

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERIARIA  
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação**

**INDICADORES DE DIGESTÃO TOTAL, PARCIAL E  
SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA EM BOVINOS**

**CRISTOVÃO COLOMBO DE CARVALHO COUTO FILHO**

**BELO HORIZONTE  
2012**

**CRISTOVÃO COLOMBO DE CARVALHO COUTO FILHO**

**INDICADORES DE DIGESTÃO TOTAL, PARCIAL E  
SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA EM BOVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Nutrição e Alimentação Animal  
Orientadora: Profa. Dra. Eloísa de Oliveira Simões Saliba

**BELO HORIZONTE  
2012**

C871i

Couto Filho, Cristovão Colombo de Carvalho, 1979-  
Indicadores de digestão total, parcial e síntese de proteína microbiana em bovinos/  
Cristovão Colombo de Carvalho Couto Filho. – 2012.

103 p. : il.

Orientadora: Eloísa de Oliveira Simões Saliba

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Bovino – Alimentação e rações – Teses. 2. Nutrição animal – Teses.  
3. Forragem – Digestibilidade – Teses. 4. Proteínas – Síntese – Teses. I. Saliba, Eloísa  
de Oliveira Simões. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.  
III. Título.

CDD – 636.208 5

Tese defendida e aprovada em 26 de março de 2012 pela Comissão Examinadora constituída por:

---

Profa. Dra. Eloísa de Oliveira Simões Saliba

---

Prof. Dr. Norberto Mario Rodriguez

---

Dr. Fernando César Ferraz Lopes

---

Prof. Dr. Geraldo Sérgio Senra Barbosa

---

Dr. Jailton da Costa Carneiro

*“Não sei  
Por quanto tempo ainda  
Hei de esperar  
Se os sonhos pelo caminho  
Vão se apagar  
Quantas pedras, buracos ainda  
Eu vou encontrar*

*Talvez  
Tenhamos um caminho paralelo a trilhar  
Enquanto a via principal interrompida está  
Já que a vida é como a Terra  
E permanece a girar”*

*Cristovão Couto (2005)*

*“Quando nada mais restar  
E toda esperança já houver se esvaído.*

*Quando o sol não mais se abrir  
E apenas a angústia habitar seu coração.*

*Se os amigos se vão,  
Nos momentos mais difíceis, turbulentos de sua vida.*

*Saiba que existirá  
Sempre alguém a olhar por você.*

*Tenha fé e força,  
Que o Senhor está contigo.  
E nunca vai te abandonar,  
Pois sua misericórdia é infinita”.*

*Cristovão Couto (2005)*

*A Deus pelo amor incondicional, pelas grandes experiências, a começar pela  
aprovação na seleção de Doutorado, e misericórdia.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, proteção e, sobretudo, direção nos meus caminhos.

À minha mãe Francisca Tereza, que sem dúvida não mediu esforços para que eu pudesse realizar esse trabalho e sempre me deu o maior apoio.

Aos meus irmãos Ângelo, Antonio e Benigna, a quem tanto amo.

À minha amada Jakelyne, companheira tão presente em todos os momentos.

Às tias Mila, Annie e Valderez por todo o carinho.

À minha dindinha Aparecida e minha avó Maria Celeste (*in memoriam*) por todo amor e carinho dispensados a mim.

À minha sogra Mônica e Dona Rosa pelas orações.

À toda minha família, pelo amor e carinho.

À Universidade Federal de Minas Gerais e, em especial, à Escola de Veterinária pela oportunidade de realização do Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento de parte da pesquisa.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), Campus Florestal, por disponibilizar hospedagem e suas instalações e animais para a condução de alguns dos experimentos que compuseram esta tese. Aos funcionários desta instituição e, de forma especial, ao Gabriel e Osvaldo por toda a ajuda.

À professora e orientadora Eloísa de Oliveira Simões Saliba, pela valiosa oportunidade de ser seu orientado, pela amizade sincera, pelo exemplo de ser humano, orientação e esforços sem medida para que pudéssemos desenvolver um bom trabalho.

Aos professores, Norberto Mario Rodriguez e Geraldo Sérgio Senra Barbosa, pela amizade, orientação e auxílio na realização deste trabalho.

Ao Professor Marcos Neves Pereira, pela valiosa orientação e oportunidade de condução de um dos experimentos na sua fazenda (Fazenda São Francisco). Agradeço também pelos ensinamentos prestados através das disciplinas Gado de Leite I e II, aprendizado que levarei para a vida.

Ao grande amigo Nilson, com quem pude contar em todos os momentos durante a realização do 1º experimento, em Lavras. Agradeço-lhe pela amizade, convivência com

você e sua família maravilhosa, da qual sinto muitas saudades. Agradeço-lhe também, pelos valiosos ensinamentos. Aprendi muito com você.

Ao Grupo do Leite da Universidade Federal de Lavras pela convivência, presteza e auxílio na realização deste trabalho.

Aos amigos Filipe Aguiar, Cecília, Matheus Pinheiro, Andressa e Nélio, pela ajuda indispensável durante a realização dos experimentos e pelo convívio prazeroso.

Aos amigos Guilherme e Juliana Colodo pelo auxílio na modelagem de taxa de passagem.

Ao amigo Danilo pelo auxílio em algumas dúvidas quanto à parte estatística.

Ao amigo José Avelino Santos Rodrigues, pela amizade, convivência e humor ímpar.

À professora Maria Ignez Leão e ao senhor Jocélio, pela oportunidade proporcionada quanto ao aprendizado da coleta omasal.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal, especialmente ao Toninho, Kelly e Marcos.

A amiga Regeane Martins, pelo auxílio nas análises por cromatografia e por toda sua ajuda sem medida.

Aos amigos Paulo, Pedro, Foguinho, Fabrício, Gerônimo e suas respectivas esposas, pela amizade e pelos momentos tão especiais vividos juntos.

A todos que não citei, mas que nem por isso são menos importantes, meu agradecimento sincero.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>i</b>
<b>FIGURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>iv</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>10</b>
<b>Capítulo 1 – Revisão de Literatura</b> .....	<b>16</b>
1.1 Indicadores em estudos de nutrição animal .....	16
1.1.1 LIPE® - Um breve histórico e novas perspectivas frente à Nanotecnologia .....	17
1.2 Indicadores Microbianos .....	19
1.2.1 Ácido 2,6-Diaminopimélico (DAPA).....	20
1.3 Referências Bibliográficas.....	23
<b>Capítulo 2 – Validação do NANOLIPE® como Indicador de Digestibilidade para Bovinos e de Menor Período de Coleta para o Indicador LIPE®</b> .....	<b>27</b>
2.1 Introdução .....	27
2.2 Material e Métodos .....	28
2.3 Resultados e Discussão.....	32
2.4 Conclusões.....	40
2.5 Referências Bibliográficas.....	41
<b>Capítulo 3 – Validação do LIPE® como Indicador de Digestibilidade Parcial em Ensaio com Bovinos Alimentados com Diferentes Volumosos Tropicais</b> .....	<b>44</b>
3.1 Introdução .....	44
3.2 Material e Métodos .....	45
3.2.1 Localização Experimental, Animais e Instalações .....	45
3.2.2 Dietas .....	46
3.2.3 Consumo .....	47
3.2.4 Digestibilidades .....	47
3.2.5 Análises Químicas .....	49
3.2.6 Delineamento Experimental e Análises Estatísticas .....	49
3.3 Resultados e Discussão.....	50
3.4 Conclusões.....	62
3.5 Referências Bibliográficas.....	62
<b>Capítulo 4 – Ácido 2,6-Diaminopimélico (DAPA), obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, na Quantificação Protéica Microbiana de Novilhas Alimentadas com Diferentes Fontes Volumosas</b> .....	<b>69</b>
4.1 Introdução .....	69
4.2 Material e Métodos .....	70
4.2.1 Localização Experimental, Animais e Instalações .....	70
4.2.2 Dietas .....	70
4.2.3 Consumo .....	72
4.2.4 Fluxo Omasal e Coleta de Digesta Ruminal para Isolamento .....	72
4.2.5 Preparo das amostras para análise de DAPA.....	73
4.2.5.1 Modelo, Especificações do Equipamento e Condições Analíticas .....	73
4.2.5.2 Hidrólise e Preparo dos Hidrolisados .....	74

4.2.6 Análises Químicas .....	74
4.2.7 Delineamento Experimental e Análises Estatísticas .....	75
4.3 Resultados e Discussão.....	75
4.4 Conclusões.....	81
4.5 Referências Bibliográficas.....	81

**Capítulo 5 – Estudo da Cinética de Passagem por Diferentes Técnicas, em Novilhas Recebendo Diferentes Fontes Volumosas .....** **86**

5.1 Introdução.....	86
5.2 Material e Métodos .....	87
5.2.1 Localização Experimental, Animais e Instalações .....	87
5.2.2 Dietas .....	87
5.2.3 Consumo .....	88
5.2.4 Técnica de Indicadores .....	89
5.2.5 Técnica do Esvaziamento .....	91
5.2.7 Delineamento Experimental e Análises Estatísticas .....	92
5.3 Resultados e Discussão.....	93
5.4 Conclusões.....	99
5.5 Referências Bibliográficas.....	99

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 1.	Composição da dieta experimental, em ingredientes.....	29
Tabela 2.	Composição da dieta experimental, em nutrientes.....	29
Tabela 3.	Produção fecal (kg MS/dia) de vacas em lactação e recuperação fecal dos indicadores (%) mensurada por diferentes métodos.....	33
Tabela 4.	Coeficientes de digestibilidade (%) obtidos por diferentes métodos, em dois ensaios com vacas em lactação.....	36
Tabela 5.	Limites inferior (LI) e superior (LS) do intervalo de confiança a 95% de probabilidade para produção e recuperação fecal dos indicadores e digestibilidade da matéria seca, obtidos por diferentes métodos em ensaios com vacas em lactação.....	39
Tabela 6.	Desvios-padrão para produção e recuperação fecal dos indicadores e digestibilidade da matéria seca obtidos por diferentes métodos em ensaios com vacas em lactação.....	39

### CAPÍTULO 3

Tabela 1.	Composição da dieta experimental, em ingredientes.....	46
Tabela 2.	Composição da dieta experimental, em nutrientes.....	47
Tabela 3.	Consumo de nutrientes em novilhas recebendo dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de Tifton (FT).....	50
Tabela 4.	Digestibilidade aparente total, ruminal e intestinal dos nutrientes das dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de Tifton (FT).....	54
Tabela 5.	Fluxos omasais de matéria seca (MS) e fibra em detergente neutro (FDN) obtidos por diferentes indicadores.....	58
Tabela 6.	Desvio-padrão para os fluxos omasais de matéria seca (MS) e fibra em detergente neutro (FDN) obtidos por diferentes indicadores em função de dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de Tifton (FT).....	60
Tabela 7.	Limites inferior (LI) e superior (LS) do intervalo de confiança a 95% de probabilidade para os fluxos omasais (kg/dia) estimados por diferentes indicadores.....	61

## CAPÍTULO 4

Tabela 1.	Composição da dieta experimental, em ingredientes.....	71
Tabela 2.	Composição da dieta experimental, em nutrientes.....	71
Tabela 3.	Composição química das bactérias isoladas do rúmen de novilhas em função de das dietas experimentais.....	76
Tabela 4.	Consumos de matéria seca e nitrogênio, fluxo omasal de compostos nitrogenados (g/dia) e degradabilidade da proteína das dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de tifton (FT).....	77
Tabela 5.	Matéria orgânica e carboidratos totais degradados no rúmen (MODR e CTDR) e eficiência de síntese microbiana em novilhas recebendo dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de tifton (FT).....	79

## CAPÍTULO 5

Tabela 1.	Composição da dieta experimental, em ingredientes.....	88
Tabela 2.	Composição da dieta experimental, em nutrientes.....	88
Tabela 3.	Cinética de passagem de fase líquida no trato gastrintestinal de novilhas recebendo dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de Tifton (FT), mensurada com o indicador Co-EDTA.....	94
Tabela 4.	Taxas de ingestão, passagem e digestão obtidos em novilhas recebendo dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de Tifton (FT) através da técnica de esvaziamento ruminal.....	95
Tabela 5.	Digesta ruminal de novilhas recebendo dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de Tifton (FT).....	96
Tabela 6.	Cinética de passagem de partículas no trato gastrintestinal de novilhas recebendo dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de Tifton (FT).....	97
Tabela 7.	Cinética de passagem no trato gastrintestinal de novilhas obtidas por diferentes técnicas.....	98

## FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1. Nível do ácido 2,6-diaminopimélico (DAPA) na digesta duodenal associado à parede celular bacteriana em diferentes tempos após a alimentação (Adaptado de Masson et al., 1991)..... 22
- Figura 2. Média semanal da contribuição de N bacteriano no N abomasal total estimado pelo ácido diaminopimélico (DAPA) em novilhas entre 2 e 11 semanas de idade (Adaptado de Quigley e Schwab, 1982)..... 23

### CAPÍTULO 2

- Figura 1. Relação entre a produção fecal (kg/dia) obtida com a coleta total e estimada com os indicadores do Experimento 1..... 34
- Figura 2. Relação entre a produção fecal (kg/dia) obtida com a coleta total e estimada com os indicadores do Experimento 2..... 35
- Figura 3. Perfil nictemeral de excreção fecal do indicador NANOLIPE<sup>®</sup> por vacas em lactação, considerando o tempo pós-dosificação ao longo de 24 horas..... 38

## RESUMO

O desenvolvimento de novos indicadores e o aprimoramento na utilização dos existentes, constitui tema de grande interesse nos estudos de nutrição animal. Dessa forma, vários estudos foram realizados com vistas à avaliação de indicadores de digestibilidade total, parcial, cinética e síntese protéica microbiana em estudos com bovinos. No primeiro estudo o objetivo foi avaliar as estimativas de produção fecal e digestibilidade em bovinos por meio de diferentes indicadores (LIPE<sup>®</sup>, NANOLIPE<sup>®</sup> e Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Para tanto, foram realizados dois experimentos. O experimento 1 apresentou como foco a avaliação de diferentes períodos de coleta de fezes sobre as estimativas do indicador LIPE<sup>®</sup>. No experimento 2, o objetivo central do estudo foi a avaliação do tempo de adaptação necessário para o indicador NANOLIPE<sup>®</sup> atingir equilíbrio de excreção. O Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> superestimou a produção fecal e, conseqüentemente, subestimou a digestibilidade nos dois ensaios. Os indicadores externos LIPE<sup>®</sup> e NANOLIPE<sup>®</sup> permitiram estimar a produção fecal e a digestibilidade de maneira acurada. O protocolo de utilização do indicador LIPE<sup>®</sup> pode ser alterado para apenas três dias de coleta de fezes. O protocolo a ser empregado para utilização do NANOLIPE<sup>®</sup> poderá ser de dois dias de fornecimento do indicador seguido de único dia de coleta, com amostragem fecal em quatro pontos equidistantes ao longo do dia. No segundo estudo buscou-se mensurar o consumo e as digestibilidades parcial e total dos nutrientes em novilhas submetidas à dietas baseadas em diferentes volumosos (silagem de milho, cana-de-açúcar e feno de tifton), e concomitantemente, avaliar a utilização do LIPE<sup>®</sup> como indicador em estudos de digestibilidade parcial em comparação com a MSi e FDNi. As dietas influenciaram o consumo de nutrientes das frações CNF e FDNi proveniente da fração volumosa, as digestibilidades aparentes totais da PB, FDN e CNF e as digestibilidades ruminal e intestinal da fração CNF. O rúmen foi o principal local de digestão da FDN, CT e CNF. A FDNi superestimou os fluxos omasais, conduzindo à subestimativas da digestibilidade ruminal e superestimativas da digestibilidade intestinal. Os indicadores LIPE<sup>®</sup> e MSi podem ser utilizados em estudos de digestibilidade parcial, com destaque para o primeiro, em virtude da maior precisão e maior praticidade de aplicação. O terceiro estudo apresentou como objetivo a quantificação da síntese protéica microbiana, a partir do ácido 2,6-diaminopimélico (DAPA), em novilhas submetidas à dietas com diferentes volumosos (silagem de milho, cana-de-açúcar e feno de tifton). O fluxo de compostos nitrogenados, assim como a eficiência de síntese protéica microbiana mostrou-se semelhante entre as dietas avaliadas. O quarto estudo objetivou avaliar a cinética de passagem, a partir da comparação da técnica de indicadores e da técnica de esvaziamento ruminal em novilhas alimentadas com as mesmas fontes volumosas do segundo e terceiro estudos. A cinética de passagem de fluidos e partículas não foi afetada pelas dietas. O indicador Co-EDTA superestimou o volume ruminal. Dessa forma, em estudos que contemplem o esvaziamento ruminal a obtenção desse parâmetro deve ser feita a partir dessa técnica. A técnica do indicador não pode ser eliminada dos ensaios de cinética de passagem de fluidos, uma vez que sua utilização é imprescindível na obtenção dos demais parâmetros neste tipo de estudo. A cinética de passagem quando avaliada pela técnica de esvaziamento ruminal possibilita um estudo específico para cada fração do alimento, bem como do conteúdo, volume e pesos da digesta ruminal, permitindo um entendimento integrado dos fatores relacionados com os efeitos de enchimento.

**Palavras-chave:** LIPE<sup>®</sup>, NANOLIPE<sup>®</sup>, Indicadores internos, DAPA, Esvaziamento Ruminal, Volumosos

## ABSTRACT

The development of new markers and improvement in the use of existing ones, is a topic of great interest in studies of animal nutrition. Thus, several trials were performed for evaluation of markers of total digestion, partial, kinetics and microbial protein synthesis in cattle. In the first study, the objective was to evaluate the estimates of fecal output and digestibility in cattle using different markers (LIPE<sup>®</sup>, NANOLIPE<sup>®</sup> and Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). To this end, two experiments were conducted. The experiment 1 had a focus on the evaluation of different fecal collection periods on estimates of the marker LIPE<sup>®</sup>. In experiment 2, the central objective was to evaluate the adaptation time required to NANOLIPE<sup>®</sup> reach the steady state. The Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> overestimated the fecal output, and therefore underestimated digestibility in both experiments. The external markers LIPE<sup>®</sup> and NANOLIPE<sup>®</sup> allowed to estimate fecal output and digestibility accurately. The protocol for use of the marker LIPE<sup>®</sup> can be changed to only three days of fecal collection. The protocol to be employed in use of the marker NANOLIPE<sup>®</sup> may be of two days administration with single day sampling fecal in four equidistant points throughout the day. In the second study sought to measure the intake and total and partial digestibility of nutrients in heifers fed with diets based on different forages (corn silage, sugar cane and tifton hay), and concomitantly, to evaluate the use of the LIPE<sup>®</sup> as marker of partial digestion compared with the iDM and iNDF. Diets affect nutrient intake fractions NFC and iNDF from the forages, the total digestibilities of CP, NDF, and NFC and ruminal and intestinal digestibility of NFC fraction. The rumen was the main site of digestion of NDF, NFC and CT. The iNDF overestimated flows omasal, leading to underestimation of ruminal digestibility and overestimation of intestinal digestibility. The markers LIPE<sup>®</sup> and iDM can be used in studies of partial digestion, especially the first, due to greater precision and practicality of application. The third study had the objective of quantifying microbial protein synthesis from 2,6-diaminopimelic acid (DAPA) in heifers fed with diets based on different forages (corn silage, sugar cane and tifton hay). The flow of nitrogen compounds as well as the efficiency of microbial protein synthesis was similar between diets evaluated. The objective fourth study was to evaluate the kinetics of passage, from the comparison of technical markers and ruminal emptying technique in heifers fed the same sources forages of the second and third studies. The kinetics of passage of fluid and particles was not affected by diets. The marker Co-EDTA overestimated ruminal volume. Thus, in studies that address the rumen emptying measuring this parameter should be made from this technique. The technique of the marker can't be removed of trials passage of fluid kinetics, considering that its use is essential for obtaining the other parameters in this type of study. The kinetics of passage as measured by ruminal emptying technique allows a specific study for each fraction of the food as well as the content, volume and weight of rumen digesta, allowing an integrated understanding of the factors related to the effects of filling.

**Key words:** LIPE<sup>®</sup>, NANOLIPE<sup>®</sup>, Internal markers, DAPA, Ruminal emptying, Forages

## INTRODUÇÃO GERAL

A digestibilidade apresenta grande valor prático na nutrição animal, tendo em vista que a digestão incompleta normalmente representa perda no processo de utilização da energia consumida. A digestibilidade aparente de um alimento ou dieta compreende a fração ingerida que é aparentemente absorvida durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Entretanto, para obtenção desse parâmetro, é necessária a quantificação da fração não degradável ou indigestível em relação à dieta consumida.

Tal procedimento além de muito trabalhoso, torna-se inviável em experimentos com animais em sistema de pastejo ou até mesmo sob o regime de confinamento, quando não se detêm mão-de-obra suficiente para tal. Entretanto, outras metodologias podem ser utilizadas alternativamente com o mesmo propósito e, dentre elas, a técnica de indicadores. Indicadores são compostos utilizados para monitorar a hidrólise e síntese de compostos, assim como a cinética de passagem da digesta (Owens & Hanson, 1992) parcialmente, ou por todo o trato gastrointestinal, promovendo estimativas qualitativas ou quantitativas do metabolismo animal (Saliba, 1998). O uso de indicadores além de viabilizar a realização de estudos que não seriam possíveis convencionalmente, minimiza a interferência nos padrões de comportamento animal.

Algumas propriedades fundamentais devem ser levadas em consideração para que um indicador seja considerado ideal. Nenhum indicador, entretanto, preenche todos os requisitos necessários e, por esta razão, a procura de indicadores ideais constitui um dos assuntos de grande interesse nas pesquisas de nutrição animal. Com este propósito, iniciou-se em meados da década de 90 no Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG uma série de pesquisas com vistas ao desenvolvimento de um novo indicador. Nos primeiros estudos, a lignina isolada das palhas de milho e soja foi testada por Saliba (1998) e Saliba et al. (1999a), mostrando-se indigestível. Apesar disso, seu isolamento para utilização como indicador não se justificava, pois a mesma não se destacou em relação aos indicadores comumente utilizados.

A partir de então, novas fontes foram estudadas para isolamento da lignina. Em 2002, esses mesmos pesquisadores começaram a trabalhar a molécula da lignina, no sentido de otimizar a sua determinação nas fezes. Saliba et al. (2003a) isolaram a lignina da madeira do *Eucalyptus grandis* e a enriqueceram com grupamentos fenólicos não comumente encontrados na lignina da dieta animal. Esse trabalho deu origem a um

hidroxifenilpropano modificado e enriquecido denominado LIPE<sup>®</sup>, um indicador externo de digestibilidade. O LIPE<sup>®</sup> foi inicialmente utilizado num estudo com coelhos. Posteriormente, uma série de experimentos foi conduzida com diferentes espécies: ovinos, aves, suínos, eqüinos e bovinos. As estimativas de produção fecal e digestibilidade revelaram a sua eficiência como indicador externo, uma vez que, não apresentou diferenças em relação à coleta total. Além disso, apresentou as vantagens de um curto período de adaptação, ausência de variação diurna, além do baixo custo.

Com o advento da nanotecnologia, foi então desenvolvido por esse mesmo Grupo de Pesquisa um indicador com as características do LIPE<sup>®</sup>, porém com propriedades nanométricas. Os materiais fabricados ou construídos em nanoescala têm propriedades únicas e se comportam de forma diferente da matéria convencional e, isso se deve aos “efeitos quânticos”. Desse modo, podemos perceber que a nanotecnologia não é apenas a busca de se conseguir usar partículas ou materiais em um tamanho infinitamente menor do que o convencional, uma vez que, reduzindo o tamanho dos materiais, eles podem adquirir novas propriedades, como condutividade elétrica, maior resistência ou reatividade, além de maior velocidade de dispersão no trato gastrointestinal. Dentre estas propriedades, ressaltamos aquelas relacionadas ao metabolismo, onde a rápida dispersão poderá proporcionar uma melhor homogeneização do material na digesta e, assim, permitir um equilíbrio de excreção mais rápido. Foi desenvolvido então, com esse conceito o NANOLIPE<sup>®</sup>.

Tão importantes quanto os estudos de digestibilidade total são as pesquisas relacionadas à partição da digestão. Nos estudos de digestibilidade parcial, a mensuração da quantidade e da composição da digesta que passa em diferentes pontos do trato gastrointestinal constituem importante informação para prever a absorção de nutrientes em locais específicos. Como o processo de digestão nos ruminantes é o resultado da seqüência de eventos que ocorrem em diferentes segmentos do trato, o local de digestão influencia a natureza dos produtos finais absorvidos, a extensão com que as perdas ocorrem e, provavelmente, a resposta produtiva do animal (Merchen et al., 1997). As informações obtidas com esses estudos são utilizadas em sistemas de exigências nutricionais como o National Research Council (NRC, 2001). Desta forma, melhorar a acurácia das técnicas utilizadas para a obtenção desses dados reduz o erro na predição de exigências nutricionais e torna mais eficiente a utilização dos nutrientes pelos animais.

Com vistas à quantificação e determinação da composição da digesta ao longo do trato gastrointestinal em estudos de digestibilidade parcial, os indicadores também se fazem necessários. Os indicadores são classificados como externos, quando adicionados à dieta ou fornecidos via oral ou ruminal aos animais e internos, representados pelas frações indigestíveis dos alimentos, geralmente uma fração da parede celular. Os últimos, apresentam a vantagem de já estarem presentes no alimento, não requererem preparação especial (Berchielli et al. 1998; Saliba, 1998) e, de modo geral, permanecerem distribuídos na digesta durante o processo de digestão e excreção (Piaggio et al., 1991).

Dentre os indicadores internos, destacam-se a fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi). Dentre os indicadores externos, destacam-se o óxido crômico ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) e o dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ), que vêm sendo bastante utilizado nos últimos anos. Dos indicadores externos, o mais utilizado é o óxido crômico. Sua utilização é bastante difundida tanto nos ensaios de digestibilidade total como parcial. Apesar da grande variação de resultados (Freitas et al., 2002), seu uso é estimulado, principalmente, pelo baixo custo e análise relativamente fácil (Merchen, 1993). Quanto aos indicadores internos, as fibras indigestíveis são as mais utilizadas, destacando-se as frações químicas fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e fibra em detergente ácido indigestível (FDAi) (Penning & Johnson, 1983; Cochran et al., 1986; Casali, 2008) e a fração física matéria seca indigestível (MSi) (Huhtanen et al., 1994; Detmann et al., 2001).

Embora a utilização de indicadores nos ensaios de digestibilidade total e parcial seja muito discutida, até o momento, não foi encontrada nenhuma substância com características de indicador ideal. Por esta razão, a procura de melhores indicadores e o aprimoramento na utilização daqueles que já existem constitui um dos assuntos de grande interesse nos estudos de nutrição animal.

Aliado aos ensaios de digestibilidade, a quantificação da proteína microbiana que chega ao duodeno constitui ponto de grande relevância nos estudos metabólicos com ruminantes. A proteína microbiana responde, em média, por 60% dos aminoácidos absorvidos no intestino e sua digestibilidade intestinal é de cerca de 80%. A sua composição é relativamente constante e independe da composição protéica ingerida pelo animal. Todos os aminoácidos, incluindo os aminoácidos essenciais, estão presentes na sua composição em uma proporção muito próxima da ideal. Com este propósito, vários

indicadores microbianos têm sido utilizados, cada um com suas vantagens e limitações. Esses indicadores classificam-se em internos (ácido 2,6-diaminopimérico (DAPA), bases purinas, D-alanina), quando fazem parte da constituição da célula microbiana, externos ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$  e  $^{32}\text{P}$ ) quando são administrados aos animais para que sejam incorporados pelos microrganismos ruminais e os metabólicos (derivados de purina), que são moléculas ou substâncias formadas, a partir, do metabolismo de outras.

Dentre esses indicadores, o ácido 2,6-diaminopimérico (DAPA) destaca-se por fazer parte da parede celular bacteriana, não requisitando fornecimento e tempo para equilíbrio de excreção. Por estas vantagens foi amplamente utilizado no passado, inclusive no Brasil. A sua quantificação laboratorial, no entanto, era realizada por cromatografia clássica. A metodologia de análise por apresentar uma série de etapas acumulava muitos erros e, além disso, era muito laboriosa, demandando grande tempo de trabalho, caindo assim, em desuso. Daí a importância de desenvolvimento de uma técnica de análise mais simples, prática e acurada.

Somando-se aos ensaios de digestibilidade total ou parcial e à quantificação do fluxo microbiano, o entendimento da cinética de passagem também ocupa destaque nas pesquisas que tem por finalidade o entendimento dos processos metabólicos do animal ruminante. No entanto, neste tipo de estudo os dados são mensurados por análise da excreção fecal de indicadores aplicados em forragens intactas e dose pulso. Embora esses dados possam ser úteis para avaliar diferenças relativas entre tratamentos, não permitem prever a digestibilidade das frações do alimento. Isto é problemático em virtude da diferença na degradabilidade das frações e tamanho de partículas, fator este responsável por diferenças na taxa de passagem para as várias frações do alimento. Portanto, os indicadores externos mordantados não podem ser usados para mensurar taxas de passagem das diferentes frações do alimento. Dessa forma, a busca por novas técnicas que possam mensurar a cinética de passagem intrinsecamente relacionada à cada fração do alimento deve constituir interesse de extrema importância.

Diante de tudo o exposto, os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar as estimativas de produção fecal e digestibilidade para bovinos leiteiros através de diferentes indicadores;
- Avaliar o tempo de adaptação necessário para o indicador NANOLIPE<sup>®</sup> atingir equilíbrio de excreção e validá-lo, a partir de comparações com o método de coleta total;

- Avaliar a utilização de diferentes períodos de coleta de fezes sobre as estimativas do indicador LIPE<sup>®</sup>;
- Avaliar o consumo e as digestibilidades parcial e total de diferentes volumosos através de ensaio de digestibilidade “in vivo”;
- Comparar as estimativas de fluxo omasal, digestibilidades ruminal e intestinal de dietas obtidas por diferentes indicadores;
- Validar o LIPE<sup>®</sup> como indicador em estudos de digestibilidade parcial;
- Separar e quantificar o ácido 2,6-diaminopimélico (DAPA) usando a cromatografia líquida de alta eficiência com troca iônica.
- Mensurar o fluxo de nitrogênio microbiano omasal, bem como a eficiência de síntese em novilhas submetidas à dietas com diferentes volumosos.
- Estudar a cinética de passagem em novilhas submetidas à dietas com diferentes volumosos através da técnica de indicadores, representada pela fibra mordantada com cromo, e da técnica de esvaziamento ruminal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERCHIELLI, T. T. *et al.* Comparação de indicadores de fase sólida para medir fluxo de matéria seca e matéria orgânica no duodeno. **Arq. Bras. Vet. Zootec.** v. 50, n. 2, p.147-152, 1998.

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.

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T. *et al.* Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1600-1609, 2001.

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.

HUHTANEN, P.; KAUSTELL, K.; JAAKKOLA, S. The use of internal markers to predict

total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, p.211-227, 1994.

MERCHEN, R.N.; ELIZALDE, J.C.; DRACKLEY, J.K. Current perspective on assessing site of digestion in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.75, n.8, p.2223-2234, 1997

MERCHEN, N.R. **Digestion, absorption and excretion in ruminantes** In: CHURCH, D.C. (Ed.) The ruminant animal digestive physiology and nutrition. 4.ed. Carvallis: O&B Books. p.172-201. 1993.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7 ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 381p. 2001.

OWENS, F.N.; HANSON, C.F. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2605-2617, 1992.

PENNING. P.D.; JOHNSON, R.H. The use of internal markes to estimate herbage digestibility and intake. 2. Indigestible acid detergent fiber. **Journal of Agricultural Science**, v.100, p.133-138, 1983.

PIAGGIO, L. M. et al. Avaliação das cinzas insolúveis em ácido, fibra detergente ácido indigestível e lignina em detergente ácido indigestível como indicadores internos da digestibilidade. **Rev. Soc. Bras. Zootec.** v. 20, n. 3, p. 306-312, 1991.

SALIBA, E.O.S.; RODRIGUEZ, N.M.; GONÇALVES, L.C. et al. Estudo comparativo da lignina isolada da palha de milho, com outros indicadores em ensaio de digestibilidade aparente. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999a. (CD-ROM).

SALIBA, E.O.S.; RODRIGEZ, N.M.; PILO-VELOSO, D. et al. Estudo comparativo da coleta total com a lignina purificada como indicador de digestibilidade para ovinos em experimento com feno de Tifton 85. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003a.

SALIBA, E. O. S. **Caracterização química e microscópica das ligninas dos resíduos agrícolas de milho e de soja expostos à degradação ruminal e seu efeito sobre a digestibilidade dos carboidratos estruturais**. 1998. 236 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, 1998.

## Capítulo 1 – Revisão de Literatura

### 1.1 Indicadores em estudos de nutrição animal

Para uma completa avaliação do valor nutritivo dos alimentos, além da sua composição química, os efeitos dos processos de consumo e digestão devem ser considerados, uma vez que, tais parâmetros constituem dois dos principais determinantes da qualidade desse alimento.

Nas avaliações de consumo e digestibilidade, no entanto, várias técnicas podem ser utilizadas alternativamente aos ensaios convencionais e, dentre elas, o método de indicadores. Essa metodologia foi desenvolvida em função do inconveniente e, em alguns casos da impossibilidade, de se realizar a coleta o total de fezes e controle da ingestão diários, comumente realizados nos estudos tradicionais (Penning & Johnson 1983; Lippke et al., 1986; Ferret et al. 1999).

O método dos indicadores apresenta vantagens, em virtude da simplicidade, conveniência de utilização, e, além disso, minimiza a interferência nos padrões de comportamento animal. Esse método pode proporcionar ainda, informações adicionais, incluindo-se a produção fecal, a taxa de passagem da digesta por diferentes segmentos do trato gastrointestinal, bem como a digestibilidade parcial do alimento, dieta ou nutriente específico nestes mesmos segmentos.

Indicadores são compostos de referência usados para monitorar aspectos químicos (como a hidrólise e síntese de compostos) e físicos da digestão (como a taxa de passagem) (Owens e Hanson, 1992), promovendo estimativas qualitativas ou quantitativas do metabolismo animal (Saliba, 1998).

Os indicadores são classificados como externos, quando adicionados à dieta ou fornecidos via oral ou ruminal aos animais e internos, representados pelas frações indigestíveis dos alimentos, geralmente uma fração da parede celular. Os indicadores internos apresentam a vantagem de já estarem presentes no alimento, não requerem preparação especial (Berchielli et al. 1998; Saliba, 1998) e, de modo geral, permanecerem distribuídos na digesta durante o processo de digestão e excreção (Piaggio et al., 1991).

Para que um indicador seja considerado ideal, deve possuir algumas propriedades fundamentais, dentre elas, ser inerte, não tóxico, não ter função fisiológica, não deve ser absorvido ou metabolizado, não deve afetar a população microbiana do trato

gastrointestinal, deve misturar-se bem ao alimento e permanecer uniformemente distribuído na digesta, deve fluir paralelamente ou ser fisicamente similar ou se associar intimamente com o material a ser avaliado, além de ser completamente recuperável e possuir um método de quantificação sensível, prático e preciso (Mayes et al., 1986; Owens & Hanson, 1992; Huhtanen et al., 1995, Saliba, 1998, Valadares Filho, 2009). Nenhum indicador, entretanto, preenche todos estes requisitos e, por esta razão, a procura de indicadores ideais constitui um dos assuntos de grande interesse nas pesquisas de nutrição animal.

### **1.1.1 LIPE<sup>®</sup> - Um breve histórico e novas perspectivas frente à Nanotecnologia**

Com o propósito de desenvolver um novo indicador, iniciou-se em meados da década de 1990 no Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG uma série de pesquisas. Nos primeiros estudos, a lignina isolada das palhas de milho e soja foi testada por Saliba (1998) e Saliba et al. (1999), mostrando-se indigestível. Apesar disso, seu isolamento para utilização como indicador não se justificava, pois a mesma não se destacou em relação aos indicadores comumente utilizados.

A partir de então, novas fontes foram estudadas para isolamento da lignina. Em 2002, esses mesmos pesquisadores começaram a trabalhar a molécula da lignina, no sentido de otimizar a sua determinação nas fezes. Saliba et al. (2003) isolaram a lignina da madeira do *Eucalyptus grandis* e a enriqueceram com grupamentos fenólicos não comumente encontrados na lignina da dieta animal. Esse trabalho deu origem a um hidroxifenilpropano modificado e enriquecido denominado LIPE<sup>®</sup>, um indicador externo de digestibilidade.

Saliba et al. (2004) caracterizaram a composição estrutural do LIPE<sup>®</sup> antes e após a sua passagem pelo trato-gastrointestinal de ovinos e verificaram que as amostras da lignina fecal mostraram espectros similares aos do LIPE<sup>®</sup>. Através deste experimento demonstrou-se que este indicador passou pelo trato gastrointestinal sem ser digerido e absorvido, sendo totalmente recuperado nas fezes. Com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura pôde-se observar a integridade ultraestrutural do polímero recuperado nas fezes e que o LIPE<sup>®</sup> assemelha-se às ligninas de madeiras duras. Estes estudos revelaram que o LIPE<sup>®</sup> apresenta propriedades físico-químicas bastante estáveis e uma grande consistência químico-estrutural, mostrando-se inalterado no trajeto pelo trato gastrointestinal dos animais, sendo totalmente recuperado nas fezes. Estas características sugeriram que o

produto poderia ser usado como indicador externo em estudos de digestibilidade de forma confiável.

O LIPE<sup>®</sup> foi inicialmente utilizado num estudo com coelhos. Posteriormente, uma série de experimentos foi conduzida com diferentes espécies: ovinos, aves, suínos, eqüinos e bovinos. As estimativas de produção fecal e digestibilidade revelaram a sua eficiência como indicador externo, uma vez que, não apresentou diferenças em relação à coleta total. Além disso, apresentou as vantagens de um curto período de adaptação, além do baixo custo. Hoje, este indicador já é amplamente utilizado e consolidado em estudos de digestibilidade total, pois fornece estimativas precisas (Saliba, 2005). Além disso, não apresenta variação diurna de excreção nas fezes, possibilitando o fornecimento e amostragem das fezes uma vez ao dia (Rodriguez et al., 2006).

Frente aos bons resultados obtidos com esse indicador e o advento da nanotecnologia, foi então desenvolvido por esse mesmo Grupo de Pesquisa um indicador com as características do LIPE<sup>®</sup>, porém com propriedades nanométricas. A nanotecnologia é bastante abrangente e engloba muitas áreas de pesquisa e de manipulação de tecnologias em escala nanométrica. Um nanômetro (nm) é a bilionésima parte de um metro, ou uma milionésima parte de um milímetro. Portanto, a palavra refere-se à coisas extremamente pequenas, invisíveis a olho nu.

Os materiais fabricados ou construídos em nanoescala têm propriedades únicas e se comportam de forma diferente da matéria convencional e, isso se deve aos “efeitos quânticos”. Desse modo, podemos perceber que a nanotecnologia não é apenas a busca de se conseguir usar partículas ou materiais em um tamanho infinitamente menor do que o convencional, uma vez que, reduzindo o tamanho dos materiais, eles podem adquirir novas propriedades, como condutividade elétrica, maior resistência ou reatividade, além de maior velocidade de dispersão no trato gastrintestinal. Dentre estas propriedades, ressaltamos aquelas relacionadas ao metabolismo, onde a rápida dispersão poderá proporcionar uma melhor homogeneização do material na digesta e, assim, permitir um equilíbrio de excreção mais rápido.

Quando o Governo Federal lançou o primeiro edital na área da Nanociência e Nanotecnologia, em 2001, a nanotecnologia começou a tomar uma forma mais institucionalizada no Brasil. A pesquisa e o desenvolvimento das nanotecnologias por indústrias e instituições acadêmicas, desde então, buscaram o desenvolvimento de patentes

de novos materiais, dispositivos e processos de fabricação nanotecnológicos. O número de empresas e universidades com pesquisas na área a fim de desenvolver tecnologicamente produtos presentes no dia-a-dia se tornou cada vez mais crescente, ano após ano. Foi então que o referido grupo de pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais que apresenta como principal linha de pesquisa o uso e desenvolvimento de indicadores em estudos de nutrição animal teve a idéia de desenvolver um indicador com características nanométricas. Foi desenvolvido então, com esse conceito, o NANOLIPE<sup>®</sup>. Para que a utilização desse indicador, no entanto, possa ser validada, o mesmo deve sempre ser comparado com um padrão, que no caso da digestibilidade, é a coleta total de fezes. Neste tipo de estudo, devem ser também avaliadas a recuperação fecal, e possíveis variações no fluxo de excreção ao longo do dia.

## **1.2 Indicadores Microbianos**

Devido à importância da proteína microbiana para o metabolismo protéico dos ruminantes, a quantificação do seu fluxo sob diferentes condições dietéticas e fisiológicas é fundamental para o atendimento dos requisitos em aminoácidos no intestino. Com este propósito, vários indicadores microbianos têm sido utilizados, cada um com suas vantagens e limitações.

Segundo Broderick & Merchen (1992), um indicador ideal deve cumprir os seguintes requisitos: ser de fácil determinação e quantificação, não estar presente na constituição dos alimentos oferecidos aos animais, ser distribuído de maneira uniforme em todas as espécies microbianas ruminais e ser biologicamente estável. Dehority (1995) apresenta outros três requisitos: não ser absorvido no trato digestivo, apresentar relação constante nos microrganismos ruminais em todas as fases do seu crescimento e que todas as suas formas, livres ou formando parte das células intactas de microrganismos ruminais ou de alguma de suas unidades apresentem o mesmo ritmo de trânsito através do trato digestivo. Indubtavelmente, nenhum dos indicadores até o momento cumpre todos esses requisitos (Broderick & Merchen, 1992; Obispo e Dehority (1999).

Os indicadores microbianos classificam-se em três grupos: internos, externos e metabólicos. Os indicadores internos são aqueles que fazem parte da constituição da célula microbiana e, por isso, não necessitam ser administrados aos animais experimentais. Dentre os indicadores internos podemos citar os ácidos nucleicos (DNA e RNA), as bases

purinas, D-alanina, ácido aminoetilfosfônico (AEP), o ácido 2,6-diaminopimélico (DAPA), perfil de aminoácidos e ATP. Já os indicadores externos são aqueles que devem ser administrados aos animais para que sejam incorporados pelos microrganismos ruminais e passem a fazer parte da estrutura destes. O procedimento mais empregado consiste em realizar uma infusão contínua do indicador no rúmen destes animais durante o período experimental até atingir condições de equilíbrio. Os principais indicadores externos são o  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$  e  $^{32}\text{P}$ . Finalmente, temos os indicadores metabólicos, que são moléculas ou substâncias formadas, a partir, do metabolismo de outras. Dentro desta classificação temos como exemplo, os derivados de purina (DP) que, por sua vez, são resultantes do catabolismo das bases purínicas adenina e guanina e que são excretadas na urina.

### **1.2.1 Ácido 2,6-Diaminopimélico (DAPA)**

Em 1950, Work relatou a descoberta de um novo aminoácido, o ácido 2,6-diaminopimélico (DAPA), na bactéria gram negativa *Corynebacterium diphtheriae*. Posteriormente, esse aminoácido foi encontrado nos oligopeptídeos ligados aos peptidoglicanos da parede celular bacteriana (Ling, 1990), não encontrado-se presentes, no entanto, em todas as bactérias ruminais (Quigley & Schwab, 1988). Além do DAPA, o aminoácido D-alanina e o ácido murâmico, também constituintes da parede celular bacteriana, são compostos microbianos utilizados como indicadores.

O DAPA foi sugerido como indicador microbiano em 1953 por Synge e, desde então, foi utilizado em diversos experimentos para estimar a síntese de proteína microbiana (Broderick & Merchen, 1992). A concentração de DAPA pode ser obtida conforme Czerkawski (1974) e, juntamente com a mensuração do fluxo duodenal, o fluxo de proteína microbiana pode ser estimado a partir da relação DAPA:N microbiano. Tal proporção pode, no entanto, variar entre as espécies bacterianas e de acordo com a dieta (Berger & Merchen, 1984; Dufva et al., 1982). Purser & Buechler (1966) relataram que a concentração de DAPA pode variar de zero a valores quatro vezes maiores que a média de 22 cepas bacterianas do rúmen.

Além de ser encontrado nas bactérias, a presença do DAPA também foi relatada nos alimentos e protozoários (Dufva et al., 1982; Theurer, 1982; Rahnema & Theurer, 1986), o que pode contribuir para a variabilidade das estimativas obtidas com o método. Rahnema & Theurer (1986) relataram que a relação DAPA:N nos alimentos comuns foi de 18 a 40%

em relação àqueles encontrados em isolados de bactérias ruminais. Eles sugeriram que o fluxo microbiano para o intestino deve ser corrigido para a ingestão de DAPA através da dieta. As concentrações de DAPA relatadas por Rahnemae & Theurer (1986) também foram elevadas, sendo atribuídas somente à contaminação bacteriana. Quanto aos protozoários, no entanto, estes são menos numerosos no conteúdo ruminal, mas devido ao seu maior tamanho, podem representar parcela significativa da biomassa microbiana do rúmen. Czerkawski (1974) relatou diferentes relações DAPA:N entre bactérias pequenas, bactérias grandes e protozoários, mostrando valores de 7,3; 4,7; e 0,9, respectivamente. Porém, segundo ele, a relação DAPA:N da mistura de bactérias ruminais é relativamente constante.

Para Czerkawski (1974) e Rahnemae & Theurer (1986), preparações ruminais de protozoários contêm algum DAPA em parte devido contaminação bacteriana do protozoário durante o isolamento por centrifugação diferencial, mas principalmente, por causa da presença de bactérias não digeridas dentro dos protozoários, engolfadas durante a predação das mesmas (Hutton et. al., 1971; Coleman, 1975). Assim, o fluxo de DAPA para o intestino reflete parcialmente a proteína dos protozoários. No entanto, os protozoários têm uma relação DAPA:N inferior às bactérias.

Hutton et al (1971) relataram teores médios de N e DAPA bacteriano ruminal de 8,4% e 0,46%, respectivamente, com relação DAPA:N de 19,1. Estes autores concluíram que a contribuição de N bacteriano no N duodenal total pode ser estimada pelo DAPA.

Para Ling & Buttery (1978) a variação nas concentrações entre *pools* microbianos e contaminação dos alimentos não são os únicos problemas do DAPA. Denholme & Ling (1989) levantaram um potencial problema com o DAPA. Eles observaram que o DAPA marcado com  $^3\text{H}$  em bactérias gram-positivas e gram-negativas foi degradado em diferentes taxas por protozoários e bactérias ruminais *in vitro*. Klopfenstein & Britton (1984) relataram ainda, que bactérias fixadas às fibras das plantas ou associadas à fase líquida também podem contribuir para a variabilidade do método DAPA.

A relação DAPA:N varia substancialmente mesmo entre animais recebendo a mesma dieta, com o tempo após a alimentação (Ling & Buttery, 1978) e entre bactérias associadas à fase líquida (BAL) e bactérias associadas à fase sólida (BAS) (Merry & McAllan, 1983). No entanto, muitos pesquisadores (Czerkawski, 1974; Ling & Buttery,

1978; Theurer, 1982; Rahnamae & Theurer, 1986) têm usado o DAPA com sucesso para determinação da relação DAPA:N sob condições específicas.

Dados *in vivo* de Masson et al. (1991), apresentados na Figura 1, mostram que a proporção de DAPA associado à célula bacteriana em relação à concentração total na digesta variou de 69%, uma hora antes da alimentação, até 29%, cinco horas após a mesma e de 30% 12 horas após a alimentação a 59% em 24 horas. De acordo com o estudo, o padrão ruminal tende a ser semelhante, porém a proporção de DAPA que deixa o rúmen oriundo das células bacterianas intactas é variável e muitas vezes, mais da metade pode não ser proveniente da parede celular.

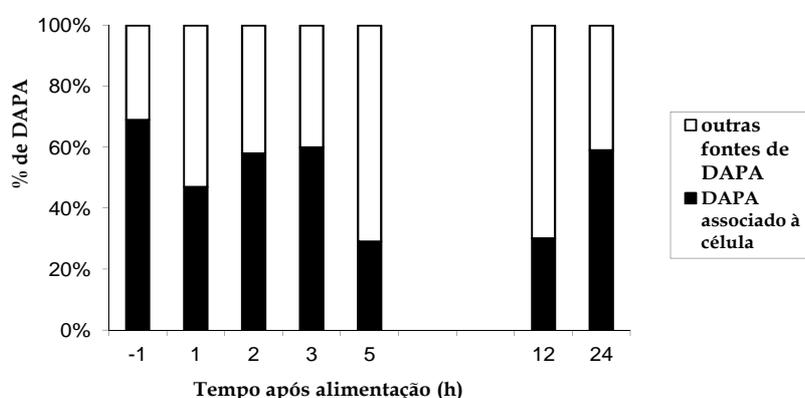


Figura 1. Nível do ácido 2,6-diaminopimélico (DAPA) na digesta duodenal associado à parede celular bacteriana em diferentes tempos após a alimentação (Adaptado de Masson et al., 1991)

Assim, o DAPA total que flui do rúmen pode ser desproporcionalmente alto, e a utilização da relação DAPA:N determinado com isolamento bacteriano pode levar à uma superestimativa da síntese de proteína bacteriana (Ling, 1990).

Quigley & Schwab (1988) observaram variação de 3,7 a 7,3 mg de DAPA/g de N na bactéria ruminal, em novilhas Holandesas entre as 2 e 11 semanas de idade. Estes autores também observaram que entre 2 e 5 semanas de idade, a concentração de N proveniente do DAPA foi menor, provavelmente devido ao estabelecimento incompleto da flora bacteriana nesta idade. Encontraram ainda, concentração média de DAPA na digesta abomasal de 2,4 mg/g N, entre a 2ª e 8ª semanas, com correlação de 89% entre a

concentração semanal de N proveniente do DAPA abomasal com o início do consumo de volumoso e concentrado, o que é indicativo do período de transição, no qual o animal torna-se efetivamente ruminante. Para Quigley & Schwab (1988), a estimativa de N bacteriano no N abomasal total pelo DAPA aumentou de 23% na 2ª semana de idade até o máximo de 68% na 11ª semana (Figura 2). Foi observada correlação de 92% entre a estimativa de DAPA e o aumento do consumo de volumoso e concentrado, representando o padrão de desenvolvimento ruminal.



Figura 2. Média semanal da contribuição de N bacteriano no N abomasal total estimado pelo ácido diaminopimélico (DAPA) em novilhas entre 2 e 11 semanas de idade (Adaptado de Quigley & Schwab, 1988)

Hutton et. al. (1971) estudando ovelhas sob regime alimentar constante por um período superior a 3 meses não observou variação na relação DAPA:N. Uma vez que este aminoácido é desprovido de outras fontes nitrogenadas e que a relação DAPA:N numa amostra de bactéria ruminal é representativa da população bacteriana ruminal, o uso do DAPA como marcador de N bacteriano mostra-se adequado (Hutton et al., 1971).

### 1.3 Referências Bibliográficas

BERCHIELLI, T. T. *et al.* Comparação de indicadores de fase sólida para medir fluxo de matéria seca e matéria orgânica no duodeno. *Arq. Bras. Vet. Zootec.* v. 50, n. 2, p.147-152, 1998.

BERGER, L.L.; MERCHEN, N.R. Markers to estimate microbial protein synthesis in ruminants. *J. Ani Sci.*, v.59, n.1, p. 432, 1984.

BRODERICK, G.A.; MERCHEN, N.R. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *J. Dairy. Sci.*, v.75, n.9, p.2618-2632, 1992.

COLEMAN, G. S. The interrelationships between rumen ciliate protozoa and bacteria. In: *Digestion and Metabolism in the Ruminant*. I. W. McDONALD, I. W; WARNER, A. C. I. Ed. Univ. New England Publ. Unit, Armidale, New South Wales, Aust., p. 149, 1975.

CZERKAWSKI, J. W. Methods for determining 2,6-diaminopirnelic acid and 2-aminoethylphosphonic acid in gut contents. *J. Sci. Food Agric.* 25:45. 1974.

DENHOLM, A. M., J. R. LING. In vitro metabolism of 2,6-diaminopimelic acid from Grampositive and Gram-negative bacterial cells by ruminal protozoa and bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 212. 1989.

DUFVA, G.S.; BARTLEY, E.E.; ARAMBEL, M.J. et al. Diaminopimelic acid content of feeds and rumen bacteria and its usefulness as a rumen bacterial marker. *J. Dairy Sci.*, v. 65, p.1754, 1982.

FERRET, A. *et al.* Using markers to estimate dry matter digestibility, faecal output and dry matter intake in dairy ewes fed italian ryegrass hay or alfalfa hay. *Small Ruminant Res.* v. 33, n. 2, p. 145-152, 1999.

HUHTANEN, P.; JAAKKOLA, S.; KUKKINEN, U. Ruminal plant cell wall digestibility estimated from digestion and passage kinetics utilizing mathematical models. *Anim. Feed Sci. Technol.* v. 49, n. 1/2, p. 159-173, 1995.

HUTTON, K.; BAILEY, F.J.; ANNISON, E.F. Measurement of the bacterial nitrogen entering the duodenum of the ruminant using diaminopimelic acid as a marker. *Br. J. Nutr.*, v.25, p. 165-173, 1971.

KLOPFESTEIN, T.J.; BRITTON, R.A. Diaminopimelic acid as a microbial marker. *J. Ani. Sci.*, v.59, n.1, p.432, 1984.

LING, J. R.; BUTTERY, P. J. The simultaneous use of ribonucleic acid, <sup>35</sup>S, 2,6-diaminopimelic acid and 2-aminoethylphosphonic acid as markers for microbial nitrogen entering the duodenum of sheep. *Br. J. Nutr.*, v. 39, p. 165, 1978.

LING, J. R. Digestion of bacterial cells in the rumen. In: HOSHINO, S., ONODERA, R., MINATO, H., ITABASHI, H. (Ed.). *The rumen ecosystem*. The microbial metabolism and its regulation. Springer-Verlag, New York, p. 83, 1990.

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.

MASSON, H. A.; DENHOLM, A. M.; LING, J. R. In vivo metabolism of 2,2'-diaminopimelic acid from Gram-positive and Gram-negative bacterial cells by ruminal

microorganisms and ruminants and its use as a marker of bacterial biomass. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 57, p.1714, 1991.

MAYES, R. W.; LAMB, C. S.; COLGROVE, P. M. The use of dosed and herbage n- alcanes as markers for the determination of herbage intake. *J. Agric. Sci.* v. 107, n. 1, p. 161-170, 1986.

MERRY, R. J., MCALLAN, A. B. A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta. *Br. J. Nutr.*, v. 50, p. 701, 1983.

OWENS, F.N.; HANSON, C.F. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *Journal of Dairy Science*, v. 75, p. 2605-2617, 1992.

PENNING. P.D.; JOHNSON, R.H. The use of internal markers to estimate herbage digestibility and intake. 2. Indigestible acid detergent fiber. *Journal of Agricultural Science*, v. 100, p. 133-138, 1983.

PIAGGIO, L. M. *et al.* Avaliação das cinzas insolúveis em ácido, fibra detergente ácido indigestível e lignina em detergente ácido indigestível como indicadores internos da digestibilidade. *Rev. Soc. Bras. Zootec.* v. 20, n. 3, p. 306-312, 1991.

PURSER, D. B., and S. M. BUECHLER. Amino acid composition of m e n organisms. *J. Dairy Sci.*, v. 49, n. 81, 1966.

QUIGLEY, J.D.; SCHWAB, C.G. Comparison of d-alanine and diaminopimelic acid as bacterial markers in young calves. *J. Ani. Sci.*, v. 66, p. 758-763, 1988.

RAHNEMA, S.H.; THEURER, B. Comparison of various aminoacids for estimation of microbial nitrogen in digesta. *J. Ani. Sci.*, v. 63, p. 603, 1986.

RODRIGUEZ, N. M.; SALIBA, E. O. S.; GUIMARÃES JÚNIOR, R. Uso de indicadores para estimativa de consumo a pasto e digestibilidade. In: GONZAGA NETO, S.; COSTA, R. G.; CAVALCANTI, E. (Eds.) SIMPÓSIOS DA XLIII REUNIÃO ANUAL DA SBZ, João Pessoa, 2006. *Anais...* João Pessoa: SBZ/UFPA, 2006. p. 323-352.

SYNGE, R. L. M. Note on the occurrence of diaminopimelic acid in some intestinal microorganisms from farm animals. *J. Gen. Microbiol.*, v. 9, p. 407, 1953.

SALIBA, E. O. S. *Caracterização química e microscópica das ligninas dos resíduos agrícolas de milho e de soja expostos à degradação ruminal e seu efeito sobre a digestibilidade dos carboidratos estruturais.* 1998. 236 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, 1998.

SALIBA, E.O.S.; RODRIGUEZ, N.M.; GONÇALVES, L.C. et al. Estudo comparativo da lignina isolada da palha de milho, com outros indicadores em ensaio de digestibilidade aparente. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. *Anais...* São Paulo: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999. (CD-ROM).

SALIBA, E.O.S.; RODRIGEZ, N.M.; PILO-VELOSO, D. et al. Estudo comparativo da coleta total com a lignina purificada como indicador de digestibilidade para ovinos em experimento com feno de Tifton 85. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. *Anais...* Santa Maria: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003. (CD-ROM).

SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M et al. Structural characterization of lignin from *Eucalipitus Grandis* before and after exposure to the gastrointestinal tract of ruminants. In: 8º SIMPÓSIO MUNDIAL DE LIGNINAS, 2004. São Carlos: *Anais...* São Carlos, 2004.

SALIBA, E. O. S. Mini curso sobre o uso de indicadores. In: I TELECONFERÊNCIA SOBRE INDICADORES EM NUTRIÇÃO ANIMAL, 2005. Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: EV – UFMG, 2005, p.23-26.

THEURER. C. B. Microbial protein estimation using DAP, AEP and other amino acids as markers. In: Protein Requirements for Cattle: *Symposium*. F. N. Owens, ed. Oklahoma State Univ., Stillwater, p. 10, 1982.

VALADARES FILHO, S. C.; AZEVÊDO, J. A. G. et al. “Utilização de Indicadores na Avaliação do Consumo de Animais: Estado de Arte”. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL AVANÇOS EM TÉCNICAS DE PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE RUMINANTES, 2009, Pirassununga. *Anais...* Pirassununga, 2009.

WORK, I. A new naturally occurring amino-acid. *Nature* (Lond.) 165:74. 1950.

## Capítulo 2 – Validação do NANOLIPE<sup>®</sup> como Indicador de Digestibilidade para Bovinos e de Menor Período de Coleta para o Indicador LIPE<sup>®</sup>

### 2.1 Introdução

A digestibilidade de um alimento ou dieta é uma função da fração ingerida que é absorvida durante a passagem pelo trato gastrintestinal. Para determinação deste parâmetro, a quantificação da fração indigestível, representada pelas fezes, constitui procedimento imprescindível. A coleta total de fezes, no entanto, além de muito trabalhosa, torna-se impraticável em experimentos com animais em pastejo ou até mesmo em confinamento, quando não se dispõe de mão-de-obra suficiente para tal.

Entretanto, outras metodologias podem ser utilizadas alternativamente com o mesmo propósito e, dentre elas, a técnica de indicadores. O uso de indicadores além de viabilizar a realização de estudos que não seriam possíveis convencionalmente, minimiza a interferência nos padrões de comportamento animal. Nenhum indicador, entretanto, preenche todos os requisitos necessários para que seja considerado ideal e, por esta razão, a pesquisa de novos indicadores ou aprimoramento na utilização dos já existentes constitui assunto de grande interesse nas pesquisas de nutrição animal.

Com este propósito, iniciou-se em meados da década de 90 no Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG uma série de pesquisas com vistas ao desenvolvimento de um novo indicador. Após alguns estudos iniciais, Saliba et al. (2003a) isolaram a lignina da madeira do *Eucalyptus grandis* e a enriqueceram com grupamentos fenólicos não comumente encontrados na lignina da dieta animal. Esse trabalho deu origem a um hidroxifenilpropano modificado e enriquecido denominado LIPE<sup>®</sup>.

Saliba et al. (2004) caracterizaram a composição estrutural do LIPE<sup>®</sup> antes e após a sua passagem pelo trato gastrointestinal de ovinos e verificaram que as amostras da lignina fecal mostraram espectros similares aos do LIPE<sup>®</sup> e que o mesmo não foi digerido ou absorvido durante o trajeto. Observaram ainda, com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura, a integridade ultraestrutural do polímero recuperado nas fezes, denotando propriedades físico-químicas bastante estáveis e uma grande consistência químico-estrutural. Estas características sugeriram que o produto poderia ser usado como indicador externo em estudos de digestibilidade de forma confiável.

O LIPE<sup>®</sup> foi inicialmente utilizado num estudo com coelhos. Posteriormente, uma série de experimentos foi conduzida com diferentes espécies: ovinos, aves, suínos, eqüinos e bovinos. As estimativas de produção fecal e digestibilidade revelaram a sua eficiência como indicador externo. Além disso, apresentou as vantagens de um curto período de adaptação, ausência de variação diurna de excreção nas fezes e baixo custo (Rodriguez et al., 2006). Hoje, este indicador já é amplamente utilizado em estudos de digestibilidade total, apresentado um período de adaptação de dois dias seguidos de cinco dias de coleta.

Frente aos bons resultados obtidos com o LIPE<sup>®</sup> e o advento da nanotecnologia, foi então desenvolvido por esse mesmo Grupo de Pesquisa um indicador com as características do indicador supracitado, porém com propriedades nanométricas denominado NANOLIPE<sup>®</sup>.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as estimativas de produção fecal e digestibilidade para bovinos leiteiros através de diferentes indicadores. Para tanto, foram realizados dois experimentos. O experimento 1 apresentou como foco a avaliação de diferentes períodos de coleta de fezes sobre as estimativas do indicador LIPE<sup>®</sup>. Para o experimento 2, o objetivo central do estudo foi a avaliação do tempo de adaptação necessário para o indicador NANOLIPE<sup>®</sup> atingir equilíbrio de excreção.

## **2.2 Material e Métodos**

Foram realizados dois experimentos. Ambos foram conduzidos nas dependências da Fazenda São Francisco, no município de Ijaci, Minas Gerais. Em cada ensaio foram utilizadas 10 vacas da raça Holandês com peso vivo médio de 631 kg. As vacas foram identificadas e alimentadas individualmente em confinamento total do tipo “Tie Stall” com camas de areia e acesso contínuo à água. Os animais receberam dieta única, constituída de silagem de milho (*Zea mays*, L.), feno de tifton (*Cynodon spp.*), milho moído, polpa cítrica, farelo de soja, soja grão crua, soja grão tostada e premix mineral (Tabelas 1 e 2).

A dieta foi dividida em duas refeições diárias, sendo fornecida às 5:30 e 13:30 horas na forma de dieta completa, à vontade em quantidade suficiente para obter, no mínimo, 15% do oferecido como sobra diária. A proporção de ingredientes na matéria seca

foi mantida constante por monitoramento semanal da porcentagem de matéria seca da silagem de milho.

Tabela 1. Composição da dieta experimental em ingredientes

Ingredientes	% Matéria Seca
Silagem de Milho	38,1
Feno de Tifton	7,9
Milho Moído	24,1
Polpa Cítrica	8,4
Soja Grão Crua	6,6
Soja Grão Tostada	6,6
Farelo de Soja	5,1
Premix <sup>1</sup>	3,2

<sup>1</sup>Premix: 12,5% de Uréia; 6,3% de Óxido de magnésio; 25% de Bicarbonato de sódio; 10% de NaCl; 10% de Vacci-Phos 156 + ADE; 36,3% de Calcário Calcítico.

Tabela 2. Composição da dieta experimental em nutrientes

Nutriente	% Matéria Seca
Proteína bruta	14,91
Fibra em detergente neutro	34,64
Fibra em detergente ácido	21,25
Cinzas	7,98
Extrato etéreo	6,01
Carboidratos não-fibrosos	36,30
	% Matéria Natural
Matéria seca	55,50

Cada ensaio consistiu de 14 dias de adaptação à dieta. Quanto à adaptação aos indicadores, utilizou-se um período de 10 dias para o óxido crômico ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ), que foi fornecido acondicionado em papel de celulose em dose única diária às 12 horas, antes da ordenha da tarde, a partir do 5º dia do período experimental.

No primeiro ensaio foi utilizado ainda o indicador LIPE<sup>®</sup> com dois dias de adaptação e três ou cinco dias de coleta de fezes. O indicador LIPE<sup>®</sup> foi fornecido na forma de cápsulas, na dose de 500 mg por vaca, diariamente, entre os dias 13 e 18. Os períodos de coleta com este indicador constituíram dois dos tratamentos deste ensaio.

No ensaio dois, além do óxido crômico foi utilizado também o indicador NANOLIPE<sup>®</sup>, com um ou dois dias de adaptação e um único dia de coleta, para ambos os

tratamentos com este indicador. A hipótese do presente trabalho é que o equilíbrio de excreção seria atingido no prazo de 24 horas após o fornecimento em virtude de uma melhor dispersão do indicador NANOLIPE<sup>®</sup> na digesta em função das propriedades nanométricas. Ainda assim, foi testado também período de adaptação de dois dias. O NANOLIPE<sup>®</sup> foi fornecido na forma de cápsulas, na dose de 500 mg. Os períodos de adaptação para o referido indicador constituíram dois dos tratamentos do segundo ensaio.

Todos os indicadores em ambos os ensaios foram fornecidos oralmente com posterior massagem do palato a fim de estimular a deglutição e, assim, garantir a ingestão dos mesmos.

As avaliações de consumo e digestibilidade foram realizadas entre os dias 15 e 20. Entre os dias 16 e 20, as sobras de cada animal foram pesadas diariamente antes da alimentação da manhã. Uma amostra composta foi formada por vaca, através da mistura de quantidades idênticas de matéria natural das sobras diárias. Entre os dias 15 e 19, os volumosos, silagem de milho e feno de tifton, assim como os concentrados e o premix foram amostrados diariamente e amostras compostas foram feitas para cada alimento.

O consumo diário de matéria seca foi calculado multiplicando o consumo diário de matéria natural de cada alimento, entre os dias 15 e 20, por seu respectivo teor de matéria seca, seguido de subtração da sobra diária de matéria seca. A ingestão diária de nutrientes por animal foi calculada multiplicando o oferecido de matéria seca de cada ingrediente por seu respectivo teor nutritivo. Do total de nutrientes oferecidos foi subtraída a massa diária do mesmo nutriente na sobra de cada animal.

A produção fecal e a digestibilidade da matéria seca e demais nutrientes foram mensuradas por coleta total de fezes e através dos diferentes indicadores. A coleta total de fezes realizada por 8 horas ininterruptas entre os dias 17 e 19. A coleta de fezes em cada dia foi iniciada com 8 horas de atraso com relação ao dia anterior, visando obter uma amostragem representativa das 24 horas do dia sem causar distúrbio no consumo de alimentos e na produção de leite dos animais. Durante o período de coleta, as fezes foram pesadas e continuamente congeladas e uma amostra composta foi formada por vaca. Simultaneamente, amostras de fezes para análise de indicadores foram coletadas diretamente na ampola retal em intervalos de seis horas, ao longo do dia, durante todo o período de coleta de fezes a fim de evitar o efeito da variação diurna na excreção dos

indicadores. Ao final, foram também feitas amostras compostas para cada animal, para análise dos diferentes indicadores.

As análises laboratoriais foram conduzidas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais (LABNUTRI/EV-UFMG). As amostras sofreram pré-secagem à 55°C, posteriormente foram moídas em moinho tipo Thomas-Willey com peneira de 1 mm e armazenadas em recipientes plásticos para realização das análises químicas. Foram determinados os teores matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) segundo o AOAC (1995). As cinzas foram determinadas através da incineração das amostras em mufla a 600°C por oito horas. As análises de fibra em detergente neutro (FDN) foram realizadas conforme técnica descrita por Van Soest et al. (1991). O teor de carboidratos não-fibrosos (CNF) foi obtido pela equação  $CNF = 100 - (\%FDN + \%PB + \%EE + \%Cinzas)$ , proposta por Sniffen et al. (1992). A concentração de cromo nas fezes foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica (Williams et al., 1962). As análises dos indicadores LIPE<sup>®</sup> e NANOLIPE<sup>®</sup> foram realizadas em espectrofotômetro com detector de luz no espectro do infravermelho (Saliba et al., 2005a). Os coeficientes de digestibilidade foram calculados a partir dos dados de consumo, medidos durante o período experimental, e dos dados de produção fecal, obtidos pela coleta total de fezes ou estimados pelo com os indicadores óxido crômico, LIPE<sup>®</sup>, NANOLIPE<sup>®</sup>, conforme proposto por Maynard et al. (1984):

$$CD (\%) = [(NUT_{CON} - NUT_{EXC}) / NUT_{CON}] \times 100$$

onde:

CD = coeficiente de digestibilidade,  $NUT_{CON}$  = quantidade de nutriente consumido, e  $NUT_{EXC}$  = quantidade de nutriente excretado.

Para as estimativas de produção fecal com os indicadores foi utilizada a fórmula proposta por Smith & Reid (1955):

$$\text{Produção fecal (kg/dia)} = \frac{\text{Dose do indicador (g/dia)}}{\text{Concentração do indicador (g/g MS)}}$$

A recuperação fecal dos indicadores foi calculada a partir dos valores de produção fecal obtidos com uso dos indicadores externos (óxido crômico, LIPE<sup>®</sup> e NANOLIPE<sup>®</sup>) e da produção fecal obtida pela coleta total das fezes, conforme Zeoula et al. (2002). Os valores encontrados por meio dos indicadores foram comparados ao valor de 100%, que representa recuperação fecal completa de um indicador.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e às médias dos tratamentos comparadas pelo teste de SNK a 5% de probabilidade por meio do software estatístico SISVAR (Ferreira, 2000) com o modelo:  $Y_{ijk} = \mu + T_i + V_{ij} + e_{ijk}$ , em que:  $\mu$  = média geral;  $T_i$  = efeito do tratamento ( $i = 1$  a 4);  $V_{ij}$  = efeito de vaca ( $j = 1$  a 10), sendo vaca considerada como bloco;  $e_{ijk}$  = erro experimental independente e com distribuição normal, com média zero e variância  $\sigma^2$ . No ensaio 1, os tratamentos foram: óxido crômico, LIPE<sup>®</sup> com período de coleta de três dias, LIPE<sup>®</sup> com período de coleta de cinco dias e coleta total de fezes. No ensaio 2, os tratamentos foram: óxido crômico, NANOLIPE<sup>®</sup> com período de adaptação de um dia, NANOLIPE<sup>®</sup> com período de adaptação de dois dias e coleta total de fezes. Os dois ensaios seguiram o mesmo modelo estatístico.

### **2.3 Resultados e Discussão**

Os dados de produção fecal obtidos com o indicador LIPE<sup>®</sup> (Experimento 1), independente do período de coleta adotado, três ou cinco dias, não diferiram em relação aos resultados obtidos com a coleta total. Da mesma forma, os resultados evidenciados com o NANOLIPE<sup>®</sup> (Experimento 2), independente do período de adaptação, um ou dois dias, seguiram a mesma tendência, não diferindo em relação à coleta total. A exceção encontrada com o óxido crômico superestimou a produção fecal em ambos os experimentos (Tabela 3). Todos os resultados podem ser comprovados pela incompleta recuperação deste indicador nas fezes, em contraste aos tratamentos com LIPE<sup>®</sup> e NANOLIPE<sup>®</sup>, que mostraram percentuais de recuperação estatisticamente iguais à 100%. Em concordância às respostas aqui obtidas, Titgemeyer (1997) citou dentre as desvantagens do óxido crômico, a incompleta recuperação fecal, principalmente em função da variabilidade dos resultados obtidos pela metodologia de análise. Além disso, Titgemeyer (1997) relata ainda, a variação de excreção entre animais, a variação diurna de excreção nas fezes, a forma de administração, o número de doses, o método e horário de amostragem das fezes, a duração dos períodos de adaptação e de coleta, a incompleta mistura com a digesta ruminal, bem como a passagem mais rápida pelo rúmen do que o material fibroso.

Tabela 3. Produção fecal (kg MS/dia) de vacas em lactação e recuperação fecal dos indicadores (%) mensurada por diferentes métodos

Método	Produção Fecal (kg MS/dia)	Recuperação do Indicador (%)
Experimento 1		
Coleta Total	6,98 <sup>a</sup>	-
LIPE <sup>®</sup> (3) <sup>1</sup>	6,97 <sup>a</sup>	100,17
LIPE <sup>®</sup> (5) <sup>2</sup>	6,94 <sup>a</sup>	100,63
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>3</sup>	9,26 <sup>b</sup>	76,77 *
EPM <sup>6</sup>	0,28	2,41
Valor- <i>P</i> <sup>7</sup>	<0,001	<0,001
Experimento 2		
Coleta Total	6,58 <sup>a</sup>	-
NANOLIPE <sup>®</sup> (1) <sup>4</sup>	6,53 <sup>a</sup>	100,20
NANOLIPE <sup>®</sup> (2) <sup>5</sup>	6,56 <sup>a</sup>	99,82
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>3</sup>	9,34 <sup>b</sup>	71,19 *
EPM <sup>6</sup>	0,25	2,05
Valor- <i>P</i> <sup>7</sup>	<0,001	<0,001

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de SNK com 5% de probabilidade; \* Recuperação fecal dos indicadores diferindo de 100% pelo teste de SNK com 5% de probabilidade

<sup>1</sup>LIPE<sup>®</sup> com três dias de coleta; <sup>2</sup>LIPE<sup>®</sup> com cinco dias de coleta; <sup>3</sup>Óxido crômico; <sup>4</sup>NANOLIPE<sup>®</sup> com um dia de adaptação; <sup>5</sup>NANOLIPE<sup>®</sup> com dois dias de adaptação; <sup>6</sup>Erro padrão da média; <sup>7</sup>Valor de probabilidade para o efeito de método.

Soares et al. (2003) relatou taxa de recuperação para o óxido crômico de 72,6, valor esse semelhante aos valores 76,77 e 71,19% encontrados no presente trabalho, respectivamente para os experimentos 1 e 2. Berchielli et al. (2005) avaliando diferentes indicadores e volumosos também verificou para o óxido crômico, recuperação fecal diferindo de 100% quando utilizou feno de tifton e silagem de milho.

Segundo Prigge et al. (1981), o emprego de duas aplicações diárias leva à redução da amplitude total de variação em torno da média, tornando o perfil de excreção do óxido crômico mais estável e próximo do equilíbrio desejado. Detmann et al. (2004), revisando o uso de indicadores, chegaram à mesma conclusão e recomendaram a aplicação de duas doses diárias. Nestes experimentos, os indicadores foram fornecidos em dose única, entretanto, outra estratégia foi adotada com vistas a contornar a variação diurna de excreção dos indicadores, sendo as coletas de fezes realizadas ao longo do dia com



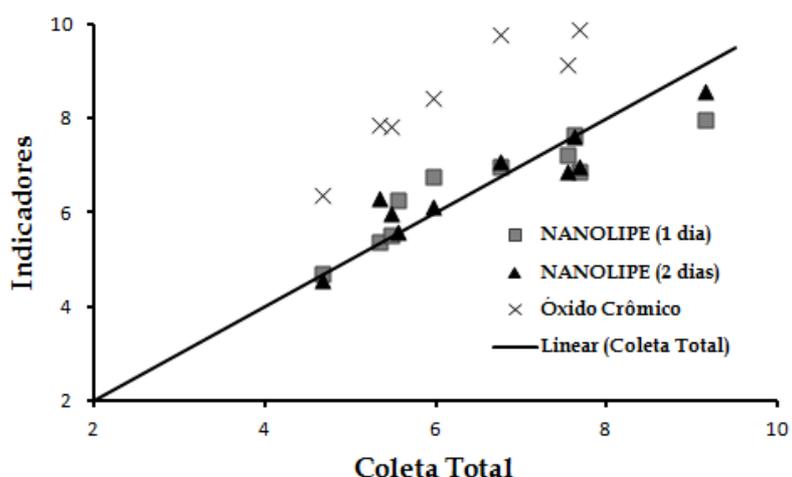


Figura 2. Relação entre a produção fecal (kg/dia) obtida com a coleta total e estimada com os indicadores do Experimento 2.

Pela dispersão dos dados, diferenciada de acordo com cada gráfico, verifica-se que os indicadores LIPE<sup>®</sup> com 3 ou 5 dias e o NANOLIPE<sup>®</sup> com 1 ou 2 dias de adaptação relacionaram-se intimamente com o método de coleta total. Nota-se ainda, que o único indicador que se mostrou diferente em relação à produção fecal observada, em ambos os experimentos, foi o óxido crômico, cujos pontos mostram-se bem distantes da reta.

No experimento 1 não houve diferença entre o LIPE<sup>®</sup> e a coleta total independentemente do período de coleta de fezes adotado sobre os coeficientes de digestibilidade da matéria seca e demais nutrientes obtidos com três ou cinco dias (Tabela 4). Vários experimentos vêm sendo conduzidos desde que o LIPE<sup>®</sup> foi desenvolvido a fim de investigar seu uso como indicador externo em diferentes espécies animais. Em experimento de avaliação do feno de tifton para ovinos, Saliba et al. (2003b) obtiveram resultados que foram estatisticamente semelhantes, sendo os valores de coeficiente de digestibilidade médios de 63,23% e 64,78% e produção fecal de 365,39 g/dia e 383,07 g/dia, respectivamente, para coleta total e LIPE<sup>®</sup>. Para frangos de corte (Saliba et al. 2005b, Vasconcellos et al. 2011), o LIPE<sup>®</sup> também mostrou ser um bom indicador de digestibilidade de nutrientes de vários alimentos quando comparado com o método de coleta total.

Tabela 4. Coeficientes de digestibilidade (%) obtidos por diferentes métodos, em dois ensaios com vacas em lactação

Experimento 1						
Fração	Método				EPM <sup>7</sup>	P <sup>8</sup>
	CT <sup>1</sup>	LIPE <sup>®</sup> (3) <sup>2</sup>	LIPE <sup>®</sup> (5) <sup>3</sup>	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>4</sup>		
Matéria Seca	69,84 <sup>a</sup>	69,86 <sup>a</sup>	70,00 <sup>a</sup>	60,49 <sup>b</sup>	1,01	<0,01
Matéria Orgânica	71,50 <sup>a</sup>	71,51 <sup>a</sup>	71,63 <sup>a</sup>	62,62 <sup>b</sup>	0,97	<0,01
Proteína Bruta	69,22 <sup>a</sup>	69,30 <sup>a</sup>	69,45 <sup>a</sup>	59,83 <sup>b</sup>	1,08	<0,01
Extrato Etéreo	88,86 <sup>a</sup>	88,89 <sup>a</sup>	88,87 <sup>a</sup>	85,60 <sup>b</sup>	0,39	<0,01
Fibra em Detergente Neutro	51,85 <sup>a</sup>	51,85 <sup>a</sup>	52,10 <sup>a</sup>	36,69 <sup>b</sup>	1,63	<0,01
Carboidratos Não-Fibrosos	87,65 <sup>a</sup>	87,67 <sup>a</sup>	87,72 <sup>a</sup>	83,97 <sup>b</sup>	0,43	<0,01
Experimento 2						
Fração	CT <sup>1</sup>	NANO <sup>®</sup> (1) <sup>5</sup>	NANO <sup>®</sup> (2) <sup>6</sup>	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>4</sup>	EPM <sup>7</sup>	P <sup>8</sup>
	Matéria Seca	72,08 <sup>a</sup>	72,22 <sup>a</sup>	71,99 <sup>a</sup>	62,24 <sup>b</sup>	0,95
Matéria Orgânica	72,89 <sup>a</sup>	73,02 <sup>a</sup>	72,82 <sup>a</sup>	63,30 <sup>b</sup>	0,94	<0,01
Proteína Bruta	70,29 <sup>a</sup>	70,49 <sup>a</sup>	70,28 <sup>a</sup>	59,60 <sup>b</sup>	0,87	<0,01
Extrato Etéreo	91,94 <sup>a</sup>	91,99 <sup>a</sup>	91,85 <sup>a</sup>	88,80 <sup>b</sup>	0,21	<0,01
Fibra em Detergente Neutro	55,22 <sup>a</sup>	55,42 <sup>a</sup>	55,14 <sup>a</sup>	39,33 <sup>b</sup>	1,64	<0,01
Carboidratos Não-Fibrosos	87,09 <sup>a</sup>	87,36 <sup>a</sup>	87,19 <sup>a</sup>	82,76 <sup>b</sup>	0,46	<0,01

Médias seguidas de letras distintas na linha diferem (P<0,05) entre si pelo teste de SNK

<sup>1</sup>Coleta total; <sup>2</sup>LIPE<sup>®</sup> com três dias de coleta; <sup>3</sup>LIPE<sup>®</sup> com cinco dias de coleta; <sup>4</sup>Óxido crômico; <sup>5</sup>NANOLIPE<sup>®</sup> com um dia de adaptação; <sup>6</sup>NANOLIPE<sup>®</sup> com dois dias de adaptação; <sup>7</sup>Erro padrão da média; <sup>8</sup>Valor de probabilidade para o efeito de método.

Da mesma forma, Pereira et al. (2004) em ensaio com coelhos, Souza et al. (2005) e Souza et al. (2007) em experimentos com avestruzes, Moraes et al. (2010) em estudo com caprinos e Soares et al. (2011) avaliando vários indicadores internos e externos em búfalos, não constataram diferenças entre os dois métodos. Na maioria destes experimentos foram comparadas a produção fecal e a digestibilidade dos nutrientes obtidos pelo uso deste indicador e pela coleta total de fezes, não sendo detectadas diferenças entre os diferentes métodos indicadores para os parâmetros estudados. Para Saliba et al. (2005), o fornecimento do LIPE<sup>®</sup> em cápsulas garante a ingestão do indicador sem a ocorrência de perdas. Para esses pesquisadores, um outro ponto importante a ser levado em consideração acerca deste indicador, diz respeito a maior precisão da técnica analítica, fator que também contribui para os bons resultados. Comerón (2005) citado por Rodriguez et al.(2006), em experimento com vacas em lactação alimentadas com dietas à base de feno de alfafa, não

verificou diferença na produção de matéria seca fecal quando comparou os dados obtidos por meio de coleta total e LIPE<sup>®</sup> (4,61 vs 4,47 kg/dia, respectivamente).

O mesmo não foi observado para o óxido crômico, que subestimou todos os parâmetros de digestibilidade (Tabela 4). Corroborando com estes resultados podemos citar vários estudos, e dentre eles o trabalho realizado por Barnicoat (1945) em estudo com ovinos e bezerros e o ensaio realizado por Berchielli et al. (2005) com bovinos a fim de avaliar diferentes indicadores de produção fecal e digestibilidade. Alguns trabalhos têm evidenciado que uma das causas da baixa recuperação fecal do cromo deve-se ao método analítico utilizado. Williams et al. (1962), afirmaram que o método utilizado para determinação de cromo nas fezes é tedioso e duvidoso por causa da técnica analítica. Além disso, Saliba (1998) alertou para o fato do cromo ser um elemento altamente dependente da chama do espectrofotômetro, e são comuns variações na sua determinação.

Da mesma maneira que no experimento 1, no experimento 2, onde foi avaliado o nano indicador, os coeficientes de digestibilidade não diferiram em relação à coleta total e além disso, o período de adaptação de apenas um dia foi suficiente para obtenção de boas estimativas, confirmando a hipótese do trabalho (Tabela 4). Os materiais produzidos em escala nanométrica apresentam propriedades únicas e se comportam de forma diferente da matéria convencional. Dessa forma, as nano partículas do material em estudo apresentaram maior velocidade de dispersão no trato gastrintestinal proporcionando melhor homogeneização do material na digesta e, assim, permitiu um “steady state” mais rápido (Figura 3). Pode-se observar que apesar das parábolas geradas pelo gráfico, a partir do tempo pós-dosificação ao longo de 24 horas em função das concentrações de NANOLIPE<sup>®</sup> nas fezes, tais concentrações foram muito próximas (Figura 3). É importante ressaltar que as amostragens em quatro pontos equidistantes ao longo do dia contribuíram para minimizar possíveis efeitos de variação diurna na excreção do nano indicador.

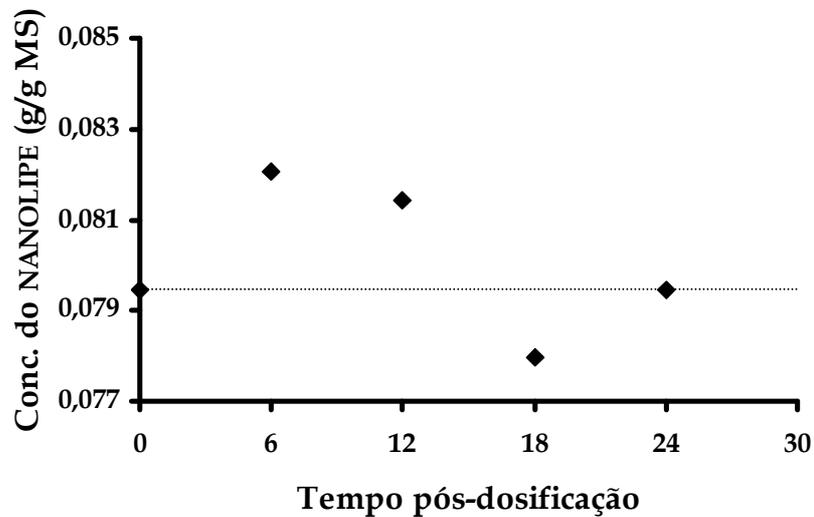


Figura 3. Perfil nictemeral de excreção fecal do indicador NANOLIPE<sup>®</sup> por vacas em lactação, considerando o tempo pós-dosificação ao longo de 24 horas.

Diferentemente do observado para os indicadores LIPE<sup>®</sup> e NANOLIPE<sup>®</sup>, os valores de digestibilidade obtidos quando o óxido crômico foi utilizado foram subestimados em todas as frações nos dois experimentos.

Na análise individual de cada indicador, considerando-se os desvios-padrão e os intervalos de confiança da média para produção e recuperação fecal dos indicadores e, ainda para digestibilidade da matéria seca, os indicadores LIPE<sup>®</sup> e NANOLIPE<sup>®</sup> foram mais precisos, apresentando valores expressivamente menores em relação ao óxido crômico (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Limites inferior (LI) e superior (LS) do intervalo de confiança a 95% de probabilidade para produção e recuperação fecal dos indicadores e digestibilidade da matéria seca, obtidos por diferentes métodos em ensaios com vacas em lactação

Método	Produção fecal		Recuperação do Indicador		Digestibilidade	
	LI	LS	LI	LS	LI	LS
Experimento 1						
LIPE <sup>®</sup> (3 dias)	6,18	7,77	98,16	102,17	65,21	74,52
LIPE <sup>®</sup> (5 dias)	6,18	7,69	98,34	102,93	65,45	74,55
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	8,17	10,35	66,35	87,19	56,65	64,34
Experimento 2						
NANOLIPE <sup>®</sup> (1 dia)	5,78	7,28	94,13	106,26	70,17	74,26
NANOLIPE <sup>®</sup> (2 dias)	5,76	7,37	94,13	106,26	69,11	74,87
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	8,05	10,63	62,87	79,51	57,11	63,74

Tabela 6. Desvios-padrão para produção e recuperação fecal dos indicadores e digestibilidade da matéria seca obtidos por diferentes métodos em ensaios com vacas em lactação

Método	Produção fecal		Recuperação do Indicador		Digestibilidade	
	LI	LS	LI	LS	LI	LS
Experimento 1						
LIPE <sup>®</sup> (3 dias)	1,11		2,81		6,51	
LIPE <sup>®</sup> (5 dias)	1,05		3,21		6,36	
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1,52		14,56		5,37	
Experimento 2						
NANOLIPE <sup>®</sup> (1 dia)	1,05		8,47		2,86	
NANOLIPE <sup>®</sup> (2 dias)	1,11		8,47		4,02	
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1,80		11,63		4,63	

O resultado da maior precisão do LIPE<sup>®</sup> em comparação aos outros indicadores pode ser explicado pela ausência de variação diurna, conforme citado por Rodriguez et al. (2006). Dessa forma, o mesmo raciocínio e justificativa podem ser utilizados para o nanoindicador, uma vez que este foi desenvolvido, a partir do LIPE<sup>®</sup>. Quanto ao óxido crômico, um ensaio com vacas em pastejo onde foi avaliada a variação animal no padrão de excreção desse indicador, Hopper et al. (1978), relatou que flutuações cíclicas na sua excreção, ocorrem normalmente por não se misturar homogeneamente na digesta ou por

apresentar característica cinética distinta das fases da digesta, ocasionando o clássico efeito conhecido como “variação diurna”, evidenciado por pequenas e grandes excreções ao longo de um período de 24 horas.

Diantes de todos os resultados relatados nos experimentos 1 e 2, os indicadores LIPE<sup>®</sup> e NANOLIPE<sup>®</sup> podem ser utilizados nos estudos de digestibilidade, com vistas à substituição da coleta total de fezes. A alternativa de se empregar apenas três dias de coleta de fezes para o indicador LIPE<sup>®</sup> mostra-se bastante interessante, por reduzir o estresse dos animais pela menor influência no comportamento destes, em função do menor do tempo e número de coletas de fezes a serem feitas. Além disso, um menor período experimental promoveria uma redução dos custos e trabalhos em ensaios desse tipo. O mesmo raciocínio utilizado para o experimento 1, pode ser adotado para o experimento 2.

## **2.4 Conclusões**

Os indicadores externos LIPE<sup>®</sup> e NANOLIPE<sup>®</sup> permitem estimar a digestibilidade de maneira acurada. A utilização do óxido crômico em substituição à coleta total de fezes conduz à superestimativas de produção fecal e, conseqüentemente, subestimativas de digestibilidade.

O protocolo de utilização do indicador LIPE<sup>®</sup> pode ser alterado para apenas três dias de coleta de fezes, em substituição aos cinco dias que vêm sendo empregado.

O protocolo a ser empregado para utilização do indicador NANOLIPE<sup>®</sup> poderá ser de dois dias de fornecimento do indicador seguido de único dia de coleta. Para tanto, a amostragem fecal deve ser feita em quatro pontos equidistantes ao longo do dia, a fim de eliminar, por menor que seja, qualquer possível variação na excreção ao longo das 24 horas.

Uma vez que este trabalho representa apenas o primeiro estudo com um nanoindicador, outros estudos com o indicador supracitado são necessários até que LIPE<sup>®</sup> seja completamente substituído. Ressalva-se a importância de serem levados em consideração os custos de produção de cada um desses indicadores, a fim de verificar a viabilidade econômica de cada um.

## 2.5 Referências Bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. *Official methods of analysis*. 16. ed. Washington, D.C.: 1995. 1094p.

BARNICOAT, C. R. Estimation of apparent digestibility coefficients by means of an inert "Reference – Substance", *N. Zealand J. Sci. Technol*, v. 27, 202-212, 1945.

BERCHIELLI, T.T.; OLIVEIRA, S.G.; CARRILHO, E.N.V.M. et al. Comparação de indicadores para estimativas de produção fecal e de fluxo de digesta em bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.34, n.3, p.987-996, 2005.

DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PAULINO, M. F. et al. Avaliação da técnica dos indicadores na estimação do consumo por ruminantes em pastejo. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n. 46, p. 40-57, 2004.

FERREIRA, D. F. *Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0*. In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, p. 255-258, Julho, 2000.

HOPPER, J. T.; HOLLOWAY, J. W.; BUTTS JUNIOR, W. T. Animal variation in chromium sesquioxide excretion patterns of grazing cows. *Journal of Animal Science*, v. 46, n. 4, p. 1096-1102, 1978.

LANZETTA, V. A. S.; REZENDE, A. S. C.; SALIBA, E. O. S.; LANA, Â. M. Q.; RODRIGUEZ, N. M.; MOSS, P. C. B. Validação do Lipe<sup>®</sup> como método para determinar a digestibilidade dos nutrientes em eqüinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, n. 1, Viçosa, 2009.

LIMA, M. A.; VIANA, J. A. C.; RODRIGUES, N. M. O uso do óxido crômico para estimar a produção fecal de novilhos zebu em pastejo. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v.9, n. 2, p. 188-202, 1980.

MAYNARD, L. A.; LOOSLI, B. S.; HINTZ, H. F. et al. *Nutrição animal*. 3ª Ed., Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 726p., 1984.

PEREIRA, R. A. N.; SALIBA, E. O. S.; MOTTA, W. F.; BERTECHINI, A. G.; DONATO, D. C. Z.; DUARTE, M. R.; CHAVES, M. L. LIPE<sup>®</sup> marker for estimating total faecal production and dry matter apparent digestibility in growing rabbits. *Proceedings...* 8th World Rabbit Congress, September, Puebla, Mexico. 2004.

PRIGGE, E. C.; VARGA, G. A.; VICINI, J. L.; REID, R. L. Comparison of ytterbium chloride and chromium sesquioxide as fecal indicators. *Journal of Animal Science*, v.53, n.6, p. 1629-1633, 1981.

RODRIGUEZ, N. M.; SALIBA, E. O. S.; GUIMARÃES J. R., R. Uso de indicadores para estimativa de consumo a pasto e digestibilidade. In: REUNIÃO ANUAL DA

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. *Anais...* João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, p.323-352. 2006.

SALIBA, E. O. S. *Caracterização Química e Microscópica das Ligninas dos Resíduos Agrícolas de Milho e de Soja Expostas à Degradação Ruminal e seu Efeito sobre a Digestibilidade dos Carboidratos Estruturais.*: Tese (Doutorado)Escola de Veterinária da UFMG, 1998. 251p., Belo Horizonte.

SALIBA, E. O. S.; PEREIRA, R. A. N.; FERREIRA, W. M. et al. Lignin from *Eucalyptus Grandis* as indicator for rabbits in digestibility trials. *Tropicaland Subtropical Agroecosystems*, v. 3, n. 1-3, 2003a (Special Volume).

SALIBA, E. O. S.; PILÓ-VELOSO, D.; RODRIGUEZ, N. M et al. Structural characterization of lignin from *Eucalyptus Grandis* before and after exposure to the gastrointestinal tract of ruminants. In: 8º SIMPÓSIO MUNDIAL DE LIGNINAS, 2004, São Carlos: *Anais...* São Carlos, 2004.

SALIBA, E. O. S.; NANJARO, A.; FERREIRA, W. M. et al. Avaliação da lignina de madeira moída do *Pinus* e da lignina purificada e enriquecida do *Eucalyptus grandis* (LIPE®), como indicadores externos em experimentos de digestibilidade aparente para coelhos em crescimento. In: TELECOFERÊNCIA SOBRE INDICADORES EM NUTRIÇÃO ANIMAL, 1., 2005, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Escola de Veterinária/UFMG, 2005a, p.23-25.

SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; PILÓ-VELOSO, D. et al. Estudo comparativo da digestibilidade pela técnica da coleta total com lignina purificada como indicador de digestibilidade para ovinos em experimento com feno de tifton 85. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. *Anais...* Santa Maria: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003c.

SALIBA, E. O. S.; VASCONCELLOS, C. H. F.; VELOSO, J. A. F. et al. LIPE® , Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e coleta total de excretas para determinação da digestibilidade em frangos de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42, 2005, Goiânia. *Anais...* Goiânia:SBZ, 2005b.

SILVA, J. J.; SALIBA, E. O. S.; BORGES, I.; GONÇALVES, L. C.; RODRIGUÉZ, N. M.; AROEIRA, L. J. M.; SILVA, A. G. M.; COSTA, F. J. N. Indicadores para estimativa de consumo total por novilhas holandesas x zebu mantidas em confinamento. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 11, n. 3, p. 838-848, jul/set, 2010.

SMITH, A. M., REID, J. T. Use of chromic oxide as an indicator of fecal output for the purpose of determining the intake of a pasture herbage by grazing cows. *Journal of Dairy Science*, v. 38, n. 5, p.515-524, 1955.

SNIFFEN, C. J., O'CONNOR, J. D., VAN SOEST, P. J. et al.. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, v. 70, n.10, p.3562- 3577. 1992.

SOARES, J. P. G.; BERCHIELLI, T. T., AZEVEDO JÚNIOR, M. A. Comparação das técnicas do óxido crômico e da coleta total de fezes na determinação da digestibilidade em bovinos. *Ars Veterinária*, Jaboticabal, SP, Vol. 19, nº 3, 280-287, 2003.

SOARES, L. F. P.; GUIM, A.; FERREIRA, M. A.; MODESTO, E. C.; BATISTA, Â. M. V.; MONTEIRO, P. B. S. Assessment of indicators and collection methodology to estimate nutrient digestibility in buffaloes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 40, n. 9, p. 2005-2010, 2011.

SOUZA, J. D. S.; FERREIRA, W. M.; SALIBA, E. O. S.; SAAD, C. E. P.; MACHADO, L. C.; MONTEIRO, J. R. Digestibilidade aparente da dieta suplementada com concentrado de leveduras vivas para avestruzes em crescimento. *Revista Acadêmica - Ciências Agrárias e Ambientais*, Curitiba, v. 3, n. 3, p. 59-66, jul./set., 2005.

SOUZA, J. D. S.; FERREIRA, W. M.; SALIBA, E. S., FONTES, D. O.; MACHADO, L. C.; AICHINGER, A.. Comparação de técnicas de estimativa da digestibilidade para filhotes de avestruzes na fase inicial de crescimento. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.8, n.4, p. 317-323, out/dez, 2007.

TITGEMEYER, E. C. Design and interpretation of nutrient digestion studies. *Journal of Animal Science*, v. 75, n. 8, p. 2235-2247, 1997.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent, and no starch polysaccharides in relation to animal nutrition, *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VASCONCELLOS, C. H. F.; FONTES, D. O.; SALIBA, E. O. S., VELOSO, J. A. F.; LARA, L. J. C. Uso da lipe como indicador externo na determinação da digestibilidade da proteína e matéria seca de alimentos em frangos de corte. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 35, n. 3, p. 613-620, maio/jun., 2011.

WILLIAMS, C. H.; DAVID, D. J.; ISMAA, O. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *Journal of Agricultural Science*, v.59, p. 381-385, 1962.

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, p.1865-1874, 2002.

## Capítulo 3 – Validação do LIPE® como Indicador de Digestibilidade Parcial em Ensaio com Bovinos Alimentados com Diferentes Volumosos Tropicais

### 3.1 Introdução

No Brasil Central a estação seca é compreendida entre os meses de maio e setembro, época em que a redução no crescimento das forrageiras tropicais resulta em menor disponibilidade e, frequentemente, baixo valor nutritivo da forragem. Como consequência, os diversos sistemas de produção animal são afetados, conduzindo à diminuição acentuada da produção leiteira, perda de peso dos animais de corte e grande redução na capacidade suporte dos pastos, prejudicando sobremaneira o desempenho dos animais do rebanho.

A utilização de volumosos suplementares como a cana-de-açúcar e as forragens conservadas constitui a principal alternativa para minimização desse problema, pois proporcionam volumosos de qualidade mais uniforme ao longo do período seco. A utilização da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) como volumoso suplementar no período seco é justificada pela facilidade de cultivo, alta produtividade, baixo custo por unidade de matéria seca produzida, além do pico de produção e valor nutritivo coincidentes com o período de escassez de forragem, além da composição bromatológica, que mantém-se praticamente inalterada a partir de um determinado estágio de crescimento. Quanto às forragens conservadas, podemos destacar a silagem de milho (*Zea mays*, L.), que destaca-se pelo alto teor de carboidratos solúveis, que proporcionam um bom padrão fermentativo e a colocam no patamar de gramínea ideal e mais utilizada nos processos de ensilagem e o feno de tifton (*Cynodon spp.*) pelas características morfofisiológicas que permitem secagem mais uniforme, produzindo, assim, um feno que mantém a qualidade e o valor nutritivo da forragem fresca.

Na avaliação nutricional de um alimento, a composição químico-bromatológica, o consumo e a digestibilidade constituem os parâmetros de maior importância, sendo os dois últimos os que mais afetam o desempenho animal. Dentro desse contexto, os estudos de digestibilidade parcial mostram-se de fundamental importância, por permitirem a avaliação quantitativa e qualitativa da digesta que passa em diferentes pontos do trato gastrointestinal, proporcionando assim, importantes informações acerca da absorção de nutrientes em locais

específicos. Para estudos dessa natureza, no entanto, os indicadores se são imprescindíveis nas estimativas do fluxo de digesta.

Nos últimos anos, têm sido propostos diversos indicadores. Dentre os mais utilizados em estudos de digestibilidade parcial, os internos têm se destacado por não requisitarem administração, uma vez que, já se encontram intrinsecamente presentes na dieta e além disso, são de fácil quantificação. Embora a utilização de indicadores nos ensaios de digestibilidade total e parcial seja muito discutida, até o momento, não foi encontrada nenhuma substância com características de indicador ideal. Por esta razão, a procura de melhores indicadores constitui uma linha de pesquisa de tão grande importância.

Com base nos bons resultados já obtidos e relatados na comunidade científica com o indicador LIPE<sup>®</sup> em estudos de digestibilidade total, nasceu a idéia de avaliar a utilização desse indicador também em estudos de digestibilidade parcial. Dessa forma, buscou-se nesse estudo mensurar o consumo e as digestibilidades parcial e total dos nutrientes em novilhas alimentadas com diferentes fontes volumosas, e concomitantemente, avaliar a utilização do LIPE<sup>®</sup> como indicador em estudos de digestibilidade parcial.

## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Localização Experimental, Animais e Instalações**

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Viçosa, no Campus de Florestal, em Florestal, Minas Gerais, e as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais (LABNUTRI/EV-UFG). Foram utilizadas seis novilhas mestiças de Holandês-Zebu, fistuladas no rúmen, com 480 kg de peso vivo médio inicial e 24 meses de idade, mantidas em baias individuais do tipo “Tie Stall”, cobertas, equipadas com bebedouros individuais, e cochos para o fornecimento da dieta.

O experimento teve duração de 57 dias, divididos em três períodos de 19 dias. Os animais foram pesados, identificados e vermifugados no início do experimento e mantidos por 13 dias em período de adaptação à dieta experimental e às instalações.

### 3.2.2 Dietas

Foram avaliados três tratamentos constituídos por diferentes volumosos nas dietas experimentais: silagem de milho (*Zea mays*, L.), feno de capim-tifton (*Cynodon spp.*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L). As dietas foram suplementadas com concentrado à base de milho moído, farelo de soja e premix mineral, sendo balanceadas para serem isonitrogenadas (14% PB), constituindo-se de volumoso e concentrado, na proporção 75:25, com base na matéria seca. As dietas foram formuladas para atender às exigências nutricionais dos animais do estudo, segundo recomendações do NRC (2001).

Os ingredientes dietéticos foram pesados e misturados manualmente duas vezes ao dia para fornecimento às 8:00 e às 16:00 horas na forma de dieta completa, sendo o consumo medido diariamente, permitindo-se 5 a 10% de sobras diárias.

A composição em ingredientes e químico-bromatológica das dietas experimentais é descrita nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais, em ingredientes

Ingredientes	Dietas		
	Silagem de Milho	Cana-de-açúcar	Feno de Tifton
		% Matéria Seca	
Silagem de Milho	74,1	-	-
Cana-de-açúcar	-	73,8	-
Feno de Tifton	-	-	74,5
Milho Moído	16,3	-	21,5
Farelo de Soja	8,9	25,5	3,3
Minerais e Vitaminas <sup>1</sup>	0,7	0,7	0,7

<sup>1</sup>Minerais e Vitaminas: 150 g de Ca; 90 g de P; 17,78 g de Mg; 15,4 g de S; 114 g de Na; 1.500 mg de Mn; 4.000 mg de Zn; 1.200 mg de Cu; 145 mg de Co; 90 mg de I; 38 mg de Se; 900 mg de F; 200.000 UI de Vit A; 50.000 UI de Vit D e 1500 mg de Vit E por kg de mistura.

Tabela 2. Composição das dietas experimentais, em nutrientes

Nutriente	Dietas		
	Silagem de Milho	Cana-de-açúcar	Feno de Tifton
	% Matéria Seca		
Proteína bruta	13,9	13,5	13,8
Fibra em detergente neutro	51,3	50,8	61,8
Cinzas	5,2	5,4	6,4
Extrato etéreo	2,7	1,1	2,3
Carboidratos não-fibrosos	26,9	29,2	15,7
Nutrientes digestíveis totais	70,6	68,3	68,0
	% Matéria Natural		
Matéria seca	31,5	37,1	89,4

### 3.2.3 Consumo

A dieta fornecida bem como as sobras de cada animal foram registradas diariamente. O consumo diário de matéria seca (CMS) foi calculado multiplicando-se o consumo diário de matéria natural de cada alimento, entre os dias 14 e 19 de cada período, por seu respectivo teor de matéria seca, seguido de subtração da sobra de matéria seca.

A ingestão diária de nutrientes por animal foi calculada multiplicando o oferecido de matéria seca de cada ingrediente por seu respectivo teor nutritivo. Do total de nutrientes oferecidos foi subtraída a sobra diária do mesmo nutriente de cada animal. O consumo de nutrientes digestíveis totais (NDT) das dietas foi calculado segundo equação descrita pelo NRC (2001), em que  $NDT = \%PB \text{ digestível} + \%FDN \text{ digestível} + \%CNF \text{ digestível} + 2,25 * \%EE \text{ digestível}$ .

Durante o período de coleta, amostras dos volumosos, concentrados e das sobras de cada animal foram coletadas diariamente, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a -20°C. Ao final de cada período foram feitas amostras compostas para cada alimento e para as sobras, a partir da mistura de quantidades idênticas de matéria natural. No caso das sobras, foram feitas amostras compostas para cada novilha, por período.

### 3.2.4 Digestibilidades

As digestibilidades ruminal, intestinal e total dos nutrientes foram determinadas por meio da coleta total de fezes e digesta omasal dos animais num período de três dias consecutivos, compreendidos entre os dias 14 e 16 de cada período. A cada 24 horas, a

produção fecal obtida pela defecação espontânea de cada animal, foi pesada, homogeneizada e amostrados aproximadamente 200g de fezes. Durante o período de coleta total, as fezes foram continuamente congeladas e uma amostra composta foi formada por novilha por período. A produção fecal média foi obtida pela média dos três dias de coleta.

Para a coleta de amostras de digesta omasal, foi utilizado um conjunto de dispositivos composto de um kitassato, um tubo coletor e uma bomba a vácuo, conforme técnica descrita por Leão (2002). As coletas de digesta omasal obedeceram ao seguinte esquema: no primeiro dia foram feitas antes do fornecimento da refeição matinal (0 hora) e 6 horas após; no segundo dia, 2 e 8 horas após e no terceiro dia, 4 e 10 horas após. As amostras de digestas omasal foram congeladas a -20°C logo após a coleta até serem processadas. Foram feitas amostras compostas por animal e período experimental. Para estimativa do fluxo de digesta omasal, foram utilizados como indicadores a matéria seca indigestível (MSi), a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e o LIPE<sup>®</sup>, a fim de validação deste indicador para este fim.

O indicador externo LIPE<sup>®</sup> foi fornecido na forma de cápsulas, na dose de 500 mg por novilha diariamente, com dois dias para adaptação acrescido do fornecimento durante todo o período de coleta. Quanto aos indicadores internos MSi e FDNi, amostras de todos os volumosos, concentrados, sobras, digesta omasal e fezes foram incubadas no rúmen de um animal durante 240 horas conforme sugerido por Casali et al. (2008), usando sacos TNT 100g/cm<sup>2</sup>, a fim de realizar sua determinação.

A análise do indicador LIPE<sup>®</sup> foi realizada em espectrofotômetro com detector de luz no espectro do infravermelho (FTIV) (Saliba et al., 2005). O fluxo de MS e demais nutrientes nas amostras de digesta omasal foram estimados conforme equação de France & Siddons (1986) para indicadores externos:

$$\text{Fluxo Omasal} = \frac{\text{Dose do indicador (mg/dia)}}{\text{Concentração do indicador (mg/g digesta)}}$$

ou para indicadores internos:

$$\text{Fluxo Omasal} = \frac{\text{Excreção fecal} \times \text{Concentração do Indicador nas Fezes}}{\text{Concentração do Indicador no Omaso}}$$

Os coeficientes das digestibilidades ruminal e intestinal foram calculados considerando a concentração dos nutrientes, e do indicador externo LIPE<sup>®</sup> na digesta

omasal e dos indicadores internos MSi e FDNi na digesta omasal e nas fezes. A digestibilidade intestinal foi obtida pela diferença entre 100 e a digestibilidade ruminal.

### **3.2.5 Análises Químicas**

As amostras de alimentos, sobras, digesta omasal e fezes sofreram pré-secagem à 55°C, posteriormente foram moídas em moinho tipo Thomas-Willey com peneira de malha de 1 mm e armazenadas em recipientes plásticos para realização das análises químicas. Foram determinados os teores matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) segundo o AOAC (1995). As cinzas foram determinadas através da incineração das amostras em mufla a 600°C por oito horas. As análises de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram realizadas conforme técnica descrita por Van Soest et al. (1991), utilizando-se sacos de tecido não-tecido (TNT) com gramatura de 100g/cm<sup>2</sup> e o aparelho ANKOM 200 (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA). A análise de FDN foi realizada utilizando-se amilase sem adição de sulfito de sódio. As porcentagens de carboidratos não-fibrosos (CNF) e totais (CT) foram obtidas pelas equações propostas por Sniffen et al. (1992):  $CNF = 100 - (\%FDN + \%PB + \%EE + \%cinzas)$  e  $CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%Cinzas)$ .

### **3.2.6 Delineamento Experimental e Análises Estatísticas**

Para o estudo da digestibilidade parcial das dietas foi utilizado delineamento experimental em quadrado latino 3 x 3 duplo simultâneo, adotando-se o LIPE<sup>®</sup> como indicador, pelos bons resultados obtidos no ensaio em que foram comparados três indicadores de digestibilidade parcial.

Para o ensaio de indicadores de digestibilidade parcial foi utilizado delineamento experimental em quadrado latino 3 x 3 duplo simultâneo, em esquema de parcela subdividida, sendo a parcela constituída pelos volumosos (silagem de milho, cana-de-açúcar e feno de tifton), e a subparcela os indicadores (LIPE<sup>®</sup>, MSi e FDNi).

Para efeito de análise estatística, todos os dados obtidos nos dois ensaios foram submetidos à análise de variância e as médias das dietas no ensaio 1 e dos indicadores no ensaio 2 comparadas pelo teste de SNK a 5% de probabilidade, por meio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000). No ensaio 2 os indicadores foram ainda analisados isoladamente, tomando por base os desvios-padrão e os intervalos de confiança da média.

### 3.3 Resultados e Discussão

Os consumos de matéria seca (kg/dia) não diferiram entre as dietas experimentais (Tabela 3). Apesar da ausência de diferença significativa, os animais que receberam dietas contendo silagem de milho ingeriram mais, em média, 0,5 kg de matéria seca em relação aos que os que receberam a cana e 1,2 kg em relação aos que receberam feno como volumoso, fato que deve ser atribuído ao maior consumo de FDN proveniente do volumoso na dieta com feno, concordando com Cabral et al. (2006), apesar da tendência fraca ( $P=0,14$ ), como pode ser comprovado por Cavalcante et al. (2004) e Martins et al. (2006).

Tabela 3. Consumo de nutrientes em novilhas recebendo dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de Tifton (FT)

Variáveis	Dietas			EPM <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>
	SM	CA	FT		
Consumo da Dieta Total (kg/dia)					
Matéria seca	10,7	10,2	9,5	0,52	0,33
Matéria orgânica	10,2	9,7	8,9	0,50	0,25
Proteína bruta	1,4	1,6	1,4	0,07	0,07
Fibra em detergente neutro	5,2	4,8	5,7	0,28	0,16
Carboidratos não-fibrosos	3,2 <sup>a</sup>	3,1 <sup>a</sup>	1,7 <sup>b</sup>	0,17	<0,01
Carboidratos totais	8,5	7,9	7,4	0,43	0,26
Nutrientes digestíveis totais	7,6	7,0	6,5	0,42	0,26
Consumo de Volumoso (kg/dia)					
Matéria seca	8,0	7,6	7,1	0,39	0,31
Fibra em detergente neutro	3,9	3,6	4,3	0,22	0,14
FDN indigestível	1,1 <sup>b</sup>	1,6 <sup>a</sup>	1,2 <sup>b</sup>	0,06	<0,01
Consumo (% PV)					
Matéria seca	2,2	2,1	2,0	0,12	0,44
Fibra em detergente neutro	1,1	1,0	1,2	0,07	0,26

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de SNK com 5% de probabilidade

EPM<sup>1</sup> = Erro padrão da média; P<sup>2</sup> = Valor de probabilidade para o efeito de dieta

Quanto às comparações entre silagem de milho e cana, estudos realizados por Costa et al. (2005), Rangel et al. (2010) e Menezes et al. (2011) também não evidenciaram diferenças. A outra justificativa diz respeito ao elevado teor de FDNi na dieta de cana, ponto que influenciou negativamente a disponibilidade dos nutrientes, como resultado da

lenta digestão no trato gastrintestinal em relação ao feno além da menor digestibilidade na dieta de cana (Tabela 4). Esses dois fatores aumentam o tempo de retenção da fibra não digerida no rúmen e intestinos, reduzindo a taxa de passagem, e conseqüentemente, interferindo negativamente no consumo de matéria seca (Allen, 2000; Landell et al., 2002). Nelson & Satter (1992), em ensaio com vacas leiteiras, relataram que dietas à base de feno estão mais sujeitas a limitações de consumo pelo enchimento ruminal, sob demandas semelhantes de energia, que dietas à base de silagem, em decorrência da maior solubilidade dos nutrientes da silagem. O consumo de feno pode ser limitado pela quantidade de saliva necessária para seu umedecimento e posterior deglutição (Luginbuhl et al., 2000). A mesma diferença encontrada neste experimento entre as dietas de silagem e cana foi relatada por Andrade & Pereira (1999) ao realizarem ensaio com novilhas.

Quando determinado em função do peso vivo, registrou-se um consumo médio geral de matéria seca de 2,1%, valor este próximo ao preconizado pelo NRC (2001), para essa categoria animal, nas condições fisiológicas e de peso em que se encontram. Quanto ao consumo de FDN em função do peso vivo, este mostrou-se estatisticamente igual entre as dietas estudadas. Mertens (1994) relata que o consumo de matéria seca em ruminantes é ótimo, quando o consumo de FDN alcança  $1,2 \pm 0,1\%$  do PV. Os resultados encontrados neste trabalho, para consumo de FDN em função do PV, independente do volumoso utilizado, encontram-se dentro desse limite, ressalvando-se que para dietas à base de cana ou silagem os valores foram inferiores aos descritos para máxima ingestão de MS, fato também observado por Mendonça et al. (2004) e Costa et al. (2005) ao testarem dietas contendo silagem de milho ou cana-de-açúcar como volumoso exclusivo. Para a dieta a base de feno esse percentual foi exatamente igual ao limite de 1,2% proposto pelo pesquisador supracitado. Segundo Van Soest (1994), se a parede celular é limitante da ingestão, ela tem máximo de ingestão constante. Contudo, neste estudo, a concentração de FDN na dieta não foi limitante no controle da ingestão voluntária. Como a relação V:C (75:25) foi a mesma para todas as dietas, pode-se inferir que em todas as dietas o controle da ingestão foi realizado pela demanda energética do animal, de acordo com as considerações realizadas por Conrad et al. (1964) e Van Soest (1994), os quais relataram que, em dietas com digestibilidade superior a 66%, como observado nesse estudo para todas as dietas, o consumo de matéria seca é controlado por fatores fisiológicos.

Um dos principais fatores que exerce influência sobre a ingestão em bovinos está relacionada à qualidade da forragem consumida, uma vez que constituem o maior percentual na dieta desses animais. Dessa forma, torna-se evidente que a digestibilidade da fibra exerce grande efeito sobre o consumo de matéria seca (Allen, 1991), ou seja, o consumo é função da fração indigestível da dieta (Conrad, 1966). A cana-de-açúcar tem sido correlacionada negativamente à ingestão de matéria seca, não apenas pela fração indigestível da fibra, mas também pela baixa taxa de digestão da fibra potencialmente degradável, as quais apresentam elevado efeito de repleção ruminal (Pereira et al., 2000). Segundo Van Soest (1994), o consumo de FDN é o que melhor representa a capacidade de consumo para dietas à base de volumosos e outras rações com quantidades médias e baixas de concentrado, pois são os constituintes da parede celular que ocupam maior espaço no rúmen.

Neste estudo, entretanto, a digestibilidade da fração fibrosa da cana (Tabela 4) não foi tão baixa quanto em outros estudos, o que pode ter reduzido o efeito sobre a ingestão de matéria seca obtida, a ponto de não ter sido evidenciada diferença estatística em relação aos outros volumosos. Valvasori et al. (1995) que, embora não encontrando diferenças quanto ao consumo de MS total, encontraram diferenças para o consumo de volumoso, sendo este menor para o percentual de 100% de substituição da silagem de milho por cana-de-açúcar. Quanto ao feno, apesar do percentual de FDN superior aos demais tratamentos, sua digestibilidade foi alta, possivelmente em função da menor taxa de passagem, proporcionando assim, um consumo semelhante entre as dietas.

Os consumos de matéria orgânica, proteína bruta, carboidratos totais e nutrientes digestíveis totais seguiram a mesma tendência que os consumos de matéria seca, não diferindo entre as dietas (Tabela 3), fato que foi também evidenciado nos estudos de Cavalcante et al. (2004), onde avaliou a substituição de feno por silagem para novilhos e Menezes et al. (2011b) ao comparar a silagem com a cana *in natura* ou ensilada para novilhos. A exceção para esse comportamento ocorreu para os carboidratos não-fibrosos e fibra em detergente neutro indigestível proveniente do volumoso.

Os resultados relacionados ao consumo de silagem de milho em comparação à cana-de-açúcar ou feno de tifton 85 são bastante divergentes. Alguns trabalhos têm evidenciado menor consumo de matéria seca em dietas com cana-de-açúcar em comparação à silagem de milho para novilhos, novilhas e vacas em lactação (Magalhães, 2006; Corrêa et al.,

2003), fato que pode ser explicado pelo consumo de fração baixa digestibilidade da FDN, como também observado neste trabalho (Tabela 4), que aumentam o tempo de retenção da fibra não digerida no rúmen e intestinos, reduzindo a taxa de passagem, e conseqüentemente, interferindo negativamente no consumo de matéria seca (Allen, 2000; Landell et al., 2002).

Os consumos de matéria orgânica, proteína bruta, carboidratos totais e nutrientes digestíveis totais referentes à dieta total, assim como os consumos de matéria seca e fibra em detergente neutro provenientes do volumoso seguiram a mesma tendência do consumo de matéria seca, não diferindo entre as dietas experimentais (Tabela 3). Dias (2009) ao avaliar dietas com cana ou silagem de milho para novilhas em dietas com relação V:C (100:0 ou 75:25) também não detectou diferenças quanto ao consumo de MO e PB. Menezes (2011b) da mesma forma não relatou diferença no consumo das frações MO, PB e NDT ao comparar a silagem de milho a diferentes formas de fornecimento de cana. Costa et al. (2005) trabalhando com vacas em lactação ao avaliarem dietas com silagem ou cana na mesma proporção não relataram diferenças entre as dietas. Rangel et al. (2010) ao testarem diferentes níveis de concentrado em dietas com cana para novilhas também não observou diferença na comparação com silagem de milho com a mesma quantidade de concentrado para esses nutrientes.

Os consumos médios de CNF foram maiores nas dietas com silagem de milho e cana, o que se justifica pelo maior teor desse nutriente nestas dietas e, principalmente na dieta de cana (Tabela 3).

Conforme demonstrado na Tabela 4, as dietas não diferiram quanto às digestibilidades aparentes totais da MS, MO e dos CT. Resultados similares foram observados por Cavalcante et al (2004) ao avaliar a substituição de feno por silagem para novilhos. Mendonça et al. (2004) e Costa et al. (2005) ao compararem a silagem de milho com a cana-de-açúcar em ensaios com vacas e Rangel et al. (2010) em experimento semelhante com novilhas também não verificaram diferenças na digestibilidade para essas frações. Quanto à fração PB, a dieta de silagem mostrou menor digestibilidade total em relação às demais. Márcia Dias (2009) e Rangel et al. (2010) também relataram maior digestibilidade para dietas à base de cana e Martins et al (2006) para dietas com feno em comparação com silagem de milho.

Tabela 4. Digestibilidade aparente total, ruminal e intestinal dos nutrientes das dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de Tifton (FT)

Nutriente	Dietas			EPM <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>
	SM	CA	FT		
Digestibilidade Total (%)					
Matéria seca	70,42	69,78	68,80	1,14	0,62
Matéria orgânica	71,69	71,12	70,80	1,17	0,86
Proteína bruta	62,70 <sup>b</sup>	78,03 <sup>a</sup>	73,52 <sup>a</sup>	1,43	<0,01
Fibra em detergente neutro	65,38 <sup>a</sup>	53,72 <sup>b</sup>	68,02 <sup>a</sup>	2,07	<0,01
Carboidratos não-fibrosos	84,71 <sup>b</sup>	94,60 <sup>a</sup>	79,40 <sup>c</sup>	1,39	<0,01
Carboidratos totais	81,22	79,30	80,10	0,55	0,10
Digestibilidade Ruminal <sup>1</sup> (%)					
Matéria seca	75,75	72,61	68,98	5,37	0,68
Matéria orgânica	89,48	86,64	85,27	3,25	0,66
Proteína bruta <sup>2</sup>	33,65	50,74	44,60	5,07	0,11
Fibra em detergente neutro	95,15	96,21	93,99	4,86	0,94
Carboidratos não-fibrosos	95,16 <sup>a</sup>	82,94 <sup>b</sup>	84,42 <sup>b</sup>	2,55	0,02
Carboidratos totais	94,95	91,52	91,69	2,91	0,66
Digestibilidade Intestinal <sup>1</sup> (%)					
Matéria seca	24,24	27,39	31,02	5,36	0,68
Matéria orgânica	10,52	13,36	14,73	3,25	0,66
Proteína bruta <sup>2</sup>	66,34	49,26	55,39	5,07	0,11
Fibra em detergente neutro	4,85	3,79	6,00	4,86	0,94
Carboidratos não-fibrosos	4,84 <sup>b</sup>	17,05 <sup>a</sup>	15,58 <sup>a</sup>	2,55	0,02
Carboidratos totais	5,05	8,48	8,31	2,91	0,66

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de SNK com 5% de probabilidade

<sup>1</sup>Expressa em % do total digerido; <sup>2</sup>Expressa em % do total ingerido que sofreu digestão no rúmen ou intestinos; EPM<sup>3</sup> = Erro padrão da média; P<sup>4</sup> = Valor de probabilidade para o efeito de dieta

Quanto à digestibilidade da FDN podem ser evidenciadas diferenças significativas entre as dietas experimentais, com melhores respostas para as dietas contendo silagem de milho e feno de tifton. (Tabela 4). Cabral et al. (2006) e Menezes et al. (2011) também evidenciaram maiores digestibilidades para a silagem de milho. Valores semelhantes aos encontrados neste trabalho para a dieta de cana foram vastamente relatados na literatura (Aroeira, 1995; Galo et al. 2000; Manzano et al. 1987; Manzano et al. 1999; Stacchini, 1998). O elevado teor de FDNi na dieta de cana pode ter contribuído para a redução na digestibilidade desta dieta, pois considerando que a FDNi é indisponível tanto no rúmen

como nos intestinos, sua concentração nos alimentos pode ser inversamente relacionada à digestibilidade (Tabela 3). Como esta fração deixa o rúmen somente por meio do processo de passagem, espera-se grande contribuição para o efeito de enchimento ruminal. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Magalhães et al. (2006), Mendonça et al. (2004), Corrêa et al. (2003). Segundo estes autores, a menor digestibilidade da FDN para dietas à base de cana-de-açúcar poderia ser apontada como o principal responsável pela diminuição de consumo de matéria seca, ponto este observado apenas numericamente neste estudo.

Concordando com estes resultados, estão os observados por Magalhães et al. (2006), que verificou decréscimo linear na digestibilidade da FDN, à medida que aumentava o nível de substituição da silagem de milho por cana-de-açúcar. Provavelmente, tal fato ocorreu em virtude do maior teor de fibra indigestível presente nas dietas à base de cana-de-açúcar. O teor e a forma como a fração fibrosa está presente pode afetar a degradabilidade da fibra entre os diferentes alimentos (Hoover, 1986). Outro fator que pode ter influenciado a digestão da FDN seria o aumento na quantidade de carboidratos de fácil fermentação, resultando em alterações na microbiota ruminal. Van Soest (1994) afirmou que a adição de grande quantidade de carboidratos de fácil fermentação pode reduzir a digestibilidade da fração fibrosa e estes efeitos podem ser mais expressivos dependendo da quantidade de nitrogênio amoniacal para crescimento microbiano. De fato, os resultados descritos por Mandebvu et al. (1998b) indicaram que a melhoria da digestibilidade e no desempenho animal com a utilização do capim-tifton 85 pode ser atribuída aos mais baixos teores de lignina e polissacarídeos interligados, além das mais baixas ocorrências de ferulatos éter ligados à lignina nessa gramínea. Verifica-se que os altos coeficientes de digestibilidade dos nutrientes, notadamente da fração FDN, corroboram vários trabalhos incluindo essa gramínea (Ribeiro et al., 2001).

No presente estudo, a cana-de-açúcar apresentou maior consumo de FDNi em comparação à silagem de milho e feno de tifton. O maior conteúdo de lignina na cana-de-açúcar pode ter afetado a proporção de FDN indigestível, além da taxa e da extensão da digestão da FDN potencialmente digestível das dietas. Segundo Hoover (1986), a concentração e a forma como a lignina está presente nas forragens pode constituir fator determinante nas diferenças de digestão da fibra entre vários alimentos. A baixa

digestão da FDN da cana-de-açúcar pode ter apresentado efeito de repleção ruminal e, conseqüentemente, limitado a ingestão de MS.

Segundo Beauchemin & Buchanan-Smith (1990), dietas contendo silagem resultam em maiores digestibilidades que aquelas contendo feno, pois, no decorrer da digestão, geralmente ocorre, em menor tempo, maior desintegração das partículas da silagem, resultando em maior taxa de passagem. Este fato pode, no entanto, facilitar o escape de material potencialmente digestível, que com menores taxas de passagem, pode ser mais bem digerido e aproveitado. Esta menor taxa de passagem para dieta de feno pode levar à uma maior digestibilidade, fazendo com que as digestibilidades da FDN se tornem equivalentes entre as dietas.

A digestibilidade aparente dos CNF foi maior para a cana-de-açúcar, seguido pela silagem de milho. Tal fato pode ser atribuído ao elevado teor de CNF destes volumosos. Segundo Valadares Filho et al. (1987), os carboidratos não-fibrosos apresentam coeficiente de digestibilidade aparente total elevado, às vezes acima de 90%, enquanto, para carboidratos estruturais, a digestibilidade aparente é próxima de 50% considerando, evidentemente, outros fatores inerentes, como a fonte volumosa. Este fato pode ser explicado pela disponibilidade rápida e praticamente completa desta fração no trato gastrintestinal dos ruminantes. Uma vez que a digestão da FDN no rúmen não diferiu entre as dietas, atribui-se aos CNF a contribuição para o aumento da digestão ruminal dos nutrientes para a silagem de milho. Valadares Filho et al. (1985) relataram digestibilidade aparente total da matéria seca ligeiramente superior (71%) para dietas à base de silagem de milho em relação à observada neste estudo. Para todas as dietas, pelo menos 85% dos CT e da FDN foram digeridos no rúmen. A digestão dos CNF no rúmen é desejável quando há disponibilidade de nitrogênio, a fim de permitir uma sincronia adequada para a síntese microbiana, uma vez que a proteína microbiana responde pelo maior percentual da proteína metabolizável absorvida no intestino dos ruminantes.

As digestibilidades parciais dos nutrientes não foram influenciadas pelos tratamentos e apresentaram grande similaridade entre as dietas, à exceção da fração CNF, com maior digestibilidade ruminal e menor digestibilidade intestinal da mesma para a dieta de silagem em relação às demais (Tabela 4).

A menor digestibilidade das frações MS, MO, FDN, CNF e CT no segmento intestinal é consequência da maior digestão ruminal destas. Para as frações FDN e CT, da

proporção digerida em todo o trato gastrointestinal, o maior percentual de digestão da FDN (95,12%, em média) e dos CT (92,72%), ocorreu no rúmen, fato este bem entendido e esperado, uma vez que a fermentação da fibra ocorre preferencialmente no rúmen, sendo realizada por uma complexa microbiota num sistema de simbiose bastante eficiente com o animal ruminante. Valadares et al. (1997a) relataram digestão ruminal média da FDN de 94,0%, com diferentes níveis de PB na dieta. Da mesma forma, Ribeiro et al. (2001) avaliando diferentes idades de rebrota do capim para produção de feno de tifton encontrou valores entre 93,7 a 97,2%. Rennó (2003) em estudo com diferentes grupos genéticos bovinos evidenciou valores oscilando entre 90,22 e 97,03%.

Considerando a alta digestibilidade ruminal da FDN, que situa-se normalmente entre 90 e 95% da digestibilidade total da fibra, apenas 5 a 10% restariam para serem digeridos no intestino. Dessa forma, a partição da digestão da FDN entre o rúmen e o intestino pode ser utilizada como indício de disfunção do indicador e, assim, verificar se o mesmo pode ou não ser usado em estudos de digestibilidade parcial. Essa questão constituiu o outro foco de avaliação deste experimento.

Não foram observadas variações nos fluxos omasais de MS e FDN, bem como para as respectivas digestibilidades ruminais e intestinais na interação entre dietas e indicadores utilizados no estudo (Tabela 5). Portanto, todos esses parâmetros foram estimados considerando apenas a variação entre indicadores independente da dieta. A falta de interação entre indicador e dieta é um fator positivo, pois demonstra o mesmo comportamento do indicador nas diferentes dietas estudadas. Como pode-se observar, os fluxos omasais (kg/dia e % ingerido) estimados com o indicador fibra em detergente neutro (FDNi) proporcionaram maiores valores para os fluxos omasais tanto de MS como de FDN, em comparação aos indicadores LIPE<sup>®</sup> e matéria seca indigestível (MSi). As maiores estimativas de fluxo promovidas pelo FDNi, refletiram diretamente nas digestibilidades ruminal e intestinal, quando obtidas com este indicador. Pode-se analisar ainda, que as digestibilidades ruminais tanto da MS como da FDN obtidas encontram-se bem distintas em relação aos demais indicadores. Os valores de digestibilidade ruminal da FDN obtidos com os indicadores LIPE<sup>®</sup> e MSi encontram-se dentro da faixa média de digestibilidade para esta fração neste segmento do trato gastrointestinal, sendo essa faixa de valores amplamente comprovada pela literatura.

Tabela 5. Fluxos omasais de matéria seca (MS) e fibra em detergente neutro (FDN) obtidos por diferentes indicadores

Parâmetro	Indicadores <sup>1</sup>			EPM <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>
	LIPE <sup>®</sup>	MSi	FDNi		
Fluxo Omasal (kg/dia)					
Matéria seca	4,83 b	5,27 b	5,96 a	0,19	<0,01
Fibra em detergente neutro	2,01 b	2,19 b	2,47 a	0,09	<0,01
Fluxo Omasal (% ingerido)					
Matéria seca	49,39 b	52,21 b	59,18 a	1,74	<0,01
Fibra em detergente neutro	39,95 b	42,53 b	48,04 a	1,45	<0,01
Digestibilidade Ruminal (%)					
Matéria seca	72,08 a	68,54 a	58,46 b	2,63	<0,01
Fibra em detergente neutro	95,12 a	90,36 b	81,58 c	1,17	<0,01
Digestibilidade Intestinal (%)					
Matéria seca	27,55 b	31,46 b	41,53 a	2,55	<0,01
Fibra em detergente neutro	4,88 c	9,63 b	18,42 a	1,17	<0,01

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de SNK com 5% de probabilidade

<sup>1</sup> LIPE<sup>®</sup> = Lignina isolada, purificada e enriquecida; MSi = matéria seca indigestível; FDNi = fibra em detergente neutro indigestível; <sup>2</sup> EPM = Erro padrão da média; <sup>3</sup> Valor de probabilidade para o efeito de indicador

Nos estudos de validação de indicadores de digestibilidade parcial, diferentemente do que acontece nos ensaios de validação de indicadores em ensaios de digestibilidade total nos quais estes são comparados à coleta total de fezes, não existe um parâmetro real de comparação, a não ser o método de abate dos animais. Em decorrência desta incapacidade de validar estimativas de fluxo digestivo, os indicadores utilizados para este fim têm sido avaliados com base em fundamentações teóricas (Ahvenjarvi et al., 2003). Ao considerar que um indicador passa primeiro no intestino delgado antes de chegar ao intestino grosso, consideramos também que a completa recuperação no duodeno é provável quando o indicador é recuperado completamente nas fezes (Titgemeyer, 1997).

Quando o fluxo total da digesta para o omaso é superestimado, a digestão ruminal da FDN pode ser subestimada e, de forma errônea, grande proporção da FDN será considerada como digerida no intestino (Titgemeyer, 1997). Pode-se notar que a digestibilidade da MS quando estimada pelo FDNi (58,46%), mostrou-se subestimada em relação aos valores de 72,08 e 68,54% obtidos pelos outros indicadores. Como consequência dessa subestimativa, a digestibilidade ruminal da FDN seguiu a mesma

tendência, apresentando o percentual de 81,58% apenas, valor este inferior aos normalmente relatados nos ensaios de digestibilidade com ruminantes. Em contrapartida, os indicadores LIPE<sup>®</sup> e MSi proporcionaram os valores de 95,12 e 90,36%, respectivamente, resultados que eram esperados, em virtude da fração fibrosa da dieta ser, preferencialmente, utilizada no rúmen. Analisando as digestibilidades intestinais da MS e FDN, pode-se verificar que, em consequência da baixa digestibilidade ruminal obtida para estas frações por meio do FDNi, os valores encontrados foram altos (41,53 e 18,42%, respectivamente), denotando baixa adequação deste indicador em estudos de digestibilidade parcial.

Sendo assim, esse parâmetro constitui um dos pontos de grande relevância na avaliação e validação de um indicador de digestibilidade parcial. Dessa forma, pode-se inferir que à exceção do FDNi, os indicadores estimaram de forma correta os fluxos de MS e FDN para o omaso e, conseqüentemente, as digestibilidades parciais para estas frações. Zeoula et al. (2000) em estudo de avaliação de indicadores de digestibilidade parcial para bovinos também relataram que a FDNi subestimou a digestibilidade e não proporcionou resultados confiáveis, em virtude das grandes variações destes. Quanto ao MSi, bons resultados com o uso deste indicador foram também evidenciados por Detmann et al. (2001), ao fazerem uso do mesmo em estudo de avaliação de indicadores de digestibilidade em ensaio com animais a pasto. Outros bons resultados foram também relatados por Torres et al. (2009) e Koslozki et al. (2009).

Na análise individual de cada indicador, considerando-se os desvios-padrão para os fluxos omasais de MS e FDNi, o indicador LIPE<sup>®</sup> foi o mais preciso, apresentando valores expressivamente menores em relação aos das frações indigestíveis. Seguido por ele evidencia-se a MSi, também com razoável precisão. O indicador FDNi foi aquele que mostrou-se menos preciso dentre todos, apresentando os maiores desvios. O resultado da maior precisão do LIPE<sup>®</sup> em comparação aos outros indicadores pode ser explicado pela ausência de variação diurna, conforme citado por Rodriguez et al. (2006). Para Hopper et al. (1978), flutuações cíclicas na excreção de um indicador, ocorrem normalmente por não se misturar homogêaneamente na digesta ou por apresentar características cinéticas distintas da fase da digesta a qual se pretende marcar.

Tabela 6. Desvio-padrão para os fluxos omasais de matéria seca (MS) e fibra em detergente neutro (FDN) obtidos por diferentes indicadores em função de dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de Tifton (FT)

Indicadores	Dietas			$P^2$	Desvio-padrão
	SM	CA	FT		
Fluxo Omasal de MS (kg/dia)					
LIPE <sup>®</sup>	4,79	4,99	4,71	0,52	0,7289
MSi	5,21	5,76	4,83	0,18	1,3678
FDNi	6,13	6,33	5,42	0,18	1,4187
Fluxo Omasal de FDN (kg/dia)					
LIPE <sup>®</sup>	1,93	2,18	1,92	0,41	0,6156
MSi	2,14	2,45	1,98	0,26	0,7916
FDNi	2,52	2,69	2,22	0,31	0,8836

<sup>1</sup> LIPE<sup>®</sup> = Lignina isolada, purificada e enriquecida; MSi = matéria seca indigestível; FDNi = fibra em detergente neutro indigestível

<sup>2</sup> Valor de probabilidade para o efeito de dieta.

Analisando as médias, considerando que o valor deveria ser o mais próximo de zero pela baixa digestibilidade intestinal de fibras, verifica-se que o LIPE<sup>®</sup> e a MSi resultaram em valores mais próximos aos desejáveis, sugerindo melhor exatidão.

Quando comparado o intervalo de confiança para os fluxos omasais, pode-se verificar maiores amplitudes para o indicador FDNi em relação aos demais, fato que o levou às superestimativas dos fluxos e, conseqüentemente, subestimativas das digestibilidades ruminais e superestimativas das digestibilidades intestinais, uma vez que estas são calculadas com base nas frações estimadas que chegam nos respectivos segmentos do trato gastrintestinal. Os resultados relatados nas pesquisas para esse indicador são bastante divergentes. Alguns trabalhos (Freitas et al., 2002; Cezimbra et al., 2010) obtiveram bons resultados com esse indicador, já outros (Zeoula et al., 2000; Maeda et al., 2011) relataram que a FDNi não se mostrou eficiente para esta finalidade.

Tabela 7. Limites inferior (LI) e superior (LS) do intervalo de confiança a 95% de probabilidade para os fluxos omasais (kg/dia) estimados por diferentes indicadores

Parâmetro	LIPE <sup>®</sup>		MSi <sup>1</sup>		FDNi <sup>2</sup>	
	LI	LS	LI	LS	LI	LS
Fluxo Omasal da MS	4,42	5,24	4,73	5,79	5,33	6,59
Fluxo Omasal da FDN	1,79	2,22	1,93	2,45	2,18	2,77

<sup>1</sup>Matéria seca indigestível

<sup>2</sup>Fibra em detergente neutro indigestível

Quanto ao indicador MSi, bons resultados foram também relatados por Detmann et al. (2005), ao analisarem o perfil nictemeral de diferentes indicadores internos, e dentre eles a MSi, em relação ao comportamento comumente descrito para o óxido crômico (indicador externo). Estes pesquisadores observaram maior estabilidade para os indicadores internos, fato justificado pelas diferenças na dosagem desses indicadores nos animais. Enquanto o óxido crômico é normalmente fornecido em uma ou duas doses diárias, os indicadores internos apresentam dosagem homogênea, já que encontram-se presentes naturalmente nos alimentos, não sendo, portanto, necessária administração dos mesmos com subsequente espera por equilíbrio de excreção. Da mesma maneira, Maeda et al. (2011) ao avaliarem diferentes indicadores para estimativa de fluxo omasal em bovinos e bubalinos sugeriram a utilização da MSi com este propósito em estudos com bovinos.

As limitações quanto à utilização dos indicadores internos são outros, destacando-se dentre eles: tempo de incubação, tamanho das partículas a serem incubadas e o material utilizado para acondicionamento das amostras a serem incubadas. O LIPE<sup>®</sup> em contrapartida, apesar de ser um indicador externo assim como o óxido crômico e requisitar fornecimento, seguido de um período de adaptação a fim de se atingir o “steady state”, não apresenta o problema da variação diurna de excreção, comumente relatado para os indicadores externos. Fica evidente que a utilização tanto da MSi como do LIPE<sup>®</sup> como indicadores em estudos de partição da digestão proporcionam resultados coerentes e precisos.

Diversos trabalhos (Zeoula et al., 2000; Brito et al., 2007; Dias, 2007; Cezimbra, 2010; Maeda et al., 2011) relataram bons resultados com a utilização da técnica de indicador único em estudos de digestibilidade parcial, com diferentes respostas entre os

indicadores. Cezimbra (2010) ratificou o uso de único indicador, em virtude dos resultados obtidos com o uso de indicador duplo em seu estudo. Este pesquisador relatou que as respostas obtidas com a técnica do duplo indicador mostraram-se subestimadas quando comparadas aos valores encontrados para cada indicador isoladamente. Para Dias (2007), que avaliou diferentes indicadores em sistema de único ou múltiplo indicador em estudos com bovinos, tanto a FDNi, como a FDAi e o Co-FDAi podem ser utilizados como indicadores em digestibilidade parcial, entretanto, esses autores recomendam o uso das fibras indigestíveis por serem menos onerosas e de mais fácil manipulação.

### 3.4 Conclusões

As fontes volumosas influenciaram o consumo de nutrientes das frações carboidratos não-fibrosos e FDNi proveniente da fração volumosa.

As dietas também influenciaram as digestibilidades totais da FDN e CNF e as digestibilidades ruminal e intestinal da fração CNF, sendo o rúmen o principal local de digestão destas frações.

Os indicadores LIPE<sup>®</sup> e MSi podem ser utilizados em estudos de digestibilidade parcial, com destaque para o primeiro, em virtude da maior precisão e maior praticidade de aplicação, uma vez que não requer incubação ruminal de amostras no período pós-experimental. A FDNi superestimou os fluxos omasais, conduzindo à subestimativas de digestibilidade ruminal e superestimativas de digestibilidade intestinal.

### 3.5 Referências Bibliográficas

AHVENJÄRVI, S.; VANHATALO, A.; SHINGFIELD, K. J. et al. Determination of digesta flow entering the omasal canal of dairy cows using different marker systems. *British Journal of Nutrition*, v. 90, n. 1, p. 41-52, 2003.

ALLEN, M. S. Carbohydrate nutrition. *The Veterinary Clinics of North America*, v. 7, n. 2, p. 327-340, 1991.

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 1598-1624, 2000.

ANDRADE, M. A. F.; PEREIRA, M. N. Performance of Holstein heifers on fresh sugarcane as the only dietary forage. *Journal of Dairy Science*, v. 82, n. 1, p. 91-92, Supplement. 1999.

AROEIRA, L. J. M.; LOPES, F. C. F.; DAYRELL, M. S.; LIZIEIRE, R. S.; TORRES, M. P. Digestibilidade, degradabilidade e taxa de passagem da cana-de-açúcar mais uréia e do farelo de algodão em vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v. 24, n. 6, p. 1016-1026, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Official Methods of Analysis. 16<sup>a</sup> ed. AOAC, Washington, DC. 1995.

BEAUCHEMIN, K. A.; BUCHANAN-SMITH, J. G. Effects of fiber source and method of feeding on chewing activities, digestive function, and productivity of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 749-762, 1990.

BRITO, R. M.; SAMPAIO, A. A. M.; RESENDE, K. T.; FERNANDES, A. R. M.; HENRIQUE, W; ROUTMAN, K. S. 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.

CABRAL, L. S.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E.; MALAFAIA, P. A. M.; ZERVOUDAKIS, J. T.; SOUZA, A. L.; VELOSO, R. G., NUNES, P. M. M. Consumo e digestibilidade dos nutrientes em bovinos alimentados com dietas à base de volumosos tropicais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, n. 6, p. 2406-2412, 2006.

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

CAVALCANTE, A. C. R., PEREIRA, O. G.; VALADARES FILHO, S. C.; RIBEIRO, K. G.; GARCIA, R.; LANA, R. P. Dietas Contendo Silagem de Milho (*Zea mays* L.) e Feno de Capim-Tifton 85 (*Cynodon* spp.) em Diferentes Proporções para Bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, n. 6, p. 2394-2402, 2004 (Supl. 3).

CEZIMBRA, I. M. *Indicadores na estimativa do fluxo de nutrientes no duodeno, produção fecal, consumo de concentrado e volumoso por bovinos*. 2010. 65p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

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.

CONRAD, H. R. Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by ruminants. Physiological and physical factors limiting feeding intake. *Journal of Animal Science*, v.25, p.227-235, 1966.

CONRAD, H. R.; PRATT, A. D.; HIBBS, J. W. Regulation of feed intake in dairy cows. 1. Change in importance of physical and physiological factors with increasing digestibility. *Journal of Dairy Science*, v.47, n.1, p.54-62, 1964.

CORREA, C. E. S.; PEREIRA, M. N.; OLIVEIRA, S. G. et al. Performance of Holstein cows fed sugarcane or corn silages of different grain textures. *Scientia Agricola*, v. 60, n. 4, p. 621-529, 2003.

COSTA, M. G.; CAMPOS, J. M. S.; VALADARES FILHO, S. C. et al. Desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com diferentes proporções de cana-de-açúcar e concentrado ou silagem de milho na dieta. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, n. 6, p. 2437-2445, 2005 (supl.).

DETMANN, E.; BARROS, E. E. L.; FONTES, C. A. A. et al. Avaliação do perfil nictemeral de excreção de indicadores internos em ensaio de digestão com bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. *Anais...* Goiânia: Macromedia, 2005.

DETMANN, E.; PAULINO, M. F.; ZERVOUDAKIS, J. T. et al. Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, p. 1600-1609, 2001.

DIAS, M. *Indicadores na coleta de digesta omasal e na cinética de trânsito do trato gastrintestinal de bovinos*. 2009. 96 p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

DIAS, Márcia et al. Indicadores para estimativa da digestibilidade parcial em bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 3, p. 689-697, 2007.

FERREIRA, D. F. *Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0*. In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, p. 255-258, Julho, 2000.

FRANCE, J.; SIDDONS, R. C. Determination of digesta flow by continuous marker infusion. *Journal of Theoretical Biology*, v. 121, n. 2, p. 105-119, 1986.

FREITAS, D.; BERCHIELLI, T. T.; SILVEIRA, R. N. Consumo e digestibilidade aparente total e parcial de rações com cana-de-açúcar e raspa de mandioca ensilados com polpa cítrica. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, n. 3, p. 1531-1542, 2002 (suplemento).

GALLO, P. C. S.; PEREIRA, M. N.; ANDRADE, M. A. F. Effect of dietary sugarcane concentration on heifer growth. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 144, 2000. (Suppl. 1).

HOOVER, W. H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *Journal of Dairy Science*, v. 69, n. 10, p. 2755-2766, 1986.

HOPPER, J. T.; HOLLOWAY, J. W.; BUTTS JUNIOR, W. T. Animal variation in chromium sesquioxide excretion patterns of grazing cows. *Journal of Animal Science*, v. 46, n. 4, p. 1098-1102, 1978.

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

ÍTAVO, L. C. V.; SILVA, F. F.; FERREIRA, C. C. B. et al. Comparação de indicadores e metodologia de coleta para estimativas de produção fecal e fluxo da digesta em bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, n. 4, p. 1833-1839, 2002.

KOZLOSKI, G. V.; MESQUITA, F. R.; ALVES, T. P.; CASTAGNINO, D. S.; STEFANELLO, C. M.; SANCHEZ, L. M. B. 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.

LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; RODRIGUES, A. A. et al. A variedade IAC-862480 como nova opção de cana-de-açúcar para fins forrageiros: manejo de produção e uso na alimentação animal. *Boletim Técnico IAC*, n. 193, 36 p., 2002.

LEÃO, M. I. *Metodologias de coletas de digestas omasal e abomasal em novilhos submetidos a três níveis de ingestão: consumo, digestibilidade e produção microbiana*. 2002. 57p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LUGINBUHL, J. M.; POND, K. R.; BURNS, J. C. et al. Intake and chewing behavior of steers consuming switchgrasses preserved as hay or silage. *Journal of Animal Science*, v.78, n.7, p.1983-1989, 2000.

MAEDA, E. M.; ZEOULA, L. M.; GOMES, H. C. C.; JACOBI, G.; SIMIONI, F. L.; OLIVIERA, R. A. Avaliação de indicadores usados nos estudos de ingestão e digestibilidade em bovinos e bubalinos. *Archivos de Zootecnia*, v. 60, n. 229, p. 123-131, 2011.

MAGALHÃES, A. L. R.; CAMPOS, J. M. S.; CABRAL, L. S. Cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho em dietas para vacas em lactação: parâmetros digestivos e ruminais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, n. 2, p. 591-599, 2006.

MAGALHÃES, F. A. Cana-de-açúcar ensilada com diferentes graus brix com ou sem óxido de cálcio e silagem de milho em dietas para bovinos de corte. 2010. 128p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MANDEBVU, P. et al. In vitro digestion kinetics of neutral detergent fiber extracted from Tifton 85 and Coastal bermudagrasses. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 73, p. 263-269, 1998b.

MANZANO, A.; ESTEVES, S. N.; FREITAS, A. R.; ROMANO, M. A.; NOVAES, N. J. Eficiência de Utilização de Nutrientes em Novilhas das Raças Canchim e Nelore e Cruzadas Canchim-Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 28, n. 6, p. 1375-1381, 1999.

MANZANO, A.; NOVAES, N. J.; ESTEVES, S. N. Eficiência de utilização de nutrientes pelas raças nelore e canchim e mestiços holandês-zebu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 22, n. 8, p. 873-880, 1987.

MARTINS, A. S. ; VIEIRA, P. F. ; BERCHIELLI, T. T. ; PRADO, I. N. ; MOLETTA, J. L. . Consumo e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com enzimas fibrolíticas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, p. 2118-2124, 2006.

MENDONÇA, S. S.; CAMPOS, J. M. S.; VALADARES FILHO, S. C. et al. Consumo, produção e composição de leite, variáveis ruminais de vacas leiteiras alimentadas com dietas à base de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, n. 2, p. 481-492, 2004.

MENEZES, G. C. C.; VALADARES FILHO, S. C.; MAGALHÃES, F. A.; VALADARES, R. F. D.; MARIZ, L. D.; DETMANN, E.; PEREIRA, O. G.; LEÃO, M. I. Total and partial digestibility, rates of digestion obtained with rumen evacuation and microbial protein synthesis in bovines fed fresh or ensiled sugar cane and corn silage. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 40, n. 5, p. 1104-1113, 2011.

MERCHEN, N.R. Digestion, absorption and excretion in ruminantes In: CHURCH, D.C. (Ed.) *The ruminant animal digestive physiology and nutrition*. 4 ed. Carvallis: O & B Books, 1993. p. 172-201.

MERTENS, D.R. Comparing forage sources in dairy rations containing similar neutral detergent fiber concentrations. In: U. S. Dairy Forage Research Center (Ed.) *Research summaries*. Wisconsin: USDA, ARS, 1996. p. 87-90.

MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: FAHEY JR., G.C. (Ed.) *Forage quality, evaluation and utilization*. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p.450-493.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 381p., 2001.

NELSON, W. F.; SATTER, L. D. Impact of stage of maturity and method of preservation of alfalfa on digestion in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n. 6, 1571, 1992.

PENNING, P. D.; JOHNSON, R. H. The use of internal markers to estimate herbage digestibility and intake. 1. Potentiality indigestible cellulose and acid insoluble ash. *Journal Agricultural Science*, v. 100, n. 1, p. 127-131, 1983.

PEREIRA, E. S.; QUEIROZ, C. A.; PAULINO, M. F. et al. Determinação das frações protéicas e de carboidratos e taxas de degradação *in vitro* da cana-de-açúcar, da cama de

frango e do farelo de algodão. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, n. 6, p. 1887-1893, 2000.

RANGEL, A. H. N.; CAMPOS, J. M. S.; OLIVEIRA, A. S.; VALADARES FILHO, S. C.; ASSIS, A. J.; SOUZA, S. M. Desempenho e parâmetros nutricionais de fêmeas leiteiras em crescimento alimentadas com silagem de milho ou cana-de-açúcar com concentrado. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, n. 11, p. 2518-2526, 2010.

RENNÓ, L. N. *Consumo, digestibilidade total e parcial, produção microbiana, parâmetros ruminais e excreções de uréia e creatinina em novilhos alimentados com dietas contendo quatro níveis de uréia ou dois níveis de proteína*. 2003. 105p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

RIBEIRO, K. G., GARCIA, R., PEREIRA, O. G. et al. Consumo e digestibilidades aparentes total e parcial, de nutrientes, em bovinos recebendo rações contendo feno de capim-tifton 85 de diferentes idades de rebrota. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, n. 2, p. 533-540, 2001.

RODRIGUEZ, N. M.; SALIBA, E. O. S.; GUIMARÃES JÚNIOR, R. Uso de indicadores para estimativa de consumo a pasto e digestibilidade. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. *Anais...* João Pessoa: SBZ, 2006. p. 323-352.

SALIBA, E. O. S. *Caracterização química e microscópica das ligninas dos resíduos agrícolas de milho e de soja expostos à degradação ruminal e seu efeito sobre a digestibilidade dos carboidratos estruturais*. 1998. 236p. Tese (Doutorado) – Escola de veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SALIBA, E. O. S.; NANJARO, A.; FERREIRA, W. M. et al. Avaliação da lignina de madeira moída do *Pinus* e da lignina purificada e enriquecida do *Eucalyptus grandis* (LIPE<sup>®</sup>), como indicadores externos em experimentos de digestibilidade aparente para coelhos em crescimento. In: TELECOFERÊNCIA SOBRE INDICADORES EM NUTRIÇÃO ANIMAL, 1., 2005, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Escola de Veterinária/UFMG, 2005. p.23-25.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; Van SOEST, P. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluation cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, 1992.

STACCHINI, P. F. *Efeito dos teores de uréia e do farelo de soja sobre a digestibilidade e balanço de nitrogênio em vacas leiteiras alimentadas com cana-de-açúcar*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998. 67p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.

TITGEMEYER, E.C. Design and interpretation of nutrient digestion studies. *Journal of Animal Science*, v. 75, n. 8, p. 2235-2247, 1997.

TORRES, L. C. L.; FERREIRA, M. A.; GUIM, A.; VILELA, M. S.; GUIMARÃES, A. V.; SILVA, E. C. 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. *Digestão total e parcial da matéria seca e carboidratos em bovinos e bubalinos*. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1985. 147p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

VALADARES FILHO, S.C., SILVA, J.F.C., LEÃO, M.I. et al. Estudo comparativo da digestão da matéria seca e carboidratos em bovinos e bubalinos alimentados com diferentes rações. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 16, n. 2, p. 120-130, 1987.

VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C.; GONÇALVES, L. C. et al. Níveis de proteína em dietas de bovinos. Concentrações de amônia ruminal e uréia plasmática e excreções de uréia e creatinina. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 26, n. 6, p. 1270-1278, 1997a.

VALADARES, R. F. D., GONÇALVES, L. C., SAMPAIO, I. B. et al. Metodologia de coleta de urina em vacas utilizando sondas de Folley. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 26, n. 6, p. 1279-1282. 1997b.

VALVASORI, E.; LUCCI, C. S. L.; ARCARO, J. R. P. et al. Avaliação da cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho para vacas leiteiras. *Brazilian Journal of Veterinarian Research in Animal Science*, v. 32, n. 4, p. 224-228, 1995.

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

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

## Capítulo 4 – Ácido 2,6-Diaminopimélico (DAPA), obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, na Quantificação Protéica Microbiana de Novilhas Alimentadas com Diferentes Fontes Volumosas

### 4.1 Introdução

As necessidades protéicas dos ruminantes são preenchidas mediante absorção de aminoácidos no intestino, sendo que 60% destes advém da proteína microbiana sintetizada a partir da simbiose existente entre animal e microbiota ruminal. A proteína microbiana, cuja digestibilidade intestinal é de aproximadamente 85% (Storm & Orskov, 1983), apresenta um perfil aminoacídico relativamente constante, com a presença de todos os aminoácidos, incluindo os essenciais, em proporção muito próxima da ideal, independente da composição protéica ingerida pelo animal.

Devido à importância da proteína microbiana para o metabolismo protéico dos ruminantes, a quantificação do seu fluxo sob diferentes condições dietéticas e fisiológicas é fundamental para o atendimento dos requisitos em aminoácidos. Com este propósito, vários indicadores microbianos têm sido utilizados, cada um com suas vantagens e limitações. Esses indicadores classificam-se em internos (Ácido 2,6-Diaminopimélico - DAPA, bases purinas, D-alanina), quando fazem parte da constituição da célula microbiana; externos ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$  e  $^{32}\text{P}$ ) quando são administrados aos animais para que sejam incorporados pelos microrganismos ruminais; e metabólicos (derivados de purina), que são moléculas ou substâncias formadas, a partir do metabolismo de outras.

Dentre os aminoácidos supracitados, um que merece destaque é o ácido 2,6-diaminopimélico (DAPA), que foi descoberto em 1950 por Work, porém só em 1953 foi sugerido como indicador microbiano por Synge e, desde então, foi utilizado em diversos experimentos para estimar a síntese de proteína microbiana (Broderick & Merchen, 1992). A sua quantificação laboratorial era realizada por cromatografia clássica, no entanto, a metodologia de análise por apresentar uma série de etapas acumulava muitos erros e, além disso, era muito laboriosa, demandando grande tempo de trabalho, caindo assim, em desuso. Com a evolução da técnica, os métodos analíticos baseados nesses princípios foram sendo refinados e automatizados, levando ao surgimento da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Dentre as vantagens do CLAE, podem ser citadas a rapidez da análise, automação, precisão e sensibilidade. Dessa forma, foi desenvolvido um

procedimento de separação e quantificação do ácido 2,6-diaminopimérico (DAPA) usando a cromatografia líquida de alta eficiência.

No presente trabalho foi proposta a avaliação de diferentes volumosos suplementares com vistas à minimização da sazonalidade forrageira que acomete o Brasil Central. A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) foi utilizada em função do pico de produção e valor nutritivo coincidentes com o período de escassez de forragem. Quanto às forragens conservadas, foram escolhidas a silagem de milho, pelo alto teor de carboidratos solúveis, que proporcionam um bom padrão fermentativo e a colocam no patamar de gramínea ideal e mais utilizada nos processos de ensilagem e o feno de tifton pelas características morfofisiológicas que permitem secagem mais uniforme, produzindo, assim, um feno que mantém a qualidade e o valor nutritivo da forragem fresca.

Com o objetivo de quantificação da síntese protéica microbiana a partir do ácido 2,6-diaminopimérico (DAPA) obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, em novilhas submetidas à dietas com diferentes volumosos, foi conduzido este estudo.

## **4.2 Material e Métodos**

### **4.2.1 Localização Experimental, Animais e Instalações**

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Viçosa, no Campus de Florestal, em Florestal, Minas Gerais, e as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais (LABNUTRI/EV-UFMG). Foram utilizadas seis novilhas mestiças de Holandês-Zebu, fistuladas no rúmen, com 480 kg de peso vivo médio inicial e 24 meses de idade, mantidas em baias individuais do tipo “Tie Stall”, cobertas, equipadas com bebedouros individuais, e cochos para o fornecimento da dieta.

O experimento teve duração de 57 dias, divididos em três períodos de 19 dias. Os animais foram pesados, identificados e vermifugados no início do experimento e mantidos por 13 dias em período de adaptação à dieta experimental e às instalações.

### **4.2.2 Dietas**

Foram avaliados três tratamentos constituídos por diferentes volumosos nas dietas experimentais: silagem de milho (*Zea mays*, L.), feno de capim-tifton (*Cynodon spp.*) e

cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.). As dietas foram suplementadas com concentrado à base de milho moído, farelo de soja e premix mineral, sendo balanceadas para serem isonitrogenadas (14% PB), constituindo-se de volumoso e concentrado, na proporção 75:25, com base na matéria seca. As dietas foram formuladas para atender às exigências nutricionais dos animais do estudo, segundo recomendações do NRC (2001).

Os ingredientes dietéticos foram pesados e misturados manualmente duas vezes ao dia para fornecimento às 8:00 e às 16:00 horas na forma de dieta completa, sendo o consumo medido diariamente, permitindo-se 5 a 10% de sobras diárias.

A composição em ingredientes e químico-bromatológica das dietas experimentais é descrita nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais, em ingredientes

Ingredientes	Dietas		
	Silagem de Milho	Cana-de-açúcar	Feno de Tifton
	% Matéria Seca		
Silagem de Milho	74,1	-	-
Cana-de-açúcar	-	73,8	-
Feno de Tifton	-	-	74,5
Milho Moído	16,3	-	21,5
Farelo de Soja	8,9	25,5	3,3
Minerais e Vitaminas	0,7	0,7	0,7

<sup>1</sup>Minerais e Vitaminas: 150 g de Ca; 90 g de P; 17,78 g de Mg; 15,4 g de S; 114 g de Na; 1.500 mg de Mn; 4.000 mg de Zn; 1.200 mg de Cu; 145 mg de Co; 90 mg de I; 38 mg de Se; 900 mg de F; 200.000 UI de Vit A; 50.000 UI de Vit D e 1500 mg de Vit E por kg de mistura.

Tabela 2. Composição das dietas experimentais, em nutrientes

Nutriente	Dietas		
	Silagem de Milho	Cana-de-açúcar	Feno de Tifton
	% Matéria Seca		
Proteína bruta	13,9	13,5	13,8
Fibra em detergente neutro	51,3	50,8	61,8
Cinzas	5,2	5,4	6,4
Extrato etéreo	2,7	1,1	2,3
Carboidratos não-fibrosos	26,9	29,2	15,7
Nutrientes digestíveis totais	70,6	68,3	68,0
	% Matéria Natural		
Matéria seca	31,5	37,1	89,4

### **4.2.3 Consumo**

A dieta fornecida bem como as sobras de cada animal foram registradas diariamente. O consumo diário de matéria seca (CMS) foi calculado multiplicando-se o consumo diário de matéria natural de cada alimento, entre os dias 14 e 19 de cada período, por seu respectivo teor de matéria seca, seguido de subtração da sobra de matéria seca.

A ingestão diária de nutrientes por animal foi calculada multiplicando o oferecido de matéria seca de cada ingrediente por seu respectivo teor nutritivo. Do total de nutrientes oferecidos foi subtraída a sobra diária do mesmo nutriente de cada animal.

Durante o período de coleta, amostras dos volumosos, concentrados e das sobras de cada animal foram coletadas diariamente, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a -20°C. Ao final de cada período foram feitas amostras compostas para cada alimento e para as sobras, a partir da mistura de quantidades idênticas de matéria natural. No caso das sobras, foram feitas amostras compostas para cada novilha, por período.

### **4.2.4 Fluxo Omasal e Coleta de Digesta Ruminal para Isolamento**

Para quantificação do fluxo omasal, o indicador externo LIPE<sup>®</sup> foi fornecido na forma de cápsulas, na dose de 500 mg por novilha diariamente, com dois dias para adaptação acrescido do fornecimento durante todo o período de coleta. Para a coleta de amostras de digesta omasal, foi utilizado um conjunto de dispositivos composto de kitassato, tubo coletor e bomba a vácuo, conforme técnica descrita por Leão (2002). As coletas de digesta omasal foram realizadas entre os dias 14 e 16 de cada período e obedeceram ao seguinte protocolo: no primeiro dia foram feitas antes do fornecimento da refeição matinal (0 hora) e 6 horas após; no segundo dia, 2 e 8 horas após e no terceiro dia, 4 e 10 horas após. As amostras de digestas omasal foram congeladas a -20°C logo após a coleta até serem processadas. Foram feitas amostras compostas por animal e período experimental. As amostras de digesta omasal foram pré-secadas em estufa de ventilação forçada, a 55°C por 96 horas, processadas em moinho com peneira de malha de 1 mm. Para estimativa do fluxo de digesta omasal, foi utilizado como indicador o LIPE<sup>®</sup>. A análise do indicador LIPE<sup>®</sup> foi realizada em espectrofotômetro com detector de luz no espectro do infravermelho (FTIV) (Saliba et al., 2005). Os fluxos de matéria seca e demais nutrientes nas amostras de digesta omasal foram estimados conforme equação de France & Siddons (1986) para indicadores externos:

$$\text{Fluxo Omasal} = \frac{\text{Dose do indicador (mg/dia)}}{\text{Concentração do indicador (mg/g digesta)}}$$

No dia 19 de cada período, foi realizada a coleta de digesta ruminal, 4 horas após a alimentação, para isolamento de bactérias conforme técnica descrita por Cecava et al. (1990). Para tanto, o conteúdo ruminal foi centrifugado a  $170 \times g$  durante 5 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$  para separação de sólidos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi submetido a uma segunda centrifugação a  $17.000 \times g$  durante 15 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$  para precipitação das bactérias. Logo após, o sobrenadante foi eliminado e as bactérias ressuspensas com NaCl 1 M. Foi realizada então nova centrifugação a  $17.000 \times g$  durante 15 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$ . O precipitado foi recolhido com espátula e lavado com acetona. Finalmente, esse precipitado foi levado à estufa e submetido à secagem em temperatura de  $45^{\circ}\text{C}$ , sendo posteriormente passado em gral com pistilo, a fim de deixar o material sob forma de pó.

O fluxo de nitrogênio microbiano (N mic) na digesta omasal foi obtido a partir da relação entre a quantidade de DAPA na digesta omasal e a relação DAPA:N nos microrganismos isolados. A eficiência microbiana foi expressa de diferentes maneiras: g N microbiano/kg de matéria orgânica degradada no rúmen (g Nmic/kg MODR), g N microbiano/kg de carboidratos degradados no rúmen (g Nmic/kg CTDR) e g PB microbiana/kg NDT ingerido (g PBmic/kg NDT).

#### **4.2.5 Preparo das amostras para análise de DAPA**

##### **4.2.5.1 Modelo, Especificações do Equipamento e Condições Analíticas**

A separação e quantificação do ácido 2,6-diaminopimélico foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) Shimadzu modelo LC-10AD (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), equipado com coluna de troca iônica e detector de fluorescência. Especificações do equipamento: módulo de comunicação CBM - 10A, bombas LC-10AD, injetor: SIL-10A, forno: CTO-10A e detector: RF-535.

A análise de DAPA nas amostras de péletes bacterianos e digesta omasal foram feitas utilizando sistema de cromatografia por troca iônica com derivatização pós-coluna com *o*-ftaladeído (OPA) e detecção fluorimétrica. Utilizou-se um padrão contendo  $5,0 \mu\text{g/L}$  de DL-2,6-Diaminopimélico (Fluka AG, Buchs SG, Suíça) em tampão citrato de sódio pH 2,2. O software *CLASS-LC10 - LC Workstation* permitiu o acesso aos cromatogramas obtidos após as análises do padrão e das amostras e também a

determinação das áreas dos picos relativos ao DAPA. A concentração final de DAPA nas amostras foi obtida através de uma relação simples entre a área do padrão e a área da amostra conforme a seguinte expressão:

$$\text{Concentração da amostra} = \frac{\text{Concentração do padrão} \times \text{Área da amostra}}{\text{Área do padrão}}$$

As condições analíticas no sistema foram: Coluna Shim-pack Amino-Na (4,6 x 100 mm), Trap Shim-pack ISC-30/S0504 Na, fases móveis A - Tampão citrato pH 3,2, B - Tampão citrato pH 10 e C - NaOH (0,2 N), eluição gradiente vazão 0,4 mL/min, temperatura 60 °C e detecção RF-20Axs Ex. 350 nm, em 450 nm.

#### **4.2.5.2 Hidrólise e Preparo dos Hidrolisados**

Para o procedimento de hidrólise, foram pesados 20 mg de proteína bruta das amostras de bactéria e digesta omasal em tubos de ensaio de 30 mL com tampa de rosca. Em seguida, foram adicionados 10 mL de HCl 6 N às amostras e os tubos foram então vedados e levados à estufa, onde permaneceram por período de 22 horas à temperatura de  $110 \pm 5^\circ\text{C}$  (Bernardi, 2000). Após esse período, as amostras foram retiradas da estufa e deixadas à temperatura ambiente até o esfriamento. Posteriormente, foram filtradas em papel de filtro qualitativo e submetidas à evaporação. Após esse procedimento, foram então ressuspensas em tampão citrato com pH 2,2 em balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume. Pipetou-se 1 mL dessa amostra em tubo de ensaio graduado, adicionou-se tampão citrato até altura suficiente para mergulhar o eletrodo do potenciômetro e ajustou-se o pH da amostra para 2,2, utilizando-se para tanto, soluções de NaOH 4 N e HCl 0,1 N. Após esse ajuste a amostra foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume deste. Finalmente, a amostra foi submetida à microfiltração com o auxílio de filtros tipo millex 25 mm HV 0,45  $\mu\text{m}$  e, posteriormente, transferida para os *vials* utilizados no injetor automático do cromatógrafo líquido.

#### **4.2.6 Análises Químicas**

As análises das amostras de alimentos, sobras e digesta omasal sofreram pré-secagem à  $55^\circ\text{C}$ , posteriormente foram moídas em moinho tipo Thomas-Willey com peneira de malha de 1 mm e armazenadas em recipientes plásticos. As análises dos teores

de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) foram realizadas conforme recomendações da Association of Official Analytical Chemist (AOAC, 1995). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) foram determinados segundo Van Soest et al. (1991).

As porcentagens de carboidratos não-fibrosos (CNF) e totais (CT) foram obtidas pelas equações propostas por Sniffen et al. (1992):  $CNF = 100 - (\%FDN + \%PB + \%EE + \%cinzas)$  e  $CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%Cinzas)$ . O teor de nutrientes digestíveis totais (NDT) das dietas foi calculado segundo equação descrita pelo NRC (2001), em que  $NDT = \%PB \text{ digestível} + \%FDN \text{ digestível} + \%CNF \text{ digestível} + 2,25 * \%EE \text{ digestível}$ .

Quanto às amostras de péletes bacterianos, além do ácido 2,6-diaminopimélico, foram feitas análises de MS e PB, segundo os procedimentos descritos anteriormente.

#### **4.2.7 Delineamento Experimental e Análises Estatísticas**

Para o estudo dos fluxos de compostos nitrogenados e das eficiências microbianas por meio do ácido 2,6-diaminopimélico (DAPA), foi utilizado delineamento experimental em quadrado latino 3 x 3 duplo simultâneo, de acordo com o seguinte modelo:  $Y_{ijkl} = \mu + Q_i + D_j + P_k + N(i)l + e_{ijkl}$ , em que:  $\mu$  = média geral;  $Q_i$  = efeito do quadrado latino i;  $D_j$  = efeito da dieta j;  $P_k$  = efeito do período k;  $N(i)l$  = efeito de novilha l, aninhado ao quadrado latino i;  $e_{ijkl}$  = erro experimental independente e com distribuição normal, com média zero e variância  $\sigma^2$ . Adotou-se o LIPE<sup>®</sup> como indicador do fluxo de digesta, pelos bons resultados relatados no Capítulo 3.

Para efeito de análise estatística, todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e às médias das dietas comparadas pelo teste de SNK a 5% de probabilidade, por meio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

#### **4.3 Resultados e Discussão**

Na Tabela 3 encontra-se a composição das bactérias isoladas do rúmen. Observar-se que os teores de DAPA são bastante próximos para os diferentes volumosos. O percentual médio geral de 0,25% de DAPA na MS das bactérias e de 44,61 para a relação DAPA:N, encontra-se dentro dos limites de 0,14 e 0,44% citados por Clark et al. (1992), e bem próximos da média de 0,31% citada pelos mesmos autores. Em experimento avaliando

diferentes técnicas para quantificação da síntese microbiana em diferentes raças bovinas Valadares Filho et al. (1990), também relataram valor médio de 0,3% de DAPA na MS, além de relação DAPA:N na bactéria ruminal de 49 mg de DAPA/g de N e de valores de N microbiano muito semelhantes aos aqui relatados. Para Clark et al. (1992), a origem e a quantidade de proteína bruta da dieta, além da relação V:C na dieta alteram significativamente essa relação. De acordo com Craig et al. (1987b) e Cecava et al. (1990), essa relação varia no período pós-alimentação em dietas ricas em concentrado. No entanto, não variam quando são utilizadas dietas com alta proporção volumosa (Dufva et al., 1982; Olubobokun et al., 1988), fato observado no presente estudo.

Tabela 3. Composição química das bactérias isoladas do rúmen de novilhas em função de das dietas experimentais

Item	Dietas		
	Silagem de Milho	Cana-de-açúcar	Feno de Tifton
Matéria seca (%)	85,63	80,60	83,97
N microbiano (% MS)	6,01	5,55	5,97
DAPA (% MS)	0,26	0,26	0,24
DAPA (mg/g MS)	2,57	2,56	2,39
DAPA:N (mg/g N mic)	47,15	46,23	40,45

Os teores de nitrogênio microbiano de 6,01, 5,55 e 5,97% para silagem de milho, cana-de-açúcar e feno de tifton, respectivamente, enquadram-se dentro do limite de 4,83 a 10,58% relatados por Clark et al. (1992) a partir da compilação de dados da literatura. Outra compilação feita por Valadares Filho (1995) com resultados de trabalhos realizados no Brasil, mostrou variações de 81,1 a 95,7% para o teor de matéria seca e de 5,2 a 8,7% para compostos nitrogenados totais, limites estes que também enquadram os valores obtidos neste estudo, principalmente pelo fato de se tratar de valores obtidos em condições tropicais. De maneira mais específica, Valadares Filho et al. (1990) encontraram valores de 5,48 a 6,5% em novilhos de diferentes grupos genéticos alimentados com dietas formuladas com silagem de milho. Em outro trabalho, Silva (2007) avaliando dietas com feno de tifton e diferentes fontes protéicas para bovinos relataram valores médios variando de 5,14 a 5,55%. Em trabalho ainda mais recente, Menezes et al. (2011) citaram valores de N microbiano de 6,06 e 6,41 para silagem de milho e cana-de-açúcar, respectivamente. No entanto, esta composição pode ser alterada em face das condições limitantes do meio

(Nocek & Russell, 1988). Esses autores sugeriram que as estimativas do rendimento microbiano fossem expressas com base no teor de N bacteriano, em vez do peso seco de células. Para Clark et al. (1992), as variações na composição das bactérias podem ser atribuídas às diferentes técnicas utilizadas para isolar e determinar a composição das mesmas e às próprias variações em sua composição.

Na Tabela 4, estão expressos os fluxos de compostos nitrogenados e a degradabilidade da proteína da dieta.

Tabela 4. Fluxo omasal de compostos nitrogenados (g/dia) e degradabilidade da proteína das dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de tifton (FT)

Parâmetro	Dietas			EPM <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>
	SM	CA	FT		
	Fluxos				
Nitrogênio total					
g/dia	139,24	128,21	114,71	7,72	0,14
% Ingerido	64,28	46,47	53,97	4,81	0,08
NNA <sup>3</sup>					
g/dia	138,46	127,22	113,98	7,71	0,14
% Ingerido	63,92	46,11	53,65	4,79	0,08
N microbiano					
g/dia	87,20	99,78	75,66	8,24	0,17
% NNA	65,24	80,40	65,36	6,92	0,26
% N Total	64,88	79,73	64,95	6,88	0,27
	Degradabilidade da Proteína				
PDR <sup>4</sup> (%)	74,45	90,25	82,74	5,67	0,20
PNDR <sup>5</sup> (%)	25,55	9,75	17,26	5,66	0,20

EPM<sup>1</sup> = Erro padrão da média; P<sup>2</sup> = Valor de probabilidade para o efeito de dieta; NNA<sup>3</sup> = Nitrogênio não-amoniaco; PDR<sup>4</sup> = proteína degradável no rúmen; PNDR<sup>5</sup> = Proteína não-degradável no rúmen

Os fluxos de nitrogênio microbiano (N mic) não variaram entre os tratamentos (P=0,17), apresentando valor médio de 87,54 g/dia. O fluxo de N bacteriano representou, em média, 70,33% do fluxo de NNA omasal e 69,85% do N total nos diversos tratamentos. Não foi observado também efeito quanto à degradabilidade das dietas. Segundo Owens et al. (1986), a produção de N microbiano, geralmente, aumenta com a elevação do consumo de MS, fato numericamente observado nesse estudo. Segundo o NRC (2001), há evidências de que aminoácidos e, especialmente, peptídeos estimulam a produção de

microrganismos que crescem em fontes energéticas rapidamente degradáveis, justificativa que se adequa ao presente estudo. Entretanto, quando os substratos energéticos são fermentados lentamente como é o caso do feno, esta estimulação não ocorre. O valor médio de 70,33% de N microbiano em relação ao nitrogênio não-amoniacal (NNA) no omaso mostrou-se próximo dos valores 75,57, 73,6 e 73,25 % relatados por Rode et al. (1985), Klusmeyer et al. (1990) e Berchielli et al. (1995b), respectivamente. Vários fatores podem influenciar o fluxo de proteína microbiana, destacando-se dentre eles, o teor e a solubilidade da proteína da dieta, as fontes de N de origem endógena, a quantidade de matéria orgânica digestível da dieta, o tratamento ao qual a proteína dietética foi submetida, bem como a absorção de N pelo rúmen, sobretudo na forma amoniacal (Hoover & Stokes, 1991).

Martins et al. (2006) em estudo comparativo entre silagem de milho e feno de tifton verificaram diferenças nos parâmetros avaliados. Os teores de MODR, assim como os fluxos de N total, N microbiano e NNA foram superiores nas dietas contendo silagem de milho em comparação àquelas contendo feno de tifton. No presente trabalho, houve apenas uma tendência de superioridade, da dieta de silagem quanto aos fluxos de N total ( $P=0,08$ ) e NNA ( $P=0,08$ ), porém quanto ao N microbiano nenhuma diferença foi observada ( $P=0,17$ ). Estes resultados podem ser explicados pelas diferenças na composição química (Tabela 2) das dietas, visto que a dieta de silagem de milho apresenta menor teor de FDN, além de maior teor de carboidratos não-fibrosos. Portanto, estes fatores podem ter contribuído para o aumento dos referidos fluxos para o omaso. De acordo com Clark et al. (1992), o fluxo de N microbiano para o intestino delgado resulta, em parte, do maior teor de energia proveniente da matéria orgânica fermentada no rúmen.

Quanto aos fluxos de N microbiano em função do NNA e do N total (Tabela 4), resultados semelhantes foram relatados por Berchielli et al. (1995b), ao estudarem dietas com diferentes relações V:C e, dentre elas a relação 80:20, semelhante à utilizada neste trabalho (75:25). Para Clark et al. (1992), pode ocorrer diminuição no fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado, quando se utilizam dietas com elevada proporção volumosa, o que pode ser atribuído à deficiência de energia prontamente disponível e ao aumento da reciclagem de compostos nitrogenados pelos microrganismos do rúmen. O fluxo duodenal de N microbiano das dietas contendo feno apresentou valor médio de 75,66 g/dia, inferior ao obtido por Guimarães et al. (2001), de 100,6 g/dia, em estudo de dieta

com relação V:C de 70:30, composta de feno de tifton e resíduo de mandioca. Esta diferença pode estar relacionada à fonte de amido da dieta. Segundo Zeoula et al. (2002), o fluxo de N microbiano pode aumentar quando o milho é substituído por fonte de amido mais degradável no rúmen, como a mandioca. Considerando o fluxo de N total (% N ingerido), a dieta de silagem de milho apresentou melhor resposta ( $P=0,08$ ) com 64,28% N total consumido alcançando o omaso. Para as dietas à base de cana e feno esses percentuais foram de apenas 46,47 e 53,97%, permitindo inferir que essas dietas proporcionaram maiores efluxos de N do rúmen. Esses resultados podem ser explicados pela falta de sincronização na degradação ruminal da proteína e dos carboidratos. No caso do feno, a fração fibrosa representa a principal fonte de energia no rúmen e a mesma apresenta lenta degradação. Para a dieta de cana, a falta de sincronia talvez justifique-se pela ausência de nitrogênio não-protéico, fonte esta importante quando se utiliza este volumoso na dieta, porém não utilizada neste trabalho em função da busca de padronização quanto à fonte protéica utilizada nos diferentes tratamentos.

As quantidades de MODR e CTDR não sofreram influência das fontes volumosas, obtendo-se valores médios gerais de 6,09 e 5,21 kg/dia, respectivamente (Tabela 5). Berchielli et al. (1995) também não verificaram efeito dos tratamentos sobre a quantidade de MODR e CTDR. Não se observou também efeito das dietas experimentais sobre a eficiência microbiana, quando a mesma foi expressa em g N mic/kg MODR, g N/kg CTDR e g PB mic/kg NDT, cujos valores médios gerais foram 16,51; 18,83; e 80,70, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Matéria orgânica e carboidratos totais degradados no rúmen (MODR e CTDR) e eficiência de síntese microbiana em novilhas recebendo dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de tifton (FT)

Parâmetro	Dietas			EPM <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>
	SM	CA	FT		
MODR (kg)	6,67	6,01	5,58	0,51	0,37
CTDR (kg)	5,90	4,90	4,85	0,44	0,23
g N mic/kg MODR	13,62	17,35	18,55	4,43	0,72
g N mic/kg CTDR	15,22	21,36	19,92	4,37	0,60
g PB mic/kg NDT	72,25	90,32	79,49	12,78	0,62

EPM<sup>1</sup> = Erro padrão da média

P<sup>2</sup> = Valor de probabilidade para o efeito de dieta

No sistema CNCPS (Fox et al., 2004), o rendimento microbiano é estimado em 40 g de células por kg de carboidratos totais degradados no rúmen, valor este obtido a partir dos requisitos de manutenção dos microrganismos e das respectivas taxas de crescimento (Russell et al., 1992). Estes valores apresentam satisfatória acurácia para elevados fluxos de matéria seca omasal, que são decorrentes de planos de nutrição superiores aos do presente estudo. Quando se trata de baixos níveis de consumo, são preditos valores superestimados para o fluxo de N microbiano. Os valores médios encontrados para eficiência de síntese microbiana em g PB mic/kg NDT foram inferiores ao recomendado pelo NRC (2001), de 130 g PB mic/kg NDT, independente da dieta. Para Clark et al., (1992), Dewhurst et al. (2000) e NRC (2001), as disponibilidades ruminais de energia e N são os fatores que mais limitam o crescimento microbiano. De acordo com esses autores, para potencializar a fermentação e a síntese de proteína microbiana no rúmen, é necessária a sincronização da disponibilidade da energia fermentável e do N degradável no rúmen.

As dietas avaliadas não diferiram quanto às eficiências de síntese de proteína quando expressas em g N mic/kg MODR ( $P=0,72$ ), g N mic/kg CTDR ( $P=0,60$ ) e g PB mic/kg NDT ( $P=0,62$ ). Os valores estimados de eficiência de síntese microbiana expressos em relação à MODR e CTDR para a dieta de cana foram similares aos valores relatados por Silveira et al. (2009), que avaliou a influência do N degradável no rúmen em dietas com cana-de-açúcar para novilhos. Os rendimentos para a dieta de feno foram, no entanto, superiores aos obtidos por Silva et al. (2007), que trabalhou com feno de tifton suplementado com farelo de soja, dentre as diferentes fontes nitrogenadas avaliadas, porém inferiores aos resultados relatados por Berchielli et al. (1995a) ao avaliar diferentes indicadores, dentre eles o DAPA e diferentes relações V:C, Cabral et al. (2008) ao avaliar diferentes volumosos. Esse mesmo autor, quando utilizou a silagem de milho relatou eficiências levemente superiores aos resultados obtidos neste trabalho.

Levando em consideração a disponibilidade ruminal de energia e nitrogênio como fatores determinantes do crescimento microbiano, elevadas proporções volumosas como a utilizada neste trabalho (75:25), podem conduzir à redução da disponibilidade de energia e aumento da reciclagem de compostos nitrogenados pelos microrganismos do rúmen. Dessa forma, a diminuição da passagem de proteína microbiana para o intestino delgado, pode ter contribuído para os menores valores de eficiência de síntese de proteína microbiana neste experimento. Portanto, a alta relação V:C da dieta utilizada neste trabalho pode ter

influenciado o crescimento microbiano, limitando-o. Além disso, a semelhança na relação V:C (75:25) para todas as dietas experimentais pode ter refletido na ausência de efeito significativo na produção e eficiência microbiana entre os diferentes volumosos utilizados neste trabalho. Para Clark et al. (1992), taxas mais rápidas de crescimento microbiano são atribuídas à maior disponibilidade de nutrientes, associadas à passagem mais rápida de microrganismos para o abomaso, levando à redução dos requisitos de manutenção da microbiota ruminal e, conseqüente, aumento da eficiência microbiana.

Uma crítica importante acerca dos trabalhos que abordam síntese de proteína microbiana diz respeito aos cálculos dos fluxos de compostos microbianos levando em consideração o percentual de nitrogênio em relação à matéria orgânica, em substituição à matéria seca. Obviamente, eventuais contaminações das bactérias com solução salina durante os procedimentos de isolamento podem ocorrer e, quando isso acontece normalmente utiliza-se o teor de N em relação à matéria orgânica. Portanto, ressalta-se, a necessidade de padronização quanto a estes cálculos, uma vez que, quando baseados na matéria seca fornecem resultados significativamente diferentes tanto para os fluxos de compostos nitrogenados como para as eficiências microbianas em relação àquelas obtidas a partir da matéria orgânica. A consequência disto é a difícil comparação entre resultados de diferentes pesquisas.

#### **4.4 Conclusões**

Os fluxos de compostos nitrogenados, assim como a eficiência de síntese protéica microbiana mostraram-se semelhantes entre as dietas avaliadas.

#### **4.5 Referências Bibliográficas**

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Official Methods of Analysis. 16<sup>a</sup> ed. AOAC, Washington, DC. 1995.

BERCHIELLI, T. T.; RODRIGUEZ, N. M.; ANDRADE, P. et al. Eficiência de síntese de proteína microbiana estimada por diferentes marcadores microbianos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 24, n. 5, p. 800-809, 1995a.

BERCHIELLI, T. T., RODRIGUEZ, N. M., GONÇALVES, L. C. et al. Fluxo de nitrogênio duodenal e degradabilidade ruminal do nitrogênio da dieta estimado por meio de

três marcadores microbianos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 24, n.5, p. 810-819, 1995b.

BERNARDI, C. A. *Preparo de hidrolisados protéicos e análise de aminoácidos por duas metodologias*. Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. 131p. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

BRODERICK, G. A.; MERCHEN, N. R. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n. 9, p. 2618-2632, 1992.

CABRAL, L. S.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E.; ZERVOUDAKIS, J. T.; SOUZA, A. L.; VELOSO, R. G. Eficiência microbiana e parâmetros ruminais em bovinos alimentados com dietas à base de volumosos tropicais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, n. 5, p. 919-925, 2008.

CECAVA, M. J.; MERCHEN, N. R.; GAY, L. C.; BERGER, L. L. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 2480-2488, 1990.

CLARK, J. H.; KLUSMEYER, T. H.; CAMERON, M. R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.75, p. 2304-2323, 1992.

CRAIG, W. M.; BROWN, D. R.; BRODERICK, G. A.; RICKER, D. B. Post-prandial composition changes of fluid and particle-associated ruminal microorganisms. *Journal of Animal Science*, v. 65, p. 1042-1048, 1987b.

DEWHURST, R. J.; DAVIES, D. R.; MERRY, R. J. Microbial protein supply from the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, v. 85, p. 1-21, 2000.

DUFVA, G. S.; BARTLEY, E. E.; ARAMBEL, M. J. et al. Diaminopimelic acid content of feeds and rumen bacteria and its usefulness as a rumen bacterial marker. *Journal of Dairy Science*, v. 65, p. 1754-1759, 1982.

FERREIRA, D. F. *Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0*. In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, p. 255-258, Julho, 2000.

FOX, D. G.; TEDESCHI, L. O.; TYLUTKI, T. P. et al. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. *Animal Feed Science and Technology*, v. 112, n. 1/4, p. 29-78, 2004.

FRANCE, J.; SIDDON, R.C. Determination of digesta flow by continuous marker infusion. *Journal of Theoretical Biology*, v. 121, n. 2, p. 105-119, 1986.

GUIMARÃES, K. C.; BRANCO, A. F.; ALCALDE, C. C. et al. Efeito do período experimental sobre a fermentação e eficiência de síntese microbiana em bovinos

alimentados com dois níveis de volumosos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.30, p.880-887, 2001.

HOOVER, W. H.; STOKES, S. R. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *Journal of Dairy Science*, v. 74, n. 10, p. 3630-3644, 1991.

KLUSMEYER, T. H.; McCARTHY, R.D.; CLARK, J.H. Effects of source and amount of protein on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, v.73, n.12, p. 3526-3537, 1990.

LEÃO, M. I. *Metodologias de coletas de digestas omasal e abomasal em novilhos submetidos a três níveis de ingestão: consumo, digestibilidade e produção microbiana*. Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. 57p. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LING, J. R. Digestion of bacterial cells in the rumen. In: HOSHINO, S., ONODERA, R., MINATO, H., ITABASHI, H. (Ed.). *The rumen ecosystem*. The microbial metabolism and its regulation. Springer-Verlag, New York, p. 83, 1990.

MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T.; PRADO, I. N.; GARCIA, J. A. S. Eficiência de síntese microbiana e atividade enzimática em bovinos submetidos à suplementação com enzimas fibrolíticas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 35, n. 3, suppl.0, 2006.

MENEZES, G. C. C., VALADARES FILHO, S. C.; MAGALHÃES, F. A.; Valadares R. F. D.; MARIZ, L. D.; DETMANN, E.; PEREIRA, O. G.; LEÃO, M. I. Total and partial digestibility, rates of digestion obtained with rumen evacuation and microbial protein synthesis in bovines fed fresh or ensiled sugar cane and corn silage. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 40, n. 5, p. 1104-1113, 2011.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 381p., 2001.

NOCEK, J. E.; RUSSELL, J. B. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *Journal of Dairy Science*, v. 71, n. 8, p. 2070-2107, 1988.

OLUBOBOKUN, J. A.; CRAIG, W. M.; NIPPER, W. A. Characteristics of protozoal and bacterial fractions from microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *Journal of Animal Science*, v. 66, p. 2701-2710, 1988.

OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. Digesta passage and microbial protein synthesis. In: MILLIGAN, L. P; GROVUM W. L.; DOBSON, A. *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*, Ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1986; p. 196.

RODE, L. M.; WEAKLEY, D. C.; SATTER, L. D. Effect of forage amount and particle size in diets of lactating dairy cows on site of digestion and microbial synthesis. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 65, n. 1, p. 101-111, 1985.

RUSSELL, J. B.; O'CONNOR, J. D.; FOX, D. G. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluation cattle diets: ruminal fermentation. *Journal of Animal Science*, v.70, n.12, p.3551-3581, 1992.

SALIBA, E.O.S.; NANJARO, A.; FERREIRA, W.M. et al. Avaliação da lignina de madeira moída do Pinus e da lignina purificada e enriquecida do *Eucalyptus grandis* (LIPE®), como indicadores externos em experimentos de digestibilidade aparente para coelhos em crescimento. In: TELECOFERÊNCIA SOBRE INDICADORES EM NUTRIÇÃO ANIMAL, 1., 2005, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Escola de Veterinária/UFMG, 2005. p. 23-25.

SILVA, E. A.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. et al. Teores de proteína bruta para bovinos alimentados com feno de capim-tifton 85: parâmetros ruminais, eficiência de síntese microbiana e degradabilidade "in situ". *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 1, p. 225-237, 2007.

SILVEIRA, R. N.; BERCHIELLI, T. T.; CANESIN, R. C.; MESSANA, J. D.; FERNANDES, J. J. R.; PIRES, A. V. Influência do nitrogênio degradável no rúmen sobre a degradabilidade *in situ*, os parâmetros ruminais e a eficiência de síntese microbiana em novilhos alimentados com cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, n. 3, p. 570-579, 2009.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; Van SOEST, P. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluation cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, 1992.

SYNGE, R. L. M. Note on the occurrence of diaminopimelic acid in some intestinal microorganisms from farm animals. *J. Gen. Microbiol.*, v. 9, p. 407, 1953.

STORM, E.; ORSKOV, E. R. The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants. 1. Large scale isolation and chemical composition of rumen micro-organisms. *British Journal of Nutrition*, v. 50, p. 463, 1983.

VALADARES FILHO, S. C.; SILVA, J. F. C.; LEÃO, M. I. et al. Eficiência de síntese microbiana em novilhos holandeses, nelores e búfalos mestiços. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v. 19, n. 5, 424-430, 1990.

VALADARES FILHO, S. C. Eficiência de síntese de proteína microbiana, degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína bruta em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE RUMINANTES, 1995, Viçosa, MG. *Anais...* Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 355-388, 1995.

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

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

WORK, I. A new naturally occurring aminoacid. *Nature*, v. 165, n. 4185, p. 74-75, 1950.

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, p. 1865-1874, 2002.

ZINN, R. A.; OWENS, F. N. Influence of feed intake level on site of digestion in steers fed a high concentrate diet. *Journal of Animal Science*, v. 56, n. 2, p. 471-475, 1983.

## **Capítulo 5 – Estudo da Cinética de Passagem por Diferentes Técnicas, em Novilhas Recebendo Diferentes Fontes Volumosas**

### **5.1 Introdução**

Para os ruminantes a fibra representa uma fração significativa, senão o principal componente, na dieta desses animais, portanto, a produtividade é limitada pela habilidade em consumir e digerir a fração fibrosa da dieta. A fermentação da fibra ocorre em um complexo ecossistema que é influenciado por uma dinâmica interação entre dieta, população microbiana e animal.

A utilização do material fibroso vegetal é possível em virtude do longo tempo de retenção das partículas alimentares no rúmen. Os resíduos alimentares podem desaparecer do rúmen por digestão ou passagem e a partir daí ocorre mais ingestão. Portanto, limitações físicas podem restringir o consumo. A fibra em detergente neutro (FDN) está diretamente relacionada aos efeitos de enchimento no rúmen. Aumentando-se a concentração de FDN na dieta, através do aumento da relação volumoso:concentrado, ocorre uma depressão no consumo (Llamas-Lamas & Combs, 1991; Dado & Allen, 1995). No Brasil, em virtude da grande extensão territorial e das condições tropicais favoráveis, a produção a pasto é predominante e, portanto, altos níveis de volumosos são frequentemente utilizados nas dietas. Dessa forma, os animais criados nesse tipo de sistema têm sua ingestão limitada em virtude do efeito de enchimento ruminal.

Sendo assim, o entendimento da dinâmica ruminal de passagem reveste-se de grande importância. No entanto, os dados de taxa de passagem disponíveis na literatura são mensurados por análise da excreção fecal de indicadores aplicados em forragens intactas e dose pulso. Embora esses dados possam ser úteis para avaliar diferenças relativas entre tratamentos, não permitem prever a digestibilidade das frações do alimento. Em modelos como o CNCPS (Fox, ) e o NRC (2001), a degradação protéica no rúmen, por exemplo, é predita usando taxas de degradação de frações protéicas individuais e taxas de passagem do alimento inteiro, derivadas a partir de experimentos usando indicadores externos mordantados. Isto é problemático em virtude da diferença na degradabilidade das frações e tamanho de partículas, fator este responsável por diferenças na taxa de passagem para as várias frações do alimento.

Portanto, os indicadores externos mordantados não podem ser usados para mensurar taxas de passagem das diferentes frações do alimento. O uso da mesma taxa de passagem para todas as frações do alimento subestimar a digestibilidade ruminal das frações solúveis e de pequenas partículas que tem taxas de passagem mais rápidas e superestimar a digestibilidade ruminal das grandes partículas que apresentam taxa de passagem mais lenta.

Diante desse contexto, o presente trabalho objetivou estudar a cinética de passagem comparando a técnica de indicadores, representada aqui pela fibra mordantada com cromo, e a técnica de esvaziamento ruminal.

## **5.2 Material e Métodos**

### **5.2.1 Localização Experimental, Animais e Instalações**

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Viçosa, no Campus de Florestal, em Florestal, Minas Gerais, e as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais (LABNUTRI/EV-UFMG). Foram utilizadas seis novilhas mestiças de Holandês-Zebu, fistuladas no rúmen, com 480 kg de peso vivo médio inicial e 24 meses de idade, mantidas em baias individuais do tipo “Tie Stall”, cobertas, equipadas com bebedouros individuais, e cochos para o fornecimento da dieta.

O experimento teve duração de 57 dias, divididos em três períodos de 19 dias. Os animais foram pesados, identificados e vermifugados no início do experimento e mantidos por 13 dias em período de adaptação à dieta experimental e às instalações.

### **5.2.2 Dietas**

Foram avaliados três tratamentos constituídos por diferentes volumosos nas dietas experimentais: silagem de milho (*Zea mays*, L.), feno de capim-tifton (*Cynodon spp.*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L). As dietas foram suplementadas com concentrado à base de milho moído, farelo de soja e premix mineral, sendo balanceadas para serem isonitrogenadas (14% PB), constituindo-se de volumoso e concentrado, na proporção 75:25, com base na matéria seca. As dietas foram formuladas para atender às exigências nutricionais dos animais do estudo, segundo recomendações do NRC (2001).

Os ingredientes dietéticos foram pesados e misturados manualmente duas vezes ao dia para fornecimento às 8:00 e às 16:00 horas na forma de dieta completa, sendo o consumo medido diariamente, permitindo-se 5 a 10% de sobras diárias.

A composição em ingredientes e químico-bromatológica das dietas experimentais é descrita nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais, em ingredientes

Ingredientes	Dietas		
	Silagem de Milho	Cana-de-açúcar	Feno de Tifton
	% Matéria Seca		
Silagem de Milho	74,1	-	-
Cana-de-açúcar	-	73,8	-
Feno de Tifton	-	-	74,5
Milho Moído	16,3	-	21,5
Farelo de Soja	8,9	25,5	3,3
Minerais e Vitaminas	0,7	0,7	0,7

<sup>1</sup>Minerais e Vitaminas: 150 g de Ca; 90 g de P; 17,78 g de Mg; 15,4 g de S; 114 g de Na; 1.500 mg de Mn; 4.000 mg de Zn; 1.200 mg de Cu; 145 mg de Co; 90 mg de I; 38 mg de Se; 900 mg de F; 200.000 UI de Vit A; 50.000 UI de Vit D e 1500 mg de Vit E por kg de mistura.

Tabela 2. Composição das dietas experimentais, em nutrientes

Nutriente	Dietas		
	Silagem de Milho	Cana-de-açúcar	Feno de Tifton
	% Matéria Seca		
Proteína bruta	13,9	13,5	13,8
Fibra em detergente neutro	51,3	50,8	61,8
Cinzas	5,2	5,4	6,4
Extrato etéreo	2,7	1,1	2,3
Carboidratos não-fibrosos	26,9	29,2	15,7
Nutrientes digestíveis totais	70,6	68,3	68,0
	% Matéria Natural		
Matéria seca	31,5	37,1	89,4

### 5.2.3 Consumo

A dieta fornecida bem como as sobras de cada animal foram registradas diariamente. O consumo diário de matéria seca (CMS) foi calculado multiplicando-se o

consumo diário de matéria natural de cada alimento, entre os dias 14 e 19 de cada período, por seu respectivo teor de matéria seca, seguido de subtração da sobra de matéria seca.

A ingestão diária de nutrientes por animal foi calculada multiplicando o oferecido de matéria seca de cada ingrediente por seu respectivo teor nutritivo. Do total de nutrientes oferecidos foi subtraída a sobra diária do mesmo nutriente de cada animal. O consumo de nutrientes digestíveis totais (NDT) das dietas foi calculado segundo equação descrita pelo NRC (2001), em que  $NDT = \%PB \text{ digestível} + \%FDN \text{ digestível} + \%CNF \text{ digestível} + 2,25 * \%EE \text{ digestível}$ .

Durante o período de coleta, amostras dos volumosos, concentrados e das sobras de cada animal foram coletadas diariamente, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a -20°C. Ao final de cada período foram feitas amostras compostas para cada alimento e para as sobras, a partir da mistura de quantidades idênticas de matéria natural. No caso das sobras, foram feitas amostras compostas para cada novilha, por período.

#### **5.2.4 Técnica de Indicadores**

Entre os dias 11 e 17 de cada período foram realizadas coletas de fezes diretamente no reto para avaliar a curva de excreção fecal e, conseqüentemente, a cinética de passagem de partículas. Entre os dias 17 e 18 foram realizadas as coletas de líquido ruminal para avaliação da cinética de passagem de fluidos. Para tanto, foram utilizados a fibra mordantada com cromo, para avaliar a taxa de passagem de partículas fibrosas e o complexo de Co-EDTA para fluidos.

O preparo destes indicadores foi feito conforme descrito por Udén et al. (1980). As doses utilizadas foram de 100 g de silagem de milho, cana-de-açúcar ou feno de tifton mordantados, que foram acondicionados em saco de papel de celulose, conforme cada tratamento e 15g de Co-EDTA, sendo fornecidos em dose única. As fibras mordantadas foram colocadas diretamente no rúmen dos animais, via fístula ruminal, imediatamente antes do fornecimento da refeição matinal do primeiro dia de coleta referente à cada avaliação. Procedimento semelhante foi adotado para o indicador de fase líquida, que foi previamente diluído em 300 mL de água e então infundido com auxílio de funil e sonda na porção ventral do rúmen.

As coletas de amostras de fezes para a curva de excreção fecal do cromo mordente, para avaliação da taxa de passagem de partículas foram feitas nos seguintes horários: 0, 6,

12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após fornecimento do indicador. Foram coletadas aproximadamente 200 g de fezes em cada horário, que foram acondicionadas em sacos plásticos identificados e imediatamente congeladas a -20°C. Posteriormente, as amostras fecais e as fibras mordantadas foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica com chama de acetileno, a fim de quantificar o teor de cromo, conforme metodologia descrita por Williams et al. (1962). Já as amostras de líquido ruminal para estimar a taxa de passagem de fase líquida foram coletadas nos horários de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 e 24 horas após a introdução dos indicadores na quantidade de aproximadamente 100 mL, sendo previamente filtradas em tecido de algodão.

No final de cada período, essas amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e secas em estufa com circulação forçada de ar, a 55°C, moídas em moinho tipo Willey, em peneira de 1 mm, e armazenadas em frascos de plástico identificados. O método de Williams et al. (1962) foi utilizado nas determinações de cromo das fezes, para estimativa da curva de excreção das fibras mordantadas, usando-se espectrofotometria de absorção atômica, com chama de acetileno.

Os parâmetros da cinética de fluxo da fase sólida no rúmen-retículo e no ceco-cólon proximal foram estimados pelo processo iterativo do algoritmo Marquardt, com auxílio do procedimento para modelos não-lineares (PROC NLIN) do programa estatístico SAS (2006), segundo os modelos descritos pelo modelo exponencial bicompartimental de Grovum & Williams (1973) de expressão geral:  $Y_{Cr} = A * e^{-K_1 * (t-TT)} - A * e^{-K_2 * (t-TT)}$  para  $t \geq TT$  e  $Y_{Cr} = 0$  para  $t < TT$ , em que  $Y_{Cr}$  = concentração do indicador nas fezes no tempo “t”;  $A$  = parâmetro de escala, indefinido do ponto de vista biológico;  $K_1$  = taxa de passagem de partículas no rúmen-retículo;  $t$  = tempo de amostragem,  $TT$  = tempo de trânsito no omaso e intestinos delgado e grosso ou ainda ao tempo em que o indicador apareceu pela primeira vez nas fezes; e  $K_2$  = taxa de passagem de partículas no ceco-cólon proximal. Para obtenção dos parâmetros de cinética de fase líquida, as curvas de concentração ruminal do cobalto foram ajustadas ao modelo exponencial unicompartimental de Hungate (1966), citado por Colucci (1984), de expressão geral:  $Y_{Co} = A * e^{-k * t}$  em que:  $Y_{Co}$  = concentração do indicador, no tempo “t”;  $A$  = concentração de equilíbrio do Co;  $k$  = taxa de passagem ou de diluição do Co (%/h); e  $t$  = tempo de amostragem, adotando-se procedimento semelhante ao exposto anteriormente para cinética de passagem de partículas.

Os parâmetros da dinâmica da fase líquida foram calculados conforme Colucci et al. (1990). O tempo de reciclagem ou retenção (h) no rúmen-retículo foi calculado como a recíproca da taxa de passagem da fase líquida no rúmen (k); O volume de fluido ruminal (L) foi estimado a partir da relação entre a quantidade de Co administrada (mg) e o valor de A (mg/L) estimado pelo modelo. A taxa de reciclagem (n<sup>o</sup> de vezes/dia) da fase líquida ruminal foi calculada conforme Maeng e Baldwin (1976) como 24/TRRR. A taxa de fluxo (L/h) foi calculada como o produto entre o volume de líquido ruminal (V) e taxa de passagem da fase líquida no rúmen (k). O tempo de reciclagem (h) foi calculado como a recíproca da taxa de passagem da fase líquida no rúmen (k).

### **5.2.5 Técnica do Esvaziamento**

No dia 19 de cada período de coleta foi feito o esvaziamento total do rúmen, quatro horas após o fornecimento da refeição da manhã, com intuito de se determinar as taxas de ingestão, passagem e digestão dos nutrientes de cada dieta, conforme modelo proposto por Robinson et al. (1987). Para estudo da cinética ruminal pela técnica de esvaziamento ruminal, toda a digesta ruminal foi retirada, pesada e, finalmente aferido o volume ruminal em procedimento totalmente manual. Em seguida, todo o conteúdo ruminal foi filtrado em tecido de algodão para separação das frações sólida e líquida, que foram pesadas separadamente, sendo posteriormente retiradas amostras de cada fase da digesta ruminal para para determinação dos teores de MS, MO, FDN, MOnFDN. Para determinação da fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), amostras de todos os volumosos, concentrados, sobras, digestas ruminal e omasal e fezes foram incubadas no rúmen de um animal durante 240 horas conforme sugerido por Casali et al. (2008), usando sacos TNT 100g/cm<sup>2</sup>. Após a amostragem, as diferentes fases foram novamente misturadas e devolvidas ao rúmen.

A taxa de ingestão (ki) foi calculada pela relação do consumo diário de matéria seca ou dos componentes pelo respectiva massa ruminal, e a taxa de passagem (kp) foi obtida pela relação entre os fluxos omasais de matéria seca ou dos nutrientes pelo conteúdo ruminal. Os fluxos omasais por sua vez, foram estimados utilizando-se como indicador a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi). As taxas de digestão (kd) foram obtidas pela diferença entre as taxas de ingestão e passagem.

Levando em consideração as bases conceituais do modelo proposto por Robinson et al (1987), propõe-se a obtenção de um parâmetro de extrema importância nos estudos de nutrição de ruminantes que é o tempo de retenção. Dessa forma, sugere-se que o mesmo seja obtido pelo inverso da taxa de passagem. Propõe-se ainda, a obtenção da taxa de passagem intestinal através da relação entre o consumo e o fluxo fecal de cada fração e, de outra forma, a obtenção do tempo de retenção intestinal por meio da recíproca da taxa de passagem do referido segmento. A última proposta desse estudo diz respeito ao tempo médio de retenção nos dois compartimentos, a ser obtido pela soma dos tempos de retenção nos dois compartimentos.

### **5.2.6 Análises Químicas**

As análises laboratoriais foram conduzidas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais (LABNUTRI/EV-UFMG). As amostras de alimentos, sobras, digesta omasal e ruminal e fezes sofreram pré-secagem à 55°C, posteriormente foram moídas em moinho tipo Thomas-Willey com peneira de 1 mm e armazenadas em recipientes plásticos para realização das análises químicas. Foram determinados os teores matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) segundo o AOAC (1995). As cinzas foram determinadas através da incineração das amostras em mufla a 600°C por oito horas. As análises de fibra em detergente neutro (FDN) foram realizadas conforme técnica descrita por Van Soest et al. (1991). As porcentagens de carboidratos não-fibrosos (CNF) e totais (CT) será obtida pelas equações propostas por Sniffen et al. (1992):  $CNF = (100 - \%FDN - \%PB - \%EE - \%Cinzas)$  e  $CT = 100 (\%PB + \%EE + \%Cinzas)$ .

### **5.2.7 Delineamento Experimental e Análises Estatísticas**

Para o ensaio de cinética de passagem foi utilizado um delineamento experimental em quadrado latino 3 x 3 duplo simultâneo, com 3 períodos e 3 tratamentos (silagem de milho, cana-de-açúcar e feno de tifton) para estudo das técnicas isoladamente.

Para a comparação de técnicas foi utilizado um delineamento experimental em quadrado latino 3 x 3 duplo simultâneo, em esquema de parcela subdividida, sendo a parcela constituída pelos volumosos (silagem de milho, cana-de-açúcar e feno de tifton), e a subparcela as técnicas (indicadores, esvaziamento ruminal).

Para efeito de análise estatística, todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, com às médias dos tratamentos comparadas pelo teste de SNK e as técnicas pelo teste “t” ao nível de 5% de probabilidade, através do programa SISVAR (Ferreira, 2000).

### **5.3 Resultados e Discussão**

Os resultados relativos à estimativa da taxa de passagem de fluidos, do tempo de retenção no rúmen, da taxa de reciclagem da fase líquida ruminal, do volume total e também em função do peso vivo são apresentados na Tabela 3. Como se pode observar, os parâmetros de cinética de passagem de fase líquida não variaram em função das dietas experimentais. Os valores estimados para a passagem de fluidos de 10,23, 8,95 e 8,39%/h para as dietas de silagem de milho, cana-de-açúcar e feno de tifton, respectivamente, foram próximos às médias de 10,80 e 10,18% para níveis de alto e baixo consumo apresentadas por Firkins et al. (1986). Outros resultados semelhantes foram citados por Berchielli et al. (1996), ao trabalhar com diferentes proporções volumosas em dietas para novilhos, obtendo valor médio de 8,33 e Carey et al. (1993) que obteve taxa de 10,1%/h. Owens & Goetsch (1988) relataram taxas de passagem de fluidos de 8,2% em dietas com proporção de concentrado na dieta variando entre 0 e 50%. Em trabalho com dietas à base de cana e silagem de milho e mesma proporção volumosa do presente trabalho, Dias (2009) evidenciou taxas de 6,74 e 8,62%, respectivamente, resultados estes inferiores aos normalmente relatados para dietas com alta relação V:C, inclusive no presente estudo. Evans (1981) e Goetsch & Galyean (1982) relataram que a taxa de passagem de fluidos foi maior em dietas com alta proporção de forragem. Ospina (1995) mencionou que, em geral, animais alimentados com volumosos apresentam maiores taxas de passagem da fase líquida que animais alimentados com concentrados, estando este fato aparentemente relacionado à maior produção salivar.

Tabela 3. Cinética de passagem de fase líquida no trato gastrointestinal de novilhas recebendo dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de Tifton (FT), mensurada com o indicador Co-EDTA

Parâmetros	Dietas			EPM <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>
	SM	CA	FT		
Taxa de Passagem (%/h)	10,23	8,95	8,39	1,19	0,55
Tempo de Retenção (h)	11,14	11,26	12,48	1,35	0,74
Taxa de Reciclagem (vezes/dia)	2,45	2,15	2,01	0,28	0,55
Volume (L)	101,15	94,60	101,08	9,07	0,84
Volume (% PV)	22,07	19,92	21,82	2,06	0,73
Taxa de Fluxo (L/h)	9,88	8,32	8,67	1,19	0,64

<sup>1</sup> EPM = Erro padrão da média

<sup>2</sup> Valor de probabilidade para o efeito de dieta

O valor médio estimado para a taxa de reciclagem da fase líquida ruminal de 2,21 vezes/dia, foi similar ao valor de 2,00 relatado por Berchielli et al. (1996) e aos resultados observados por Carey et al. (1993), ao avaliar dietas com feno para novilhos com diferentes fontes suplementares. Na metodologia utilizada, o Co-EDTA superestimou o volume de líquido ruminal, que foi, em média, 98,94 L, correspondendo a 21,27% do peso vivo das novilhas, situando-se portanto, dentro do limite de 15 a 21% relatado por Owens & Goetsch (1986). Entretanto, é importante ressaltar que, ao considerarmos as dietas isoladamente, verificamos que os volumes obtidos para as dietas de silagem de milho e feno de tifton, foram levemente superestimadas. Para Colucci et al. (1990), o volume de líquido ruminal é reduzido com o aumento na proporção de concentrado da dieta, portanto, pode-se inferir que em dietas com alta proporção de volumoso, os volumes tendem a ser mais altos. Quando o volume foi obtido pela técnica de esvaziamento os resultados foram inferiores, com média de 76,42 L, aos obtidos com o Co-EDTA e enquadraram-se dentro do limite supracitado, observando-se uma média 15,78% quando expresso em função do peso (Tabela 4), valor que corresponde ao menor percentual dentro da amplitude citada por Owens & Goetsch (1986). A diferença entre as duas técnicas pode ser bem evidenciada na Tabela 7, onde as mesmas são comparadas e a resposta obtida com a técnica de esvaziamento mostra-se significativamente diferente e com valor inferior. Levando em consideração a premissa de Owens & Goetsch (1986) que trata dos limites de capacidade ruminal em função do peso vivo e o volume obtido com a técnica de evacuação, pode-se inferir que o indicador Co-EDTA superestima o volume ruminal.

Na Tabela 4 são mostradas as taxas de ingestão, passagem e digestão da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria orgânica não-FDN (MOnFDN) e fibra em detergente neutro (FDN) para as diferentes dietas.

Tabela 4. Taxas de ingestão, passagem e digestão obtidos em novilhas recebendo dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de Tifton (FT) através da técnica de esvaziamento ruminal

Parâmetros	Dietas			EPM <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>
	SM	CA	FT		
Taxa de Ingestão (%/h)					
Matéria Seca	7,72	6,56	6,07	0,43	0,07
Matéria Orgânica	8,56	7,05	6,58	0,52	0,06
Matéria Orgânica não-FDN	17,30 <sup>a</sup>	17,65 <sup>a</sup>	10,32 <sup>b</sup>	0,84	<0,01
Fibra em Detergente Neutro	5,90	4,52	5,51	0,47	0,16
Taxa de Passagem (%/h)					
Matéria Seca	4,43 <sup>a</sup>	4,03 <sup>ab</sup>	3,48 <sup>b</sup>	0,23	0,05
Matéria Orgânica	3,82 <sup>a</sup>	3,37 <sup>ab</sup>	2,87 <sup>b</sup>	0,22	0,05
Matéria Orgânica não-FDN	7,19 <sup>a</sup>	6,93 <sup>a</sup>	5,34 <sup>b</sup>	0,37	0,02
Fibra em Detergente Neutro	2,78	2,44	2,17	0,26	0,30
Taxa de Digestão (%/h)					
Matéria Seca	3,28	2,53	2,59	0,44	0,45
Matéria Orgânica	4,73	3,68	3,70	0,48	0,27
Matéria Orgânica não-FDN	10,11 <sup>a</sup>	10,72 <sup>a</sup>	4,98 <sup>b</sup>	0,94	0,005
Fibra em Detergente Neutro	3,12	2,08	3,34	0,46	0,17

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de SNK com 5% de probabilidade

<sup>1</sup> EPM = Erro padrão da média

<sup>2</sup> Valor de probabilidade para o efeito de dieta

Avaliando as taxas de ingestão da MS, MO, MOnFDN e da FDN, observa-se que as mesmas não diferiram entre as dietas, com exceção da fração MOnFDN, cujos valores foram maiores para a silagem de milho e para a cana-de-açúcar, refletindo a riqueza em frações solúveis para estes volumosos. As taxas de passagem da MS e MO foram maiores para a silagem em comparação com o feno. Quanto à fração MOnFDN a menor taxa de passagem foi verificada para a dieta de feno de tifton. As dietas também não exerceram efeito sobre as taxas de digestão, à exceção da fração MOnFDN cujas respostas foram maiores para as dietas de silagem e cana, refletindo mais uma vez o grande percentual em frações solúveis, principalmente carboidratos não-fibrosos para essas dietas.

Em relação aos conteúdos ruminais total, líquido e das diferentes frações não foi verificada nenhuma diferença entre as dietas (Tabela 5). Quanto à fração FDN apesar da falta de poder estatístico ( $P=0,29$ ) para detectar diferença entre as dietas, pôde-se observar uma discreta diferença numérica entre elas, com maiores valores para as dietas de cana e feno. Teores elevados de FDN de forrageiras geralmente têm mostrado correlação negativa com consumo de matéria seca devido a menor taxa de passagem de partículas, o que pode proporcionar a distensão do rúmen e o enchimento físico (Forbes, 1995). É bem evidente a menor taxa de passagem para a fração FDN em relação às demais (Tabela 4), comprovando a teoria deste pesquisador.

Tabela 5. Digesta ruminal de novilhas recebendo dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de Tifton (FT)

Nutriente	Dietas			EPM <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>
	SM	CA	FT		
Volume Total (L)	74,33	78,17	76,75	2,37	0,54
Volume (%PV)	15,50	15,89	15,95	0,59	0,85
Conteúdo Ruminal (kg)					
Total	53,17	56,17	54,17	2,47	0,69
Líquido	47,10	49,63	47,70	2,08	0,68
Matéria Seca	5,90	6,55	6,61	0,39	0,41
Matéria Orgânica	5,08	5,76	5,73	0,38	0,39
Matéria Orgânica não-FDN	1,21	1,16	1,32	0,07	0,33
Fibra em Detergente Neutro	3,86	4,61	4,41	0,32	0,29

<sup>1</sup>EPM = Erro padrão da média

<sup>2</sup> Valor de probabilidade para o efeito de dieta

A capacidade de enchimento, por sua vez, depende do peso e volume da digesta, bem como da taxa de fluxo desta num dado segmento. O rúmen é geralmente relacionado a um local no trato gastrointestinal em que a distensão limita a ingestão em dietas de alto enchimento, como a do presente estudo, embora evidências sugiram que a distensão do abomaso pode também limitar o consumo. Dentro desse contexto, a fração FDN, por apresentar uma passagem mais lenta que outros constituintes dietéticos, tem um melhor efeito de enchimento ao longo do tempo que componentes não fibrosos do alimento e portanto, constitui o melhor preditor do consumo de matéria seca. De acordo com Allen (1996) os processos de degradação e trânsito devem ser avaliados de forma integrada, no sentido de que à medida que se amplia a velocidade de utilização dos compostos potencialmente degradáveis pelos microrganismos, reduz-se o tempo necessário para que a

partícula alcance a faixa de densidade específica capaz de habitá-la para passagem ao segmento posterior. Entretanto, muitos outros fatores afetam o enchimento, incluindo tamanho de partícula, frequência de mastigação, fragilidade da partícula, taxa de fermentação da FDN potencialmente digestível e características de contração reticular.

Quanto à cinética de passagem de partículas, não foram observadas diferenças na interação entre dietas e técnicas. Dessa forma, foram avaliados apenas os efeitos dieta e técnica isoladamente. As estimativas das taxas de passagem de partículas, para os diferentes volumosos, nos segmentos ruminal e intestinal, bem como seus respectivos tempos de retenção e o tempo médio de retenção encontram-se apresentadas nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Cinética de passagem de partículas no trato gastrintestinal de novilhas recebendo dietas à base de silagem de milho (SM), cana-de-açúcar (CA) e feno de Tifton (FT)

Parâmetros	Dietas			EPM <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>
	SM	CA	FT		
Taxa de Passagem Ruminal (%/h)	3,37	2,99	2,82	0,28	0,40
Taxa de Passagem Intestinal (%/h)	10,22	9,14	9,25	0,49	0,28
Tempo de Retenção Ruminal (h)	33,14	35,95	39,84	2,84	0,29
Tempo de Retenção Intestinal (h)	10,77	11,67	14,06	1,13	0,16
Tempo Médio de Retenção (h)	43,92	47,62	53,90	3,18	0,13

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de SNK com 5% de probabilidade

<sup>1</sup> EPM = Erro padrão da média

<sup>2</sup> Valor de probabilidade para o efeito de dieta

As taxas de passagem ruminal e intestinal (TPR e TPI), assim como os respectivos tempos de retenção foram estatisticamente iguais entre as dietas. O tempo médio de retenção (TMR) também não diferiu entre as dietas, apesar da tendência ( $P=0,13$ ) de superioridade observada para a dieta de feno em relação às demais. Resposta levemente superior à observada neste trabalho para o feno, foi relatada por Ribeiro et al. (2001b) ao avaliar diferentes idades de rebrota, ocasião em que o valor médio encontrado foi de 3,2%/h. Em outro trabalho, Martins et al. (2006) verificou taxas de passagem ruminal de 3,40 e 3,02, respectivamente para a silagem de milho e feno de tifton, respostas que condizem com os valores aqui encontrados. Já Cavalcante et al. (2004), estudando níveis crescentes de substituição de feno de tifton por silagem de milho observaram os valores

4,00 e 4,40%/h, correspondentes à dietas com 100% de feno ou de silagem, taxas estas superiores às encontradas neste estudo.

Quanto ao TRR, Martins et al. (2006) verificou ao trabalhar com silagem de milho e feno de tifton os tempos 31,64 e 33,46 horas, respectivamente, valores estes inferiores aos do presente estudo. Esse mesmo autor relatou ainda valores inferiores para o TRI e TMR em relação ao presente trabalho. Segundo Mertens & Ely (1982), as cinéticas de trânsito e de passagem estariam relacionadas, principalmente, ao nível de consumo, à forma física da dieta, às diferenças na ruminação entre animais, ao tipo de indicador utilizado na determinação da curva de excreção fecal, à relação V:C e aos fatores climáticos.

No que diz respeito à comparação das técnicas quanto aos parâmetros, podemos evidenciar menor taxa de passagem no rúmen e maior no intestino quando utilizada a técnica de esvaziamento. Consequentemente, os tempos de retenção ruminal e intestinal obtidos a partir desta técnica, mostraram-se maior e menor, respectivamente, em relação à técnica do indicador, uma vez que a taxa de passagem influencia diretamente no tempo de retenção. Uma menor TPR foi também evidenciada por Krizan et al. (2010) ao fazer uso do esvaziamento em comparação à curva de excreção de indicador. Uma possível explicação para este fato é que a taxa de passagem estimada a partir do esvaziamento inclui no tempo de retenção um grande conteúdo de partículas, enquanto que a taxa quando estimada a partir da cinética do indicador representa o tempo de retenção de pequenas partículas no compartimento. Quanto ao TMR, a resposta obtida com a técnica de esvaziamento foi superior, registrando o tempo de 51,91 horas.

Tabela 7. Cinética de passagem no trato gastrintestinal de novilhas obtidas por diferentes técnicas

Parâmetros	Técnica		EPM <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>
	Indicador	Esvaziamento		
Volume (L)	98,94 <sup>a</sup>	76,42 <sup>b</sup>	3,68	0,0007
Taxa de Passagem Ruminal (%/h)	3,66 <sup>a</sup>	2,46 <sup>b</sup>	0,12	<0,001
Taxa de Passagem Intestinal (%/h)	7,40 <sup>b</sup>	11,70 <sup>a</sup>	0,04	0,01
Tempo de Retenção Ruminal (h)	29,59 <sup>b</sup>	43,03 <sup>a</sup>	2,84	0,0006
Tempo de Retenção Intestinal (h)	15,45 <sup>a</sup>	8,88 <sup>b</sup>	0,95	0,0003
Tempo Médio de Retenção (h)	45,04 <sup>b</sup>	51,92 <sup>a</sup>	1,44	0,004

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de teste “t” com 5% de probabilidade

<sup>1</sup> EPM = Erro padrão da média; <sup>2</sup> Valor de probabilidade para o efeito de técnica

O tempo de retenção médio (TMR) estimado a partir de curvas descendentes de excreção de indicadores, assim como verificado neste trabalho, tem se mostrado inferior quando em comparação aos dados obtidos de forma direta em estudos de abate (Walz et al., 2004). Dessa forma, acredita-se que este parâmetro quando obtido através da técnica de esvaziamento, que também constitui uma forma direta de mensurar a cinética de passagem, forneceria informações biologicamente mais relevantes. É importante ressaltar no entanto, que a técnica de esvaziamento apresenta alguns inconvenientes e, dentre eles o fato de que a cinética é determinada para a dieta total e não para ingredientes individualmente.

#### **5.4 Conclusões**

A cinética de passagem de fluidos e partículas não foi afetada pelas dietas. O indicador Co-EDTA tende a superestimar o volume ruminal. Dessa forma, em estudos que contemplem o esvaziamento ruminal a obtenção desse parâmetro deve ser feita a partir dessa técnica. Ressalta-se ainda, que a técnica do indicador não pode ser eliminada dos ensaios de cinética de passagem de fluidos, uma vez que sua utilização é imprescindível na obtenção dos demais parâmetros neste tipo de estudo.

A cinética de passagem quando avaliada pela técnica de esvaziamento ruminal possibilita um estudo específico para cada fração do alimento. A técnica de esvaziamento ruminal permite ainda uma avaliação detalhada de todo o conteúdo do rúmen, como volume e pesos da digesta. Dessa forma, o estudo da cinética de passagem, pode ser entendido de uma maneira integrada com os fatores intrinsecamente relacionados com os efeitos de enchimento.

#### **5.5 Referências Bibliográficas**

ALLEN, M. S. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. *Journal of Animal Science*, v. 74, n. 12, p. 3063-3075, 1996.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Official Methods of Analysis. 16<sup>a</sup> ed. AOAC, Washington, DC. 1995.

BERCHIELLI, T. T.; RODRIGUEZ, N. M.; GONÇALVES, L. C. Polietilenoglicol e cobalto-EDTA como marcadores da fase líquida ruminal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 48, p. 463-471, 1996.

CAREY, D. A.; CATON, J. S.; BIONDINI, M. Influence of energy source on forage intake, digestibility, in situ forage degradation, and ruminal fermentation in beef steers fed medium-quality brome hay. *Journal of Animal Science*, v. 71, n. 8, p. 2260-2269, 1993.

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

CAVALCANTE, A. C. R.; PEREIRA, O. G.; VALADARES FILHO, S. C. et al. Dietas contendo silagem de milho (*Zea mays* L.) e feno de capim-Tifton 85 (*Cynodon spp.*) em diferentes proporções para bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, n. 6, p. 2394-2402, (Suplemento 3), 2004.

COLUCCI, P. E. *Comparative digestion and digesta kinetics in sheep and cattle*. Guelph:University of Guelph, 1984, 221p. Thesis (Ph.D. Thesis Animal Science) - University of Guelph, 1984.

COLUCCI, P. E.; MACLEOD, G. K.; GROVUM, W. L. et al. Digesta kinetics in sheep and cattle fed diets with different forage to concentrate ratios at high and low intakes. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 2143-2156, 1990.

DADO, R. G.; ALLEN, M. S. Intake limitations, feeding behavior, and rumen function of cows challenged with rumenfill from dietary fiber or inert bulk. *Journal of Dairy Science*, v. 78, p. 118-133, 1995.

DESBORDES, C. K.; WELCH, J. G. Influence of specific gravity on rumination and passage of indigestible particles. *Journal of Animal Science*, v. 59, p. 470, 1984.

DIAS, M. *Indicadores na coleta de digesta omasal e na cinética de trânsito do trato gastrintestinal de bovinos*. 2009. 96 p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

EVANS, E. An evaluation of the relationships between dietary parameters and rumen turnover rate. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 61, n. 1, p. 91-96, 1981.

FERREIRA, D. F. *Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0*. In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, p. 255-258, Julho, 2000.

FIRKINS, J. L.; BERGER, L. L.; MERCHEN, N. R. et al. Effects of forage particle size, level of feed intake and supplemental protein degradability on microbial protein synthesis

and site of nutrient digestion in steers. *Journal of Animal Science*, v. 62, n. 4, p. 1081-1094, 1986.

FORBES, J. M. *Voluntary food intake and diet selection in farm animals*. Wallingford: CAB International, 532p., 1995.

FORBES, J. M. Integration of regulatory signals controlling forage intake in ruminants. *Journal of Animal Science*, v. 74, n. 12, p. 3029-3035, 1996.

GALLOWAY, D. L.; GOETSCH, A. L.; FORSTER, L. A. et al. Feed intake and digestibility by cattle consuming bermudagrass or orchardgrass hay supplemented with soybean hulls and (or) corn. *Journal of Animal Science*, v. 71, n. 11, p. 3087-3095, 1993.

GOETSCH, A. L.; GALYEAN, M. L. Effect of dietary concentrate level on rumen fluid dilution rate. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 62, n. 2, p. 649-652, 1982.

GROVUM, W. L.; WILLIAMS, V. J. Rate of passage of digesta in sheep. 4. Passage of marker through the alimentary tract and the biological relevance of rate-constants derived from the changes in concentration of marker in faeces. *British Journal of Nutrition*, v. 30, p. 313-329, 1973.

HUHTANEN, P; NOUSIAINEN, J; RINNE, M. Recent developments in forage evaluation with special reference to practical applications. *Agricultural and Food Science*, v. 15, p. 293-323, 2006.

HUNGATE, R. E. *The rumen and its microbes*. Nova York: Academic, 1966, 533p.

KRIZSAN, S. J.; AHVENJÄRVI, S.; VOLDEN, H.; HUHTANEN, P. Relationship between passage rate and extrinsic diet characteristics derived from rumen evacuation studies performed with dairy cows. In: SAUVANT, D.; Van MILGEN, J.; FAVERDIN, P.; FRIGGENS, N. Ed. *Modelling Nutrient Digestion and Utilization in Farm Animals*. Wageningen, Holanda: Wageningen Academic Publishers, 2010, p. 191-200.

LLAMAS-LAMAS, G.; COMBS, D. K. Effect of forage to concentrate ratio and intake level on utilization of early vegetative alfalfa silage by dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 526, 1991.

LUND, P. *The effect of forage type on passage kinetics and digestibility of fibre in dairy cows*. PhD Thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark. 2002.

MAENG, W. J., BALDWIN, R. L. Dynamics of fermentation of purified diet and microbial growth in the rumen. *Journal of Dairy Science*, v. 59, n. 4, p. 636-642, 1976.

MARTINS, A. S.; VIEIRA, F. P.; BERCHIELLI, T. T. Taxa de passagem e parâmetros ruminais em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, p. 1-11, 2006.

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.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 381p., 2001.

NEEL STETTER, J. P.; PRIGGE, E. C.; TOWNSEND, E. C. Influence of moisture content of forage on ruminal functional specific gravity and passage of digesta. *Journal of Animal Science*, v. 73, p. 3094-3102, 1995.

OSPINA, H. *Influência do nível de consumo de feno sobre a digestibilidade, cinética digestiva e degradação ruminal em bovinos*. 1995. 249p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

OWENS, F. N., GOETSCH, A. L. Ruminal fermentation. In: CHURCH, D. C. (Ed.). *The ruminant animal digestive physiology and metabolism*. New Jersey: Prentice Hall, 1988, p. 145-171.

OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. Digesta passage and microbial protein synthesis. In: MILLIGAN, L. P; GROVUM W. L.; DOBSON, A. *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*, Ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1986, p. 196.

POPPI, D. P.; ELLIS, W. C.; MATIS, J. H.; LASCANO, C. E. Marker concentration patterns of labelled leaf and stem particles in the rumen of cattle grazing bermuda grass (*Cynodon dactylon*) analysed by reference to a raft model. *British Journal of Nutrition*, v. 85, p. 553-563, 2001.

RIBEIRO, K. G.; PEREIRA, O. G.; GARCIA, R. et al. Eficiência microbiana, fluxo de compostos nitrogenados no abomaso, amônia e pH ruminais, em bovinos recebendo rações contendo feno de capim-tifton 85 de diferentes idades de rebrota. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, n. 2, p. 581-588, 2001b.

ROBINSON, P. H.; TAMMINGA, S.; Van VUUREN, A. M. Influence of declining level of feed intake and varying the proportion of starch in the concentrate on rumen ingesta quantity, composition and kinetics of ingesta turnover in dairy cows. *Livestock Production Science*, v. 17, p. 37-62, 1987.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. *SAS user's guide: version 9.1*. Cary: SAS Institute, 2006. 235p.

SCHETTINI, M. A.; PRIGGE, E. C.; NESTOR, E. L. Influence of mass and volume of ruminal contents on voluntary intake and digesta passage of a forage diet in steers. *Journal of Animal Science*, v. 77, p. 1896-1904. 1999.

SISSONS, V. W.; THURNSTON, S. M.; SMITH, R. H. Reticular myoelectric activity and turnover of rumen digesta in the growing steer. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 64, n. 70, Suppl., 1984.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; Van SOEST, P. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluation cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, 1992.

ÚDEN, P.; COLUCCI, P. E.; VAN SOEST, P. J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 31, n. 7, p. 625-632, 1980.

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

WALZ, L. S.; ELLIS, W. C.; WHITE, T. W.; MATIS, J. H.; BATEMAN, H. G.; WILLIAMS, C. C. et al. Flow paths of plant tissue residues and digesta through gastrointestinal segments in Spanish goats and methodological considerations. *Journal of Animal Science*, v.82, p. 508-520, 2004.

WILLIAMS, C. H.; DAVID, D. J.; ISMAA, O. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *Journal of Agricultural Science*, v. 59, p. 381-385, 1962.