

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PAULO VITOR VALENTINI

**Indicadores de produção fecal de novilhas em
diferentes planos de alimentação**

Belo Horizonte - MG
Escola de Veterinária – UFMG

2012

PAULO VITOR VALENTINI

**Indicadores de produção fecal de novilhas em
diferentes planos de alimentação**

Dissertação 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 Mestre em Zootecnia

Área de concentração: Nutrição Animal

Orientador: Fernando César Ferraz Lopes

Valentini, Paulo Vitor, 1985-

V161i Indicadores de produção fecal de novilhas em diferentes planos de alimentação / Paulo Vitor Valentini. – 2012.
58 p. : il.

Orientador: Fernando César Ferraz Lopes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia


1. Bovino – Alimentação e rações – Teses. 2. Dieta em veterinária – Teses. 3. Nutrição animal – Teses. 4. Digestibilidade – Teses. I. Lopes, Fernando César Ferraz.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.208 5

Dissertação defendida e aprovada em 15/06/2012, pela Comissão Examinadora
constituída por:



Prof. Fernando César Ferraz Lopes
(Orientador)



Dr. Mirtan José Frota Morenz



Prof. Ana Luiza da Costa Cruz Borges

Belo Horizonte/MG, 15 de junho de 2012

Agradecimentos

A Deus por mais esta oportunidade.

A meu pai, Dilvo Valentini, minha maior fonte de conhecimento e aprendizado, e minha mãe, Onilce Valentini, minha maior fonte de carisma. Vocês foram minha base.

A toda minha família pelo apoio e confiança.

À Universidade Federal de Minas Gerais especialmente ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, pela oportunidade.

Ao Professor Fernando César Ferraz Lopes pela orientação, confiança e grandioso apoio.

Ao Professor Ricardo Reis e Silva, pelos ensinamentos e todo apoio concedido para o desenvolvimento desse trabalho.

À professora Ana Luiza da Costa Cruz Borges pelo apoio e oportunidade em trabalhar junto à sua equipe.

Ao meu amigo e colega Alexandre Lima Ferreira, pelo grandioso companheirismo, aprendizado e apoio.

Ao Guilherme, pelo apoio estatístico e amizade.

Ao professor Emílio Osório Neto pela grandiosa contribuição para desenvolvimento das análises do cromo.

À professora Eloísa Simões Saliba, pela confiança amizade e apoio.

Aos funcionários do laboratório de nutrição animal da EV-UFMG, especialmente ao Toninho pelo auxílio nas análises.

À professora Sonia e sua equipe por disponibilizar seu laboratório para realizar parte das minhas análises.

À CAPES, pela bolsa concedida, à Fapemig e ao CNPq pelo financiamento do trabalho, e à Epamig que disponibilizou os animais.

À equipe Nutrirum, pelo aprendizado e oportunidade em poder contribuir com os trabalhos de desenvolvimento de pesquisa praticado por esse grupo.

A todos que trabalharam na execução deste experimento. Thiago, Helena, Pedro, Ricardo, Carlos Pancoti, Raphael, Gabriela, Ana Carolina, Marcelina, André, Carlos, Carlos Ricardo, Alexandre, Mônica.

Aos demais que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho e pelo grandioso apoio moral e amizade que tive neste local.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA..	12
2.1 Indicadores: Conceito e Classificação	12
2.2 Produção fecal e digestibilidade	13
2.3 Método dos indicadores.....	14
2.4 Indicadores Internos	15
2.4.1 Matéria seca indigestível (MSi), Fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e Fibra em detergente ácido indigestível (FDAi)	16
1.5 Indicadores Externos	20
1.5.1 Óxido crômico	21
2.5.2 Dióxido de Titânio (TiO ₂)	22
2.5.3 Lignina Purificada e Enriquecida (LIPE [®])	23
2.6 Potencial efeito de variáveis sobre resultados de excreção fecal obtidos com emprego de indicadores.....	25
2.6.1 Grupamento genético	25
2.6.2 Período de adaptação	26
2.6.3 Número de dias de coleta de fezes	27
2.6.4 Protocolos de coletas de amostras.....	28
2.6.5 Diferentes planos de dieta	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Local e Instalações.....	30
3.2 Animais e alimentação.....	31
3.3 Manejo e condução experimental.....	32
3.4 Análise Estatística	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35

5. CONCLUSÕES	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (%) estimados utilizando indicadores internos e externos em novilhas e vacas em lactação	19
Tabela 2. Média dos coeficientes de digestibilidade da matéria seca (DMS), da matéria orgânica (DMO), da proteína (DPB) e da energia bruta (DEB) em função do grupamento genético.....	26
Tabela 3. Médias diárias de excreções de matéria seca fecal (EMSF), de coeficientes de digestibilidade de MS (CDMS), MO (CDMO), PB (CDPB), EE (CDEE), FDN (CDFDN) e CNF (CDCNF) e os teores de NDT, estimadas com dois dias de coleta (8 h e 16 h) e seis dias de coleta de fezes (6 coletas em intervalos de 26 horas) utilizando os indicadores FDAi e FDNi	28
Tabela 4. Composição bromatológica dos alimentos utilizados na alimentação das novilhas, em porcentagem da matéria seca (MS)..	31
Tabela 5. Composição bromatológica do feno de Tifton 85 utilizado na alimentação dos animais, expressa em porcentagem da matéria seca..	32
Tabela 6. Produção de matéria seca (MS) fecal (kg/novilha/dia) mensurada por coleta total (CT) de fezes e estimada pelos indicadores internos MSi (MS indigestível), FDNi (fibra em detergente neutro indigestível) e FDAi (fibra em detergente ácido indigestível), e pelos indicadores externos Cr ₂ O ₃ (óxido crômico), TiO ₂ (dióxido de titânio) e LIPE	36
Tabela 7. Produção de matéria seca (MS) fecal (kg/novilha/dia) mensurada por coleta total (CT) de fezes e estimada pelos indicadores internos MSi (MS	

indigestível), FDNi (fibra em detergente neutro indigestível) e FDAi (fibra em detergente ácido indigestível), e pelos indicadores externos Cr_2O_3 (óxido crômico), TiO_2 (dióxido de titânio) e LIPE[®]36

Tabela 8. Produção de matéria seca (MS) fecal (kg/novilha/dia) obtida por dois protocolos de coleta de fezes.....48

Tabela 9. Produção de matéria seca (MS) fecal (kg/novilha/dia) obtida por dois protocolos de coleta de fezes.....48

RESUMO

Objetivou-se avaliar a produção de matéria seca fecal (PMSF) de novilhas de três grupos raciais, submetidas a diferentes planos de alimentação, comparando-se as produções fecais mensuradas pelo método de coleta total de fezes com aquelas estimadas com auxílio dos indicadores externos óxido crômico (Cr_2O_3), dióxido de titânio (TiO_2) e LIPE[®], e dos indicadores internos matéria seca indigestível (MSi), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e fibra em detergente ácido indigestível (FDAi). Foram realizados dois ensaios. No primeiro utilizaram-se 18 novilhas dos grupos raciais Holandês, F1 (½ Holandês x Gir) e Gir, alimentadas com dietas com relação volumoso:concentrado de 70:30 (base MS), respectivamente, sob consumo *ad libitum*. No segundo ensaio, foram utilizadas 12 novilhas dos grupos raciais Gir e F1, alimentadas exclusivamente de volumoso sob dieta restrita, em nível de manutenção. Foram ainda comparados nos dois ensaios dois protocolos de coletas de fezes (8 h e 16 h em cinco dias de coleta *versus* seis horários intervalados de 6 h num período de 3 dias). Em todas as comparações, os indicadores internos MSi, FDNi e FDAi superestimaram a PMSF. Os indicadores externos dióxido de titânio e óxido crômico são possíveis serem utilizados em estudos de nutrição de ruminantes em condições específicas, enquanto que a LIPE[®] pode ser amplamente utilizada. Não houve diferença entre protocolos, ficando sua escolha a critério do pesquisador e das condições da pesquisa.

Palavras-chave: bovino, dióxido de titânio, indicador interno, LIPE[®], óxido crômico.

ABSTRACT

The aim of this review was to evaluate the fecal dry matter production (FDMP) from three different breed groups of heifers submitted to a different feeding levels; using the method of total collection and estimated with external markers chromium oxide, titanium dioxide and LIPE[®], and indigestible dry matter markers (iDM), indigestible neutral detergent fiber (iNDF) and indigestible acid detergent fiber (iADF) support. Two experiments were conducted. On the first one we used 18 heifers from three genetic groups: Holstein, ½ Holstein / Gir (F1) and Gir, fed with 70:30 forage x concentrate diet, under *ad libitum* consumption. On the second experiment, we used 12 animals from Gir and F1 groups, fed on a restricted diet, only with forage, on maintenance levels. Two different protocols were also compared: fecal collection (at 8:00 and 16:00 h during 5 days collection and six times with 6 hour intervals on a 3-day period). In all comparisons, internal markers MSi, and iADF iNDF overestimated the FDMP. The external markers chromium oxide, titanium dioxide, can be used in ruminant nutrition studies in specific conditions. Whereas the LIPE[®], can be used in all conditions. There was no difference between protocols. The protocol choice will be according to the researcher and the research conditions.

Key-words: bovine, titanium dioxide, internal markers, LIPE[®], chromic oxide.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por produtos de origem animal desencadeou novas perspectivas e diversos avanços relacionados à nutrição de ruminantes. A complexidade do sistema digestivo de ruminantes evidenciou a necessidade em intensificar estudos relacionados aos efeitos da digestibilidade de nutrientes, taxa de passagem e eficiência energética. Para estimação desses valores, faz-se necessário avaliar a excreção fecal dos animais. Apesar de ser considerado o método padrão, a determinação pela coleta total de fezes requer rigoroso controle da ingestão e excreção, o que o torna por demais trabalhoso e oneroso, principalmente quando se trata de herbívoros de grande porte e/ou criados em sistema de pastejo.

Neste sentido, a busca por métodos alternativos ao procedimento padrão de coleta total de fezes levou ao emprego de substâncias denominadas “indicadores”, que permitem a estimação da produção fecal dos animais a partir de amostras de fezes obtidas seguindo protocolos pré-estabelecidos de coletas.

A utilização destes indicadores pode permitir a obtenção de uma série de informações importantes do ponto de vista da nutrição animal, tais como taxa de passagem da digesta nos diversos compartimentos do trato gastrointestinal, trânsito de líquidos e sólidos, consumo e produção de matéria seca fecal. Muitos indicadores já foram avaliados em experimentos de nutrição de ruminantes e recomendados para estimar a excreção fecal de animais. Conquanto não possam ser considerados perfeitos, muitos apresentaram comportamento adequado para serem utilizados em ensaios de digestibilidade.

Deste modo, diversos estudos têm sido realizados objetivando a busca de indicadores de excreção fecal com características mais próximas daquelas atribuídas a um indicador ideal.

Diversas variáveis pouco estudadas podem, potencialmente, provocar efeito sobre os resultados de estimação da produção fecal em ruminantes, tais como: tipo e dose de indicadores, grupamento genético, idade e sexo do animal, plano

de alimentação, extensão do período de adaptação, número de dias e horário das coletas de fezes, dentre outros.

Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi comparar a produção de matéria seca fecal de novilhas de três grupos raciais, submetidas a diferentes planos de alimentação, por meio do método de coleta total de fezes, com aquelas estimadas com auxílio dos indicadores externos óxido crômico, dióxido de titânio e LIPE[®], e dos indicadores internos matéria seca indigestível (MSi), fibra em detergente neutro indigestível (FDAi) e fibra em detergente neutro indigestível (FDNi).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Indicadores: Conceito e Classificação

Indicadores são compostos de referência utilizados para monitorar aspectos químicos (hidrólise e síntese) e físicos (fluxo) da digestão, podendo ser utilizados para estimar o fluxo da digesta e a produção fecal de ruminantes.

Para ser utilizada como indicador uma substância deve possuir algumas características intrínsecas, tais como, ser inerte e atóxica, totalmente indigerível e inabsorvível, não apresentar função fisiológica, poder ser processada com o alimento, misturar-se bem ao alimento e permanecer uniformemente distribuída na digesta, ser, preferencialmente, de ocorrência natural no alimento, não influenciar ou ser influenciada por secreções intestinais, absorção, motilidade e pela população microbiana, possuir método específico e sensível de determinação. Dentre estas características, as que mais limitam a utilização de indicadores é a recuperação incompleta e a variação diurna na excreção (Lopes, 2007). Não há nenhum indicador que pode ser considerado ideal e que consiga atender a todas essas premissas, ou definir qual componente químico se assemelha melhor com aquelas desejadas (Zeoula *et al.*, 2002). No entanto, alguns indicadores apresentam características que podem ser consideradas adequadas para fornecer resultados confiáveis, embora sua acurácia varie de acordo com a variável avaliada. Todavia, é importante a seleção de um indicador

em relação a outro de acordo com cada estudo específico, como, por exemplo, visando estimar a produção de matéria seca fecal (PMSF) ou a cinética de fluxo de partículas (Lopes, 2007).

Os indicadores podem ser classificados em dois grupos: 1) os internos, os quais estão presentes naturalmente no alimento ou dieta (exemplos: MSi – matéria seca indigestível, FDNi - fibra em detergente neutro indigestível e FDAi - fibra em detergente ácido indigestível); e 2) os externos, que precisam ser fornecidos ou administrados aos animais (exemplos: LIPE[®], dióxido de titânio, óxido crômico) (Rodriguez *et al.*, 2006).

É essencial que o indicador seja quantitativamente recuperado nas fezes e distribuído uniformemente, de modo a permitir concentração constante e quantificável na digesta, atingindo o chamado estado de equilíbrio (“steady-state”) o mais rapidamente possível. Uma das maiores limitações dos indicadores externos é não se comportarem como as partículas do alimento, promovendo alterações nas características químicas e físicas da porção fibrosa (e.g. gravidade específica), e para os internos, a maior limitação é sua recuperação nas fezes (Rodriguez *et al.*, 2006). Uma possível razão para o indicador ter a taxa de passagem mais rápida que o alimento é ser constituído de partículas muito finamente moídas e com alta densidade (Marais, 2000).

Resultados de recuperação fecal diferentes de 100% podem ser devidos à absorção parcial no trato digestivo ou à transformação em outros compostos, causando superestimativa da produção fecal (Berchielli *et al.*, 2006).

2.2 Produção fecal e digestibilidade

O consumo de matéria seca é o fator de maior importância na nutrição animal, uma vez que determina a ingestão de nutrientes e, conseqüentemente, o desempenho dos animais (Berchielli *et al.*, 2006).

Conhecer a quantidade de alimento ingerida e os nutrientes absorvidos é essencial para que se façam alterações a respeito do alimento, visando determinada resposta do animal. Medidas confiáveis da ingestão de matéria seca

são de extrema importância no âmbito de um programa de nutrição, para os processos de digestão e metabolismo de nutrientes (Machado *et al.*, 2011).

A digestibilidade corresponde à capacidade de utilização dos nutrientes dos alimentos pelos animais, sendo definida como a proporção da dieta ingerida que não foi excretada nas fezes. A digestibilidade é estimada pela diferença entre as quantidades diárias de dieta ingerida e a produção de fezes ou dos nutrientes nela contidos em relação à quantidade ingerida da dieta num dado período de tempo, sendo representada pela equação (Berchielli *et al.*, 2006):

$$\text{Digestibilidade da MS} = \frac{\text{MS ingerida} - \text{MS excretada}}{\text{MS ingerida}} \times 100$$

A produção fecal pode ser mensurada pelo método *in vivo*, o que demanda rigoroso controle da ingestão e excreção, principalmente se for herbívoros de grande porte e/ou criados em sistema de pastejo (Berchielli *et al.*, 2006).

Metodologia alternativa ao método *in vivo* é a utilização de indicadores, que podem auxiliar na estimação da produção fecal. Este método consiste no fornecimento de substâncias indigestíveis (indicadores externos), ou componentes intrínsecos da dieta (indicadores internos), que podem ser recuperados e analisados nas fezes, permitindo a estimação da produção fecal e, por conseguinte, a determinação da digestibilidade do alimento ou da dieta (Berchielli *et al.*, 2006).

2.3 Método dos indicadores

A utilização de indicadores de excreção fecal surge como alternativa ao método de coleta total de fezes, haja vista a possibilidade de obtenção de estimativas da digestibilidade aparente da dieta de forma menos laboriosa (Rodrigues *et al.*, 2010). Os indicadores têm-se mostrado úteis e eficientes na estimativa da

produção fecal, proporcionando resultados semelhantes aos obtidos pelo método de coleta total de fezes (Mendes *et al.*, 2005).

O cálculo da produção de matéria seca fecal utilizando o método dos indicadores externos e internos baseia-se na razão entre a quantidade fornecida ou consumida do indicador por sua concentração nas fezes (Berchielli *et al.*, 2006).

$$PMSF (g) = \frac{\text{Indicador Ingerido (g)}}{\text{Concentração do Indicador nas fezes (g/g)}}$$

2.4 Indicadores Internos

Os indicadores internos estão presentes naturalmente no alimento e, além disso, apresentam outras vantagens competitivas, tais como: não prescindirem de dosagem, permanecerem uniformemente distribuídos na digesta durante o processo de digestão e excreção, apresentarem facilidade de avaliação em diversas espécies, além do baixo custo (Berchielli *et al.*, 2000).

No entanto, podem existir certas restrições, ocasionadas por alterações no processo digestivo, as quais podem interferir na recuperação fecal. Os principais problemas encontrados no emprego de indicadores internos são: incompletas e variáveis taxas de recuperação, maior sensibilidade a erros nas estimativas de digestibilidade e/ou de produção fecal em função de sua normalmente baixa concentração, interação do indicador com a dieta ou forragem, variação diurna na excreção, concentração do indicador na dieta, falta de padronização de técnicas de determinação desses indicadores, processamento inadequado e falta de representatividade das amostras (forragens, fezes e sobras) (Lopes, 2007).

Os principais indicadores internos atualmente recomendados para estimar excreção fecal em ruminantes são: fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), *n*-alcanos, dentre outros (Lopes, 2007).

2.4.1 Matéria seca indigestível (MSi), Fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e Fibra em detergente ácido indigestível (FDAi)

A FDNi e a FDAi estão entre os mais promissores indicadores internos para estimação da PMSF de ruminantes (Watanabe *et al.*, 2010). Consistem de frações indigeríveis do alimento que podem ser utilizadas para estimação da produção fecal, por meio da relação entre sua concentração no alimento/dieta e nas fezes.

A matéria seca residual após incubação ruminal *in situ* também pode ser utilizada como indicador interno (MSi). No entanto, pode ser menos precisa para detectar diferenças na digestibilidade de alimentos impostas pelos tratamentos em um experimento (Kozloski *et al.*, 2006). MSi, FDAi e FDNi constituíram as melhores alternativas para a determinação indireta da digestibilidade da dieta e do consumo da matéria seca (Berchielli *et al.*, 2005).

A determinação da concentração desses indicadores internos nos alimentos, sobras e fezes pode ser realizada pela incubação *in situ* no rúmen ou *in vitro* destas amostras (Freitas *et al.*, 2002). Na maioria dos trabalhos são utilizados períodos de incubação que variam de 144 a 264 horas (Rodriguez *et al.*, 2006; Casali *et al.*, 2008). Soares *et al.* (2009) avaliaram a digestibilidade da matéria seca estimada pelos indicadores internos MSi, FDNi e FDAi, incubados durante 144 e 288 horas em bubalinos alimentados com capim-Cameroon. Não foi observada diferença entre os tempos de incubação. Entretanto, Casali *et al.* (2008) obtiveram estimativas mais exatas das frações indigestíveis com tempos de incubações de 240 horas para MS e FDN, e 264 horas para FDA.

Diversos trabalhos demonstraram que o indicador FDNi pode ser considerado eficiente para determinar a excreção fecal e/ou fluxo duodenal (Berchielli *et al.*, 2000; Zeoula *et al.*, 2002; Berchielli *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2005; Pina *et al.*, 2006; Detmann *et al.*, 2007; Peter *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2009a). Da mesma forma, em outros estudos foi relatado que o FDAi apresentou resultados promissores na estimação da produção fecal (Berchielli *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2002; Berchielli *et al.*, 2005; Pina *et al.*, 2006).

Entretanto, alguns autores questionaram a utilização da FDNi e/ou da FDAi, por estes terem apresentado inadequadas estimativas (Freitas *et al.*, 2002; Zeoula *et al.*, 2002; Oliveira Jr. *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2009a; Silva *et al.*, 2009). Conforme relataram Zeoula *et al.* (2002), recuperações inadequadas desses indicadores podem estar relacionadas aos problemas na filtragem durante as análises, ou mesmo à inadequada digestão *in situ* no rúmen, a qual ocorre, principalmente, pelas possíveis perdas de fezes devido ao irregular tamanho dos poros da bolsa de náilon utilizada. Conforme Berchielli *et al.* (2006), os erros de metodologias das análises desses indicadores continuam sendo os maiores problemas na aplicação da técnica. De acordo com a variabilidade dos resultados observados, é possível a existência de um indicador adequado para cada volumoso utilizado.

Silva *et al.* (2008) avaliaram a excreção fecal e a digestibilidade utilizando os indicadores internos FDNi e FDAi em 16 novilhas $\frac{3}{4}$ Holandês x $\frac{1}{4}$ Zebu alimentadas com silagem de capim-elefante suplementada com bagaço de mandioca e concentrado. Os autores concluíram que os dois indicadores apresentaram resultados diferentes daqueles obtidos pelo método de coleta total, sendo que a FDNi subestimou a produção fecal e superestimou a digestibilidade da MS, enquanto que a FDAi superestimou a excreção fecal e subestimou a digestibilidade da MS. Zeoula *et al.* (2002) compararam a eficiência de quatro indicadores internos: FDNi, FDAi, cinza insolúvel em ácido (CIA), e cinza insolúvel em detergente ácido (CIDA), em ovinos alimentados com quatro níveis de substituição do fubá de milho por farinha de varredura. A FDNi e a CIA apresentaram resultados de recuperação fecal que não diferiram de 100%. Por outro lado, a FDAi e CIDA apresentaram valores que diferiram daqueles obtidos por meio da coleta total. Resultados divergentes foram encontrados por Oliveira Jr. *et al.* (2004), que compararam a FDNi com a lignina em detergente ácido e o óxido crômico, em seis novilhas Nelore alimentadas com dietas à base de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e concentrado. A FDNi apresentou resultados de menor precisão que os obtidos com a utilização dos demais indicadores, e subestimou a digestibilidade em todas as dietas avaliadas. As diferenças nos resultados da literatura com respeito à utilização da FDNi como indicador interno para estimação da produção fecal podem ser parcialmente atribuídas às

variações existentes na recuperação de indicadores indigestíveis, falta de padronização no método de determinação, além daquelas relacionadas às formas de avaliação *in situ* no rúmen ou *in vitro* (Oliveira Jr. *et al.*, 2004).

Alguns autores sugerem a determinação *in vivo* para estimar a FDNi e FDAi (Freitas *et al.*, 2002; Cabral *et al.*, 2008). A metodologia *in vitro* para estimativa desses indicadores tem a principal vantagem sobre o método *in situ* por ser mais simples e econômica, uma vez que não há necessidade de manter material incubado em animais fistulados (Freitas *et al.*, 2002). Entretanto, Casali *et al.* (2008) afirmaram que nas incubações *in vitro* as partículas fibrosas podem permanecer aderidas à parede e à tampa do tubo e não ter contato com o inóculo ruminal, o que acarreta aumento do resíduo pós-incubação e superestima a quantidade do indicador nas amostras. Portanto, o procedimento *in situ* parece ser mais adequado que o método *in vitro*. Além disso, Cochran *et al.* (1986) afirmaram que a técnica *in vitro* não simula as alterações na digestibilidade por efeito associativo, nível de consumo e taxa de passagem, observadas *in vivo*. Assim, essa metodologia não é adequada para ser utilizada como indicador de digestibilidade na determinação do consumo a pasto.

Ferreira *et al.* (2009a) trabalharam com vacas em lactação alimentadas com silagem de milho e 4 kg/dia de concentrado e encontraram resultados superestimados de digestibilidade de nutrientes quando utilizaram o indicador interno FDNi em relação aos resultados obtidos a partir do método de coleta total de fezes. Nesta mesma situação, a FDAi, bem como os indicadores externos óxido crômico (Cr₂O₃), dióxido de titânio (TiO₂) e LIPE[®], apresentaram resultados satisfatórios e semelhantes aos obtidos por meio da coleta total. Os mesmos autores, em outro experimento comparando os mesmos indicadores, porém, utilizando novilhas mestiças alimentadas com cana de açúcar com 1% de ureia/sulfato de amônio e concentrado (1% do peso vivo) concluíram que a FDAi foi o único entre os indicadores avaliados que apresentou resultados diferentes (P<0,05) daqueles obtidos por meio do método de coleta total de fezes. Portanto, quando o volumoso utilizado foi a cana de açúcar, o pior resultado foi verificado com a FDAi. No entanto, quando a silagem de milho foi utilizada como volumoso, o indicador menos preciso foi a FDNi. As prováveis razões para essas variações

podem estar relacionadas à constituição da fibra de cada volumoso e à seletividade da dieta pelos animais. Ressalte-se que o resíduo da sobra do cocho é rico em material indigestível, e este precisa ser devidamente amostrado e contabilizado (Ferreira *et al.*, 2009a). A Tabela 1 apresenta os valores de digestibilidade aparente da MS de novilhas e vacas em lactação, estimados a partir da utilização de diversos indicadores internos e externos com aqueles obtidos a partir do método de coleta total de fezes.

Tabela 1. Coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (%) estimados utilizando indicadores internos e externos em novilhas e vacas em lactação

Método	Novilhas	Vacas em Lactação
Coleta total	76,41 A	62,84 A
LIPE [®]	76,48 A	61,06 A
Cr ₂ O ₃	73,58 A	63,46 A
TiO ₂	76,60 A	62,60 A
FDAi	69,49 B	61,99 A
FDNi	75,86 A	67,39 B
CV (%)	1,87	4,67

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem ($P>0,05$) entre si.

Adaptado de Ferreira *et al.* (2009).

Freitas *et al.* (2002) compararam os indicadores FDNi e FDAi, obtidos nos resíduos de incubações *in vitro* (IV) e *in situ* (IS) em novilhos Holandês x Zebu confinados, alimentados à base de silagem de milho, raspa e casca de mandioca, e também com cana de açúcar ensilada com polpa cítrica peletizada. Os autores verificaram que a FDAiv, FDAis, FDNiv, FDNis mostraram-se adequados para estimar fluxo duodenal de matéria seca e orgânica. No entanto, a FDNiv e a FDNis subestimaram e superestimaram a produção fecal, respectivamente. Tanto a FDAis como a FDAiv apresentaram resultados mais precisos na avaliação da produção fecal. Sendo assim, foi recomendada a utilização da FDAiv, por ser técnica mais simples e não necessitar incubação ruminal por longos períodos em animais fistulados.

Dias *et al.* (2008) encontraram resultados que representaram melhor recuperação fecal para a FDAi e produziram estimativas similares a coleta total e à digestibilidade total, quando comparada à coleta total de fezes, diferentemente da FDNi.

Detmann *et al.* (2007) encontraram valores de recuperação completa da FDNi, demonstrando que tal indicador apresentou comportamento ideal para determinar a digestibilidade em ovinos. Os autores relataram que a FDAi nesta mesma condição experimental apresentou-se mais sensível a erros, provavelmente, como decorrência da sua menor concentração nos alimentos.

Berchielli *et al.* (2000) avaliaram os indicadores internos FDAi, FDNi, lignina e CIA na estimação da digestibilidade de nutrientes em bovinos Holandês x Zebu alimentados à base de silagem de milho suplementada com concentrado. Estes autores verificaram que os indicadores FDNi, FDAi e lignina apresentaram resultados precisos nas estimativas.

1.5 Indicadores Externos

É considerado indicador externo toda substância adicionada à dieta com finalidade de estimar a produção fecal dos animais. Conceitualmente, o indicador externo não deve ser absorvido pelas paredes do trato digestivo, sendo assim, indigestível e completamente recuperável nas fezes. Sua utilização pode ter duas finalidades: estimar a produção fecal para determinar a digestibilidade ou consumo de pasto, mas também para estudar parâmetros de fluxo digestivo (Berchielli *et al.*, 2006; Lopes, 2007).

Esses indicadores podem ser administrados aos animais por via oral, por meio de fístula ruminal ou ainda por cápsulas de liberação lenta ou por dose única. Os indicadores externos óxido crômico ou sesquióxido de cromo (Cr_2O_3), dióxido de titânio (TiO_2) e LIPE[®] têm sido utilizados em estudos de digestão parcial de ruminantes (Ferreira *et al.*, 2009a).

1.5.1 Óxido crômico

O óxido crômico é um dos indicadores mais utilizados em ensaios de digestibilidade de ruminantes. Além de estimar a PMSF, tem sido utilizado para avaliar o fluxo de MS e matéria orgânica (MO) no trato digestivo, e estudar a partição da digestão dos nutrientes na dieta (Berchielli *et al.*, 2006).

Pode ser administrado por meio de impregnação em papel, cápsulas de gelatina, na forma de péletes, ou mesmo, misturado na dieta, de forma que todo o material fornecido deve ser consumido pelo animal (Machado *et al.*, 2011).

Sua determinação pode ser realizada por colorimetria (processo mais simples), por espectrofotometria de absorção atômica, e por espectroscopia de emissão (EAA), sendo último, o mais preciso, porém mais complexo e caro (Marais, 2000).

Para o óxido crômico são normalmente observados períodos de adaptação de, aproximadamente, 5 a 7 dias, necessários para manter seu fluxo constante. O óxido crômico pode ser administrado em uma ou duas doses diárias. No entanto, o maior número de administrações do indicador por dia está associado à menor variabilidade da recuperação fecal. Em contrapartida, é limitado pelo trabalho requerido e dificuldades práticas, inerentes ao manejo e à contenção dos animais. Dessa forma, o procedimento de duas dosagens ao dia tem sido o mais indicado em diversos trabalhos e pode apresentar resultados satisfatórios (Lopes, 2007).

Apesar de o óxido crômico ser amplamente estudado e apresentar algumas vantagens e resultados satisfatórios, existem limitações relacionadas ao seu emprego como indicador externo como: recuperação fecal variável de acordo com a constituição da dieta, variação na consistência das fezes, possibilidade de alterar a digestibilidade de alguns minerais da dieta, influência negativa sobre o consumo, e manifestação de propriedades carcinogênicas aos animais (Rodriguez *et al.*, 2006).

A utilização do óxido crômico nas pesquisas tem apresentado resultados variados. Resultados divergentes podem ocorrer, principalmente, devido à instabilidade no fluxo digestivo e variação diurna de sua excreção nas fezes. Alguns trabalhos mostram que o óxido crômico possui passagem mais rápida pelo

rúmen que o material fibroso, havendo ainda a possibilidade deste indicador se acumular em alguma parte do trato digestivo (Rodriguez *et al.*, 2006).

Silva *et al.* (2006) utilizaram o indicador óxido crômico para estimar a produção fecal de novilhas leiteiras em dois sistemas de pastejo (monocultura de *Brachiaria decumbens* e em sistema silvipastoril). O óxido crômico produziu resultados com baixas precisões e sensibilidade. A produção fecal estimada pelo óxido crômico não diferiu ($P>0,05$) entre os sistemas.

Moraes (2007) avaliou a digestibilidade e o consumo em caprinos alimentados com feno de tifton 85 suplementado com diferentes níveis de subprodutos da agroindústria (resíduos de semente de urucum, bagaço de caju desidratado e farelo da castanha de caju). Os resultados de excreção fecal estimados com o óxido crômico não diferiram daqueles obtidos por meio da coleta total de fezes para as dietas com inclusão de resíduos de semente de urucum e de bagaço de caju desidratado. Na dieta suplementada com farelo de castanha de caju o óxido crômico superestimou a digestibilidade.

Oliveira Jr. *et al.* (2004) trabalharam com novilhos Nelore alimentados com dietas contendo 20% de bagaço de cana de açúcar *in natura* como volumoso e 80% de concentrado. Estes autores encontraram valores de digestibilidade da matéria seca, utilizando óxido crômico na estimação da produção fecal, semelhantes aos obtidos pelo método da coleta total. Resultado semelhante foi relatado por Ferreira *et al.* (2009a), que compararam diferentes indicadores em ensaios de digestibilidade em novilhas mestiças alimentadas com cana de açúcar com 1% de ureia/sulfato de amônio e concentrado (1% do peso vivo).

De acordo com Ferreira *et al.* (2009b), o óxido crômico apresentou valores confiáveis para estimar o consumo individual de concentrado. Também pode ser recomendado para avaliar o fluxo duodenal em ovelhas alimentadas com diferentes níveis de forragem na dieta (Myers *et al.*, 2006).

2.5.2 Dióxido de Titânio (TiO₂)

O dióxido de titânio (TiO_2) é uma substância com comportamento semelhante ao observado com óxido crômico e possui potencial para ser utilizado como indicador externo em ensaios de digestibilidade. Poucos trabalhos foram realizados com esse indicador. No entanto, alguns autores afirmaram que o dióxido de titânio apresentou bons resultados de recuperação fecal (Titgemeyer *et al.*, 2001; Myers *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2009a; Sampaio *et al.*, 2011).

À medida que novos estudos vão sendo realizados, o dióxido de titânio pode surgir como promissora alternativa, visto que em algumas situações o Cr_2O_3 não tem apresentado índices de recuperação fecal iguais a 100% (Titgemeyer *et al.*, 2001). E, segundo Myers *et al.* (2006), o TiO_2 apresenta bons resultados de recuperação fecal e não possui propriedades carcinogênicas.

Ferreira *et al.* (2009b) conduziram estudo avaliando o consumo de concentrado de vacas em lactação, e concluíram que o dióxido de titânio apresentou resultados confiáveis como indicador.

Trabalhando com o TiO_2 , Ferreira *et al.* (2009a) encontraram valores de recuperação fecal semelhantes aos obtidos com a coleta total de fezes em novilhas mestiças alimentadas à base de cana de açúcar e concentrado. No entanto, Titgemeyer *et al.* (2001) conduziram três experimentos com novilhos, avaliando a acurácia dos indicadores Cr_2O_3 e TiO_2 , e observaram que a recuperação fecal variou em função das características de cada ensaio. No primeiro experimento, os animais foram alimentados com dietas à base de feno e concentrado e nos demais com dietas baseadas em silagem de milho. Segundo os autores, somente no primeiro experimento o TiO_2 estimou valores de produção fecal semelhantes aos da coleta total. Nos demais, foi observada subestimação da excreção fecal.

2.5.3 Lignina Purificada e Enriquecida (LIPE[®])

Em diversos estudos realizados por pesquisadores da Escola de Veterinária da UFMG (Belo Horizonte, MG), a lignina foi enriquecida com grupamentos fenólicos, dando origem a um hidroxifenilpropano modificado e enriquecido, denominado

LIPE[®], para ser utilizado em pesquisas como indicador externo para avaliar o consumo e a digestibilidade de dietas (Rodriguez *et al.*, 2006). A LIPE[®] tem sido avaliada e considerada indicador com características relevantes, apresentando resultados acurados em estudos de digestibilidade (Silva *et al.*, 2006; Moraes, 2007; Silva *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009a; Ferreira *et al.*, 2009b).

A principal vantagem da LIPE[®] é apresentar maior estabilidade durante a passagem pelo trato gastrintestinal do animal, sendo que sua concentração e seu fluxo pouco variam. Ademais, mostrou-se totalmente recuperável nas fezes. Outras principais vantagens do emprego deste indicador são: baixo custo; curto período de adaptação (aproximadamente, 48 h) e facilidade de análise, pois pode ser acuradamente analisado por espectroscopia no infravermelho (Lopes, 2007).

Sua utilização tem sido considerada promissora em diversas espécies como coelhos, ovinos, equinos, suínos, aves e bovinos (Rodriguez *et al.*, 2006).

Ferreira *et al.* (2009b) realizaram experimento com vacas em lactação alimentadas com silagem de milho e concentrado, e utilizaram a LIPE[®] como indicador. Estes autores encontraram resultados de excreção fecal semelhantes ao obtido com o método de coleta total de fezes. Ferreira *et al.* (2009a) também encontraram bons resultados com o emprego da LIPE[®] trabalhando com novilhas mestiças alimentadas com cana-de-açúcar + ureia e concentrado.

Silva *et al.* (2006) trabalharam com novilhas leiteiras em dois sistemas de pastejo, e consideraram a LIPE[®] mais precisa para estimar a produção fecal, quando comparada ao óxido crômico.

Moraes (2007) avaliou o consumo e a digestibilidade de nutrientes em caprinos alimentados com dietas à base de subprodutos da agroindústria (semente de urucum, bagaço de caju desidratado e farelo da castanha de caju). Em todos os ensaios, a LIPE[®] apresentou estimativas de produção fecal semelhantes às obtidas a partir do método de coleta total de fezes. Segundo este autor, a utilização do óxido crômico foi associada à superestimação dos valores de digestibilidade da dieta suplementada com farelo de castanha de caju. Silva *et al.* (2008) trabalharam com borregos castrados recebendo níveis crescentes de torta de babaçu na dieta, e concluíram que a LIPE[®] pode ser recomendada para

estimação da produção fecal. Além disso, relataram que sua concentração nas fezes não variou durante o dia.

2.6 Potencial efeito de variáveis sobre resultados de excreção fecal obtidos com emprego de indicadores

Na aplicação da técnica do indicador, diversas são as variáveis que, potencialmente, podem provocar efeito sobre a estimação da produção fecal. Dentre várias, podem ser citadas: extensão do período de adaptação; número de dias e horários de coletas de fezes; plano de alimentação e grupamentos genéticos.

2.6.1 Grupamento genético

Existem poucos estudos avaliando a potencial interação entre indicadores de produção fecal e diferentes grupos raciais em bovinos.

Lançanova *et al.* (2002) conduziram experimento para avaliar a digestibilidade dos nutrientes em bovinos Guzerá, Nelore, Caracu, Canchim e Santa Gertrudes, alimentados com 45% de feno de *Brachiaria brizantha*, 33% de quirera de milho e 22% de farelo de algodão, utilizando como indicador interno a lignina em detergente ácido (Tabela 2). Foi observado que os bovinos Guzerá apresentaram maior aproveitamento dos nutrientes, com exceção da proteína bruta (PB) e da fibra em detergente ácido (FDA). Caracu foi a raça que apresentou menor eficiência na digestibilidade dos nutrientes, com exceção da FDA e PB. Os animais da raça Nelore apresentaram recuperação fecal de 83%, enquanto que a média geral de outras raças foi de 95%, apresentando coeficiente de variação de 11,3%.

Tabela 2 Média dos coeficientes de digestibilidade da matéria seca (DMS), da matéria orgânica (DMO), da proteína bruta (DPB) e da energia bruta (DEB) em função do grupamento genético

Grupo genético	DMS	DMO	DPB	DEB
Guzerá	47,79a	49,48a	38,15ab	45,91a
Canchim	47,28a	48,36a	38,08ab	44,84ab
Santa Gertrudes	44,85ab	46,10ab	34,07ab	42,46ab
Nelore	44,85ab	46,91ab	33,78b	42,93ab
Caracu	43,45b	44,62b	38,69a	41,29b
CV (%)	7,87	7,61	13,51	8,78

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey (Adaptado de Lançanova *et al.*, 2002).

Ladeira *et al.* (2007) realizaram estudo comparando os consumos de matéria seca (CMS), de FDN e de PB em novilhos Guzerá, Tabapuã e Nelore, mantidos em confinamento e alimentados com 70% de volumoso e 30% de concentrado. Para determinação do consumo foi utilizado óxido crômico e para estimativa da excreção fecal a LIPE[®]. Os autores concluíram que não houve diferença significativa entre as diferentes raças comparando os CMS, FDN e PB, expressos em percentagem do peso vivo.

2.6.2 Período de adaptação

É fundamental para garantir a eficiência na utilização de um indicador em ensaios de digestibilidade, a observação de período adequado para que este possa estabilizar sua concentração nas fezes. Esse período pode variar de cinco a sete dias para o óxido crômico (Detmann *et al.*, 2001; Berchielli *et al.*, 2006; Lopes, 2007). Para a LIPE[®] dois dias seriam suficientes (Rodriguez *et al.*, 2006).

Glindemann *et al.* (2009) utilizaram o dióxido de titânio para avaliar o período de adaptação para início das coletas. Estes autores trabalharam com ovelhas manejadas sob diferentes taxas de lotação em sistema de pastejo. Foi observado

que o equilíbrio da ingestão e excreção do TiO_2 foi alcançado cinco dias após a administração inicial. Outros autores, ao utilizar TiO_2 em seus experimentos para estimar a produção fecal, mantiveram período de adaptação de sete dias (Myers *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2009a), e Sampaio *et al.* (2011) adotaram período de cinco dias de adaptação.

2.6.3 Número de dias de coleta de fezes

Normalmente, em ensaios de digestibilidade utilizando-se indicadores para estimação da produção fecal, são utilizados cinco e seis dias de coleta de fezes. No entanto, algumas pesquisas demonstraram que menor número de dias pode ser suficiente para obter estimativas precisas, minimizando o trabalho por meio das coletas (Pina *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2009a).

Para a LIPE, cinco dias são suficientes para bovinos (Rodriguez *et al.*, 2006).

Marcondes *et al.* (2006a) utilizaram novilhas mestiças alimentadas à base de cana de açúcar e concentrado para avaliar os indicadores óxido crômico, dióxido de titânio, LIPE[®] e FDNi na estimação da produção fecal obtida em três ou seis dias de coleta de fezes. Os autores concluíram que apenas três dias seriam suficientes para esses indicadores, pois os resultados não diferiram das coletas realizadas durante seis dias. Ferreira *et al.* (2009a) realizaram experimento em condições semelhantes, e também concluíram que apenas três dias de coleta para a FDNi, LIPE[®], óxido crômico e dióxido de titânio seriam suficientes.

Pina *et al.* (2006) realizaram estudo comparando a excreção fecal estimada pelos indicadores FDNi e FDAi, utilizando protocolos de coletas de fezes de dois e seis dias em vacas da raça Holandês, alimentadas com 60% de silagem de milho suplementada com concentrados. As amostras de fezes foram coletadas em intervalos de 26 horas, a partir das 8 h no primeiro dia até as 18 h do sexto dia de coletas. O primeiro protocolo de coleta representou amostras de seis dias e o segundo, amostras de dois dias (1^o e 4^o.dia) de coleta (8 h e 16 h). Segundo os autores, dois dias de coleta foram suficientes para que estimativas confiáveis de produção fecal fossem obtidas (Tabela 3).

Tabela 3 Médias diárias de excreções de matéria seca fecal (EMSF), de coeficientes de digestibilidade de MS (CDMS), MO (CDMO), PB (CDPB), EE (CDEE), FDN (CDFDN) e CNF (CDCNF) e os teores de NDT, estimadas com dois dias de coleta (8 h e 16 h) e seis dias de coleta de fezes (6 coletas em intervalos de 26 horas) utilizando os indicadores FDAi e FDNi

Item	Dias de amostragem		CV (%)
	2 dias	6 dias	
EMSF	6,84	6,87	5,50
CDMS	64,30	64,12	3,01
CDMO	65,70	65,51	2,73
CDPB	69,91	69,64	4,04
CDEE	84,41	84,59	2,37
CDFDN	46,85	46,85	5,98
CDCNF	90,37	90,07	2,14
NDT	68,45	68,28	2,53

.Adaptado de Pina *et al.* (2006).

2.6.4 Protocolos de coletas de amostras

Alguns estudos indicaram que a concentração de um indicador nas fezes varia ao longo de 24 h (Detmann *et al.*, 2001; Kozloski *et al.*, 2006). O animal se alimenta e defeca em tempos distintos, isso pode fazer com que o fluxo do indicador nas fezes não seja sempre estável. Sua concentração nas fezes pode variar de acordo com o período de coleta (Detmann *et al.*, 2001).

Para a LIPE[®], que segundo Rodriguez *et al.* (2006) possui fluxo mais estável de excreção, pode ser realizada apenas uma coleta de fezes ao dia. Outras pesquisas afirmaram que existe interação entre os horários de coletas e as concentrações de cromo nas fezes (Detmann *et al.*, 2001; Kozloski *et al.*, 2006).

Trabalhando com óxido crômico, Kozloski *et al.* (2006) realizaram dois experimentos avaliando diferentes horários para coletas de fezes. No primeiro foram utilizadas vacas Holandês manejadas em pastagens tropicais. As coletas de fezes foram realizadas nos seguintes horários ao longo de 24 h: 1 h, 5 h, 9 h,

13 h, 17 h e 21 h. No segundo experimento, utilizaram novilhos Nelore x Charolês manejados em pastagens, recebendo ou não suplemento concentrado. Os horários de coletas foram: 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 15 h, 18 h, 21 h e 24 h. Em todas as avaliações as concentrações de cromo nas fezes variaram durante o dia. No entanto, foi constatado equilíbrio das concentrações quando foram realizadas duas coletas ao dia, no início da manhã e ao final da tarde.

Myers *et al.* (2006) realizaram três experimentos utilizando ovelhas adultas alimentadas com dietas contendo 100, 50 e 25% de forragem, visando avaliar eventuais diferenças nos padrões de excreção dos indicadores Cr_2O_3 e TiO_2 . As amostras de fezes foram coletadas em intervalos de 6 h durante seis dias. Apesar da concentração fecal estimada pelo TiO_2 ter sido superior àquela obtida a partir do Cr_2O_3 , não houve interação significativa entre indicador \times tempo. Os autores concluíram que as coletas de amostras podem ser realizadas duas vezes ao dia ou com intervalos de 12 h.

Detmann *et al.* (2001) utilizaram o óxido crômico como indicador para comparar os efeitos de número de administrações diárias e protocolos de amostragem. Os autores concluíram que a aplicação de óxido crômico uma vez ao dia, às 13 h, subestimou os valores de excreção fecal e, conseqüentemente, do consumo de animais a pasto, sendo recomendado o emprego de duas aplicações e coletas diárias, às 8 h e 17 h. Esses autores observaram que a curva de excreção do óxido crômico possui comportamento cíclico simétrico, com um ponto de máximo e um de mínimo valor de concentração fecal, cujo comprimento para total de ciclização está próximo de 24 horas. No entanto, existe uma fase estacionária que segue um padrão médio que pode representar 100% de recuperação do indicador e do valor real de excreção fecal.

2.6.5 Diferentes planos de dieta

Em muitos estudos em que resultados de recuperação fecal incompleta foram observados, estes podem estar relacionados ao tipo de alimento fornecido, ou à composição da dieta, ou à relação volumoso:concentrado ou mesmo pela

restrição ou não da dieta (Berchielli *et al.* , 2006; Detmann *et al.* , 2007; Ferreira *et al.* , 2009a).

Sampaio *et al.* (2011) estudaram o efeito de diferentes planos de alimentação sobre a recuperação fecal de indicadores. Foram avaliados os indicadores externos óxido crômico e dióxido de titânio e os indicadores internos MSi, FDNi e FDAi. Foram utilizados novilhos F1 *Red Angus* x Nelore de, aproximadamente, 12 meses de idade alimentados com diferentes dietas, à base de silagem de capim elefante, silagem de milho e feno de capim *Brachiaria*, suplementadas ou não com 20% de concentrado (base MS). Não foram observados efeitos do tipo de volumoso ou da suplementação concentrada e nenhum efeito de outras características da dieta com a recuperação fecal em nenhum dos indicadores avaliados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e Instalações

O trabalho foi realizado no Laboratório de Metabolismo e Calorimetria da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (LAMACA – EV UFMG), em Belo Horizonte (MG), e os procedimentos para análises químicas foram realizadas, no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da EV-UFMG, no Laboratório de Alimentação Animal da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG), e no Laboratório de Engenharia Metalúrgica da UFMG (Belo Horizonte, MG).

Os animais foram mantidos em confinamento (*tie-stall*), em galpão de alvenaria coberto, com comedouros e bebedouros individualizados.

Os procedimentos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo CETEA N° 223/2010).

3.2 Animais e alimentação

Foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro em julho de 2010, e o segundo, em janeiro de 2011.

No primeiro experimento foram utilizadas 18 novilhas com peso corporal médio de 412 kg, divididas em três grupos raciais (seis animais por grupo), quais sejam: Gir, Holandês e F1 ($\frac{1}{2}$ Holandês x Gir). No segundo experimento foram utilizadas 12 novilhas com peso corporal médio de 449 kg, divididas em dois grupos raciais (seis animais por grupo), quais sejam: Gir e F1($\frac{1}{2}$ Holandês x Gir). Os animais foram os mesmos utilizados no Experimento 1.

Os animais Gir e F1 foram provenientes da Fazenda Experimental da EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) em Felixlândia-MG, enquanto que as fêmeas da raça Holandesa foram doadas pela produtora Lindalva de Oliveira Dutra Vivenza, cuja propriedade localiza-se no município de Campos Altos – MG.

No experimento 1, a alimentação foi composta (na base MS) de 70% de volumoso (feno de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85) e 30% de concentrado, distribuída duas vezes ao dia, sempre às 8 h e 16 h. As dietas foram formuladas de acordo com o Nutrient (2001).

Tabela 4 Composição bromatológica dos alimentos utilizados na alimentação das novilhas, em porcentagem da matéria seca (MS)

Alimentos	Nutrientes				
	MS	PB	FDN	FDA	MM
Feno de Tifton 85	90,18	12,2	77,7	37,48	6,07
Concentrado	85,46	15,1	17,63	4,21	9,56

MS = Matéria seca, PB = Proteína Bruta, FDN = Fibra em detergente neutro, FDA = Fibra em detergente ácido, MM = Matéria mineral.

As novilhas receberam alimentação *ad libitum* (10% de sobras), com ganho de peso esperado de 1 kg/dia.

No experimento 2, a alimentação foi composta exclusivamente de volumoso (feno de *C. dactylon* cv. Tifton – 85), distribuído duas vezes ao dia, sempre às 8:00 e 16:00 h (Tabela 5).

Tabela 5. Composição bromatológica do feno de Tifton 85 utilizado na alimentação dos animais, expressa em porcentagem da matéria seca.

MS	PB	FDN	FDA	MM
88,35	8,61	73,82	34,33	5,87

MS = Matéria seca, PB = Proteína Bruta, FDN = Fibra em detergente neutro, FDA = Fibra em detergente ácido, MM = Matéria mineral.

As novilhas receberam alimentação restrita com objetivo de manutenção do peso corporal a um leve ganho de 200 g/animal/dia.

3.3 Manejo e condução experimental

Foram avaliados os indicadores externos óxido crômico (Cr_2O_3), dióxido de titânio (TiO_2) e LIPE[®], e os indicadores internos matéria seca indigestível (MSi), fibra em detergente ácido indigestível (FDAi) e fibra em detergente neutro indigestível (FDNi). Produções fecais estimadas pelos indicadores utilizando dois protocolos de amostragens de fezes foram comparadas àquelas obtidas a partir do emprego do método da coleta total de fezes. Os dois protocolos de amostragens de fezes avaliados foram:

Protocolo 1: Coletas individuais de fezes, realizadas nos últimos cinco dias do período experimental (11^o ao 15^o dia), duas vezes ao dia (8 h e 16 h), realizadas imediatamente após o momento em que o animal defecou. Estas amostras foram posteriormente transformadas em compostas (com base na MS), representativas da excreção diária individual das novilhas.

Protocolo 2: No 11^o, 12^o e 13^o dias do período experimental foram realizadas seis coletas individuais de fezes em intervalos de 4 h (4 h, 8 h,

12 h, 16 h, 20 h e 24 h). Estas amostras foram, posteriormente, transformadas em compostas (com base na matéria présecada), representativas da excreção individual de um período de 24 h.

O experimento teve duração de 15 dias, sendo os primeiros 10 dias destinados à adaptação dos animais aos indicadores externos Cr_2O_3 e TiO_2 , de forma a garantir estabilidade no fluxo de excreção dos mesmos. Para a LIPE[®], foi observado período de adaptação de três dias, ou seja, este indicador foi administrado somente a partir do oitavo dia do ensaio. Nos restantes cinco dias, os indicadores externos continuaram a ser administrados e foram realizadas as coletas totais de fezes, bem como foram seguidos os protocolos de amostragem de fezes que foram comparados no estudo.

Para os indicadores externos Cr_2O_3 e TiO_2 foram fornecidos 10 g do indicador/novilha, divididos em duas administrações diárias de 5 g, sempre às 8 h e 16 h, administrados de forma oral. As cápsulas da LIPE[®] foram fornecidas também por via oral, uma vez ao dia, às 8 h (500 mg/dia/novilha).

A mensuração da produção total de fezes foi realizada individualmente, durante os últimos cinco dias dos ensaios, por meio da pesagem das fezes excretadas em bandejas coletoras apropriadas para este fim e adequadamente instaladas na baia de cada animal, duas vezes ao dia, sempre às 9 h e 17 h. Em cada bandeja, após a pesagem das fezes, foi realizada amostragem, visando posterior determinação da concentração de matéria seca.

Nos cinco últimos dias de cada ensaio, o consumo individual dos animais foi concomitantemente mensurado, por meio da pesagem da dieta oferecida a cada animal e de suas respectivas sobras na manhã do dia seguinte. Amostras diárias representativas dos alimentos componentes da dieta, bem como das respectivas sobras individuais foram coletadas.

Imediatamente após sua coleta, todas as amostras de fezes, alimentos oferecidos e respectivas sobras individuais foram armazenadas a -12°C .

Posteriormente, as amostras de fezes, sobras e oferecido foram descongeladas em temperatura ambiente, colocadas em bandejas de alumínio e secadas por 72 horas, em estufa de circulação forçada de ar, regulada para temperatura de 55°C ,

para determinação da matéria pré-seca. Em seguida, foram moídas em moinho de facas dotado de peneiras com abertura de malhas de 1 mm, e armazenadas em potes plásticos, devidamente identificados.

As amostras de fezes, sobras e alimento oferecido foram transformadas em compostas representativas de acordo com cada comparação do trabalho. As concentrações fecais dos indicadores externos foram determinadas, sendo, o óxido crômico por espectrofotometria de absorção atômica, segundo a técnica proposta por Williams *et al.* (1962), o dióxido de titânio por colorimetria, conforme Myers *et al.* (2004), e de LIPE[®] por espectroscopia no infravermelho (Saliba *et al.*, 2001).

Para determinação da concentração dos indicadores internos MSi, FDNi e FDAi foram coletadas amostras dos alimentos componentes da dieta, das respectivas sobras e fezes individuais que foram incubadas no rúmen de um bovino fistulado, por 264 horas, conforme Casali *et al.* (2008). O animal recebeu alimentação *ad libitum*, à base de silagem de milho e 2 kg/dia de concentrado. Foram utilizados *filter bags* F57 Ankon[®]. Após a incubação ruminal, os *filter bags* foram lavados, secados em estufas de ventilação forçada (55°C, por 72 h) e os resíduos de incubação analisados quanto às concentrações de MSi, FDNi e FDAi, segundo recomendações de Silva e Queiroz (2002).

A produção de matéria seca fecal (PMSF) foi determinada pela razão entre a quantidade do indicador administrado ao animal e sua concentração nas fezes (Lopes, 2007):

$$PMSF (g) = \frac{\text{Indicador Ingerido (g)}}{\text{Concentração do Indicador nas fezes (g/g)}}$$

3.4 Análise Estatística

Nos dois ensaios foi utilizado delineamento experimental em blocos casualizados em esquema de parcelas subdivididas, com o método de mensurar/estimar a

produção fecal alocado na parcela e o protocolo de amostragem, na subparcela. O grupo racial foi incluído no modelo como bloco.

O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + M_j + \gamma_{ij} + P_k + (M \times P)_{jk} + \varepsilon_{ijk}, \text{ onde:}$$

Y_{ijk} = variável resposta do i-ésimo bloco, no j-ésimo método e k-ésimo protocolo;

μ = efeito médio geral;

B_i = efeito do i-ésimo bloco;

M_j = efeito do j-ésimo método para a obtenção da produção fecal;

γ_{ij} = erro aleatório da parcela inteira;

P_k = efeito do k-ésimo protocolo de coleta de fezes;

$(M \times P)_{jk}$ = efeito da interação do j-ésimo método com o k-ésimo protocolo;

ε_{ijk} = erro aleatório na parcela dividida, suposto NID $\sim N(0, \sigma^2)$.

i = B1, B2 e B3 (Experimento 1); e B2 e B3 (Experimento 2);

j = coleta total, MSi, FDNi, FDAi, Cr₂O₃, TiO₂ e LIPE®;

k = Protocolo 1 e Protocolo 2;

B1= Holandês; B2 = F1 Holandês x Gir; B3 = Gir.

Para verificar a necessidade de transformação dos dados de produção de MS fecal foram realizadas análises da distribuição da normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk; $P < 0,10$). Posteriormente, os dados originais ou transformados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o pacote estatístico Sisvar (Ferreira, 2003), sendo as médias comparadas pelos testes Scott-Knott e F ($\alpha = 0,05$), para as variáveis método e protocolo, respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Tabelas 6 e 7 são apresentadas as médias das estimativas de excreção de matéria seca fecal obtidas pelos indicadores e o método da coleta total para os experimentos 1 e 2, respectivamente.

Tabela 6. Produção de matéria seca (MS) fecal (kg/novilha/dia) mensurada por coleta total (CT) de fezes e estimada pelos indicadores internos MSi (MS indigestível), FDNi (fibra em detergente neutro indigestível) e FDAi (fibra em detergente ácido indigestível), e pelos indicadores externos Cr₂O₃ (óxido crômico), TiO₂ (dióxido de titânio) e LIPE[®]

CT	MSi	FDNi	FDAi	LIPE [®]	Cr ₂ O ₃	TiO ₂	EPM	CV(%)
3,22 b	4,04 d	4,05 d	3,86 c	3,32 b	3,05 a	2,91 a	0,0587	10,1

Médias seguidas por letras iguais são semelhantes (P<0,05) pelo teste Scott-Knott; EPM = erro padrão da média; CV = Coeficiente de variação.

Tabela 7. Produção de matéria seca (MS) fecal (kg/novilha/dia) mensurada por coleta total (CT) de fezes e estimada pelos indicadores internos MSi (MS indigestível), FDNi (fibra em detergente neutro indigestível) e FDAi (fibra em detergente ácido indigestível), e pelos indicadores externos Cr₂O₃ (óxido crômico), TiO₂ (dióxido de titânio) e LIPE[®]

CT	MSi	FDNi	FDAi	LIPE [®]	Cr ₂ O ₃	TiO ₂	EPM	CV(%)
2,52 a	3,14 b	3,42 c	3,22 b	2,52 a	2,38 a	2,42 a	0,0654	11,4

Médias seguidas por letras iguais são semelhantes (P<0,05) pelo teste Scott-Knott; EPM = erro padrão da média; CV = Coeficiente de variação.

Protocolo1 = Coleta de fezes realizada das 8:00 e 16:00 h durante 5 dias;
Protocolo 2 = Coleta de fezes realizada em seis horários alternados num intervalo de 3 dias

Em ambos os experimentos não houve interação indicador x protocolo (P>0,05). Os indicadores externos apresentaram estimativas de PMSF mais próximas das mensuradas por coleta total de fezes do que as obtidas a partir dos indicadores internos.

No experimento 1, apenas o indicador LIPE[®] apresentou média semelhante à coleta total ($P>0,05$), os demais indicadores apresentaram valores que diferiram ($P<0,05$) dos obtidos pela coleta total de fezes.

No experimento 2, os indicadores externos LIPE[®], Cr₂O₃ e TiO₂ apresentaram estimativas de PMSF que não diferiram da coleta total ($P>0,05$).

Os indicadores internos MSi, FDNi e FDAi superestimaram ($P<0,05$) a PMSF nos dois ensaios.

Resultados superestimados para os indicadores internos podem ser explicados por diversos fatores ou condições experimentais.

Conforme observado no presente estudo, Freitas *et al.* (2002) também observaram valores de PMSF superestimados em relação aos mensurados por coleta total para estimativa obtida da FDNi. Do mesmo modo, Oliveira Jr. *et al.* (2004) e Silva *et al.* (2009), ao avaliarem a acurácia dos indicadores internos em novilhos Nelore e novilhas Girolando, respectivamente, encontraram superestimacões da excreção fecal tanto para a FDNi como para a FDAi.

Assim como no presente estudo, pode-se observar que, a maioria das pesquisas que apresentam estimativas não acuradas para os indicadores internos foram relacionadas à superestimacão da produçao fecal.

A FDAi, por estar presente em menor concentraçao em amostras de alimentos, sobras e fezes, em relaçao aos demais indicadores internos, pode apresentar, proporcionalmente, erros mais elevados, constituindo elemento de deficiência em sua aplicaçao como indicador. Isto a torna mais sensível a erros sistemáticos decorrentes de falhas ou ausência de padronizaçao dos métodos analíticos (Detmann *et al.*, 2007).

No entanto, Rodrigues *et al.* (2010), trabalhando com ovinos, encontraram estimativas da PMSF com o uso da FDAi mais acuradas do que para as obtidas a partir da FDNi.

A falta de padronizaçao da técnica para utilizaçao dos indicadores internos, a forma de incubaçao (*in situ* ou *in vitro*) e as perdas de partículas pelos poros dos sacos de náilon podem ser as principais causas das variaçoes observadas na recuperaçao fecal de indicadores. Apesar da ampla utilizaçao dessa técnica,

ainda são necessários estudos para a padronização da determinação desses indicadores. Uma das principais causas que pode explicar a superestimação da produção fecal verificada neste trabalho, é a possível perda de partículas de fezes pelos poros dos *filter-bags* F57 durante a incubação *in situ*, ou mesmo durante as determinações da FDNi ou FDAi no equipamento ANKON. Outra possível explicação para essas perdas pode ser a diferença entre os tamanhos de partículas dos materiais incubados (LIPPKE *et al.*, 1986). Isto porque, as fezes moídas a 1 mm, podem conter partículas ainda menores, devido à sua maior fractabilidade. Ao passo que, em algumas amostras de alimentos moídas a 1 mm, como o feno, podem ser facilmente encontradas partículas maiores que 1 mm.

A perda de partículas pode ser o principal fator de comprometimento na exatidão dos resultados obtidos a partir de procedimentos de avaliação de alimentos *in situ* no rúmen. Ela pode potencialmente conduzir à obtenção de valores superestimados de degradabilidade e prejudicar a determinação das frações da MS rapidamente degradável e prontamente solúvel no ambiente ruminal (Casali *et al.*, 2009).

É possível observar ampla variação de resultados entre os indicadores internos observados nesse estudo e os encontrados em literatura. Conforme Berchielli *et al.* (2005), observações divergentes em vários estudos podem ser explicadas pelos indicadores internos apresentarem comportamento diferenciado de acordo com o volumoso avaliado. Segundo estes autores, em função de como é constituída a porção fibrosa de cada volumoso, pode haver diferenças na taxa e extensão de degradação.

O tempo de incubação ruminal também é uma variável de grande influência sobre a representatividade dos resíduos incubados *in situ* no rúmen (Casalli *et al.*, 2008). No presente trabalho foi utilizado *filter-bag* F57 da ANKOM e tempo de incubação de 264 h. Existem vários estudos em que foram utilizados sacos de náilon ou de TNT, e tempo de incubação de 144 h.

De acordo com Casalli *et al.* (2008), ainda não existe consenso quanto ao tempo ideal de incubação, que permita melhor representar as frações indigestíveis dos materiais incubados. Na literatura, observam-se tempos variáveis de incubação, tais como: 144 h (Berchielli *et al.*, 2000; Paziani *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2002;

Ítavo *et al.*, 2002; Oliveira Jr. *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2005; Casali *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010; Watanabe *et al.*, 2010), 192 h (Zeoula *et al.*, 2002), 240 a 264 h (Casali *et al.*, 2008) e 288 h (Torres *et al.*, 2009).

Casali *et al.* (2008) estudaram a influência do tempo de incubação ruminal *in situ* e do tamanho de partículas sobre as estimativas da MSi, FDNi e FDAi em alimentos e fezes bovinas. Foram comparadas moagens a 1, 2 ou 3 mm e tempos de incubação ruminal de 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 e 312 horas. As amostras foram acondicionadas em sacos de TNT. O tamanho de partícula associou-se positivamente ao tempo necessário para estimar a fração indigestível. Os autores sugeriram a utilização de partículas de 2 mm, por possibilitar maior precisão das estimativas, e tempos de incubação de 240 h para MSi e FDNi e de 264 h para FDAi. O tempo de incubação sugerido por esses autores foi o mesmo utilizado no presente trabalho. Porém, foram utilizados *filter-bags* F57 da ANKOM com moagem de 1 mm, que está de acordo com Casali *et al.* (2009).

Berchielli *et al.* (2000) realizaram estudo com os indicadores internos FDNi, FDAi e lignina, incubados *in vitro* por três e seis dias, e verificaram que somente a incubação por seis dias (144 h) apresentou resultado semelhante, na estimativa da digestibilidade, aos calculados a partir dos resultados da coleta total de fezes. Da mesma forma, Watanabe *et al.* (2010), ao estudar os indicadores internos FDNi e FDAi em bovinos Nelore, obtidos pelo procedimento *in vitro*, concluíram que a incubação por 144 horas possibilitou a obtenção de estimativas semelhantes dos coeficientes de digestibilidade dos nutrientes. No entanto, segundo Berchielli *et al.* (2000), incubações por tempos menores que 144 horas não reproduzem a real fração indigestível do indicador. Neste sentido, Casali *et al.* (2008) também alertaram para a necessidade do estabelecimento de tempos superiores de incubação aos comumente empregados. No entanto, os tempos necessários possuem grande variabilidade, conforme os indicadores e alimentos: de 87,8 h (MSi do farelo de trigo) a 268,6 h (FDNi em silagem de milho moída a 3 mm).

Nos estudos de Casali *et al.* (2008), o tamanho de partícula associou-se positivamente ao tempo necessário para estimar a fração indigestível,

dependendo do tipo de alimento incubado. Houve efeito dos tamanhos de partículas sobre a velocidade de degradação da MS da silagem de milho e do fubá de milho, da FDN da cana-de-açúcar, da silagem de milho e da palha de milho e sobre a velocidade de degradação da FDA da cana-de-açúcar.

Outro fator que pode explicar a baixa recuperação fecal dos indicadores internos é a taxa de passagem do alimento no trato digestivo associada ao tempo de permanência no ambiente ruminal. É possível que haja partículas dos alimentos que não foram totalmente digeridas devido à influência do trânsito do alimento no trato digestivo. Essas partículas foram coletadas nas amostras de fezes e inseridas no rúmen de um animal fistulado por 264 horas para contabilizar a MSi. Portanto, é possível que existam partículas que não foram digeridas anteriormente, mas seriam no segundo momento, pois durante a incubação, as amostras ficariam presas em contato com ambiente ruminal por tempo provavelmente muito maior e não seriam influenciadas pela taxa de passagem. Essa hipótese faria com que o teor de MSi nas fezes fosse reduzido e, em consequência, promoveria diminuição também nos teores de FDNi e FDAi, os quais levariam à superestimativas da PMSF, como foi observado nesse trabalho.

Além do tempo de incubação, Casali *et al.* (2009) destacaram a importância do tipo de saco utilizado nas incubações, e realizaram experimento comparando a determinação da FDNi *in situ* no rúmen, utilizando sacos de diferentes tecidos: náilon (50 μm); F57 (Ankom[®]); e tecido não-tecido (TNT – 100 g/m^2), sendo as amostras moídas a 1 mm e incubadas durante 144 horas, utilizando diferentes tipos de alimentos. Foi observado que as incubações obtidas com TNT e F57 resultaram em teores de FDNi similares e superiores, respectivamente, quando comparados aos obtidos a partir dos sacos de náilon. Isto pode ser explicado pelas possíveis perdas de partículas fibrosas quando empregado o náilon, devido à estrutura do seu tecido. Segundo esses autores, o F57 é recomendado para obtenção dos teores de FDNi pela técnica *in situ* em função da exatidão. O mesmo não foi observado no presente estudo com a aplicabilidade do F57, o que talvez possa estar relacionado às diferenças metodológicas ou pelo tipo de amostra incubada, já que o principal problema é a perda de partículas nas

amostras de fezes, e no experimento de Casali *et al.* (2009), foram incubadas apenas amostras de alimentos.

Outra fonte de variação inerente aos indicadores internos é a divergência de metodologias utilizadas na aplicação desse método. Neste sentido, Van Soest (1994) sugeriu que a utilização da FDAi e FDNi obtidas *in vitro* pode gerar estimativas mais precisas da digestibilidade, uma vez que a incubação ruminal por longos períodos de tempo pode resultar em influxo de partículas nos sacos de incubação, causando considerável variação nos resíduos.

Berchielli *et al.* (2005) realizaram estudo comparando diferentes metodologias de incubação (*in vitro* ou *in situ*) para determinação dos indicadores FDNi e FDAi em diferentes tipos de volumosos (silagem de milho, feno de Tifton-85 e cana-de-açúcar). Segundo esses autores, os resultados mostraram-se variáveis de acordo com cada volumoso, independentemente da metodologia empregada. Quando utilizado o feno de Tifton 85, as produções fecais estimadas pelos indicadores FDNi pelo método *in vitro* (FDNiv) e FDAi pelo método *in situ* (FDAis) não diferiram da obtida por coleta total. A FDAi *in vitro* (FDAiv) subestimou e a FDNi *in situ* (FDNis) superestimou a produção fecal em relação à coleta total. Para silagem de milho, apenas as estimativas obtidas por meio da FDAiv não diferiram da mensurada por coleta total. Quando utilizada cana-de-açúcar as estimativas de digestibilidade diferiram para a FDNiv e FDAiv. Possivelmente, a constituição da fibra de cada volumoso é importante variável que interfere na aplicabilidade dessa técnica, e pode afetar sua taxa e extensão de degradação (Berchielli *et al.*, 2005).

Detmann *et al.* (2001) ao conduzirem estudo utilizando os indicadores internos MSi, FDNi e FDAi, observaram que a FDAi demonstrou comportamento variável de acordo com o tipo de suplementação concentrada, sendo, em média, superior à FDNi e MSi, e inferior à DIVMS (digestibilidade *in vitro* da MS). Os demais indicadores mostraram resultados constantes entre os suplementos.

Em estudo realizado por Sampaio *et al.* (2011) foi avaliada a recuperação fecal dos indicadores MSi, FDNi, FDAi, Cr₂O₃ e TiO. Os animais foram alimentados com silagem de capim-elefante, silagem de milho ou feno de capim-braquiária, suplementados ou não com 20% de mistura concentrada. Em todos os indicadores a recuperação fecal não diferiu de 100% e não foram observados

efeitos de forragem, nível de concentrado ou de sua interação sobre as estimativas de recuperação fecal, tanto dos indicadores internos quanto dos externos. Todavia, Ferreira *et al.* (2009a) encontraram diferenças nas recuperações fecais dos indicadores FDNi e FDAi de acordo com a dieta. Ao trabalhar com novilhas alimentadas com cana-de-açúcar com 1% de ureia/sulfato de amônio e concentrado (1% do peso vivo) a FDNi apresentou estimativas de produção fecal que não diferiram da coleta total, ao passo que a FDAi apresentou estimativas de digestibilidade dos nutrientes subestimadas. Resultados divergentes foram observados nesse mesmo estudo, quando utilizadas vacas em lactação alimentadas com silagem de milho e 4 kg de concentrado. Neste último estudo, foi verificado possível efeito do teor de concentrado na dieta com a recuperação fecal dos indicadores internos.

Podem-se observar na literatura diversas justificativas que tentam explicar as causas das baixas acurácias estimadas pelos indicadores MSi, FDNi e FDAi. Ainda não foi possível garantir exatidão em todas as justificativas apresentadas, devido à diversidade de resultados observados.

O óxido crômico permitiu estimativas de PMSF diferentes ($P < 0,05$) ou semelhantes ($P > 0,05$), respectivamente, nos experimentos 1 (Tab. 6) e 2 (Tab. 7).

Diversos autores encontraram resultados satisfatórios para utilização do Cr_2O_3 e recomendaram sua utilização (Oliveira Jr. *et al.*, 2004; Kozloski *et al.*, 2006; Myers *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2010; Sampaio *et al.*, 2011).

Sampaio *et al.* (2011) conduziram estudo sobre o emprego do Cr_2O_3 e encontraram resultados de recuperação fecal de 99,5%. Kozloski *et al.* (2006) observaram resultados acurados ao estimar a PMSF utilizando o Cr_2O_3 como indicador em bovinos sob condição de pastejo. Da mesma forma, Ferreira *et al.* (2009), ao estimar a digestibilidade da MS, PB, FDN, EE e NDT, utilizando o óxido crômico como indicador, encontraram estimativas muito próximas das obtidas a partir do método de coleta total de fezes.

Ferreira *et al.* (2009b) ao avaliar o consumo individual de concentrado para animais alimentados em grupo, destacaram o Cr_2O_3 como uma boa opção.

Hardison *et al.* (1955) realizaram estudo avaliando efeitos da alimentação sobre a recuperação fecal do Cr_2O_3 e não observaram relação significativa entre a concentração fecal desse indicador com o tempo de alimentação e as condições do experimento.

Por outro lado, vários autores obtiveram resultados insatisfatórios com o emprego do Cr_2O_3 como indicador (Titgemeyer *et al.*, 2001; Patterson *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2003; Moraes, 2007; Peter *et al.*, 2007; Barros *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010), atribuídos às superestimativas de recuperação fecal (Titgemeyer *et al.*, 2001) ou à baixa recuperação fecal (Patterson *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2009).

Silva *et al.*, (2010) ao realizarem experimento com novilhas Holandês x Zebu, mantidas em confinamento, constataram que óxido crômico produziu resultados subestimados para o consumo de matéria seca, independente da dieta fornecida.

Soares *et al.* (2003) realizaram estudo comparando valores de digestibilidade obtidos a partir do óxido crômico com aqueles calculados da coleta total e observaram subestimativas em virtude da elevada produção fecal estimada pelo indicador. O mesmo foi observado por Barros *et al.* (2009), os quais estimaram a PMSF fecal utilizando óxido crômico e encontraram valores superestimados em relação aos mensurados por coleta total.

Peter *et al.* (2007) testaram o óxido crômico para estimar fluxos intestinais de nutrientes e verificaram que esse indicador subestimou fluxos intestinais de fibra. Todavia, esses autores encontraram resultados satisfatórios para FDNi e recomendam sua utilização nesta ocasião.

A maioria dos estudos que apresentam resultados insatisfatórios para o Cr_2O_3 são devido à superestimativa da PMSF, em virtude da baixa recuperação do indicador nas fezes. Isto pode ocorrer em função da incompleta homogeneização deste na digesta ruminal, passagem mais rápida pelo rúmen que o material fibroso, possibilidade de acúmulo em algum segmento do aparelho digestório, e variação diurna nas concentrações (Berchielli *et al.*, 2005). Outra importante causa pode ser decorrente de erros de análise química.

Assim como para os indicadores internos estudados neste trabalho, para o Cr_2O_3 também foram encontrados resultados muito divergentes na literatura.

O método analítico de dosagem pode evidenciar baixa recuperação fecal do cromo. Além disso, o método utilizado para determinação de cromo nas fezes pode ser duvidoso e tedioso devido à técnica analítica. No momento da leitura, o cromo é um elemento altamente dependente da chama do espectrofotômetro, e são comuns variações na sua determinação (Soares *et al.*, 2003). Talvez essa possa ser importante justificativa para o Cr_2O_3 apresentar resultados muito divergentes na literatura.

A principal dificuldade das análises foi observada durante a realização das leituras no equipamento de espectrofotometria de absorção atômica, uma vez que, este aparelho apresenta elevada sensibilidade. Além disso, é muito sensível a erros de análise, requer manutenção periódica e o auxílio de técnicos especializados nesta função, no momento das leituras, o que não é observado em todas as instituições de pesquisa.

Conforme Neto (1996), os espectrofotômetros de absorção atômica são acompanhados por manual de métodos analíticos, que contêm todos os parâmetros de operação do equipamento (comprimento de onda, fenda, tipo de chama etc., para cada elemento). Ao manusear este aparelho, o operador deve ter rigoroso controle. Deve-se verificar adequada relação combustível/comburente, rigoroso controle no preparo dos padrões e calibração do aparelho, verificar ajuste dos queimadores, qualidade da chama, ajuste do comprimento de onda e identificar possíveis interferências como, por exemplo, a presença do elemento ferro nas amostras, o qual pode causar interferência química no momento da leitura do cromo (Neto, 1996).

Apesar das diversas limitações e condições relatadas para o Cr_2O_3 , ele apresentou no segundo ensaio resultados acurados e menos dependentes das condições experimentais, porém, foi o indicador que exigiu maior nível de controle na etapa de análise química. Portanto, é preciso analisar todas as condições de trabalho antes da escolha do indicador.

O emprego do TiO_2 neste trabalho apresentou comportamento semelhante ao Cr_2O_3 ($P > 0,05$). Além disso, resultou em estimativas semelhantes ($P > 0,05$) às

mensuradas por coleta total no experimento 2 (Tab.7). Vários autores afirmaram que o dióxido de titânio apresentou recuperações fecais satisfatórias, sendo recomendada sua utilização em ensaios de digestibilidade (Titgemeyer *et al.*, 2001; Myers *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2009a; Sampaio *et al.*, 2011).

Foi observado que as pesquisas acerca desse indicador são mais recentes que para o Cr_2O_3 . Portanto, é destacável a importância dos estudos sobre sua utilização, principalmente as vantagens em relação ao Cr_2O_3 , o qual ainda é o indicador tradicionalmente mais utilizado em ensaios de digestibilidade de ruminantes no Brasil.

Titgemeyer *et al.* (2001) estimaram recuperações fecais do dióxido de titânio que variaram de 90% a 95%. Os autores destacaram que mais pesquisas fazem-se necessárias para determinar sua utilidade em ensaios de digestibilidade. Possui vantagem em relação ao óxido de cromo, pois pode ser adicionado legalmente as dietas, já que o TiO_2 não possui propriedades carcinogênicas (Myers *et al.*, 2006), e também por ser atualmente aprovado como aditivo dietético pelo FDA (EUA), o que não é aplicável ao Cr_2O_3 (Lopes, 2007).

O óxido crômico está na forma trivalente e não é absorvido pela membrana celular nem reativo com o DNA, todavia, o cromo hexavalente, presente em dicromatos é altamente reativo e solúvel nas membranas. A solubilização do cromo para posterior quantificação laboratorial forma dicromatos, o que torna indispensável o cuidado com o manuseio e o descarte do resíduo de análise (Vasconcellos *et al.*, 2007). Neste sentido, Myers *et al.* (2006) apontaram preocupações com propriedades cancerígenas do Cr_2O_3 e riscos à saúde se o indicador for inalado. Lopes (2007) relatou a importância das medidas e equipamentos de segurança durante o manuseio desse indicador, ou mesmo na ocasião da moagem de amostras de digesta e de fezes dos animais cujo indicador foi administrado.

Ferreira *et al.* (2009a) realizaram experimento com vacas em lactação alimentadas com silagem de milho e concentrado, utilizando o dióxido de titânio como indicador. Foi observado que as digestibilidades de todos os nutrientes não diferiram daquelas obtidas a partir do método da coleta total

Ferreira *et al* (2009b) relataram boas estimativas também para o consumo de concentrado, utilizando os indicadores óxido crômico e dióxido de titânio em vacas de lactação.

Conforme observado na Tab. 6, no primeiro experimento o TiO_2 apresentou média de produção fecal que diferiu ($P < 0,05$) da obtida a partir do método de coleta total. E, conforme observado para o Cr_2O_3 , também o TiO_2 apresentou resultados com comportamentos diferentes entre os dois ensaios. Titgemeyer *et al.* (2001) observaram que a recuperação fecal do TiO_2 variou em função das características da dieta. Quando os animais foram alimentados à base de feno *ad libitum* e concentrado, obtiveram taxas de recuperação fecal de 93%, a qual foi satisfatória para estimar a digestibilidade. Porém, ao trabalhar com dietas à base de silagem de milho *ad libitum*, a estimativa de recuperação fecal foi insatisfatória.

Glindemann *et al.* (2009) também encontraram influência da dieta ao avaliarem o indicador TiO_2 em ovinos adultos. A recuperação do TiO_2 foi maior ($P < 0,001$) em dietas à base de feno do que naquelas baseadas em feno e concentrado (1,08% e 0,99%, respectivamente).

Sampaio *et al.* (2011) ao estudarem o efeito de diferentes planos de alimentação sobre a recuperação fecal do TiO_2 e Cr_2O_3 em bovinos alimentados com silagem de capim elefante, silagem de milho ou feno de *Brachiaria* suplementadas ou não com 20% de concentrado, não observaram efeito da forragem ou nível de concentrado sobre a recuperação fecal. As recuperações fecais observadas para o TiO_2 e Cr_2O_3 foram de 101,95 e 99,5%, respectivamente.

No experimento 1, como o consumo dos animais foi *ad libitum* com participação de volumoso e concentrado na dieta, a taxa de passagem dos alimentos no trato digestivo pode ter sido supostamente maior que a das novilhas no experimento 2. Isso pode ocasionar diferença na concentração do indicador nas fezes de acordo com o fluxo da digestão se comparado ao segundo experimento, o que também pode justificar comportamentos diferentes como ocorreu para os indicadores TiO_2 e Cr_2O_3 . Mesmo não sendo possível comparar na mesma análise de variância os dois experimentos, pode-se observar comportamentos que diferiram entre os ensaios para esses dois indicadores, o que é possível indicar que o TiO_2 e Cr_2O_3 sofreram influências das condições experimentais de cada ensaio.

A LIPE[®] apresentou nos dois experimentos valores de produção fecal semelhantes ($P>0,05$) aos obtidos a partir do método de coleta total (Tab. 6 e 7).

Resultados satisfatórios acerca da utilização da LIPE[®] também foram apresentados por vários autores (Silva *et al.*, 2006; Moraes, 2007; Silva *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009a; Ferreira *et al.*, 2009b; Silva *et al.*, 2010).

Ferreira *et al.* (2009a) realizaram dois experimentos utilizando LIPE[®] como indicador. No primeiro trabalharam com novilhas alimentadas com cana-de-açúcar com 1% de ureia/sulfato de amônio e concentrado (1% do peso vivo), e no segundo, com vacas em lactação alimentadas com silagem de milho e 4 kg/dia de concentrado. Nos dois experimentos, as digestibilidades dos nutrientes estimadas a partir da LIPE[®] não diferiram das obtidas pelo método de coleta total de fezes.

Silva *et al.* (2010) avaliaram a utilização de indicadores para estimar o consumo em novilhas em confinamento alimentadas com quatro diferentes dietas: silagem de capim elefante, silagem de capim elefante e concentrado comercial, cana-de-açúcar picada e ureia, cana-de-açúcar picada, ureia e concentrado comercial. Independente da dieta a LIPE[®] apresentou estimativas de consumo que não diferiram das mensuradas diretamente no cocho. Os autores relataram que o Cr_2O_3 subestimou o consumo das novilhas em todas as dietas avaliadas.

Silva *et al.* (2006) destacaram a importância da LIPE[®] como indicador, pois o mesmo apresentou estimativas semelhantes às obtidas por coleta total de fezes, e produziu resultados de menor variabilidade se comparados aos estimados pelo Cr_2O_3 , mostrando ser um indicador com maior sensibilidade às mudanças no consumo e, conseqüentemente, na produção fecal das novilhas.

A LIPE[®] é promissora e pode ser utilizada em estudos de digestibilidade em ruminantes, haja vista que, a metodologia de apenas um fornecimento diário seguida por duas coletas no dia facilita a aplicação do método, exigindo menos mão de obra e menor necessidade de contenção dos animais.

Apesar da LIPE[®] ser boa opção como indicador, também são observadas algumas limitações a seu respeito. A metodologia de análise é restrita ao fabricante, o que torna difícil realizar estudos e considerações acerca das análises

laboratoriais, além de constituir limitação para utilização desse indicador em estudos conduzidos em regiões distantes do local de fabricação e análise.

Nas Tabelas 8 e 9, verificam-se as estimativas médias de PMSF em função dos diferentes protocolos para os experimentos 1 e 2, respectivamente.

Tabela 8. Produção de matéria seca (MS) fecal (kg/novilha/dia) obtida por dois protocolos de coleta de fezes de novilhas alimentadas com feno de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85 e concentrado (70:30, base MS)

Protocolo 1	Protocolo 2	EPM	CV(%)
3,44	3,55	0,0396	12,7

Médias seguidas por letras iguais são semelhantes ($P < 0,05$) pelo teste Scott-Knott; EPM = erro padrão da média; CV = Coeficiente de variação.

Protocolo 1 = Composta de coletas realizadas duas vezes ao dia (08h e 16h) durante cinco dias.

Protocolo 2 = Composta de coletas realizadas em intervalos de 4h (04h, 08h, 12h, 16h, 20h e 24h) ao longo de três dias.

Tabela 9. Produção de matéria seca (MS) fecal (kg/novilha/dia) obtida por dois protocolos de coleta de fezes de novilhas alimentadas com feno de *Cynodon dactylon* cv. Tifton 85

Protocolo 1	Protocolo 2	EPM	CV(%)
2,83	2,78	0,0397	13,0

Médias seguidas por letras iguais são semelhantes ($P < 0,05$) pelo teste Scott-Knott; EPM = erro padrão da média; CV = Coeficiente de variação.

Protocolo 1 = Composta de coletas realizadas duas vezes ao dia (08h e 16h) durante cinco dias.

Protocolo 2 = Composta de coletas realizadas em intervalos de 4h (04h, 08h, 12h, 16h, 20h e 24h) ao longo de três dias.

Nos dois ensaios não foi observada diferença ($P < 0,05$) entre as médias de produção fecal estimadas pelos dois protocolos avaliados.

A diferença no número de dias e horários utilizados para a coleta de fezes poderia representar variações na taxa de excreção dos indicadores com relação aos períodos diurno e noturno. Essa diferença, possivelmente, poderia estar relacionada com a dieta e com o momento do seu fornecimento aos animais, já que as coletas das 8 h e 16 h coincidem com o momento do fornecimento da dieta e dos indicadores. Contudo, nenhuma diferença foi observada entre as duas metodologias de coleta.

Alguns autores afirmaram ser possível trabalhar com menor quantidade de dias de coleta para os mesmos indicadores avaliados neste estudo (Pina *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2009a).

Avaliando diferentes protocolos de coletas de fezes, Kozloski *et al.* (2006), realizaram trabalho similar ao do presente estudo, com objetivo de avaliar a variação na concentração de cromo nas fezes em função dos horários de coletas em bovinos em pastejo. Segundo esses autores, as concentrações de cromo variaram ao longo do dia. No entanto, as estimativas de excreção baseadas em duas amostragens diárias (no início da manhã e final da tarde) foram representativas e não diferiram daquelas obtidas em intervalos de 4 h no período de 24 h.

Conforme Hardison *et al.* (1955), efetuar mais que duas coletas diárias de fezes pode permitir reduzir ainda mais a variabilidade de excreção do Cr_2O_3 . Porém, duas coletas diárias podem ser mais aconselháveis, por não diferir e simplificar o trabalho.

A forma tradicional de coleta do Protocolo 1 (8 h e 16 h) pode não ter diferido daquela realizada pelo protocolo de horários alternados (Protocolo 2), pois as amostras compostas de fezes do Protocolo 1 podem representar a média da concentração diária do indicador (coleta no início da manhã e final da tarde), sem precisar realizar mais que duas coletas num intervalo de 24 h, conforme relataram vários autores (Hardison *et al.*, 1955; Kozloski *et al.* 2006; Myers *et al.*, 2006).

Dois coletas diárias também foram sugeridas por Myers *et al.* (2006), que ao realizarem estudo visando avaliar eventuais diferenças nos padrões de excreção dos indicadores Cr_2O_3 e TiO_2 em ovinos, coletaram amostras de fezes em intervalos de 6 h e não encontraram interação significativa entre indicador x

tempo. Os autores concluíram que amostras podem ser coletadas duas vezes ao dia ou com intervalos de 12 h.

O Protocolo 1 foi escolhido para avaliação neste estudo porque é tradicionalmente o mais utilizado. Contudo, no Protocolo 1, as coletas foram realizadas durante cinco dias e no Protocolo 2, apesar de ser em horários alternados, foi proposta duração de três dias. Avaliando a quantidade de dias para coleta de fezes, como não foi observada diferença entre os protocolos, pode-se optar por três ou cinco dias.

Ferreira *et al.* (2009a) concluíram que três dias são suficientes para o FDNi, LIPE[®], óxido crômico e dióxido de titânio, enquanto que Pina *et al.* (2006) afirmaram que até mesmo dois dias de coleta seriam suficientes para os indicadores FDNi e FDAi em vacas da raça Holandês, alimentadas com 60% de silagem de milho suplementada com concentrados.

Na comparação geral entre os dois protocolos, eles não diferem, o que pode indicar que um protocolo não é melhor que o outro. Portanto, o pesquisador pode optar pela escolha dos protocolos de acordo com a situação de cada experimento.

De acordo com todos os resultados e observações deste trabalho, é possível afirmar que não existe um indicador perfeito, todos apresentaram limitações. Todavia, alguns apresentaram resultados mais satisfatórios como foi observado para o Cr₂O₃, TiO₂ e, principalmente, a LIPE[®], o que torna possível seu emprego em estudos de digestibilidade em ruminantes.

5. CONCLUSÕES

Os indicadores internos matéria seca indigestível, fibra em detergente neutro indigestível, fibra em detergente ácido indigestível superestimam a produção de matéria seca fecal.

Os indicadores externos dióxido de titânio e óxido crômico podem ser recomendados para estimação da produção de matéria seca fecal de novilhas em situações específicas, enquanto que a LIPE[®] pode ser amplamente utilizada.

A escolha pelo protocolo de realizar duas coletas de fezes ao dia (08h e 16h) durante cinco dias, ou seis coletas de fezes em intervalos de 4h ao longo de três dias, fica a critério do pesquisador e das condições da pesquisa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, E.E.L.; FONTES, C.A.A.; DETMANN, E. *et al.* Vícios na estimação da excreção fecal utilizando indicadores internos e óxido crômico em ensaios de digestão com ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, n.10, p.2015-2020, 2009

BERCHIELLI, T.T.; ANDRADE, P.; FURLAN, C.L. Avaliação de indicadores internos em ensaios de digestibilidade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, n.3, p.830-833, 2000.

BERCHIELLI, T.T.; OLIVEIRA, S.G.; CARRILHO, E.N.V.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.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, V. A.; OLIVEIRA, S. G. *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: Funesp, 2006. 583 p.

CABRAL, L.S.; VALADARES FILHO, S.C.; DETMANN, E. *et al.* Avaliação de indicadores na estimação da excreção fecal e da digestibilidade em ruminantes. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.9, n.1, p.29-34 2008.

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.

CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. *et al.* Estimação de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.38, n.1, p.130-138, 2009

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, n.5, p.1476-1483, 1986.

DETMANN, E.; SOUZA, R.; GARCIA, S.C. *et al.* Avaliação do vício de “tempo longo” de indicadores internos em ensaio de digestão com ruminantes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia*, v.59, n.1, p.182-188, 2007.

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, n.5, p.1600-1609, 2001.

DIAS, M.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. *et al.* Técnicas para estimativa da digestibilidade e produção microbiana em bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*., v.37, n.3, p.504-512, 2008.

FERREIRA, D.F. *Sistema de análise de variância – SISVAR*. Lavras: DEX/UFLA, versão 4.3 (Build 45), 1999-2003.

FERREIRA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; MARCONDES, M.I. *et al.* Avaliação de indicadores em estudos com ruminantes: digestibilidade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, n.8, p.1568-1573, 2009a.

FERREIRA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; COSTA E SILVA, L.F. *et al.* Avaliação de indicadores em estudos com ruminantes: estimativa de consumos de concentrado e de silagem de milho por vacas em lactação . *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, n.8, p.1574-1580, 2009b

FREITAS, D.; BERCHIELLI, T.T.; SILVEIRA, R.N. *et al.* Produção fecal e fluxo duodenal de matéria seca e matéria orgânica estimados por meio de indicadores. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.31, n.3, p.1521-1530, 2002.

GLINDEMANN, B.M. WANG, C.; ALVERS, S. *et al.* Avaliação do Dióxido de titânio como indicador utilizado nas estimativas de excreção fecal em ovinos em pastejo. *Animal Feed Science and Technology*, v.152, n.3, p.186-197, 2009.

HARDISON, W.A.; ENGEL, B.W.; LINKOUS, W.N. *et al.* Fecal chromic oxide concentration in 12 dairy cows as related to time and frequency of administration and to feeding schedule. *The Journal Nutrition*. p. 11-17. 1955.

ÍTAVO, L.C.V.; VALADARES FILHO, S.C. SILVA, F.C.F.; VALADARES, R.F.D. Comparação de Indicadores e Metodologia de Coleta para Estimativas de Produção Fecal e Fluxo de Digesta em Bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.31, n.4, p.1833-1839, 2002

KOZLOSKI, G.V.; NETTO, D.P.; OLIVEIRA, L. *et al.* Uso de óxido de cromo como indicador da excreção fecal de bovinos em pastejo: variação das estimativas em função do horário de amostragem. *Ciência Rural*, v.36, n.2, p.599-603, 2006.

LADEIRA, J.S. RIBEIRO, T.M. GONSALVES, SC. *et al.* Estudo comparativo do consumo alimentar entre grupos genéticos zebuínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44., 2007, Jaboticabal. *Anais...* Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2007. CD-ROM.

LANÇANOVA, J.A.C. OLIVEIRA, M.D.S. PACOLA, L.J. *et al.* Digestibilidade dos nutrientes de uma ração completa, em bovinos de diferentes grupos genéticos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.37, n.3, p.421-426, 2002.

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

LOPES, F.C.F. Determinação do consumo de forrageiras tropicais por vacas em lactação em condição de pastejo. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n. 52, p.1-116, 2007.

MACHADO, A.S.; GODOY, M.M.; MOREIRA, M.L. *et al.* Utilização de óxido crômico e LIPE® como indicadores externos na estimativa de digestibilidade em ruminantes. *PUBVET*, v. 5, n. 20, ed. 167, Art.1124, 2011.

MARAIS, J.P. Use of markers. In: J.P.F. Mello (ed.) *Farm animal metabolism and nutrition*. CABI Publ., Wallingford, p. 255–277, 2000.

MARCONDES, M.I. VALADARES FILHO, S.C. BRITO. A.F. *et al.* Uso de indicadores para estimar a produção de matéria seca fecal e avaliar o consumo individual de concentrado e volumoso em novilhas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. *Anais...* João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2006a. CD-ROM.

MENDES, A.R.; BERTOCCO, J.M.; ROSEMARY, L.G.R. *et al.* Consumo e digestibilidade aparente total e parcial de dietas utilizando farelo de girassol e três fontes de energia em novilhos confinados. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.34, n.2, p.611-623, 2005.

MORAES, S.A. *Subprodutos da agroindústria e indicadores externos de digestibilidade aparente em caprinos*. 2007. 57f. Tese, (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte MG.

MYERS, W.D.; LUDDEN, P.A.; NAYIGINUGU, V. *et al.* Technical Note: a procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *Journal of Animal Science*, v.82, n.1, p.179-183, 2004.

MYERS, W.D.; LUDDEN, P.A.; NAYIGIHUGU, V. *et al.* Excretion patterns of titanium dioxide and chromic oxide in duodenal digesta and feces of ewes. *Small Ruminant Research*, v.63, p.135–141, 2006.

NETO, E.O. *Espectrofotometria de absorção atômica*. Belo Horizonte UFMG. 1996, p.146.

NUTRIENT requirements of dairy cattle. Washington: National Research Council, 7. ed., 2001. 381p

OLIVEIRA Jr., R.C.; PIRES, A.V.; RESENDE, J.J. *et al.* avaliação de indicadores para estimar a digestibilidade dos nutrientes em novilhos Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.3, p.749-758, 2004.

PAZIANI, S.F.; BERCHIELI, T.T.; ANDRADE, P. Digestibilidade e degradabilidade de rações à base de milho desintegrado com palha e sabugo em diferentes graus de moagem. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.30, n.5, p.1630-1638, 2001.

PETER, L.; WEISBJERG, M.R.; HVELPLUND, T. Determination of digestibility of different forages in dairy cows. *Acta Agriculturae scand section A*, v.57, p.16–29, 2007.

PINA, S.D.; VALADARES FILHO, S.C.; DETMANN, E. *et al.* Efeitos de indicadores e dias de coleta na digestibilidade dos nutrientes e nas estimativas do valor energético de alimentos para vacas alimentadas com diferentes fontes de proteína. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, n.6, p.2461-2468, 2006.

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

RODRIGUEZ, N.M. SALIBA, E.O.S, Guimaraes Jr., 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, 2006. CD-ROM.

SALIBA, E.O.S.; RODRIGUEZ, N.M.; MORAIS, S.A.L. *et al.* Ligninas – Métodos de obtenção e caracterização química. *Ciência Rural*, v.31, n.5, p.917-928, 2001.

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

SILVA, A.G.M. BORGES, I. NEIVA, J.N. *et al.* Avaliação do lipe como indicador externo de digestibilidade em ovinos recebendodietas com torta de babaçu. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 1., 2008, Fortaleza *Anais...* Fortaleza: UFC, 2008. CD-ROM.

SILVA, F.F.; AGUIAR, C.M.; VELOSO. A.J.V. *et al.* Produção fecal e digestibilidade estimada por indicadores internos comparados a coleta total. *Archivos de Zootecnia.*, v.58, n.224, p.741-744. 2009.

SILVA, J.S.; QUEIROZ, A.C. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos.* 3.ed. Viçosa: UFV, 2002. 235p.

SILVA, J.J.; SALIBA, E.O.S.; AROEIRA, B.J.M. *et al.* Estimativa da produção fecal de novilhas leiteiras mantidas em diferentes sistemas de pastejo pela utilização dos indicadores externos óxido crômico e lipe. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa, *Anais...*: João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2006. CD-ROM.

SILVA, J.J.; SALIBA, E.O.S.; SIMÕES, E.O. *et al.* Indicadores para estimativa de consumo total por novilhas holandês x zebu mantidas em confinamento. *Revista Brasileira de Saúde e Produção. Animal*, v.11, n.3, p.838-848, 2010.

SOARES, J. P.; BERCHIELLI, T.T.; AZEVEDO Jr., M.A. Comparação das técnicas do óxido crômico e da coleta total de fezes na determinação da digestibilidade em bovinos. *ARS veterinaria*, v.19, n.3, p.280-287, 2003.

SOARES, L.F.P.; GUIM, A.; FERREIRA, M.A. *et al.* Avaliação de indicadores para estimativa digestibilidade da matéria seca em bubalinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 19., 2009, Águas de Lindóia. *Anais... Águas de Lindóia*: Associação Brasileira de Zootecnistas, 2009. CD-ROM.

TITGEMAYER, E.C.; ARMENDARIZ, C.K.; BINDEL, D.J. *et al.* Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *Journal of Animal Science*, v.79, p.1059-1063, 2001.

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

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

VASCONCELLOS, R.S, CARCIO, L.D.; OLIVEIRA, F. *et al.* Utilização de indicadores para estimar a digestibilidade aparente em gatos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.2, p.466-472, 2007.

WATANABE, P EZEQUIEL, J.M.; GALATI, R.L. *et al.* Indicadores internos indigestíveis para a estimativa das digestibilidades de dietas à base de coprodutos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção. Animal*, v.11, n.3, p.849-857, 2010.

WILLIAMS, C.H.; DAVID, D.J.; IISMAA, O. The determination of chromic oxide in feces 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. Recuperação fecal de indicadores internos avaliados em ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.31, n.4, p.1865-1874, 2002.