não podendo ser alterada por nenhum sistema enzimático (Detmann, 2010), a ação de sistemas enzimáticos distintos pode produzir diferentes taxas de dinâmica de degradação do alimento e seus componentes. Conseqüentemente, mudanças nos sistemas enzimáticos podem alterar o tempo de incubação necessário para o isolamento de frações indigestíveis. Desta forma, as divergências observadas entre os resultados de Casali et al. (2008) perante aos gerados neste trabalho podem ser atribuídas a diferenças inerentes às espécies bovina e ovina. Outrossim, a diferença entre as dietas utilizadas nos dois experimentos pode ter alterado o ambiente ruminal colaborando para a diferença observada.

Mertens & Ely (1982) afirmaram que o efeito de diferentes espécies sobre a capacidade de tamponamento, reciclagem de nutrientes e regulação da taxa de *turnover* podem afetar consideravelmente a taxa de digestão no rúmen. Estes autores observaram que os bovinos são mais eficientes na utilização de alimentos menos digestíveis do que os ovinos, que por sua vez, aproveitam melhor dietas mais ricas em carboidratos não fibrosos.

Foi encontrada uma relação de 4,93 vezes a recíproca da taxa relativa à relativa à dinâmica de degradação ruminal. Mertens (1993) afirmou que para estimar adequadamente frações indigestíveis esta relação deveria ser de 4,6. Este parâmetro foi contestado por Casali et al. (2008), quanto à sua aplicabilidade a alimentos de origem tropical, uma vez que no estudo realizado por estes autores uma relação de 4,86 foi encontrada. A relação encontrada neste experimento (4,93) reforça a hipótese de Casali et al. (2008) de que alimentos de origem tropical apresentam diferenças na dinâmica de degradação ruminal em relação à alimentos originários de condições temperadas como os utilizados por Mertens (1993).

As recomendações mais recentes a respeito do tempo de incubação para isolamento da FDNi, dizem respeito apenas à metodologias com uso de bovinos. Por convenção estas recomendações seguem escalas de 24 horas, de modo a facilitar os procedimentos de incubação. Neste sentido, Casali et al. (2008) recomendaram um período de incubação 240 horas para o isolamento da FDNi em bovinos. O Sistema Nórdico de Avaliação de Alimentos (NorFor), por sua vez, sugere que a incubação para isolamento da FDNi deve ser de 288 horas (Åkerlind et al, 2011). Estas recomendações excedem os tempos observados com a utilização de ovinos neste estudo. *Observou-se* no presente estudo dentre os diversos materiais tempo crítico máximo de 154,7 horas. Seguindo a convenção de utilização de escalas de 24 horas para recomendações de procedimentos de incubação *in situ* sugere-se que o tempo de incubação em ovinos para o isolamento da FDNi deve ser de 168 horas.

Uma possível limitação a metodologias que requerem longos tempos de incubação foi sinalizada por Van Milgen et al. (1992). Estes autores constataram a ocorrência de contaminação mineral em sacos de náilon em procedimentos *in situ* em tempos de incubação superiores a 240 horas, mesmo com a posterior lavagem dos sacos com detergente ácido. A ocorrência de tal

fenômeno foi observada em bovinos alimentados com dietas à base de feno de alfafa. Os autores observaram que a contaminação ocorre sobre os sacos e também no interior destes sugerindo que a dimensão dos poros dos sacos utilizados nos procedimentos *in situ*, poderia influenciar a ocorrência deste fenômeno.

O modelo de Waldo et al. (1972) considera o conceito de digestibilidade potencial, ou seja, admite que uma fração do material desaparece completamente após longos tempos de incubação, sendo a fração remanescente, constante ao longo do tempo, considerada indigestível. O ajuste do modelo aos dados demonstra que houve estabilização da CIDN não disponibilizada em incubações de até 312 horas. Isto indica que não houve ocorrência de contaminação mineral extrínseca em longos tempos de incubação ruminal. Sendo assim, a contaminação mineral observada ao final do período de incubação é inerente à composição química dos materiais.

Tabela 4 - Estimativas da taxa de disponibilização da CIDN (c) e da fração indisponível da CIDN (base da CIDN), limite superior do intervalo de confiança assintótico ($1 - \alpha = 0,95$) e tempo crítico (h) necessário para estabilização da CIDN não disponibilizada

Material	Parâmetro				
	c	Fração indisponível da CIDN%	LS	tc	r ²
Cana-de-açúcar <i>in natura</i>	0,121	26,09	30,67	23,06	0,67
Feno de tifton 85	0,174	22,19	26,29	16,94	0,84
Feno de capim braquiária	0,114	15,21	19,25	26,76	0,85
Farelo de algodão	0,050	44,25	50,61	43,66	0,59
Fezes de ovinos AC	0,078	65,14	68,81	29,00	0,58
Fezes de ovinos BC	0,060	63,26	66,66	40,00	0,52
Fezes de bovinos	0,125	41,05	44,54	22,67	0,73
Média	-	-	-	28,9	-
CV%	-	-	-	33,5	-

* AC = alto concentrado; BC = baixo concentrado.

Utilizando o conceito de intervalo de confiança assintótico foi possível determinar o tempo em que ocorre a estabilização dos teores de CIDN para cada material, sendo este em média igual a 28,9 horas (Tabela 4). Emanuele & Staples (1990), trabalhando com seis forrageiras, observaram tempos de disponibilização máxima de macro e microminerais, variando entre duas horas (potássio) e 72 horas (cálcio - *Pennisetum purpureum* Schum cv. Mott).

Altas correlações entre teores de lignina e FDNi têm sido relatadas (Smith et al., 1972; Nousiainen et al., 2004). De acordo com Nicodeno & Laura (2001) a lignina é capaz de ligar-se aos minerais, causando sua precipitação e tornando-os indisponíveis. Considera-se que além dos minerais ligados a estes compostos fenólicos, os minerais associados à celulose e hemicelulose blindadas pela lignina, participem significativamente da fração indisponível da CIDN. Acredita-se que as diferenças observadas na dinâmica de degradação da FDN e disponibilização da CIDN, se devem ao fato de que possivelmente a ação microbiana sobre a fração potencialmente digestível da fibra, exponha os minerais associados ao ambiente ruminal e que estes sejam solubilizados antes que a fibra potencialmente digestível seja totalmente degradada. Assim permaneceria aderida a fibra apenas as cinzas ligadas à lignina e à parede celular protegida por tais compostos fenólicos.

Neste estudo não foi investigada a ocorrência de contaminação mineral sobre a matéria seca incubada por longos períodos. Todavia, considerando a ocorrência deste fenômeno descrita por Van Milgen et al. (1992), acredita-se que a ação aniônica do detergente neutro, foi capaz de eliminar os possíveis depósitos minerais formados durante o período de incubação.

Conclusões

O isolamento *in situ* da FDNi com a utilização de ovinos alimentados com 30% de concentrado na dieta, deve basear-se em tempos de incubação de 168 horas. A contaminação mineral extrínseca não representa um fator limitante ao uso de longos tempos de incubação para isolamento da FDNi. Para a validação do processo de isolamento da FDNi com ovinos aqui proposto, sugere-se que sejam realizadas investigações a cerca da precisão e acurácia

das estimativas de parâmetros de digestibilidade, comparando estes aos gerados pelo método da coleta total e também ao método indireto com utilização de FDNi isolada em bovinos.

Referências Bibliográficas

- ÅKERLIND, M., WEISBJERG, M.R., ERIKSSON, T. et al. Feed analyses and digestion methods. In: Volden, H.(Org). **NorFor—The Nordic Feed Evaluation System**, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, 2011, p. 41–54.
- ALLEN, M.S.; LINTON, J.A.V. *In vivo* methods to measure digestibility and digestion kinetics of feed fractions in the rumen. In: Simpósio Internacional Avanços em Técnicas de Pesquisa em Nutrição de Ruminantes, 1, 2007. Pirassununga. **Anais...** Pirassununga, p.72-89, 2007.
- BERCHIELLI, T.T.; OLIVEIRA, S.G.; CARRILHO, E.N.V. et al. Comparação de marcadores para estimativas de produção fecal e fluxo de digesta em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p. 987-996, 2005.
- BERCHIELLI, T.T.; VEGA-GARCIA, A; OLIVEIRA, S.G. Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudos de nutrição. In: BERCHIELLI, T.T.; VAZ PIRES; A.; OLIVEIRA S.G. (Org). **Nutrição de Ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 415-436.
- CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p. 335-342, 2008.
- DETMANN, E. Fibra na nutrição de novilhas leiteiras. In: PEREREIRA, E.S.; PIMENTEL, P.G.; QUEIROZ, A.C.; MIZUBUTI, I.Y. (Org). **Novilhas leiteiras**. Fortaleza: Graphiti gráfica e editora, 2010. p. 253-302.
- DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C. et al. **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214p.
- EMANUELE, S.M.; STAPLES, C.R. Ruminal release of minerals from six forage species. **Journal of Animal Science**, v.68, p. 2052-2060, 1990.
- EZEQUIEL, J.M.B.; GALATI, R.L. Técnicas *in vitro* e *in situ* para estimativa da digestibilidade ruminal de alimentos. In: Simpósio Internacional Avanços em Técnicas de Pesquisa em Nutrição de Ruminantes, 1, 2007. Pirassununga. **Anais...** Pirassununga, p.16-71, 2007.

- HUHTANEN, P.; AHVENJÄRVI, S.; WEISBJERG. et al. Digestion and passage of fibre in ruminants. In: SEJRSEN, K.; HVELPLUND, T.; NIELSEN, M.O. (Org). **Ruminant Physiology**. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. 2006. p. 87-135.
- MERTENS, D.R. Rate and extent of digestion. In: FORBES, J.M.; FRANCE, J. (Org). **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. Wallingford: CAB Publishing, 1993. p.13-51.
- MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: FAHEY JR., .C. **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p.450-493.
- MERTENS, D.R.; ELY, L.O. Relationship of rate and extent of digestion to forage utilization – A Dynamic Model Evaluation. **Journal of Animal Science**, v.54, p. 895-905, 1982.
- NICODENO, M.L.F.; LAURA, V.A. **Elementos minerais em forrageiras: formas químicas, distribuição e biodisponibilidade**. Campo Grande: Embrapa/CNPGC, 2001, 39p. (Documento Técnico, 115).
- NOCEK, J.E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2051-2069, 1988.
- NOUSIAINEN, J.; AHVENJÄRVI, S.; RINNE, M. et al. Prediction of indigestible cell wall fraction of grass silage by near infrared spectroscopy. **Animal Feed Science and Technology**, v.115, p.395-311, 2004.
- OWENS, F.N.; HANSON, C.F. External and internal markers appraising site and extent of digestion in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v.75, p. 2605-2617, 1992.
- R Development Core Team (2011). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- RODRIGUES, P.H.M.; GOMES, R.C.; SIQUEIRA, R.F. et al. Acurácia, precisão e robustez das estimativas da digestibilidade aparente da matéria seca determinada com uso de indicadores em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.5, p. 1118-1126, 2010.
- SALIBA, E.O.S.; RODRIGUEZ, N.M. Uso de indicadores na avaliação da digestibilidade em ruminantes - Lipe[®] Lignina Purificada e Enriquecida. In: Simpósio Internacional Avanços em Técnicas de Pesquisa em Nutrição de Ruminantes, 2, 2009. Pirassununga. **Anais...** Pirassununga, p.50-67, 2009.
- SMITH, L.W.; GOERING, H.K.; GORDON, C.H. Relationships of forage compositions with rates of cell wall digestion and indigestibility of cell walls. **Journal of Dairy Science**, v.55, p. 1140-1147, 1972.

- SOUZA, G.S. **Introdução aos modelos de regressão linear e não-linear.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. 505p.
- VALADARES FILHO, S.C.; MARCONDES, M.I. Utilização de indicadores na avaliação do consumo de animais: Estado da arte. In: Simpósio Internacional Avanços em Técnicas de Pesquisa em Nutrição de Ruminantes, 2, 2009. Pirassununga. **Anais...** Pirassununga, p.15-49, 2009.
- 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 MILGEN, J.; ROACH, M.L.; BERGER, L.L. et al. Technical note: mineral deposits on Dracon bags during ruminal incubation. **Journal of Animal Science**, v.70, p. 2551-2555, 1992.
- Van SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant.** 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- VIEIRA, R.A.M.; CAMPOS, P.R.S.S.; SILVA, J.F.C. et al. Heterogeneity of digestible insoluble fiber of selected forages *in situ*. **Animal Feed Science and Technology**, v.171, p. 154-166, 2012.
- WALDO, D.R.; SMITH, L.W.; COX, L.E. Model of cellulose disappearance from the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.55, p.125-129, 1972.

Capítulo 2

Influência da dieta sobre o isolamento *in situ* da fibra insolúvel em detergente neutro indigestível (FDNi) e da fibra insolúvel em detergente ácido indigestível (FDAi) em ovinos

Resumo - Objetivou-se avaliar a influência do nível de concentrado da dieta sobre as estimativas da FDNi e FDAi de alimentos volumosos e os tempos de incubação *in situ* necessários para o isolamento destas frações em ovinos. Foram utilizadas para os procedimentos *in situ* amostras dos alimentos: cana-de-açúcar *in natura*, feno de tifton 85, palha de milho e silagem de milho. Todas as amostras foram processadas em moinho de facas utilizando peneira com poros de 2 mm de diâmetro. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em sacos de tecido não tecido (TNT, gramatura 100g/m²) de dimensão igual a 4 x 5 cm, na proporção de 20 mg de matéria seca(MS)/cm² de superfície exposta. Os tratamentos constituíram-se de dietas com diferentes relações volumoso(V):concentrado(C): 100V:0C; 80V:20C; 60V:40C e 40V:60C. Os tratamentos foram designados a quatro ovinos machos, sem raça definida, fistulados no rúmen por meio de um delineamento quadrado latino 4 x 4. Utilizou-se os mesmos tempos de incubação utilizados no primeiro experimento. Após a retirada dos sacos, estes tiveram seus teores de FDN e FDA analisados de forma sequencial. Os perfis de degradação foram inicialmente interpretados de forma individual para cada alimento em cada tratamento através de modelo logístico não linear. Procedeu-se, para cada alimento incubado, a comparação entre os modelos ajustados, de modo a verificar o efeito dos tratamentos sobre as estimativas das frações indigestíveis (FDNi e FDAi) e taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal. Observou-se efeito de tratamento (P<0,05) sobre a estimativa da FDNi e FDAi da cana-de-açúcar e silagem de milho. Para todos os alimentos foi observada influência dos tratamentos (P<0,05) sobre as taxas de degradação da FDN e FDA. Recomenda-se, para procedimentos *in situ*, em ovinos alimentados com até 20% de concentrado, a utilização de incubações de 120 e 144 horas, para isolamento da FDNi e FDAi, respectivamente.

Diet influence on the isolation of neutral indigestible detergent insoluble (iNDF) and indigestible acid detergent insoluble (iADF) in sheep

Abstract – The objective was to evaluate the influence of concentrate level in the diet on the estimates of roughages iNDF and iADF, and, incubation time needed for the *in situ* isolation of these fractions in sheep. The following forages were used for *in situ* procedures: *in natura* sugarcane, Tifton 85 hay, corn straw and corn silage. The samples were processed in a cutting mill with a sieve pore of 2 mm diameter. The samples were placed in 4 x 5 cm bags of non woven textile (NWT - 100g / m²) at the rate of 20 mg dry matter / cm². The treatments consisted on diets with different roughage (R): concentrate (C) proportions: 100V: 0C; 80V: 20C, 60V: 40C, 40F: 60C. Treatments were assigned to four male sheep breed, rumen using a Latin square design 4 x 4. The same incubation times used in the first experiment were applied in this experiment. After removal of the bags, they had their NDF and ADF contents analyzed sequentially. The degradation profiles were initially interpreted individually for each forage in each treatment using a non-linear logistic model. For each incubated roughage, the adjusted models were compared to check the effect of treatments on the indigestible fractions (iNDF and iADF) estimates and the fiber degradation rate. It was observed treatment effect (P <0.05) on the iNDFi and iADF estimates for *in natura* sugarcane and corn silage. It was observed influence of the treatments (P <0.05) on the degradation rates of NDF and ADF to the four roughages. It is recommended that for *in situ* procedures using sheep fed up to 20% concentrate, incubations times of 120 and 144 hours be used for isolation of iNDF and iADF, respectively.

Introdução

A digestão de componentes fibrosos pode ser influenciada por fatores extrínsecos. A composição da dieta pode notadamente afetar a população microbiana ruminal (Huhtanen et al., 2006) e, conseqüentemente, a degradação da fibra. Dietas com alto teor de carboidratos solúveis, ou baixa fibra, possuem maiores taxas de digestão e produção de ácidos de cadeia curta, causando um abaixamento do pH ruminal (Valadares Filho & Pina, 2011). Os microrganismos celulolíticos, responsáveis pela digestão da fibra, não se adaptam bem a tais condições (Slyter, 1976).

Mould et al. (1983) atribuem o efeito depressivo dos carboidratos não fibrosos sobre a digestão da parede celular a dois fenômenos diferentes: “efeito do pH” e “efeito do carboidrato”. Considerando, desta forma, que a presença de carboidratos solúveis *per se* apresenta efeito inibidor da digestão da fibra. Tal fenômeno foi observado, *in vitro*, por Mertens & Loften (1980), onde os autores mantiveram o pH da solução constante e adicionaram amido, observando uma leve diminuição da taxa de degradação da FDN e um grande aumento da fase *lag*. Esta fase está associada principalmente à hidratação das partículas e aderência das bactérias a estas. Huhtanen & Khalili (1992) observaram menor atividade enzimática de microrganismos aderidos à fibra na presença de altos teores de carboidratos. No entanto, Kozloski (2011) considera que o efeito do pH sobre a digestão da fibra apresenta maior representatividade.

Huhtanen & Jakkola (1993) trabalhando com níveis crescentes de concentrados na dieta observaram diminuição da taxa de degradação da FDN de 0,081 para 0,047 quando passaram de uma dieta de 25% para 75% de concentrado, o que denota a influência da dieta sobre a degradação da fibra.

O tempo necessário para o isolamento de frações fibrosas indigestíveis é diretamente influenciado pela taxa de degradação da fibra. Desta forma, fatores que provoquem alterações nesta taxa, como dietas com diferentes relações volumoso:concentrado (V:C), devem ser considerados ao se recomendar uma metodologia para isolamento de tais frações indigestíveis.

Frações químicas indigestíveis da fibra, como a fibra insolúvel em detergente neutro (FDNi) e a fibra insolúvel em detergente ácido (FDAi) são

constantemente utilizadas como indicadores internos em experimentos com ruminantes (Torres et al., 2009; Rodrigues et al., 2010; Sampaio et al., 2011).

Aspectos voltados ao isolamento destas frações são de extrema relevância para a qualidade dos dados gerados a partir da utilização da FDNi e FDAi como indicadores internos. Assim, padronizações metodológicas com relação ao tamanho de partículas, tecido dos sacos utilizados nas incubações e tempo de incubação têm sido buscadas (Casali et al., 2008; Valente et al., 2011). No entanto, pouco tem sido discutido com relação à influência das dietas sobre a estimativa de tais frações, bem como, sobre o tempo necessário para o isolamento destas.

Ademais, existe grande escassez de trabalhos visando estabelecer uma metodologia para o isolamento de FDNi e FDAi em procedimentos *in situ* com outras espécies que não a bovina.

Assim, objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar a influência de dietas com diferentes relações volumoso:concentrado sobre a estimativa de FDNi e FDAi, e o tempo de incubação em ovinos necessário para obtenção de tais frações.

Material e Métodos

O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal (LNA) do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG.

Foram utilizadas amostras de quatro alimentos volumosos: cana-de-açúcar *in natura*, feno de tifton 85, palha de milho e silagem de milho.

As amostras tiveram seus teores de umidade diminuídos com uso de estufa de ventilação forçada, utilizando-se o binômio temperatura tempo 60°C / 72 horas. Posteriormente, as amostras dos materiais foram moídas utilizando-se peneira de porosidade de 2 mm. O tamanho de partículas utilizado nos procedimentos de incubação *in situ* baseou-se nas recomendações de Casali et al. (2008).

Para permitir a realização de análises químicas do material original, foram retiradas subamostras de cada material e moídas utilizando-se peneira de 1 mm, também em moinho de facas tipo Willey. As amostras foram então

analisadas quanto aos seus teores de matéria seca (MS) (INCT-CA G-003/1), matéria mineral (MM) (INCT-CA M-001/1), proteína bruta (PB) (INCT-CA N-001/1), extrato etéreo (EE) pelo método de Randall (INCT-CA G-005/1), fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) (INCT-CA F-001/1) e fibra insolúvel em detergente ácido (INCT-CA F-003/1) em aparelho analisador de fibras Ankom[®], conforme descrito por Detmann et al. (2012) (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição química dos materiais utilizados no ensaio experimental

Alimento	Componente					
	MS	MO	PB	EE	FDN	FDA
Cana de açúcar <i>in natura</i>	24,99	96,26	3,55	0,78	60,81	35,16
Feno de tifton 85	88,55	93,56	10,94	2,20	74,08	33,65
Palha de milho	89,15	98,45	1,35	2,92	90,82	40,82
Silagem de milho	32,54	93,80	6,46	3,18	49,31	26,40

Foram confeccionados sacos de tecido não tecido (TNT) com gramatura de 100 g/m². Os sacos foram confeccionados de modo a apresentarem dimensão livre de 4 x 5 cm. Portanto, possuíam área exposta de 40 cm², considerando as duas faces dos mesmos. Uma vez confeccionados, os sacos foram lavados em detergente neutro (Detmann et al., 2012), secos em estufa ventilada a 60 °C, por 48 horas e, sequencialmente, levados à estufa não ventilada, a 105 °C, por duas horas e, então, pesados, obtendo-se as taras. Para realização dos procedimentos *in situ*, amostras dos quatro alimentos volumosos foram acondicionadas nos sacos, na proporção de 20 mg de MS/cm² de superfície exposta (Nocek, 1988).

Os tratamentos deste ensaio experimental foram constituídos pela relação volumoso (V):concentrado (C) da dieta dos animais utilizados para o procedimento de incubação, tendo sido constituídos pelas relações 100%V:0%C; 80%V:20%C; 60%V:40%C e 40%V:60%C (Tabela 2).

Para a realização da incubação ruminal das amostras, foram utilizados quatro ovinos machos adultos, sem raça definida e fistulados no rúmen. Os tempos de incubação utilizados seguiram metodologia proposta por Casali et al. (2008): 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 e 312 horas. Os

sacos foram incubados em ordem reversa de tempo. Sendo assim, a retirada destes foi realizada de forma simultânea, ao final de cada período.

Tabela 2 – Composição alimentar e química das dietas experimentais

Composição alimentar e química (% da MS da dieta)	Tratamento			
	100V:0C	80V:20C	60V:40C	40V:60C
Silagem de milho	98,27	80	60	40
Fubá de milho	-	10,23	31,13	52,02
Farelo de soja	-	9,77	8,87	7,98
Uréia/Sulfato de amônio	1,73	-	-	-
MO	92,96	95,05	95,99	96,93
PB	11,85	11,64	11,53	11,43
FDN	50,67	43,99	36,10	28,22

Para cada tempo de incubação, foram incubados, em cada um dos carneiros, quatro sacos distintos, contendo as amostras de cana-de-açúcar *in natura*, feno de tifton, palha de milho e silagem de milho. Este procedimento foi repetido ao longo de quatro períodos de 23 dias, dos quais dez dias foram despendidos para a adaptação dos animais à dieta e os treze dias seguintes para os procedimentos de incubação. A cada período, os quatro tratamentos foram aplicados em animais distintos, constituindo um delineamento em quadrado latino 4x4. Desta forma, ao final dos quatro períodos, foram obtidas quatro alíquotas de cada material incubado, em cada tempo de incubação utilizado, para cada tratamento aplicado aos animais. Durante todo o experimento, os animais tiveram, à sua disposição, água e mistura mineral para consumo *ad libitum*.

Após a retirada do rúmen, os sacos foram lavados com água corrente, até que esta se encontrasse totalmente clara. Na sequência, os sacos foram, imediatamente, colocados em estufa com ventilação forçada a 60 °C, por 72 horas para redução do teor de umidade, sendo, então, acondicionados em sacos plásticos e armazenados para posteriores análises.

Os sacos foram, em seguida, submetidos à extração com detergente neutro, por 60 minutos, em aparelho analisador de fibras Ankom[®]. Após a extração dos compostos não FDN, os sacos foram lavados com água destilada quente e acetona, de modo a eliminar os resíduos de detergente. Posteriormente, os sacos foram mantidos em estufa ventilada a 60°C, por 48

horas, sendo sequencialmente levados à estufa não ventilada, a 105°C, por duas horas. Após os procedimentos de secagem, os sacos foram acondicionados em dessecadores (15 sacos/dessecador), sendo, então, pesados em balança analítica com precisão de 0,0001 g, obtendo-se a FDN não degradada.

Para determinação dos teores de FDA não degradada, foram, novamente, realizados os procedimentos descritos para obtenção da FDN não degradada, com a substituição do detergente neutro pelo detergente ácido.

O perfil de degradação da FDN e FDA de cada material em cada tratamento foi interpretado individualmente utilizando o modelo proposto por Van Milgen et al. (1991):

$$R_t = B \cdot (1 + k \cdot t) \exp(-k \cdot t) + I$$

Onde: R_t = resíduo não digerido da FDN ou FDA (%); B = fração insolúvel potencialmente degradável da FDN ou FDA (%); k = taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal da fração insolúvel potencialmente degradável (h^{-1}); t = tempo de permanência no ambiente ruminal (h) e I = fração indegradável (%), a qual representa o teor de FDN_i ou FDA_i.

Os ajustamentos não lineares seguiram os protocolos do algoritmo de Gauss-Newton (Souza, 1998).

Os modelos ajustados foram comparados, de forma a verificar o efeito dos tratamentos sobre a estimativa do parâmetro I (FDN_i e FDA_i). Para tal, utilizou-se o teste de identidade de modelos de regressão não linear descrito por Regazzi (2003), com as seguintes hipóteses:

$$H_0: I_{100V:0C} = I_{80V:20C} = I_{60V:40C} = I_{40V:60C} \times H_a: \text{não } H_0$$

No caso de rejeição de H_0 , concluiu-se que os tratamentos apresentaram efeito sobre as estimativas da FDN_i e FDA_i. No caso de aceitação da hipótese de nulidade, as estimativas dos demais parâmetros foram geradas considerando um valor constante para o parâmetro I .

Avaliou-se o efeito dos tratamentos sobre o parâmetro k (taxa de degradação), através da comparação dos modelos ajustados utilizando-se o teste de identidade de modelos de regressão não linear descrito por Regazzi (2003), mediante as hipóteses:

$$H_0: k_{100V:0C} = k_{80V:20C} = k_{60V:40C} = k_{40V:60C} \times H_a: \text{não } H_0$$

A influência dos tratamentos sobre a estimativa do parâmetro k , indica indiretamente a homogeneidade dos tempos críticos observados entre os tratamentos, uma vez que esta indica a velocidade com que ocorre a degradação ruminal (Van Milgen et al., 1991).

A estimação do tempo de incubação necessário para a obtenção da FDNi e FDA para cada material em cada relação V:C, aqui denominado tempo crítico (t_c), seguiu procedimento adotado por Casali et al. (2008), fazendo uso das propriedades de intervalo de confiança assintótico. Foram utilizados procedimentos iterativos para gerar a estimativa dos tempos críticos. Estes foram considerados equivalentes ao tempo em que a estimativa do resíduo não degradado igualou-se numericamente ao limite superior do intervalo de confiança assintótico ($1 - \alpha = 0,95$) para o parâmetro I (Figura 1). Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011), considerando-se período e animal como efeitos fixos.

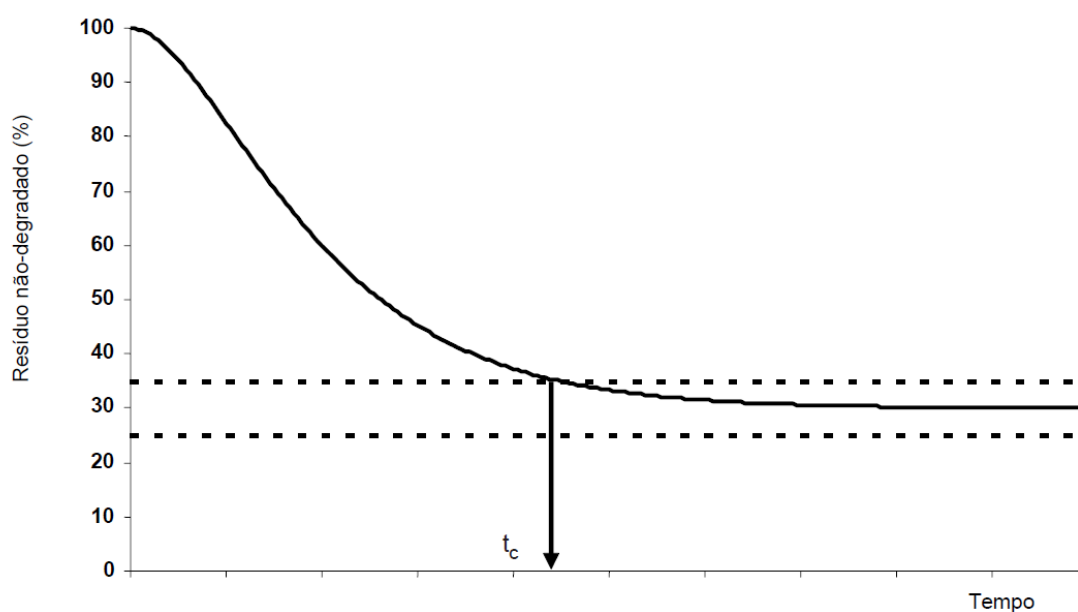


Figura 1 – Perfil hipotético de degradação ruminal em função do tempo. O tempo crítico (t_c) corresponde ao ponto em que o resíduo não degradado se iguala ao limite superior do intervalo de confiança assintótico, indicado pelas linhas tracejadas. Extraído de Casali et al. (2008).

Resultados e Discussão

Observou-se efeito dos tratamentos ($P < 0,05$) sobre as estimativas de FDNi e FDAi da cana-de-açúcar *in natura* e silagem de milho. As estimativas das frações FDNi e FDAi do feno de Tifton 85 e palha de milho, por sua vez, não diferiram entre os tratamentos (Tabela 3). Com relação às taxas relativas à degradação da FDN e FDA, o teste de identidade apontou efeito dos tratamentos ($P < 0,05$) para todos os alimentos (Tabela 4).

Tabela 3 – Níveis descritivos de probabilidade (P-valor) para o erro tipo I associado à hipóteses de nulidade para diferenças nas estimativas da dimensão da fração indigestível entre os tratamentos.

Volumoso	Fração indigestível	
	FDNi	FDAi
Cana de açúcar <i>in natura</i>	0.0113	0.0075
Feno de Tifton 85	0.5001	0.2631
Palha de milho	0.2473	0.1659
Silagem de milho	0.0089	0.0124

A dimensão da fração indigestível não é afetada pelo ambiente ruminal, tratando-se de uma característica intrínseca do alimento (Detmann, 2010). Portanto, as diferenças nas estimativas da FDNi e FDAi da cana-de-açúcar *in natura* e silagem de milho, observadas neste experimento, não representam diferenças reais na dimensão destas frações. Todavia, a diferença observada demonstrou que o método utilizado foi incapaz de estimar adequadamente a dimensão da FDNi e FDAi, superestimando este parâmetro para os volumosos nos tratamentos 60V:40C e 40V:60C para cana-de-açúcar *in natura* e 40V:60C para silagem de milho. Ademais a superestimação da FDNi e FDAi causou vieses também no tempo crítico e taxa de degradação da FDN e FDA (k), tornando inválida qualquer discussão à respeito dos dados associados à tais superestimativas (Tabelas 5 e 6).

Acredita-se que o maior teor de concentrado dos tratamentos em questão tenha reduzido drasticamente a real taxa de degradação da porção

fibrosa destes volumosos, fazendo com que o tempo máximo de incubação utilizado (312 horas) não fosse suficiente para o isolamento da FDNi.

As taxas de degradação da fibra são afetadas diretamente pela dieta, especialmente pelo aumento do teor de carboidratos rapidamente fermentescíveis. O aumento do aporte de carboidratos não fibrosos ao rúmen apresenta efeito negativo sobre a digestão da fibra, o qual têm sido atribuído principalmente à diminuição do pH ruminal (Mould et al., 1983). Cullen et al. (1986) observaram que todos os açúcares, com exceção das pentoses, causam abaixamento do pH ruminal e aumento das concentrações de ácido láctico.

Tabela 4 – Níveis descritivos de probabilidade (P-valor) para o erro tipo I associado às hipóteses de nulidade para diferenças nas estimativas da taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal (k) entre os tratamentos.

Volumoso	Fração indigestível	
	FDNi	FDAi
Cana de açúcar <i>in natura</i>	0,0053	0,0065
Feno de Tifton 85	<0,001	0,0002
Palha de milho	0,0068	0,0161
Silagem de milho	0,0158	0,0165

Observou-se para cana-de-açúcar *in natura* que nos tratamentos 100V:0C e 80V:20C o teor de FDNi estimado apresentou valores próximos e inferiores aos gerados nos tratamentos de maior inclusão de concentrado. Para silagem de milho nos tratamentos com inclusão de concentrado até o nível de 40% foram geradas estimativas da FDNi próximas numericamente e abaixo daquela gerada para o tratamento 40V:60C (Tabela 5).

As estimativas referentes à FDAi apresentaram comportamento similar ao observado para FDNi com relação à dimensão da fração indigestível. Para a cana-de-açúcar *in natura*, os tratamentos 60V:40C e 40V:60C superestimaram a FDAi. Nos tratamentos 100V:0C e 80V:20C, observou-se queda na taxa de degradação com o aumento da proporção de concentrado na dieta. A silagem de milho teve sua fração FDAi adequadamente estimada para os tratamentos

100V:0C, 80V:20C e 60V:40C. Não obstante, o tratamento 40V:60C superestimou a FDAi (Tabela 6).

Portanto, para a cana-de-açúcar *in natura*, observou-se ocorrência de vieses nas estimativas desde a inclusão de 40% de concentrado na dietas, diferindo do comportamento observado para os demais volumosos. A baixa qualidade da fibra da cana-de-açúcar exige intensa a ação das bactérias fibrolíticas para sua degradação. De modo que, a redução na população deste tipo de microrganismo provocada pelo alto uso de carboidratos não fibrosos afetou a taxa de degradação deste volumoso em maior extensão.

Tabela 5 – Estimativas da taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal da FDN (*k*) e da FDNi (% da FDN), limite superior (LS) do intervalo de confiança assintótico ($1 - \alpha = 0,95$) e tempo crítico (*t_c* - horas) necessário para o isolamento da FDNi de quatro alimentos volumosos.

Volumoso	Tratamento	Parâmetro			
		<i>k</i>	FDNi	LS	<i>t_c</i>
Cana de açúcar <i>in natura</i>	100V:0C	0,0698	60,42	67,05	46,3
Cana de açúcar <i>in natura</i>	80V:20C	0,0372	58,81	65,65	87,1
Cana de açúcar <i>in natura</i>	60V:40C	0,0503	70,42	77,14	56,2
Cana de açúcar <i>in natura</i>	40V:60C	0,0344	73,15	79,96	77,7
Feno de Tifton 85	100V:0C	0,0573	53,83	61,98	54,4
Feno de Tifton 85	80V:20C	0,0398	53,83	61,98	79,4
Feno de Tifton 85	60V:40C	0,0297	53,83	61,98	106,4
Feno de Tifton 85	40V:60C	0,0256	53,83	61,98	123,3
Palha de milho	100V:0C	0,0450	41,79	50,36	75,5
Palha de milho	80V:20C	0,0382	41,79	50,36	88,9
Palha de milho	60V:40C	0,0250	41,79	50,36	135,7
Palha de milho	40V:60C	0,0337	41,79	50,36	100,9
Silagem de milho	100V:0C	0,0261	46,02	55,97	118,9
Silagem de milho	80V:20C	0,0256	50,20	60,34	116,0
Silagem de milho	60V:40C	0,0179	50,52	61,43	160,3
Silagem de milho	40V:60C	0,0310	66,8	76,60	79,5

De forma geral, observou-se diminuição das taxas de degradação FDN e FDA com o aumento da participação de concentrado na dieta nos tratamentos em que a FDNi e FDAi não foram superestimadas (Tabelas 5 e 6). Um resultado não esperado foi observado para a palha de milho, havendo um

aumento em sua taxa de degradação da FDN de 0,0250 para 0,0337 com a elevação da participação de concentrado na dieta de 40 para 60% (Tabela 5). A diminuição do pH ruminal leva a alterações na microbiota ruminal causando redução na população de bactérias fibrolíticas, reduzindo assim a eficiência de degradação das frações fibrosas da dieta. Khalili & Huhtanen (1991), observaram que as taxas de degradação da FDN e FDA reduziram de 0,056 para 0,034 e de 0,060 para 0,034, respectivamente, quando reduziram o teor de FDN da dieta em cerca de 25% e, acrescentaram sacarose à dieta de bovinos.

O tempo de incubação necessário para isolamento da FDNi e FDAi é dependente da extensão da dimensão destas frações e da taxa de degradação da fração potencialmente digestível da FDN e FDA. Portanto, para as situações em que as frações indigestíveis não foram superestimadas, maiores tempos críticos foram observados para os tratamentos com maior inclusão de concentrado.

Para todos os alimentos os tempos necessários para o isolamento da FDNi foram inferiores àqueles necessários para isolamento da FDAi nos diferentes tratamentos para os quatro volumosos. O maiores tempos críticos foram observados para silagem de milho no tratamento 60V:40C, correspondendo a 160,3 e 184,3 horas para FDNi e FDAi, respectivamente (Tabelas 5 e 6). Casali et al. (2008) observaram tempo crítico de 196,5 horas para FDNi e 248,8 horas para FDAi para silagem de milho em incubação em bovinos alimentados com dieta composta por 90% de volumoso e 10% de concentrado. Estes autores recomendaram, para o isolamento da FDNi e FDAi em bovinos, incubações por 240 e 264 horas, respectivamente.

Na busca por uma recomendação universal para o isolamento da FDNi e FDAi de alimentos volumosos em ovinos, acredita-se que a utilização de dietas com mais de 20% de concentrado para os animais utilizados nos procedimentos de incubação devem ser evitadas. Uma vez que, alimentos com fibra de pior qualidade podem não ter suas frações indigestíveis corretamente isoladas, conforme observado para cana-de-açúcar *in natura* neste estudo.

Tabela 6 - Estimativas da taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal da FDA (k) e da FDAi (% da FDA), limite superior (LS) do intervalo de confiança assintótico ($1 - \alpha = 0,95$) e tempo crítico (t_c - horas) necessário para o isolamento da FDAi.

Volumoso	Tratamento	Parâmetro			
		k	FDAi	LS	t_c
Cana de açúcar <i>in natura</i>	100V:0C	0,0508	62,46	70,53	57,1
Cana de açúcar <i>in natura</i>	80V:20C	0,0284	61,06	69,41	102,2
Cana de açúcar <i>in natura</i>	60V:40C	0,039	73,16	81,29	62,2
Cana de açúcar <i>in natura</i>	40V:60C	0,0278	78,59	86,87	74,5
Feno de Tifton 85	100V:0C	0,0534	56,02	65,43	54,4
Feno de Tifton 85	80V:20C	0,0334	56,02	65,43	87
Feno de Tifton 85	60V:40C	0,0234	56,02	65,43	126,8
Feno de Tifton 85	40V:60C	0,016	56,02	65,43	181,1
Palha de milho	100V:0C	0,0421	43,76	53,4	75,9
Palha de milho	80V:20C	0,0333	43,76	53,4	96,2
Palha de milho	60V:40C	0,0252	43,76	53,4	126,8
Palha de milho	40V:60C	0,0202	43,76	53,4	158,7
Silagem de milho	100V:0C	0,0231	49,12	60,17	124,9
Silagem de milho	80V:20C	0,02	48,35	59,84	142,6
Silagem de milho	60V:40C	0,0142	49,61	62,92	184,3
Silagem de milho	40V:60C	0,0243	71,17	82,14	86,2

Para a dieta com até 20% de concentrado, os maiores tempos críticos foram observados para a silagem de milho, correspondendo a 118,9 e 142,6 horas para FDNi e FDAi, respectivamente (Tabelas 5 e 6). A recomendação de tempos superiores aos observados para os diversos materiais utilizados neste tipo de estudo é desejável, pois, garante-se o isolamento das frações indigestíveis e, ainda, padronizam-se os procedimentos de incubação para todos os materiais utilizados nos ensaios de digestibilidade, como pondera Casali et al. (2008).

A utilização de escalas de 24 horas nos procedimentos de incubação *in situ* para isolamento de frações indigestíveis tem sido convencionada na literatura (Ferret et al., 1999; Zeoula et al., 2002; Dias et al., 2007; Sampaio et al., 2011; Tamminga et al., 1989). Desta forma, incubações *in situ* em ovinos alimentados com dietas com até 20% de concentrado de 120 e 144 horas, são suficientes para o isolamento da FDNi e FDAi, respectivamente, de alimentos volumosos.

Os resultados deste experimento, com relação ao tempo necessário para isolamento da FDNi de alimentos volumosos, discordam daqueles observados no experimento que originou o primeiro capítulo desta Dissertação, neste o maior tempo crítico para alimentos volumosos foi observado para a silagem de milho e correspondeu a 137,2 horas. No entanto, ressalta-se que no trabalho apresentado no primeiro capítulo a dieta dos ovinos utilizados nos procedimentos de incubação consistia apresentava 30% de concentrado.

Ressalta-se a necessidade de realização de novas investigações científicas utilizando alimentos concentrados e fezes para observação do efeito da dieta sobre do tempo de incubação necessário para isolamento da FDNi e FDAi destes materiais. Desta forma, será possível o estabelecimento de um protocolo único considerando tempo de incubação e nível máximo de concentrado na dieta de ovinos utilizados nos procedimentos de isolamento da FDNi e FDAi em materiais de qualquer natureza.

Conclusões

O teor de carboidratos não fibrosos presentes na dieta de ovinos utilizados em procedimentos de *in situ* afeta diretamente o tempo necessário para o isolamento da FDNi e FDAi de alimentos volumosos. Incubações *in situ* por período de 120 e 144 horas são indicada para isolamento da FDNi e FDAi, respectivamente, de alimentos volumosos, utilizando ovinos alimentados com dietas com até 20% de concentrado.

Referências Bibliográficas

CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p. 335-342, 2008.

CULLEN, A.J.; HARMON, D.L.; NAGARAJA, T.G. *In vitro* fermentation of sugars, grains and by-products feeds in relation to initiation of ruminal lactate production. **Journal of Dairy Science**, v.69, p. 2616-2621, 1986.

DETMANN, E. Fibra na nutrição de novilhas leiteiras. In: PEREREIRA, E.S.; PIMENTEL, P.G.; QUEIROZ, A.C.; MIZUBUTI, I.Y. (Org). **Novilhas leiteiras**. Fortaleza: Graphiti gráfica e editora, 2010. p. 253-302.

DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C. et al. **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214p.

DIAS, M.; DETMANN, E.; LEÃO, M.I. et al. Indicadores para estimativa da digestibilidade parcial em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.3, p.689-697, 2007.

FERRET, A.; PLAIXATS, J.; CAJA, G. et al. 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**, v. 33, p.145-152, 1999.

HUHTANEN, P.; AHVENJÄRVI, S.; WEISBJERG. et al. Digestion and passage of fibre in ruminants. In: SEJRSEN, K.; HVELPLUND, T.; NIELSEN, M.O. (Org). **Ruminant Physiology**. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. 2006. p. 87-135.

HUHTANEN, P.; JAAKKOLA, S. The effects of forage conservation method and proportion of concentrate on digestion of cell wall carbohydrates and rumen digesta pool size in cattle. **Grass and Forage Science**, v.48, p. 155-165, 1993.

HUHTANEN, P.; KHALILI, H. The effect of sucrose supplements on particle-associated carboxymethylcellulase (E.C. 3.2.1.4) and xylanase (E.C. 3.2.1.8) activities in cattle given grass-silage based diets. **British Journal of Nutrition**, v.67, p. 245-255, 1992.

KHALILI, K.; HUHTANEN, P. Sucrose supplements in cattle given grass silage based diet. 2. Digestion of cell wall carbohydrates. **Animal Feed Science and Technology**, v.33, p. 262-273, 1991.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos Ruminantes**. 3 ed, Santa Maria: Editora da UFSM, 2011. 216p.

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.

MOULD, F.L., ORSKOV, E.R. AND MANN, S.O. Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. **Animal Feed Science and Technology**, v.10, p. 15—30, 1983.

NOCEK, J.E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2051-2069, 1988.

R Development Core Team (2011). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

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.

RODRIGUES, P.H.M.; GOMES, R.C.; SIQUEIRA, R.F. et al. Acurácia, precisão e robustez das estimativas da digestibilidade aparente da matéria seca determinada com uso de indicadores em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.5, p. 1118-1126, 2010.

SAMPAIO, C.B.; DETMANN, E.; VALENTE, T.N.P. et al. Evaluation of fecal recovering and long term bias of internal and external markers in a digestion assay with cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.1, p. 174-182, 2011.

SLYTER, L.L. Influence of acidosis on rumen function. **Journal of Animal Science**, v.43, p. 910-929, 1976.

SOUZA, G.S. **Introdução aos modelos de regressão linear e não-linear**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. 505p.

TAMMINGA, S.; ROBINSON, P.H.; MEIJS, S. et al. Feed components as internal markers in digestion studies with dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.27, p.49-57, 1989.

TORRES, L.C.L.; FERREIRA, M.A.; DUIM, A. et al. Substituição da palma-gigante por palma-miúda em dietas para bovinos em crescimento e avaliação de indicadores internos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.11, p. 2264-2269, 2009.

VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S. Fermentação Ruminal. In: BERCHIELLI, T.T.; VAZ PIRES, A.; OLIVEIRA S.G. (Org). **Nutrição de Ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 161-191.

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, n.3, p. 666-675, 2011.

ZEOULA, L.M.; PRADO, I.N.; DIAN, P.H.M. et al. Recuperação fecal de indicadores internos avaliados em ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.4, p. 1865-1874, 2002.