

## 1. INTRODUÇÃO

As forragens representam uma enorme gama de alimentos que permitem a obtenção de produtos de origem animal (carne, leite, lã, couro) com os custos mais baixos. No entanto, como mencionado por Beever & Mould (2000), a grande diversidade de forragens representa ao mesmo tempo oportunidades e desafios para a utilização destes alimentos nas dietas de ruminantes. A diversidade mencionada pelos pesquisadores acima não apenas se refere à enorme quantidade de espécies com potencial forrageiro mas também às grandes variações encontradas para uma mesma espécie forrageira.

Enquanto nutricionistas de monogástricos podem rotineiramente recorrer ao uso de tabelas de composição de alimentos para o balanceamento de rações com certa segurança, os nutricionistas de ruminantes devem considerar que ao menos uma fonte alimentar deverá ser uma forrageira e, embora haja muitas tabelas de composição, as variações encontradas nestas plantas são enormes, principalmente em se tratando de forrageiras tropicais.

Além disto, a avaliação de forragens para nutrição de ruminantes deve considerar que o seu valor nutritivo depende, além de sua composição, de vários outros fatores que atuam simultaneamente e que resultarão, ao final, no desempenho animal. Analisar isoladamente estes fatores não é simples, pois, na maioria das vezes, eles são interdependentes e, fora do contexto, são pouco significativos.

Neste trabalho, apenas para facilidade de discussão, estes fatores serão abordados separadamente, mas a relação entre eles é a pedra fundamental desta pesquisa.

Os principais fatores nutricionais que interferem direta ou indiretamente no desempenho relacionam-se à dieta do animal (Figura 1).

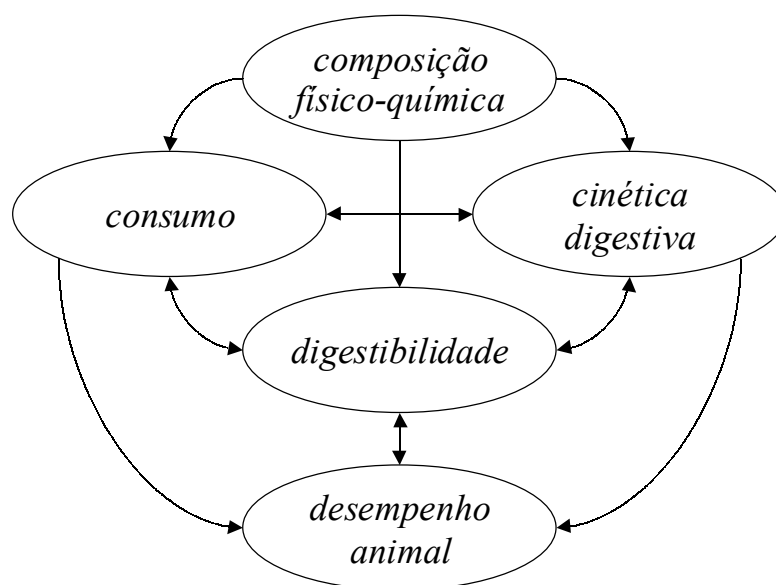


Figura 1. *Esquema de interdependência entre os fatores nutricionais que resultam no desempenho animal*

Dentre os fatores dietéticos que atuam no desempenho animal, conforme esquematicamente descrito na Figura 1, a composição físico-química dos alimentos que compõem a dieta, o consumo voluntário, as cinéticas de degradação e de digestão e a digestibilidade do alimento são aqueles que mais vezes são citados como limitantes nutricionais à produção animal.

Diversas técnicas foram propostas para estudar cada fator, mas normalmente, são empregadas isoladamente. Algumas são mais conhecidas e difundidas, outras, seja pela complexidade, pelo custo ou pela necessidade de infra-estrutura especial, são menos conhecidas.

Para avaliar estes aspectos ligados à avaliação de alimentos para ruminantes, neste trabalho foram utilizadas diversas técnicas, sendo que, para medir os mesmos parâmetros, intencionalmente foi utilizada mais de uma técnica. Isto foi feito para poder compreendê-las e compará-las. Ao conhecer uma técnica, talvez o ponto mais importante para o pesquisador seja compreendê-la e ter ciência de suas limitações. Só assim, os resultados podem ser interpretados com maior segurança.

O objetivo deste trabalho foi a avaliação de fenos de valores nutritivos distintos na nutrição de ovinos quanto à capacidade de síntese microbiana e à cinética digestiva, através de ensaios *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, baseados em metodologias convencionais e nucleares.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

Durante a evolução da avaliação de alimentos, diversas técnicas foram criadas com o intuito de prever o desempenho animal a partir de certas características dos alimentos fornecidos na dieta.

Indubitavelmente, a melhor forma de avaliar um alimento, seja ele volumoso ou concentrado, é a performance animal. Características dos alimentos para ruminantes, como consumo, digestibilidade, e eficiência de utilização dos nutrientes, são determinantes para o bom desempenho animal. Cerca de 60 a 90 % da energia digestível dos alimentos dependem destas características (Mertens, 1994). Porém, experimentos *in vivo* para caracterizar o real valor nutritivo dos alimentos são dispendiosos e carecem de grande quantidade de alimento.

### **2.1. Caracterização química dos alimentos para ruminantes**

Certas frações químicas dos alimentos estão intimamente associadas com o consumo e a digestibilidade, incluindo as fibras, a lignina e a proteína (Cherney, 2000). O sistema rotineiro de caracterização química fornece subsídios para formar uma primeira idéia do aproveitamento que o alimento poderia ter na alimentação animal. Quando, porém, este sistema é usado isoladamente para a predição do desempenho animal, os resultados são bastante contestáveis.

Na nutrição de ruminantes, dois são os principais sistemas de caracterização química dos alimentos (Figura 2): o sistema proximal, também conhecido como

Weende, e o sistema das fibras, também conhecido como Van Soest.

As análises do sistema de Weende têm sido usadas por quase 150 anos e os procedimentos são seguidos conforme a Association of Official Agricultural Chemists (AOAC, 1995). O sistema de Van Soest é mais recente e foi descrito por Van Soest & Wine (1967). As frações que cada sistema avalia podem ser observadas na Figura 2.

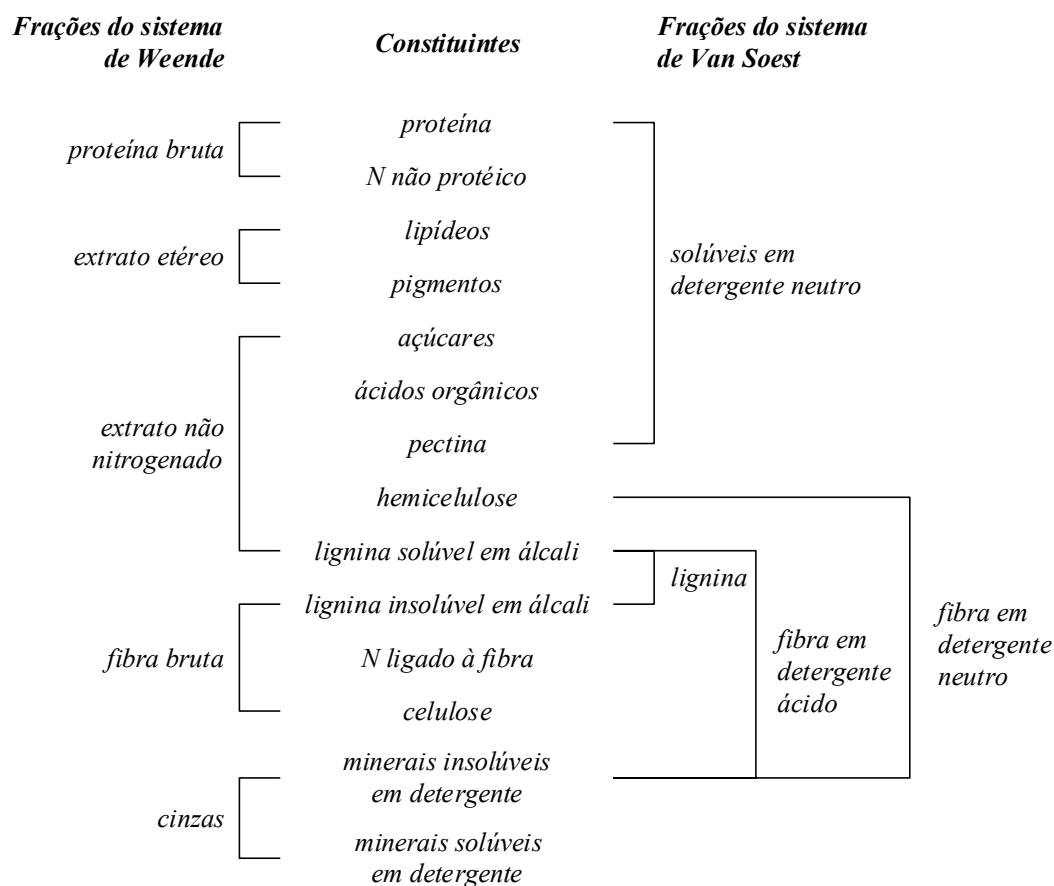


Figura 2. Comparação entre os sistemas de Weende e de Van Soest para caracterização química dos alimentos

Ambos sistemas têm suas deficiências e não cabe aqui pormenorizá-las. O mais importante, segundo a visão mais recente dos pesquisadores (Cherney, 2000;

Chesson, 2000), é o conhecimento do real significado das frações apresentadas por estes sistemas. A caracterização feita por estas técnicas provê os pesquisadores e nutricionistas de dados incontestes de quantidades de nutrientes que podem ser oferecidas aos animais quando estes são alimentados, mas o aproveitamento destes nutrientes pelos animais é praticamente impossível de ser predito apenas através destas análises.

Outras técnicas físico-químicas vêm sendo testadas para a avaliação da composição de alimentos como, por exemplo, as técnicas de espectroscopia de alta (NMR, MIR, PyMS) ou de baixa (NIR, UV) resolução (Deville & Flinn, 2000; Himmelsbach, 2000).

## **2.2. Exigências nutricionais de ovinos**

Para formulação de dietas para atender as exigências nutricionais de ovinos, normalmente são utilizadas tabelas de composição dos alimentos e de exigências nutricionais das diversas categorias animais, como por exemplo, as publicações “Nutrient requirements of sheep” (National Research Council - NRC, 1985) e “The nutrient requirements of ruminant livestock” (Agricultural Research Council - ARC, 1980).

Mas nem sempre os resultados previstos por estas tabelas para o desempenho animal são alcançados com sucesso. Muitas pessoas desprezam os cuidados necessários para utilização destas tabelas que são comentados no capítulo introdutório do NRC (1985):

- “variações entre ovinos afeta a utilização e a exigência de nutrientes;
- a competição entre ovinos de tamanhos, idades e raças diferentes pode afetar o consumo diário de um animal individual, resultando no consumo excessivo dos animais dominantes e no consumo inadequado dos animais dominados (...);

- alimentos com excesso de fibra ou água podem restringir o consumo de nutrientes (...);
- o nível de performance esperado pode diferir dos níveis indicados nas tabelas;
- inter-relações entre os nutrientes pode afetar as exigências;
- o estado nutricional prévio dos animais pode influir nas exigências. Ovinos alimentados com forragens deficientes em carotenóides ou animais muito gordos ou magros devem ser alimentados com dietas diferentes daquelas calculadas para ovinos em condição média;
- o nível de consumo pode afetar a utilização dos nutrientes (...);
- doenças, parasitas, estresse ambiental e outros distúrbios menos óbvios podem exercer influência nas exigências nutricionais.”

Sendo assim, as tabelas de composição dos alimentos e as de exigências nutricionais são ferramentas muito úteis, mas devem ser utilizadas com critérios e com a ciência de que diversos fatores podem estar atuando de modo a alterar os resultados esperados.

### 2.3. Consumo voluntário

O consumo é provavelmente o fator determinante mais importante do desempenho animal e está normalmente relacionado ao teor de nutrientes que podem ser aproveitados do alimento, ou seja, sua digestibilidade (Romney & Gill, 2000).

Os principais controladores de consumo voluntário podem ser agrupados em “físicos” e “metabólicos”. Os fatores “físicos”, na verdade, referem-se aos aspectos que influenciam diretamente o preenchimento do rúmen, como, por exemplo, volume do rúmen, teor de fibras, tamanho de partículas, estrutura da planta, etc.

Os fatores “metabólicos” estão relacionados a compostos do alimento que

podem inibir ou favorecer o consumo, como os compostos gerados pelo processo de conservação do alimento ou a presença de fatores anti-nutricionais (Romney & Gill, 2000).

Outros fatores também influenciam no consumo e não necessariamente dependem do alimento. O estado fisiológico e sanitário do animal, o conforto térmico, o sistema de manejo da alimentação, etc. também influenciam positiva ou negativamente o consumo de um determinado alimento.

Mas, assim como para outros mamíferos, o consumo de alimento por ruminantes é regulado não apenas pelos fatores citados acima, mas por inúmeros outros. A seletividade alimentar dos mamíferos em geral e particularmente dos ruminantes faz com que estes animais exibam preferências por combinar teores de proteína que maximizem a produtividade (Kyriazakis & Oldham, 1997; Ellis et al., 2000), às vezes, em detrimento do consumo de matéria seca.

Um modelo teórico (Figura 3) de como é a relação entre a concentração de um nutriente essencial ao animal e seu consumo voluntário é dado por Forbes (1995).

Através deste modelo, ilustra-se de forma didática que o consumo voluntário normal é atingido quando os nutrientes essenciais estão em concentração suficientes para atender às exigências do animal.

Com teores pouco superiores às exigências, o consumo não é afetado, mas quando os teores são excessivos, chegando a níveis tóxicos, ou deficientes em demasia provocam uma drástica redução no consumo.

Outro fato ilustrado na Figura 3 e que normalmente pode ser observado é o consumo exacerbado com níveis de deficiência marginal. Isto ocorre pois o animal, numa tentativa de atender suas exigências, consome mais que o normal até um limite físico.

O consumo voluntário relaciona-se comumente com o teor de proteína dietética de maneira curvilínea, conforme demonstrado na Figura 4, e pode ser representado por uma função do tipo Michaelis-Merten.



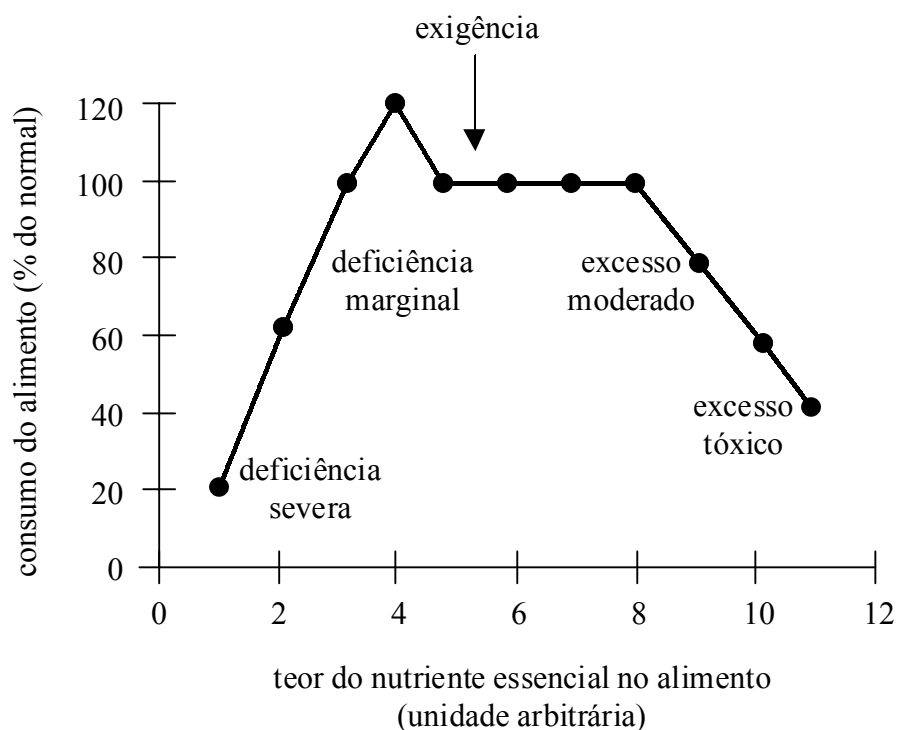


Figura 3. *Modelo didático da influência da composição química do alimento no consumo voluntário (adaptado de Forbes, 1995)*

A Figura 4 traz dois exemplos citados por Ellis et al. (2000) da relação entre o consumo e o teor de proteína bruta (PB) das dietas. No primeiro exemplo, é apresentado o consumo voluntário por cordeiros de diversas variedades de sorgo forrageiro com e sem suplementação de proteína purificada de soja. No referido experimento, que foi realizado com teores de PB entre 40 e 190 g.kg<sup>-1</sup> MS, o máximo consumo não pôde ser atingido, mesmo quando, baseado na função de resposta do tipo Michaelis-Merten, o teor de PB projetado excedesse a 1000 g.kg<sup>-1</sup> MS.

A Figura 4 ainda mostra o consumo voluntário de forragens por ovinos sob condição de pastejo. Neste experimento, os teores de PB variaram entre 224 e 366 g.kg<sup>-1</sup>

MS e a resposta observada neste caso foi linear.

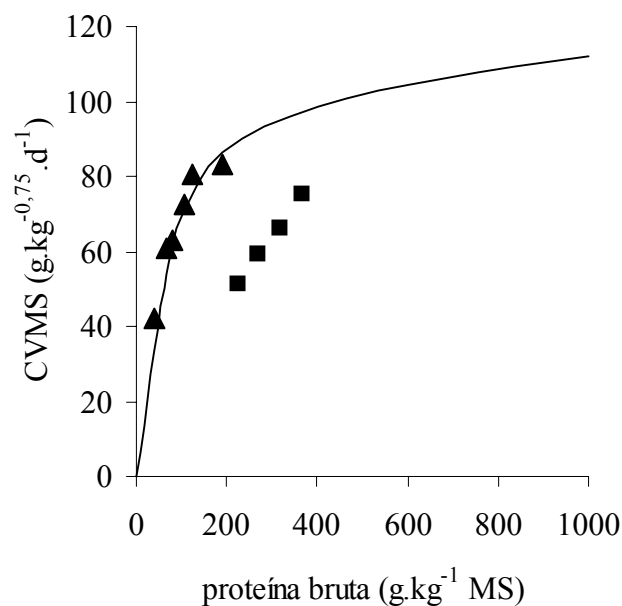


Figura 4. *Relação entre teor de proteína bruta e consumo voluntário de diversas variedades de sorgo forrageiro com e sem suplementação de proteína purificada (▲), consumo voluntário esperado pelo modelo cinético do tipo Michaelis-Merten (—) e consumo voluntário de forragens em pastejo (■) (Fonte: Ellis et al., 2000).*

Os resultados demonstrados na Figura 4, embora contraditórios, são muito característicos. Se analisados com os dados até aqui apresentados, pouco poderia ser elucidado. O fato é que a causa das diferenças entre estas relações foi outra que não as características do alimento. Em ambos os casos apresentados acima, os animais utilizados foram ovinos. A diferença é que no primeiro, os animais eram adultos e, no segundo, animais em crescimento.

Os animais jovens, por apresentarem rápido ganho de peso, conseqüentemente são mais exigentes quanto ao teor de proteína e, dentro da margem estudada, apresentaram respostas lineares para o consumo voluntário.

Este fato indica que características do animal, não só a idade, como apresentado acima, podem ser também fator determinante do consumo.

Forbes (2000) defende a teoria de que o consumo de alimento é primariamente controlado por aspectos fisiológicos e metabólicos. A Figura 5 ilustra de modo simplificado a sua teoria que engloba diversos fatores, sendo parte deles controlado pelo sistema nervoso central (SNC).

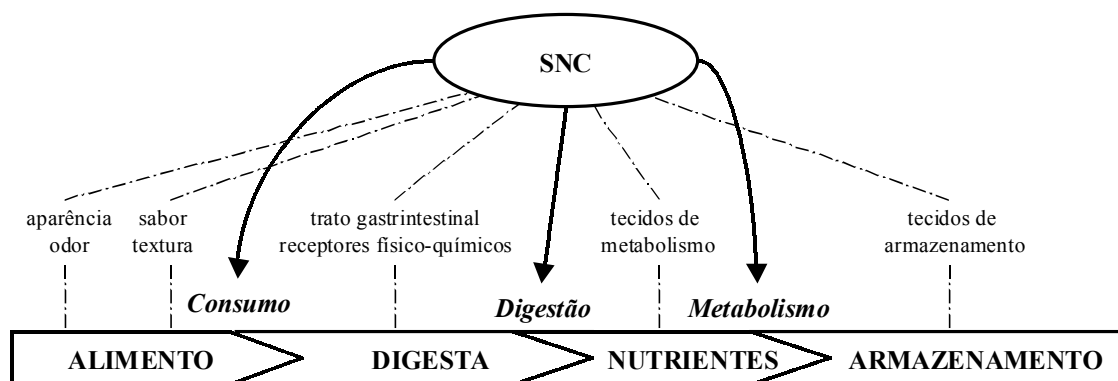


Figura 5. *Controle do comportamento alimentar associado ao sistema nervoso central (SNC)*(Fonte: Forbes, 2000)

Através desta abordagem fisiológica para explicar o mecanismo de controle do consumo, Forbes (2000) consegue englobar os aspectos ligados ao alimento, que são os que inicialmente podem controlar o consumo, independente do SNC, mas destaca os aspectos fisiológicos e metabólicos como sendo os principais controladores, caso o alimento seja aceito pelo animal.

#### 2.4. Degradação e fermentação ruminal

Beever & Mould (2000) salientam que “a principal razão pela qual monogástricos e pré-ruminantes são incapazes de utilizar quantidades significativas de forragens, é que, assim como outros mamíferos, eles não possuem enzimas capazes de quebrar os polímeros complexos que formam as paredes celulares dos vegetais. Nos ruminantes, no entanto, o principal sítio de digestão, com relação às forragens, é o rúmen, local onde o alimento é retido por períodos substanciais e sujeito à fermentação microbiana extensiva, sob condições anaeróbias”.

Quanto maior a contribuição de alimentos fibrosos na composição da dieta do ruminante, maior é a importância dos processos digestivos ocorridos no rúmen.

Na nutrição de ruminantes, é fato conhecido que a principal fonte de proteína para o animal normalmente não é proteína dietética e sim proteína de origem microbiana, sintetizada no processo fermentativo de degradação ruminal a partir de proteína dietética, proteína microbiana reciclada, nitrogênio reciclado via saliva ou mesmo fontes de nitrogênio não protéico.

Em animais em regime de criação extensiva, as proteínas de origem microbiana ruminal podem responder por quase a totalidade da proteína que chega ao intestino delgado. Csapó et al. (2001) relatam que para bovinos, cerca de 70 % da proteína dietética é reduzida a aminoácidos no rúmen, podendo ser aproveitados diretamente ou degradados para suprir de amônia necessária para o crescimento microbiano. O excesso de amônia é absorvido pela parede ruminal e convertido à uréia no fígado.

Sendo assim, o conhecimento de como ocorre e quão eficiente é a degradação dos alimentos pelos microrganismos ruminais é de extrema importância em estudos de avaliação de alimentos para ruminantes.

As técnicas *in vitro* são uma alternativa viável para avaliação de alimentos e tiveram bastante destaque após a apresentação das técnicas desenvolvidas por Tilley &

Terry (1963), Goering & Van Soest (1970) e Menke et al. (1979) que possibilitam compartimentalizar o aproveitamento do alimentos em um estágio relacionado ao ambiente ruminal e outro ligado à digestão pós-ruminal. Porém, as técnicas *in vitro* não consideram as condições comportamentais dos animais. Um determinado alimento poderia ser testado por estas técnicas, apresentar um ótimo aproveitamento pelos microrganismos e ser bem aproveitado pós ruminalmente, porém, este alimento poderia não ser aceito pelos animais ou ter seu consumo severamente debilitado e, portanto, os resultados não corresponderiam à realidade.

#### 2.4.1. Degradabilidade ruminal *in situ*

A técnica *in situ* para caracterização e avaliação de alimentos para ruminantes foi citada pela primeira vez no final dos anos 1930 (citado em Huntington & Givens, 1995) e desde então tem sido desenvolvida e adaptada para uso em estudos de nutrição de ruminantes. Com o internacionalmente conhecido trabalho de Ørskov & McDonald (1979), a técnica tornou-se a base de sistemas de avaliação de alimentos para ruminantes, mesmo apresentando diversos pontos de divergência entre os centros de pesquisa. Este fato acaba gerando dados que devem ser interpretados de modo diferenciado.

Como forma de avaliação do valor nutritivo de alimentos para ruminantes, a técnica *in situ*, ou *in sacco*, é uma alternativa viável em função de sua simplicidade e economicidade. Esta técnica consiste em medir a taxa de degradação do alimento colocado em sacos de nylon dispostos no rúmen por determinados períodos de tempo. Através do modelo proposto por Ørskov & McDonald (1979), é possível estimar as degradabilidades potencial e efetiva do alimento em estudo, bem como a taxa que ocorre esta degradação. Este modelo, no entanto, foi modificado por McDonald (1981) e pode ser descrito como:

$$p = A; \quad t \leq t_0 \quad (1)$$

$$p = a + b \times (1 - e^{-ct}); \quad t > t_0 \quad (2)$$

onde:  $p$  é a degradabilidade do alimento no tempo  $t$ ;  $A$  representa a fração prontamente solúvel;  $t_0$  é o tempo de colonização para início da degradação microbiana;  $a$  e  $b$  são constantes matemáticas, cuja a soma ( $a+b$ ) corresponde numericamente à degradabilidade potencial do alimento; e  $c$  é a taxa de degradação.

Destas variáveis ainda pode-se obter a fração insolúvel potencialmente fermentecível do alimento ( $B$ ):

$$B = (a + b) - A \quad (3)$$

A degradabilidade efetiva dos alimentos ( $p_{efet}$ ), que é o resultado gerado mais próximo da dos valores reais, pode ser calculada da seguinte forma:

$$p_{efet} = a + b \times \left[ \frac{c}{(c + k_e)} \right] \quad (4)$$

onde  $k_e$  representa a taxa de saída da digesta do rúmen.

Esquemáticamente, estas variáveis podem ser observadas na Figura 6.

A técnica *in situ* é bastante utilizada no sistema britânico (AFRC) para estimar as quantidades de proteína e energia metabolizáveis na avaliação de alimentos para ruminantes e tem sido utilizada com sucesso no Brasil para determinar a degradabilidade ruminal da matéria seca, da matéria orgânica e da proteína bruta de alimentos para ruminantes (Aroeira et al., 1993; Castilho et al., 1993; Dechamps, 1994).

Segundo Broderick & Cochran (2000), a técnica *in situ* pode ser criticada por pelo menos quatro pontos: (i) a contaminação microbiana do resíduo subestima a degradabilidade da matéria seca e, principalmente, da proteína; (ii) o desaparecimento de material particulado não degradado superestima a degradação; (iii) o desaparecimento de nutrientes solúveis não degradados, particularmente de N protéico, é classificado como

A, material prontamente solúvel, e interpretado como degradado, o que por sua vez superestima a extensão da degradabilidade; e (iv) a separação física de digesta contaminante, dentro e fora das sacolinhas, subestima a degradação. Algumas destas fontes de erro podem ser minimizadas, por exemplo, através do monitoramento de material microbiano contaminante.

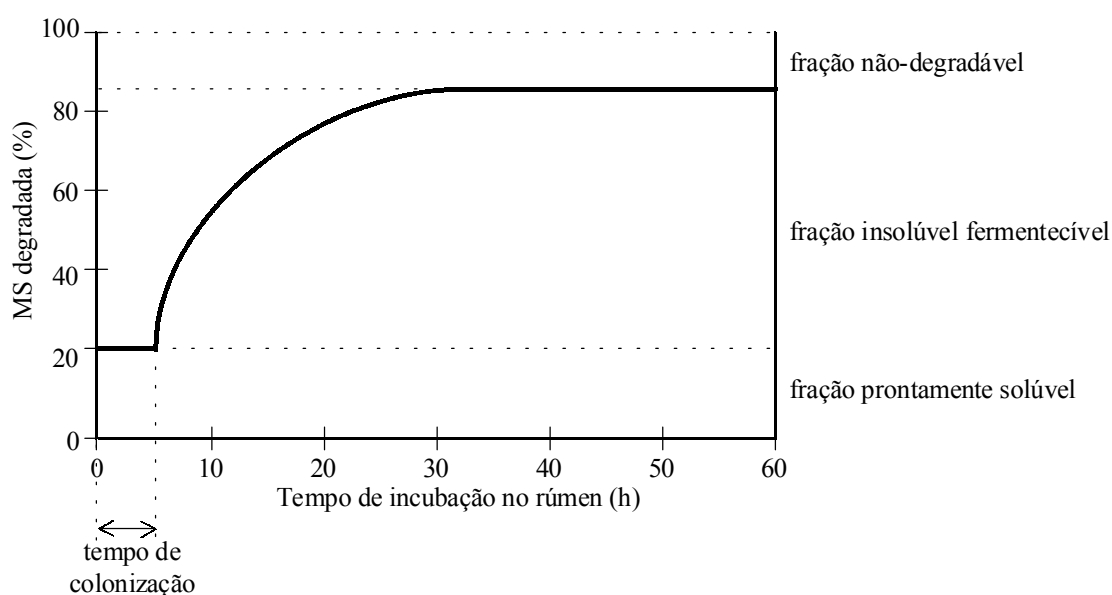


Figura 6. *Esquema da cinética de primeira ordem utilizada pelo modelo de Ørskov & McDonald (1979) para descrição da degradação ruminal dos alimentos*

O maior problema, no entanto, é a falta de padronização para o uso da técnica. Diversos são os pontos de divergência entre os pesquisadores que utilizam a técnica, como o tamanho de poros das sacolinhas, material utilizado para confecção das sacolinhas, grau de moagem das amostras, tipos de processos de descontaminação, etc. (Huntington & Givens, 1995).

#### 2.4.2. Produção de gases *in vitro*

Semelhante à técnica *in situ*, a técnica *in vitro* de produção de gases também se baseia na degradação dos alimentos pelos microrganismos ruminais. Através da simulação *in vitro* do ambiente ruminal, a técnica permite além de mensurar o desaparecimento de material no decorrer do tempo, através da quantificação dos resíduos após a incubação, visualizar a cinética fermentativa, uma vez que esta técnica também mede a formação de subprodutos (gases) da ação microbiana durante o processo de degradação.

Estudos recentes têm demonstrado que a produção de gases possui alta correlação com a digestibilidade e com a degradabilidade do alimento (Menke et al., 1979; Theodorou et al., 1994; Blümmel et al., 1997; Maurício et al., 1998; Bueno et al., 1999a; 1999b). A grande vantagem desta metodologia é a praticidade de se medir a produção de gases, com o uso de um transdutor e a pequena quantidade necessária de material para um ensaio (Theodorou et al., 1994;; Perez, 1997; Maurício et al., 1998; 1999).

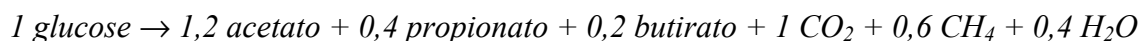
De modo generalizado, a técnica *in vitro* de produção de gases é similar às demais metodologias de digestibilidade *in vitro*, que usam alimentos moídos, meio anaeróbio e inóculo preparado a partir de uma mistura de microrganismos ruminais (Williams, 2000). Por simular exclusivamente o ambiente ruminal, a produção de gases *in vitro* está mais relacionada à fermentação que ocorre no rúmen que à digestibilidade que ocorre no trato todo, o que inclui processos de digestão enzimática, absorção e fermentação no ceco.

O processo fermentativo ruminal envolve uma série de reações exo-energéticas catalisadas pelas células microbianas.

A energia dos alimentos para ruminantes é geralmente fornecida pelos carboidratos. O desdobramento desta energia dos carboidratos é feito preponderantemente no rúmen, através da ação fermentativa ruminal. Além da produção



de massa microbiana, a fermentação de 1 mol de glucose, por exemplo, produz 1,6 mol de gases ( $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ ) e 1,8 mol de ácidos graxos de cadeia curta, conforme a reação teórica citada por Schofield (2000):



Se a fermentação ocorreu em meio tamponado com bicarbonato (pH 6,5), os ácidos graxos de cadeia curta (ou, conforme nomenclatura mais antiga, ácidos graxos voláteis - AGV's) reagirão com o tampão gerando 1,8 mol de  $\text{CO}_2$ . Esta produção é conhecida como produção indireta de gases.

Neste exemplo, então, tem-se que a produção total de gases é de 3,4 moles.mol<sup>-1</sup> de glucose. Aplicando-se a lei geral dos gases ( $PV = nRT$ ), é possível estequiometricamente predizer que a fermentação completa de 1 g de glucose, em ambiente anaeróbio tamponado com bicarbonato, produziria 537 ml de gases a 39°C. Porém, os resultados práticos têm demonstrado que a produção de gases a partir de substratos fibrosos é bem menor, cerca de 200 a 400 ml.g<sup>-1</sup> equivalente de glucose (Pell & Schofield, 1993).

Alguns fatores são apontados como responsáveis por este “erro” estequiométrico. Schofield (2000) destaca os aspectos físicos da amostra e o controle do pH, da temperatura e da pressão atmosférica como possíveis fatores. Mas, salienta ainda, que o grande responsável por esta diferença entre a estequiometria da fermentação e a produção determinada dos gases gerados na fermentação é o crescimento microbiano.

A Figura 7 demonstra as relações entre os carboidratos digeridos e seus produtos.

Então, as razões mais convincentes para a variação na produção de gases são a produção de biomassa microbiana, a natureza química do substrato e a eficiência da população microbiana (Schofield, 2000).

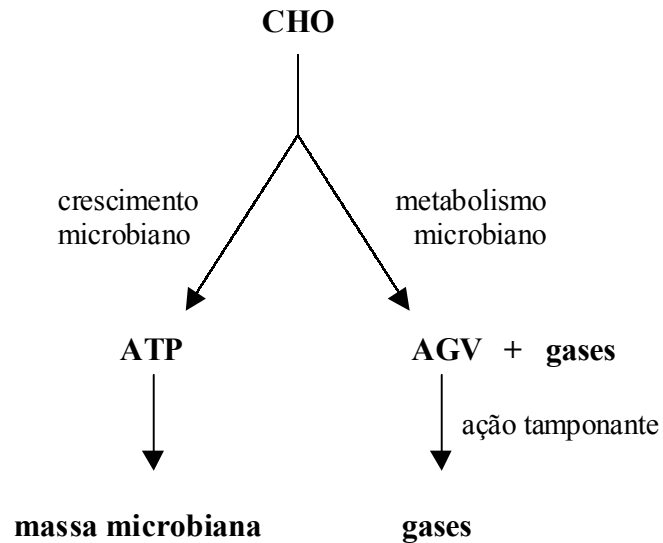


Figura 7. *Produção de gases e de biomassa microbiana a partir da digestão de carboidratos (adaptado de Schofield, 2000)*

Diversos são os modelos matemáticos utilizados para expressar os dados da cinética fermentativa, sendo que os mais comumente presentes nos trabalhos científicos são o de Ørskov & McDonald (1979) (vide item 2.4.1) e o de France et al. (1993). Como a técnica de produção de gases é mais sensível que a técnica das sacolinhas, o modelo exponencial de primeira ordem de Ørskov & McDonald (1979) não ajusta adequadamente os dados e subestima o tempo de colonização inicial. O modelo de France et al. (1993), representa melhor o perfil sigmoidal da cinética fermentativa e é dado por:

$$V = V_f \times \left\{ 1 - e^{[-b \times (t - t_0) - c \times (\sqrt{t} - \sqrt{t_0})]} \right\} \quad (5)$$

onde  $V$  é o volume acumulado de gases produzidos até o tempo  $t$ ;  $V_f$  é o volume assintótico dos gases produzidos;  $b$  e  $c$  são constantes do modelo; e  $t_0$  representa um tempo de colonização discreto.

A taxa de fermentação ( $\mu$ ), para  $t > t_0$ , é dada por:

$$\mu = \frac{b + c}{2 \times \sqrt{t}} \quad (6)$$

Como pode ser observado na Equação 6, a taxa de fermentação é variável de acordo com o transcorrer do tempo. Este modelo introduziu o conceito de dependência do tempo para a fermentação (Schofield, 2000). Isso está mais próximo da realidade pois diferentes frações do alimento são fermentadas em tempos diferentes e a taxas diferenciadas.

Mais modelos matemáticos para ajuste dos dados da produção de gases são descritos na revisão de Schofield (2000).

## 2.5. Digestibilidade aparente

Se, como descrito anteriormente, o consumo depende de diversos fatores, entre eles, da digestibilidade do alimento, esta também depende do consumo, e ambos, no entanto, dependem da cinética de desaparecimento de alimento no rúmen, seja pela degradação ou pelo escape.

Alimentos fibrosos (forragens) usualmente têm baixos ou médios coeficientes de digestibilidade. Porém, a digestibilidade aparente de forragens de baixo valor nutritivo, vista de modo isolado, às vezes, apresenta valores acima dos esperados, mas ao trazer ao contexto o baixo consumo voluntário e/ou a cinética digestiva, pode-se justificar o baixo desempenho animal (Poppi et al, 2000).

Os ensaios *in vivo* sobre digestibilidade normalmente referem-se à digestibilidade aparente, ou seja, não sendo computado o fator endógeno presente nas excreções. A equação geral da digestibilidade aparente é a seguinte:

$$\text{Digestibilidade aparente de } X = \frac{\text{Consumo de } X - \text{Excreção de } X}{\text{Consumo de } X} \quad (7)$$

## 2.6. Cinética digestiva

A quantidade total de nutrientes absorvidos de um alimento é, em último termo, o mais importante fator para determinar o seu valor nutricional. Sendo assim, consumo e digestão são os parâmetros fundamentais para qualquer sistema de avaliação de alimentos (Poppi et al., 2000). Porém estes parâmetros, como mencionado anteriormente, não são estáticos, tampouco independentes.

As transformações digestivas que o alimento sofre são determinadas por atributos intrínsecos do alimento e por sua interação com os processos cinéticos da digestão. Isto implica a necessidade de expressões quantitativas das cinéticas de digestão e de passagem do alimento, bem como de sua subsequente eficiência de utilização pelo animal (Ellis et al., 1994).

O alimento apreendido pelo ruminante é fragmentado pela mastigação, durante a ingestão e a ruminação, e submetido à digestão no rúmen. Os fragmentos gerados não são uniformes, variam em massa, tamanho, formato, composição química, solubilidade, fluatibilidade, etc. Estes fragmentos comportam-se, do ponto de vista cinético, diferentemente. Alguns componentes, como certas proteínas, podem ser rapidamente solubilizados pela saliva ou pelos fluidos ruminais e são digeridos externamente aos fragmentos. Outros compostos, no entanto, somente são solubilizados pela digestão e, conseqüentemente, devem ser digeridos dentro do labirinto arquitetural do fragmento. A arquitetura do fragmento é uma barreira física ao acesso e colonização microbiana. Estas características determinam, por fim, a velocidade com que o alimento é digerido e seus nutrientes são disponibilizados para absorção.

### 2.6.1. Taxa de passagem

A quantidade de digesta que passa por um certo ponto ao longo do trato digestório em um determinado intervalo de tempo é conhecida como taxa de passagem

(Kobt & Luckey, 1972). A taxa de passagem da dieta sofre influências do nível de consumo de matéria seca, da composição química ou física da dieta, da ingestão de água e da presença de sais ou tamponantes presentes na dieta.

A medição do trânsito e/ou fluxo da digesta requer animais providos de cânulas em zonas específicas do trato digestório e métodos apropriados para calcular as taxas de fluxo nestes pontos. A medição do fluxo da digesta nos animais pode ser feita de modo mais fácil através do uso de marcadores em amostragens periódicas da digesta.

#### 2.6.2. Uso de marcadores em estudos de cinética digestiva

Marcadores são compostos de referência usados para monitorar os aspectos químicos (hidrólise e síntese) e físicos (fluxo) da digestão (Owens & Hanson, 1992).

Um marcador para ser ideal deve apresentar características essenciais como (i) não ser absorvido pelo animal, (ii) não afetar ou ser afetado pelo trato gastrintestinal ou pela sua população microbiana, (iii) ser fisicamente similar ou estar intimamente associado ao material marcado, além de que (iv) o método de estimativa em amostras de digesta deve ser específico (Faichney, 1975).

A digesta não flui através do sistema digestório como se fosse água através de um cano. Os ruminantes têm a capacidade de reter, regurgitar, remastigar e fermentar o alimento. O conteúdo ruminal também mostra ser bastante estratificado, horizontal e verticalmente. A digesta ruminal consiste de pools interativos (fluido livre, partículas embebidas por fluido, partículas de baixa densidade, partículas de elevada densidade, partículas flutuantes). Os microrganismos estão distribuídos nestes pools também de modo diferenciado, uma fração está livre no fluido, outra aderida às partículas e outra aderida à parede ruminal, e podem mover-se entre estas frações. Sendo assim, um marcador indicado para um destes pools pode não ser adequado para outro (Owens & Hanson, 1992).

Para determinar a cinética de nutrientes é necessário determinar a taxa de

passagem destes nutrientes nos diferentes pools pelos quais eles passam. Normalmente, para facilitar os estudos de cinética, faz-se o monitoramento da cinética das fases sólida e líquida da digesta, pois estas são relativamente independentes. Faichney (1975) sugere o uso de marcadores para as fases sólida e líquida em conjunto, para tentar reconstituir de modo mais preciso possível a dinâmica da digesta real.

### 2.6.3. Modelos para fluxo de digesta

O fluxo da digesta através do trato digestório é extensivamente estudado e os modelos mais utilizados são os que incluem o conceito de compartimento.

Os modelos compartimentais foram, segundo Ellis et al. (1994), baseados inicialmente na cinética dos fluidos. Estes modelos assumem que (i) ocorre a completa e instantânea mistura dos fragmentos que entram no trato; (ii) há a mesma oportunidade de escape para todos os fragmentos presentes, independentes do seu tempo de residência; (iii) a entrada e a saída de fragmentos, bem como a massa compartimental são constantes (“steady state”). Outros modelos foram propostos utilizando distribuições não exponenciais de tempos de retenção, subcompartimentos múltiplos acoplados a um compartimento de mistura e fluxo determinado pela difusão.

Dos modelos utilizados para explicar a cinética de digestão, um dos mais simples e utilizados é o de Grovum & Williams (1973) que pode ser demonstrado esquematicamente da seguinte forma:



Este modelo pode ser expresso matematicamente da seguinte forma:

$$y = 0 \rightarrow t \leq TT \quad (9)$$

$$y = A_1 \times e^{-k_1(t-TT)} - A_2 \times e^{-k_2(t-TT)} \rightarrow t > TT \quad (10)$$

onde,  $y$  é a concentração do marcador no tempo  $t$ ;  $A_1$  e  $A_2$ , constantes do modelo sem valor biológico definido;  $k_1$  e  $k_2$ , taxas de passagem pelos pools 1 e 2; e  $TT$ , tempo de trânsito.

Das Equações (9) e (10), tem-se:

$$TT = \frac{\ln A_2 - \ln A_1}{k_2 - k_1} \quad (11)$$

$$TMR_{pool1} = \frac{1}{k_1} \quad (12)$$

$$TMR_{pool2} = \frac{1}{k_2} \quad (13)$$

$$TMRT = TT + TMR_{pool1} + TMR_{pool2} \quad (14)$$

onde,  $TMR_{pool1}$  e  $TMR_{pool2}$  são, respectivamente, o tempo médio de retenção do marcador nos pools 1 e 2; e  $TMRT$  é o tempo médio de retenção total do marcador.

#### 2.6.4. Detecção de multielementos por fluorescência de raios X

“A análise multielementar instrumental por fluorescência de raios X (XRF) é baseada na medida das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos químicos componentes da amostra, quando devidamente excitada” (Nascimento Filho, 1999).

Quando uma amostra é submetida à energia emitida por tubos de raios X (ou raios  $\gamma$ ), seus elementos constituintes são excitados e, por sua vez emitem linhas espectrais com energia característica de cada elemento de forma isolada. A intensidade, ou seja o número de raios X característicos de cada elemento detectados por unidade de tempo, está correlacionada diretamente com a concentração do elemento na amostra. Deste modo, a análise por fluorescência de raios X é um método tanto qualitativo como

quantitativo (Nascimento Filho, 1999).

A determinação de elementos marcadores, como Cr, Co, Yb, La, Cd, etc., utilizados em estudos de nutrição animal normalmente são feitos por técnicas da química analítica. Para tanto as amostras necessitam ser previamente processadas para extração, usualmente com secagem, moagem e digestão ácida à quente, ou ainda outros modos de extração ainda mais trabalhosos, para somente então poderem ser analisadas por técnicas espectrométricas.

Na técnica de XRF, o preparo se resume a secagem e moagem do material, que é levado diretamente para excitação e detecção. Sendo assim, a técnica é mais simples e muito menos trabalhosa, poupando tempo principalmente em estudos de cinética com o uso de marcadores, nos quais o número de amostras a serem analisadas é muito grande.

As principais variantes da técnica de XRF são a ED-XRF (XRF por dispersão de energia), a WD-XRF (XRF por dispersão de comprimento de onda) e a TXRF (XRF por reflexão total) (Nascimento Filho, 1999),

Nos últimos anos, alguns experimentos com o uso de marcadores para estudo da cinética digestiva utilizaram com sucesso a técnica de ED-XRF. Korndörfer (1999) estudando a cinética digestiva de ovinos alimentados com três feno de forrageiras tropicais utilizou a técnica de ED-XRF para detecção de Cr e Co. Oetting (2002) determinou, por ED-XRF e por espectrometria de emissão ótica com plasma de argônio induzido (ICP-OES), os elementos Cr, La e Yb, como marcadores externos em estudo de cinética digestiva de suínos.

## **2.7. Síntese microbiana**

Sabendo-se que as exigências de proteína, para produção ou manutenção dos ruminantes, são o resultado da síntese de proteína microbiana a partir da degradação de proteína no rúmen, do nitrogênio endógeno reciclado via saliva, da proteína dietética não



degradada no rúmen e da proteína do animal (Boer et al., 1987), é de elevada importância o conhecimento do potencial de produção do nitrogênio microbiano a partir do alimento.

A quantidade de proteína dietética não degradada no rúmen e que portanto chega ao intestino delgado depende da degradação ruminal. A quantificação da proteína microbiana sintetizada no rúmen como resultado da fermentação microbiana é de interesse porque há evidências de que a proteína microbiana pode ser influenciada pela dieta (Dove & Milne, 1994).

A determinação ou a estimativa do suprimento de proteína microbiana é uma importante área de estudo na nutrição protéica dos ruminantes. Segundo Chen & Gomes (1992), a contribuição da proteína microbiana no fluxo intestinal de proteína é considerado por muitos sistemas de avaliação de modo mais ou menos constante e com base na quantidade de alimento ingerido. Usualmente a contribuição microbiana é expressa em g de N microbiano (NM) por kg de matéria orgânica digestível fermentada no rúmen ( $MOD_R$ ), mas os dados experimentais têm mostrado que as variações são grandes (de 14 a 60 g  $NM \cdot kg^{-1} MOD_R$ ) (Chen & Gomes, 1992). Estas variações, segundo os mesmos autores, são devidas à influência de vários fatores relacionados à dieta e ao ambiente ruminal.

Os estudos para determinar a contribuição das proteínas microbianas como fonte de proteína para o hospedeiro utilizam marcadores microbianos, que podem ser internos ou externos. Dentre os principais marcadores internos estão ácido 2,6-diaminopimélico (DAPA), D-alanina, ácido 2-aminoetilfosfônico (AEP), ácidos nucléicos (DNA e RNA) e ATP. Os marcadores externos mais utilizados são os isótopos estáveis ( $^{15}N$ ) e radioativos ( $^{35}S$ ,  $^{32}P$ ,  $^{33}P$ ) (Broderick & Merchen, 1992; Csapó et al., 2001).

Outra possibilidade de estimar a síntese de proteína microbiana é o uso de técnicas indiretas como a excreção urinária de derivados de purina. A quantidade de derivados de purina excretados na urina dos ruminantes está relacionada à quantidade de purinas microbianas absorvidas no intestino (Broderick & Merchen, 1992; Chen &

Gomes, 1992).

### 2.7.1. Uso de técnicas nucleares para estimativa de síntese microbiana

A utilização de radiofósforo para a determinação da síntese microbiana tem mostrado ser bastante eficiente. Através da coleta de amostra do líquido do rúmen pode-se medir a taxa de incorporação do radiofósforo ( $^{32}\text{P}$ ) *in vitro*, avaliando dessa maneira a atividade microbiana.

O método baseia-se na relação entre a incorporação do fósforo na matéria microbiana e a síntese de proteína, utilização de amônia ou produção de ácidos graxos voláteis, em curtos períodos de incubações usando  $^{32}\text{P}$  como marcador (Van Nevel & Demeyer, 1977; Vitti et al., 1988).

A técnica *in vitro* de incorporação de  $^{32}\text{P}$  para estimar síntese microbiana baseia-se na incubação de uma pequena quantidade de amostra com líquido ruminal em meio tamponado e uma diminuta quantidade de radiofósforo como marcador de proteína microbiana. Com base na atividade específica do fósforo solúvel ( $AE$ ) e na incorporação do radiomarcador pelos microrganismos, é possível calcular a quantidade total de massa microbiana gerada, como demonstrado nas equações abaixo:

$$AE = \frac{A_{32P_{solúvel}}}{P_{total}} \quad (15)$$

$$P_{incorp} = A_{32P_{incorp}} \times AE \quad (16)$$

$$NM = 8.37 \times P_{incorp} \quad (17)$$

onde:  $A_{32P_{solúvel}}$  é a atividade radioativa do  $^{32}\text{P}$  em solução;  $P_{total}$  é a quantidade total de fósforo em solução;  $P_{incorp}$  é a quantidade de fósforo incorporado à massa microbiana após a incubação;  $A_{32P_{incorp}}$  é a atividade radioativa do  $^{32}\text{P}$  incorporado; e  $NM$  é a

quantidade de nitrogênio microbiano gerado, assumindo que a relação entre N e P na massa microbiana é de 8,37.

Pode-se também estimar a síntese microbiana através de outros marcadores. A síntese microbiana é determinada *in vivo*, com a utilização do isótopo pesado do nitrogênio ( $^{15}\text{N}$ ). Uma fonte enriquecida em  $^{15}\text{N}$  (sulfato de amônio marcado, por exemplo) é fornecida aos animais, ou, ainda, colocada diretamente no rúmen. Esta fonte é metabolizada pelos microrganismos do rúmen e proteínas microbianas são sintetizadas com o nitrogênio marcado. Nas amostras da digesta coletadas no duodeno, determina-se, então, a quantidade de proteína microbiana que passa para o restante do sistema digestório (McAllan et al., 1994).

#### 2.7.2. Estimativa de síntese microbiana a partir da excreção dos derivados de purina

A técnica de determinação de derivados de purina (DP) para estimar a síntese microbiana assume que todos os ácidos nucleicos de origem dietética são degradados no rúmen e que, portanto, todos os ácidos nucleicos que deixam o rúmen são essencialmente de origem microbiana.

A Figura 8 mostra de modo esquemático o princípio deste método.

As purinas dos ácidos nucleicos microbianos então são absorvidas, degradadas e excretadas na urina como seus derivados (produtos de degradação), hipoxantina, xantina, ácido úrico e alantoína, conforme pode ser observado na Figura 9. A excreção de DP é diretamente proporcional a absorção de purinas (Chen & Gomes, 1992).

Os DP urinários compreendem, portanto, hipoxantina, xantina, ácido úrico e alantoína (Figura 9). Estes quatro estão presentes na urina de ovinos, caprinos, cervídeos e lhamas, mas apenas ácido úrico e alantoína são excretados por bovinos e bubalinos. Isto porque bovinos e bubalinos têm uma alta atividade de xantina oxidase na mucosa intestinal, degradando, portanto, as bases púricas a seus derivados mais distantes, ácido

úrico e alantoína. Nos ovinos, a concentração de xantina oxidase no tecido intestinal é praticamente nula (Chen & Gomes, 1992).

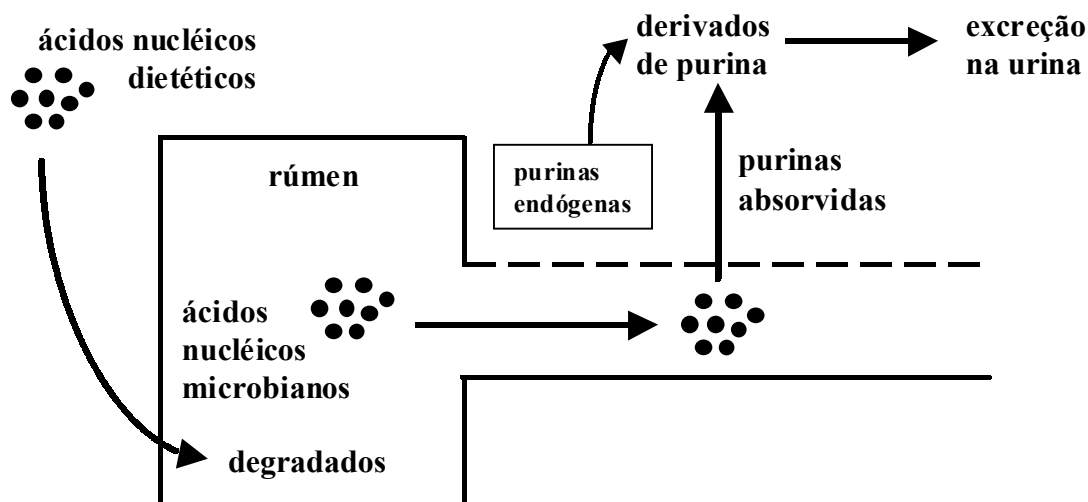


Figura 8. *Representação esquemática do princípio do método de determinação da excreção urinária de derivados de purina para estimativa do suprimento de proteína microbiana para ruminantes (adaptado de Chen & Gomes, 1992)*

A excreção de DP endógena já foi determinada para diversos animais, incluindo, ovinos, bovinos, caprinos, bubalinos e lhamas. Para ovinos e bovinos, a excreção dos DP de origem endógena está diretamente correlacionada às purinas exógenas absorvidas no intestino (Chen et al., 1990; Verbic, et al, 1990, Balcells et al., 1991). Assim, a excreção de DP pode fornecer uma estimativa quantitativa do fluxo de proteína microbiana se a razão entre purinas e proteína nos microrganismos ruminais for assumida como constante (Tamminga & Chen, 2000).

Diferenças específicas no metabolismo das purinas têm sido observadas (Tamminga & Chen, 2000). É importante notar que diferentes equações são necessárias para cada espécie animal. As equações desenvolvidas e validadas até o momento são

para ovinos (Equação 18 - Chen et al., 1990) e bovinos (Equação 19 - Verbic et al., 1990). Cabe salientar que foram desenvolvidas para animais europeus. Os resultados recentes demonstram que a excreção de DP por animais tropicais é relativamente menor (Chen & Gomes, 1992, Tamminga & Chen, 2000).

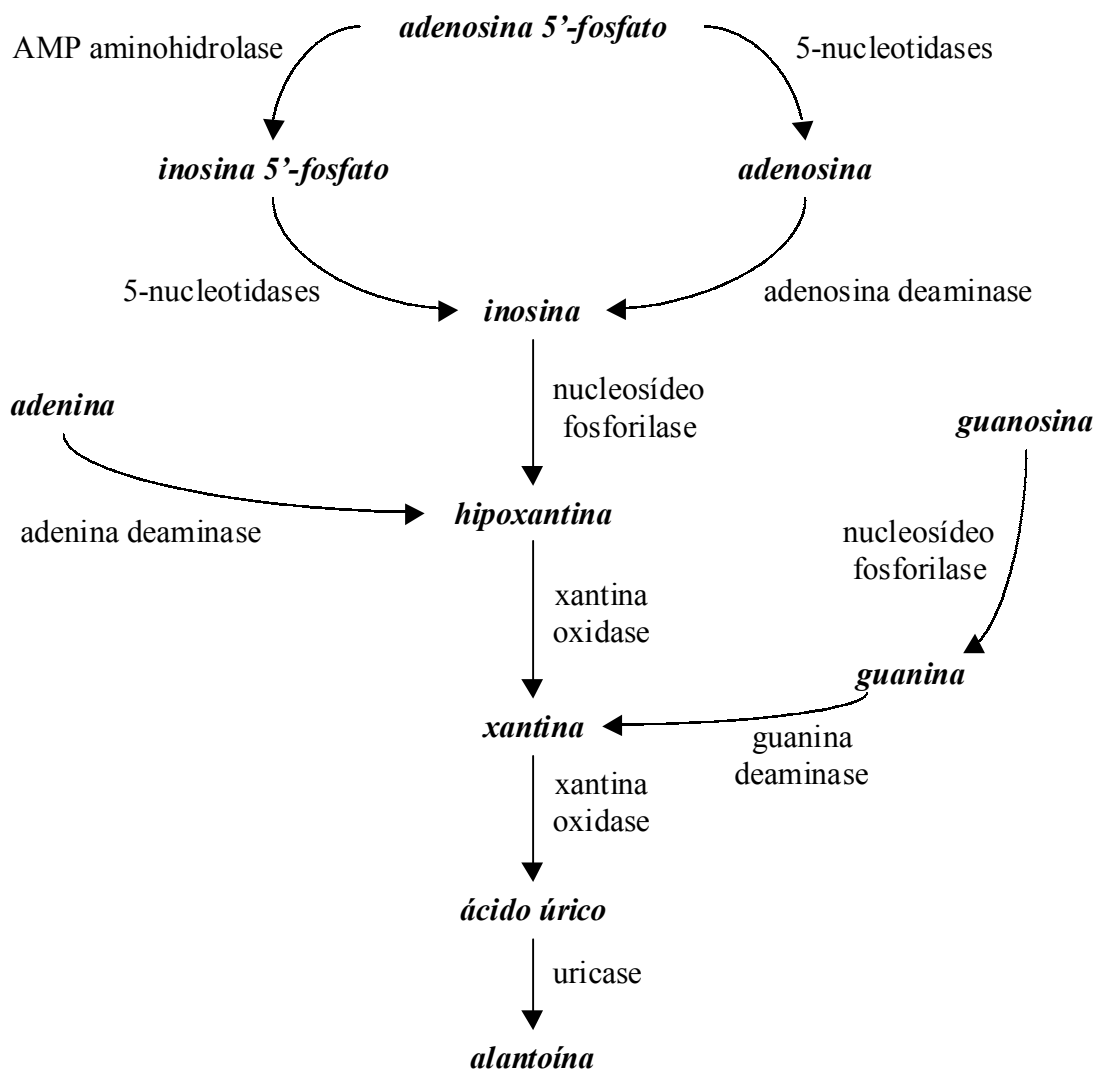


Figura 9. Formação dos derivados de purina a partir da degradação dos nucleotídeos púricos (adaptado de Chen & Gomes, 1992)

As equações mais usadas para descrever as relações quantitativas entre a absorção de purinas microbianas ( $X$ , em  $\text{mmol.d}^{-1}$ ) e a excreção de DP na urina ( $Y$ , em  $\text{mmol.d}^{-1}$ ) são as seguintes:

- para ovinos: 
$$Y = 0,84 X + (0,150 PV^{0,75} e^{-0,25 X}) \quad (18)$$

- para bovinos: 
$$Y = 0,85 X + (0,385 PV^{0,75}) \quad (19)$$

onde  $PV^{0,75}$  representa o peso metabólico (em kg) do animal.

As principais limitações desta técnica residem no fato de estar baseada em duas suposições. A primeira é que todo ácido nucléico que chega ao intestino delgado é de origem microbiana. Assumir tal fato não compromete a maioria dos estudos, pois realmente os ácidos nucléicos dietéticos são rapidamente e extensivamente degradados no rúmen. Porém, há exceções que não podem ser desprezadas. Para certos alimentos de origem animal, principalmente farinha de peixe, tal fato não se aplica. O segundo ponto de limitação refere-se a relação entre purinas e proteína nos microrganismos ruminais ser constante. Até o momento, não há informação suficiente para tal afirmação.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Local e animais**

Todos os ensaios foram conduzidos nas instalações do Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo (LANA-CENA-USP), bem como grande parte das análises. As exceções foram as análises por fluorescência de raios X e por cintilação líquida, realizadas no Laboratório de Instrumentação Nuclear, e análises por espectrometria de massas, realizadas no Laboratório de Ecologia Isotópica, ambos da mesma instituição acima.

Os animais utilizados foram ovinos da raça Santa Inês, machos, adultos e castrados com peso vivo médio de  $40 \pm 5,7$  kg.

No total, oito animais foram submetidos à cirurgia para implantação de cânulas no rúmen e no duodeno proximal, cerca de cinco meses antes do início do experimento. Dos oito animais disponíveis, foram escolhidos os seis mais aptos, tomando-se como parâmetros para escolha as condições das fistulas ruminais e duodenais, a sanidade e os aprumos.

Antes de cada período experimental, foi realizada análise coproparasitológica para contagens de ovos de endoparasitas, mas nenhum animal apresentou necessidade de controle por vermifugação. Antes de iniciar o experimento, os animais foram casqueados para correções dos aprumos, de modo a não comprometer seu desempenho durante o experimento.

### 3.2. Período experimental

O experimento principal constou de três períodos subseqüentes. Cada período, consistido de 28 dias, foi subdividido nas seguintes fases:

- adaptação às dietas – 08 dias (d1 a d8);
- ensaio de degradabilidade ruminal *in situ* – 05 dias (d4 a d8);
- ensaio de consumo voluntário – 10 dias (d9 a d18);
- ensaio de produção de gases *in vitro* – 05 dias (d9 a d13);
- adaptação às gaiolas – 03 dias (d19 a d21);
- administração de marcadores de digesta e de microrganismos – 01 dia (d22);
- coletas para marcadores de fluxo de digesta – 05 dias (d22 a d26);
- coletas para marcador de síntese microbiana – 03 dias (d22 a d24);
- coletas para derivados de purina – 05 dias (d23 a d27);
- ensaio de digestibilidade aparente – 05 dias (d23 a d27);
- jejum – 01 dia (d28);
- ensaio de síntese microbiana *in vitro* – 01 dia (no primeiro dia do período posterior, antes da mudança de dieta).

Os animais permaneceram em baias individuais durante os dezoito primeiros dias, em gaiolas metabólicas durante os nove dias subseqüentes e novamente em baias individuais durante o último dia de cada período.

O Quadro 1 resume todas as fases de um período experimental. Nele fica demonstrado que algumas fases (ensaios) se sobrepuseram, mas isso não interferiu de modo prejudicial ao andamento nem à obtenção de resultados fidedignos nos ensaios. A forma como os ensaios foram conduzidos será abordada a frente.





### 3.3. Tratamentos

Três fenos de forrageiras foram escolhidos para este experimento, tendo como critério principal o teor de proteína bruta. Sendo assim, os tratamentos foram fenos de alfafa (*Medicago sativa*), de braquiária (*Brachiaria decumbens*) e de Tifton-85 (*Cynodon sp.*). Doravante, estes alimentos serão denominados ALF, BRA e TIF, respectivamente.

Os alimentos foram caracterizados quimicamente segundo AOAC (1995) (MS – matéria seca; MM – matéria mineral; MO – matéria orgânica; e PB – proteína bruta) e Van Soest & Wine (1967) (FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido; LDA – lignina em detergente ácido). Também foram determinada as quantidades de proteína insolúvel em detergente ácido, aqui denominada PIDA, e estimadas as quantidades de hemicelulose, celulose e sílica, conforme indicado por Van Soest & Wine (1967).

É importante salientar que, em momento algum, foi interesse deste trabalho a caracterização química e nutricional destas espécies forrageiras. Se assim fosse, outro delineamento seria necessário e o número de amostras deveria ser maior. Portanto, os fenos escolhidos foram objeto de estudo devido às suas variações quanto ao teor de PB.

### 3.4. Ensaio de consumo voluntário

Durante este ensaio, os animais foram mantidos em baias individuais, tendo livre acesso a água e sal mineralizado.

Os alimentos foram oferecidos em duas refeições diárias, sendo a primeira às 8:30 e a segunda às 16:30 h. O resíduo foi completamente retirado diariamente às 8:00 h. Estes horários foram respeitados durante todo o período experimental.

Amostras diárias do alimento oferecido e do resíduo foram coletadas para

determinação dos teores de matéria seca em estufa com circulação forçada de ar, a 60 °C, por 48 h.

O consumo voluntário de matéria seca (CVMS) dos animais foi, portanto, calculado como a diferença entre as quantidades de matéria seca oferecida e refugada.

Para assegurar oferecimento *ad libitum*, as dietas foram oferecidas em quantidade calculada para permitir sobra de 10 a 20 %. Sempre que as sobras fossem inferiores a 10 ou superiores a 20 %, a quantidade oferecida era reajustada para este intervalo.

### 3.5. Ensaio de degradabilidade ruminal *in situ*

A cinética de degradação ruminal *in situ* foi determinada utilizando-se a técnica descrita por Ørskov & McDonald (1979).

Sacolinhas de nylon com porosidade de 35 µm, contendo aproximadamente 3 g do mesmo alimento consumido pelos animais, foram incubadas diretamente no rúmen destes. As sacolinhas foram retiradas após 3, 8, 16, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. As amostras dos alimentos utilizadas foram previamente secas a 60 °C e moídas em moinho tipo Wiley, com peneiras com crivos de 2 mm.

Devido ao pequeno volume ruminal dos ovinos, a colocação das sacolinhas não pôde ser simultânea, conforme as recomendações de Huntington & Givens (1995). O esquema utilizado para a colocação e a retirada das sacolinhas pode ser observado no Quadro 2.

Também foram confeccionadas sacolinhas para determinação da perda de material prontamente solúvel (*A*), conforme sugestão de McDonald (1981), o que caracteriza a degradabilidade inicial (Equação 1).

Os dados foram ajustados pelo modelo de Ørskov & McDonald (1979) modificado por McDonald (1981) (Equações 1 a 4).

Quadro 2. Cronograma esquemático de entrada (▲) e saída (▼) das sacolinhas durante o ensaio de degradabilidade ruminal *in situ*

<i>horários</i>	<i>dias</i>				
	<i>d4</i>	<i>d5</i>	<i>d6</i>	<i>d7</i>	<i>d8</i>
<i>8:00</i>	▲ 96h, 72h, 24h	▲ 48h ▼ 24h		▲ 8h, 3h ▼ 72h, 48h	▼ 96h, 16h
<i>11:00</i>				▼ 3h	
<i>16:00</i>				▲ 16h ▼ 8h	

### 3.6. Ensaio de produção de gases e degradabilidade ruminal *in vitro*

A técnica foi conduzida segundo Maurício et al. (1999), utilizando como fonte microbiana para o inóculo líquido ruminal dos mesmos ovinos utilizados no experimento.

O inóculo foi preparado usando proporções iguais de fase sólida e líquida do conteúdo ruminal. Estas frações foram homogeneizadas em liquidificador por alguns segundos e filtrado em nylon com porosidade de 35 µm.

Foram preparados separadamente inóculos provenientes de animais alimentados com os diferentes tratamentos. Todos os tratamentos foram inoculados com

todos os inóculos, para testar a especificidade do inóculo.

Os seguintes horários foram usados para medida de volume dos gases produzidos: 0, 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 60, 72 e 96 horas após inoculação, sendo que a degradação *in vitro* dos alimentos foi determinada nos seguintes horários: 0, 3, 9, 16, 24, 48, 72 e 96 horas após inoculação.

A degradabilidade ruminal foi calculada como a diferença entre a quantidade total de amostra colocada para fermentar em cada frasco e a quantidade de resíduo recuperado por filtração em cadinho sinterizado (nº 1) após a incubação.

Os dados de produção de gases foram ajustados pelo modelo de France et al. (1993) (Equações 5 e 6) e os de degradação ruminal pelo modelo de Ørskov & McDonald (1979), modificado por McDonald (1981) (Equações 1 a 4).

### 3.7. Parâmetros ruminais

Amostras de líquido ruminal foram coletadas para caracterizar o ambiente ruminal através do pH e do teor de N amoniacal, que foram determinados nos seguintes horários: 0, ½, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 8½, 9, 10, 11, 12, 14, 18 e 24 horas (dias d22 e d23), sendo que 0 e 8 horas correspondem aos horários em que foi oferecida a alimentação (8:30 e 16:30 h).

O pH ruminal foi determinado imediatamente após a coleta.

Para determinação do teor de N amoniacal, uma amostra de líquido ruminal (cerca de 15 ml) foi coletada, imediatamente acidificada com três ou quatro gotas de ácido sulfúrico concentrado e congelada para posterior determinação de N amoniacal. A determinação de N amoniacal foi feita em aparelho do tipo micro Kjeldahl, conforme metodologia descrita por Preston (1995).

### **3.8. Ensaio de digestibilidade aparente**

Durante os dias deste ensaio (d23 ao d27), foram controlados o consumo de alimento (oferecido e sobras) e a excreção de fezes de cada animal.

Durante este ensaio, a quantidade de alimento oferecido foi de 90 % da média do CVMS, calculada individualmente para cada animal. Isto foi feito para “eliminar”, ou pelo menos reduzir, a seletividade dos animais, forçando-os a consumir todo o alimento.

Amostras diárias de alimentos oferecido e refogado e também das fezes foram tomadas para determinação químicas. As quantidades amostradas do alimento oferecido e das fezes excretadas foram de 10 % do total diário. As sobras, quando houve, foram amostradas integralmente. As amostras foram, logo após a coleta, secas em estufa com circulação forçada de ar, a 60 °C, por 48 h. Após secagem, as amostras foram moídas em moinho tipo Wiley, com peneiras com crivos de 1 mm, e armazenadas em sacos plásticos identificados. Ao final do experimento, as amostras diárias foram misturas proporcionalmente, formando uma amostra composta por animal.

Os coeficientes de digestibilidade aparente de cada unidade dietética dos alimentos foram determinados conforme a Equação 7.

### **3.9. Ensaio de balanço de nitrogênio**

Durante os dias do ensaio de digestibilidade aparente (d23 ao d27), foram controlados, como comentado acima, o consumo de alimento (oferecido e sobras) e a excreção de fezes de cada animal. Durante estes dias também foram controladas as excreções de urina, por coleta total e amostrados cerca de 20 ml para posteriormente fazer parte de uma amostra composta para determinação de derivados de purina. Nestas amostras compostas (alimento oferecido, sobras, fezes e urina), foi determinado o teor

de nitrogênio total, pelo método micro Kjeldahl (AOAC, 1995). O balanço de nitrogênio foi calculado como:

$$\text{Balanço de } N = N_{\text{oferecido}} - (N_{\text{sobras}} + N_{\text{fezes}} + N_{\text{urina}}) \quad (20)$$

onde  $N_{\text{oferecido}}$ ,  $N_{\text{sobras}}$ ,  $N_{\text{fezes}}$  e  $N_{\text{urina}}$  representam, respectivamente, as quantidades médias diárias de nitrogênio nos alimentos oferecidos, nas sobras alimentares, nas fezes e na urina.

### 3.10. Ensaio de trânsito de digesta

Como marcadores para estimativa de trânsito de digesta foram usados o sal NaCoEDTA.3H<sub>2</sub>O (Co-EDTA) para marcar a fase líquida e fibra mordantada com cromo (Cr-FDN) para marcar a fase sólida.

O preparo destes marcadores foi feito segundo descrito por Udén et al. (1980). As doses utilizadas foram de 50 g de Cr-FDN por animal e 1,38 g Co-EDTA por kg de matéria seca consumida.

A Cr-FDN foi colocada diretamente no rúmen dos animais com o auxílio de um aplicador (cano de PVC) acoplado à cânula ruminal. O Co-EDTA foi previamente diluído em 40 ml de água, colocados em uma seringa de 60 ml e depois injetado diretamente no rúmen dos animais.

Ambos foram aplicados imediatamente antes da primeira refeição do dia d22.

As coletas de amostras de fezes para determinação de marcadores de trânsito de digesta através do trato gastrintestinal (TGI) foram feitas nos seguintes horários: 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132 e 144 horas após a introdução dos marcadores de fases líquida e sólida.

A quantidade amostrada das fezes para determinação dos marcadores foi de 10 % da quantidade excretada no intervalo ou, no mínimo, 25 g de fezes frescas.

Após amostragem, as fezes foram secas, moídas e armazenadas do mesmo modo mencionado acima, sem, no entanto, misturá-las.

As determinações dos marcadores de cinética digestiva (Cr e Co) foram feitas por ED-XRF, pelo Laboratório de Instrumentação Nuclear (CENA-USP).

Os resultados foram ajustados pelo modelo de Grovum & Williams (1973) (vide item 2.6.3.).

### **3.11. Ensaio de trânsito de proteína microbiana**

Para este ensaio, o marcador de microrganismos ruminais utilizado foi o sal ( $^{15}\text{NH}_4$ )SO<sub>4</sub>, com enriquecimento isotópico de 90 %. A dose aplicada foi de 1 mg de  $^{15}\text{N}$  por kg de peso vivo (adaptado de McAllan et al., 1994). A aplicação deste sal foi feita de modo semelhante a do Co-EDTA, também em dose única.

A dose foi aplicada pela manhã, imediatamente antes do oferecimento do alimento. A dose foi diluída em aproximadamente 40 ml de água e aplicada com auxílio de uma seringa.

As coletas de líquido duodenal foram nos seguintes horários: 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 26, 30, 34, 38, 42 e 46 horas após a dosificação.

A análise para determinação do  $^{15}\text{N}$  foi feita por espectrometria de massas, pelo Laboratório de Ecologia Isotópica (CENA-USP). Os dados foram ajustados pelo modelo de Grovum & Williams (1973). O modelo é indicado para o trato digestório completo (vide Equação 8) e para este ensaio foi estudado apenas uma fração deste trato (rúmen → duodeno). Sendo assim, o modelo apresentado na Equação 8 pode ser esquematizado da seguinte forma:



$$\text{Marcador} \rightarrow \underset{k_1}{\text{pool1}} \rightarrow \underset{k_2}{\text{pool2}} \rightarrow \text{duodeno} \quad (21)$$

Na interpretação dos resultados, *pool1* é a população microbiana no rúmen,  $k_1$  a taxa de incorporação do marcador pelo *pool1*, *pool2* é a população microbiana no duodeno e  $k_2$  a taxa de passagem da proteína microbiana do rúmen para o duodeno.

### 3.12. Ensaio de síntese de proteína microbiana *in vivo*

Para a estimativa do suprimento diário de proteína microbiana foi utilizada a técnica de excreção urinária de derivados de purina (DP).

A excreção diária de urina entre os dias d23 e d27 foi recolhida em balde plástico contendo 100 ml de ácido sulfúrico 10 %. Esta quantidade foi suficiente para manter o pH da urina coletada entre 2 e 3. Após a medição do volume excretado, 20 ml de urina foram amostrados e congelados. Após o experimento, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas em banho ultra-sônico, por 5 min. Uma amostra composta foi feita para cada animal, com base na proporcionalidade de suas excreções, e diluída de modo equivalente a 3 litros de total urinário excretado diariamente.

Desta amostra composta pré diluída, duas novas amostras foram preparadas por diluição segundo proposta de Chen & Gomes (1992). Uma amostra mais diluída foi utilizada para determinação de alantoína e a outra para determinação de ácido úrico, xantina e hipoxantina, conforme metodologia colorimétrica descrita por Chen & Gomes (1992).

### 3.13. Ensaio de síntese de proteína microbiana *in vitro*

A síntese microbiana foi estimada *in vitro* através do uso da técnica de incorporação de radiofósforo ( $^{32}\text{P}$ ), conforme descrição de Van Nevel & Demeyer

(1977) com as modificações propostas por Bueno (1998) e Gobbo (2001). Como inóculo, foi utilizado conteúdo ruminal dos animais alimentados com as dietas experimentais.

Assim como no ensaio *in vitro* de produção de gases, foram também preparados separadamente inóculos provenientes de animais alimentados com os diferentes tratamentos. Todos os tratamentos foram inoculados com todos os inóculos, para testar a especificidade do inóculo.

A dose de  $^{32}\text{P}$  aplicada a cada frasco foi de 25  $\mu\text{l}$ , correspondente a 0,1  $\mu\text{Ci}$  (3700 Bq). Após incubação, determinou-se a atividade radioativa nas frações solúveis e insolúveis. A emissão de partículas radioativas foi detectada por cintilação líquida.

Todo o radiofósforo excedente à abundância isotópica natural, foi computado como  $^{32}\text{P}$  aplicado. A quantidade de fósforo incorporado à massa microbiana foi quantificada conforme as Equações 15 e 16 e a quantidade de proteína microbiana sintetizada foi estimada conforme a Equação 17.

### 3.14. Análise estatística

O delineamento deste experimento foi de dois quadrados latinos amalgamados (3 dietas, 3 períodos e 6 animais) resultando em um retângulo 3×6 (Mead et al., 1993). Aos seis animais escolhidos foram atribuídos números de 1 a 6, por sorteio. Esta identificação foi respeitada até o final do experimento (três períodos).

Para cada período foram sorteados dois animais para cada dieta, não podendo estes animais receber mais estas dietas nos períodos posteriores.

Pelo delineamento estatístico proposto para o experimento como um todo, os dados foram submetidos à análise de variância de acordo com seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_j + P_k + e_{ijk} \quad (22)$$

onde:  $Y_{ijk}$  = variável dependente;

$\mu$  = média geral;

$T_i$  = efeito do tratamento (dietas) (i = 1 a 3);

$A_j$  = efeito do animal (j = 1 a 6);

$P_k$  = efeito do período (k = 1 a 3);

$e_{ijk}$  = resíduo.

Duas exceções, porém foram feitas. Os ensaios de produção de gases e de síntese de proteína microbiana *in vitro* foram conduzidos em um delineamento do tipo fatorial completo. Isto foi feito por dois motivos. Os ensaios *in vitro* não consideram o fator “animal” como fonte de variação. As técnicas *in vitro* utilizadas usaram líquido ruminal como fonte de inóculo, sendo esta, portanto, um fonte de variação, com possibilidade de haver interação entre inóculo e substrato. Para estes casos, a análise de variância foi feita com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + I_j + P_k + S_i \times I_j + e_{ijk} \quad (23)$$

onde:  $Y_{ijk}$  = variável dependente;

$\mu$  = média geral;

$S_i$  = efeito do substrato (alimentos) (i = 1 a 3);

$I_j$  = efeito do inóculo (j = 1 a 3);

$P_k$  = efeito do período (k = 1 a 3);

$S_i \times I_j$  = efeito da interação substrato\*inóculo;

$e_{ijk}$  = resíduo.

Para as análises estatísticas foi utilizado o PROC GLM do programa estatístico SAS (SAS, 2000). O nível de probabilidade para aceitação ou rejeição no teste de hipótese foi de 5 %.

As médias foram corrigidas (“least square means”) e comparadas pelos erros padrões das diferenças entre as médias (epd) e pelas diferenças mínimas significativas obtidas utilizando o teste t de Student ao nível de probabilidade de 5 %.

Quando necessário, os dados foram comparados também pelo coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização química dos tratamentos

A caracterização química dos fenos utilizados neste experimento é apresentada na Tabela 1.

Houve diferença entre os três fenos quanto aos teores de PB ( $P < 0,01$ ), proteína insolúvel em detergente ácido (PIDA) ( $P < 0,01$ ), MS ( $P < 0,05$ ), MO ( $P < 0,05$ ), FDN ( $P < 0,05$ ), hemicelulose ( $P < 0,05$ ) e celulose ( $P < 0,05$ ).

Os tratamentos BRA e TIF não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre si quanto aos teores de FDA, LDA e sílica, mas, para os mesmos componentes, ambos diferenciaram-se do tratamento ALF ( $P < 0,05$ ).

Em trabalho semelhante a este, Korndörfer (1999) reportou teores de MS, MO, FDN e FDA próximos aos encontrados neste trabalho para ALF e BRA. Porém, quanto ao teor de PB, seus resultados foram de 61 e 140  $\text{g.kg}^{-1}$  MS, respectivamente para BRA e ALF, diferindo, portanto daqueles aqui reportados.

Os teores de PB encontrados variaram praticamente 250 % entre os tratamentos. Ressalte-se o fato de que grande parte do teor de PB foi representado pela PB insolúvel em detergente ácido (PIDA) e, portanto, de baixa disponibilidade aos animais.

A composição dos tratamentos é bastante característica, não diferindo muito dos valores encontrados na literatura, exceto para os teores de proteína dos tratamentos

BRA e TIF. Estes teores estão abaixo dos esperados para fenos comerciais, mas se enquadram para o propósito deste experimento.

Tabela 1. *Caracterização química, em g.kg<sup>-1</sup> MS, dos fenos de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF)*

<i>componentes</i>	<i>tratamentos</i>			<i>epd*</i>
	<i>ALF</i>	<i>BRA</i>	<i>TIF</i>	
<i>matéria seca**</i>	841,7 <sup>c</sup>	851,9 <sup>a</sup>	848,5 <sup>b</sup>	1,25
<i>matéria orgânica</i>	900,3 <sup>c</sup>	925,5 <sup>a</sup>	907,1 <sup>b</sup>	2,92
<i>fibra em detergente neutro</i>	520,8 <sup>c</sup>	777,9 <sup>b</sup>	803,5 <sup>a</sup>	11,02
<i>fibra em detergente ácido</i>	417,7 <sup>b</sup>	470,2 <sup>a</sup>	460,7 <sup>a</sup>	8,32
<i>lignina em detergente ácido</i>	105,7 <sup>a</sup>	60,7 <sup>b</sup>	65,6 <sup>b</sup>	3,96
<i>hemicelulose</i>	103,1 <sup>c</sup>	307,7 <sup>b</sup>	342,8 <sup>a</sup>	6,55
<i>celulose</i>	307,7 <sup>c</sup>	382,3 <sup>a</sup>	361,3 <sup>b</sup>	4,90
<i>silica</i>	4,3 <sup>b</sup>	27,2 <sup>a</sup>	33,9 <sup>a</sup>	3,46
<i>proteína insolúvel em detergente ácido</i>	21,4 <sup>a</sup>	8,2 <sup>c</sup>	15,6 <sup>b</sup>	0,68
<i>proteína bruta</i>	190,8 <sup>a</sup>	29,0 <sup>c</sup>	75,1 <sup>b</sup>	2,89
<i>PIDA/PB***</i>	11,2 <sup>c</sup>	28,3 <sup>a</sup>	20,7 <sup>b</sup>	1,79

\* *epd: erro padrão da diferença entre as médias*

\*\* *valores de matéria seca expressos em g.kg<sup>-1</sup> matéria original*

\*\*\* *relação percentual entre os teores de proteína insolúvel em detergente ácido (PIDA) e proteína bruta (PB)*

<sup>a, b, c</sup> *médias seguidas por superescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si (P < 0,05)*

Segundo Van Soest (1994), o teor mínimo de PB na dieta de ruminantes para suprir N para as atividades microbianas ruminais e não comprometer o consumo e a digestibilidade dever ser de 60 a 80 g.kg<sup>-1</sup> MS. Sendo assim, os tratamentos estão dispostos abaixo (29), acima (191) e dentro deste limite (75 g PB.kg<sup>-1</sup> MS),

respectivamente para os tratamentos BRA, ALF e TIF. É importante notar que os valores citados por Van Soest (1994) não são os de exigência de proteína pelo animal. O NRC (1985) aponta, para ovinos com peso vivo médio de 40 kg, teor protéico na dieta de  $116 \text{ g.kg}^{-1} \text{ MS}$ .

Na literatura, os poucos dados referentes a *Brachiaria decumbens* como alimento para ovinos referem-se ao fornecimento de planta verde, normalmente em condição de pastejo. Dados com feno de braquiária são muito escassos.

A composição de ALF apresentou resultados bastante similares aos dados relacionados a fenos de alfafa de boa qualidade (Alexandrov, 1998; Ferret et al., 1999; Moreira et al., 2001a; 2001b).

O tratamento TIF apresentou características químicas similares às encontradas por Ribeiro et al. (2001) para o feno de Tifton-85 com 42/56 dias de idade, caracterizando-o como feno de qualidade regular. Ataíde Júnior et al. (2001), porém, constatou composição de maior qualidade protéica para fenos de Tifton-85 com idades de corte de 35, 42 e 56 dias (respectivamente, 171, 146 e  $122 \text{ g PB.kg}^{-1} \text{ MS}$ ).

#### 4.2. Consumo voluntário de matéria seca

Os resultados de consumo voluntário de matéria seca (Tabela 2) dos tratamentos foi maior para ALF ( $P < 0,01$ ). O consumo de ALF foi maior para todos os animais e, de modo oposto, BRA foi o menos consumido. Porém, estatisticamente, não houve diferença ( $P = 0,08$ ) entre os tratamentos BRA e TIF e ambos diferiram do tratamento ALF ( $P < 0,01$ ).

Os valores de CVMS encontrados são bastante semelhantes aos encontrados na literatura para dietas exclusivas de volumosos, porém, abaixo dos valores das tabelas de exigência do NRC (1985), que apontam para ovinos em terminação, com peso vivo médio de 40 kg, consumo de  $1,6 \text{ kg MS.d}^{-1}$  (ou seja  $40 \text{ g.kg}^{-1} \text{ .d}^{-1}$ ). CVMS desta ordem

apenas seria possível com forragem se esta fosse de extrema qualidade ou, então, com a suplementação de concentrados, pois a dieta necessitaria ter teor de nutrientes digestíveis totais (NDT) ao redor de 750 – 800 g.kg<sup>-1</sup>.

Tabela 2. Consumo voluntário de matéria seca (CVMS) dos fenos de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF)

CVMS*	tratamentos			epd**
	ALF	BRA	TIF	
g.d <sup>-1</sup>	1463,9 <sup>a</sup>	750,4 <sup>b</sup>	928,8 <sup>b</sup>	101,81
g.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	35,5 <sup>a</sup>	19,2 <sup>b</sup>	23,0 <sup>b</sup>	1,94
g.kg <sup>-0,75</sup> .d <sup>-1</sup>	89,9 <sup>a</sup>	47,8 <sup>b</sup>	57,8 <sup>b</sup>	5,20

\* g.d<sup>-1</sup>: gramas por dia; g.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>: gramas por quilograma de peso vivo por dia; g.kg<sup>-0,75</sup>.d<sup>-1</sup>: gramas por quilograma de peso metabólico por dia;

\*\* epd: erro padrão da diferença entre as médias;

<sup>a, b</sup> médias seguidas por superescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si ( $P < 0,05$ )

O CVMS encontrado para BRA é bastante similar àquele encontrado por Korndörfer (1999) (20,3 g.kg<sup>-1</sup> PV.d<sup>-1</sup>), mesmo sendo seu feno com teor protéico mais elevado (61 g PB.kg<sup>-1</sup> MS).

Quanto ao CVMS de ALF, os dados aqui encontrados (35,5 g.kg<sup>-1</sup> PV.d<sup>-1</sup>) são superiores aos de Korndörfer (1999) (22,7 g.kg<sup>-1</sup> PV.d<sup>-1</sup>) e de Moreira et al. (2001a) (26,9 g.kg<sup>-1</sup> PV.d<sup>-1</sup>). Isso talvez seja reflexo do teor de PB de ALF (191 g.kg<sup>-1</sup>) que foi ligeiramente superior quando comparado aos teores dos fenos utilizados naqueles trabalhos (respectivamente, 140 e 180 g PB.kg<sup>-1</sup> MS).

A Figura 10 mostra que estes dados estão de acordo com o fato de que o teor de proteína é um fator limitante ao consumo voluntário de matéria seca, conforme exposto por Ellis et al. (2000) (vide Figura 4).



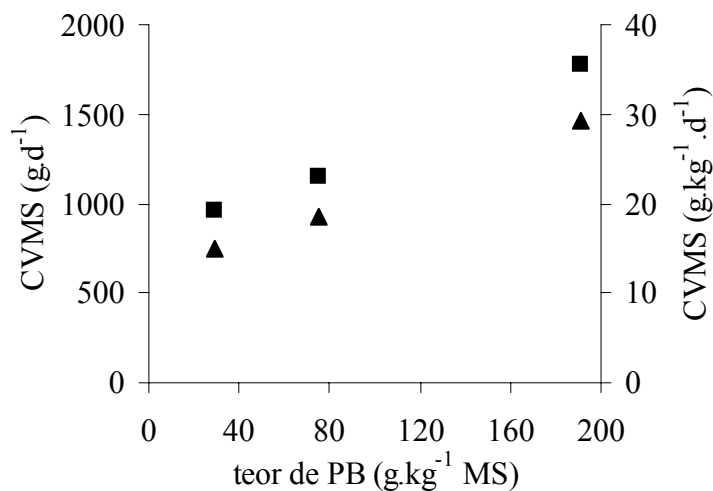


Figura 10. Relação entre o teor de proteína bruta (PB) e o consumo voluntário de matéria seca (CVMS), em  $\text{g.d}^{-1}$  ( $\blacktriangle$ ) e  $\text{g.kg}^{-1} \text{PV.d}^{-1}$  ( $\blacksquare$ )

### 4.3. Degradabilidade ruminal

Os resultados de degradabilidade ruminal *in situ* e *in vitro* são, inicialmente, apresentados separadamente (itens 4.3.1 e 4.3.2), mas o confrontamento destes resultados é feito no item 4.3.3.

#### 4.3.1. Degradabilidade ruminal *in situ*

Os perfis de degradação *in situ* dos alimentos testados estão graficamente representados na Figura 11.

Pode-se notar que o ajuste dos dados pelo modelo de Ørskov & McDonald (1979) foi satisfatório ( $R^2 > 0,95$ ), para os três alimentos (Figura 11). Os parâmetros

biológicos ( $A$ ,  $B$ ,  $A+B$ ,  $t_0$ ,  $p_{efet}$  e  $c$ ) e matemáticos (constantes  $a$  e  $b$ ) do modelo usado para o ajuste dos dados observados são apresentados na Tabela 3.

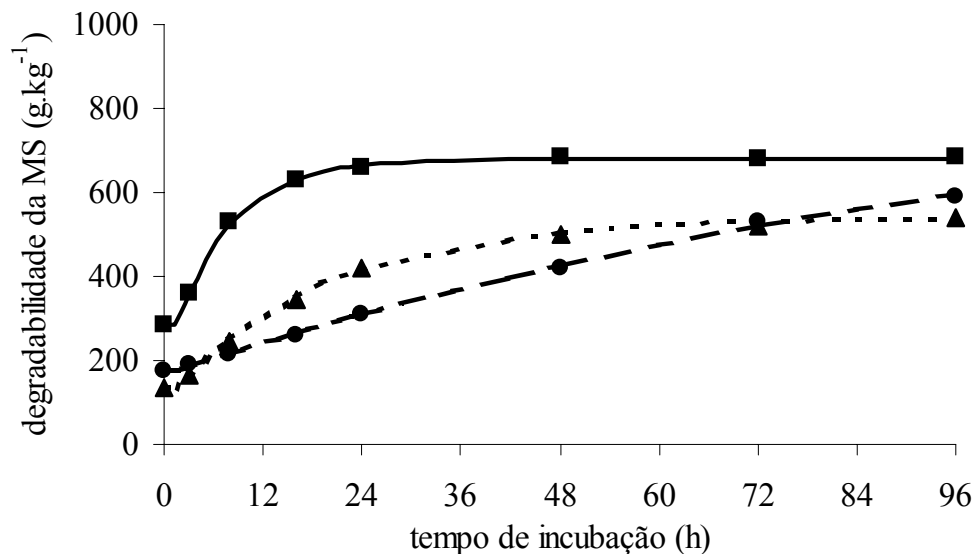


Figura 11. *Perfis da cinética de degradação in situ dos fenos de alfafa (◻ e linha sólida), de braquiária (● e linha tracejada) e de Tifton-85 (▴ e linha pontilhada) (os pontos referem-se aos dados médios observados e as linhas, ao ajuste de dados pelo modelo de Ørskov & McDonald (1979))*

O modelo de Ørskov & McDonald (1979) é representado por um equação exponencial de primeira ordem. O grau de curvatura dos perfis por ele gerados é dado por  $c$  (vide Equação 2). Quando a taxa de degradação,  $c$ , tende a zero (ou é muito diminuta, como é o caso de BRA,  $c = 0,014 \text{ h}^{-1}$ ), a equação se aproxima de uma reta, como pode ser observado na Figura 11. Isso provoca uma superestimativa do potencial de degradação ( $A+B$ ), podendo produzir valores irrealistas como degradabilidades superiores a  $1000 \text{ g.kg}^{-1}$  (Tabela 3).

Tabela 3. *Parâmetros do modelo de Ørskov & McDonald (1979) para a degradação in situ da matéria seca dos fenos de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF)*

parâmetros*	tratamentos			epd**
	ALF	BRA	TIF	
<i>matemáticos</i>				
<i>a</i>	172,8	115,3	113,2	33,59
<i>b</i>	505,5 <sup>ab</sup>	997,1 <sup>a</sup>	427,5 <sup>b</sup>	251,75
<i>biológicos</i>				
<i>A</i>	288,3 <sup>a</sup>	177,3 <sup>b</sup>	137,0 <sup>c</sup>	0,68
<i>B</i>	389,2 <sup>b</sup>	935,0 <sup>a</sup>	403,8 <sup>b</sup>	254,03
<i>A+B</i>	677,9 <sup>ab</sup>	1112,2 <sup>a</sup>	540,8 <sup>ab</sup>	253,39
<i>c</i>	0,145 <sup>a</sup>	0,014 <sup>c</sup>	0,051 <sup>b</sup>	0,0062
<i>t<sub>0</sub></i>	1,57	3,78	0,93	1,949
<i>p<sub>efet</sub></i> ( <i>k<sub>e</sub></i> = 0,02 h <sup>-1</sup> )	617,7 <sup>a</sup>	389,4 <sup>c</sup>	418,8 <sup>b</sup>	14,33
<i>p<sub>efet</sub></i> ( <i>k<sub>e</sub></i> específico)	592,6 <sup>a</sup>	386,2 <sup>b</sup>	400,8 <sup>b</sup>	14,59

\* *a e b: constantes do modelo; A: fração prontamente solúvel (g.kg<sup>-1</sup>); B: fração insolúvel potencialmente fermentecível (g.kg<sup>-1</sup>); A+B: degradabilidade potencial (g.kg<sup>-1</sup>); c: taxa de degradação da fração B (h<sup>-1</sup>); t<sub>0</sub>: tempo de colonização (h); p<sub>efet</sub>: degradabilidade efetiva (g.kg<sup>-1</sup>); k<sub>e</sub>: taxa de escape do rúmen; k<sub>e</sub> específico: taxa real de escape do rúmen, obtida pelos marcadores de digesta, 0,0301; 0,0204 e 0,0244 h<sup>-1</sup>, respectivamente para ALF, BRA e TIF*

\*\* *epd: erro padrão da diferença entre as médias*

<sup>a, b, c</sup> *médias seguidas por superescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si (P < 0,05)*

A taxa de degradação (*c*) de BRA e TIF está de acordo com Sampaio (1990), Bueno (1998), Korndörfer (1999), Cabral Filho (1999) e Machado et al. (2001) que

estimaram valores de  $c$  para forrageiras tropicais entre 0,02 e 0,05  $\text{h}^{-1}$ .

A taxa de degradação de ALF foi superior àquelas relatadas por Alexandrov (1998), Korndörfer (1999) e Machado et al. (2001) (respectivamente, 0,077, 0,090 e 0,081  $\text{h}^{-1}$ ).

As degradabilidades efetivas ( $p_{efet}$ ) (adotando-se  $k_e = 0,02 \text{ h}^{-1}$ ) de ALF, BRA e TIF foram, respectivamente, de 618, 389 e 419  $\text{g.kg}^{-1}$  (Tabela 3). Os resultados de ALF são inferiores aos encontrados por Machado et al. (2001) (698  $\text{g.kg}^{-1}$ ) para a planta fresca de alfafa, que normalmente tem uma degradabilidade superior. Alexandrov (1998) encontrou degradabilidade de feno de alfafa de 659  $\text{g.kg}^{-1}$ .

As degradabilidades efetivas de fenos de braquiária encontradas por Korndörfer (1999) (537 e 542  $\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente para fenos com 28 e 56 dias de idade) também foram superiores à encontrada para BRA. A razão pode ser o grau de moagem mais intenso utilizado pela autora acima, que utilizou peneiras com crivo de 1 mm.

Quanto à degradabilidade efetiva de TIF, esta foi similar àquelas encontradas por Cabral Filho (1999) e Machado et al. (2001) para fenos de Tifton.

#### 4.3.2. Degradabilidade ruminal *in vitro*

Os perfis de degradação *in vitro* dos alimentos testados (ALF, BRA e TIF) utilizando como inóculo o líquido ruminal de ovinos alimentados exclusivamente com o alimento correspondente estão graficamente representados na Figura 12.

Pode-se notar que, também para esta técnica, o ajuste dos dados pelo modelo de Ørskov & McDonald (1979) foi satisfatório ( $R^2 > 0,95$ ), para os três alimentos (Figura 12). Os parâmetros biológicos ( $A$ ,  $B$ ,  $A+B$ ,  $t_0$ ,  $p_{efet}$  e  $c$ ) e matemáticos (constantes  $a$  e  $b$ ) do modelo usado para o ajuste dos dados observados são apresentados na Tabela 4.

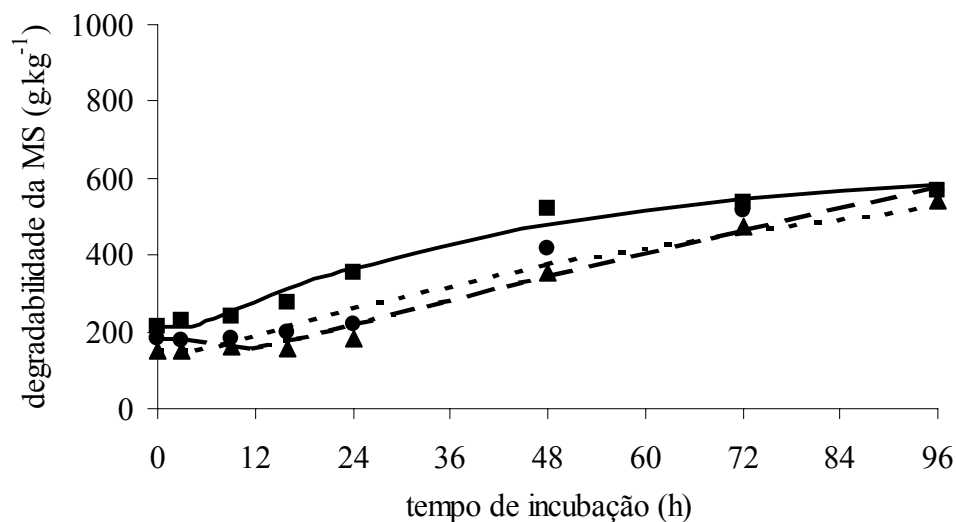


Figura 12. *Perfis da cinética de degradação in vitro dos fenos de alfafa (□ e linha sólida), de braquiária (● e linha tracejada) e de Tifton-85 (π e linha pontilhada) (os pontos referem-se aos dados médios observados e as linhas, ao ajuste de dados pelo modelo de Ørskov & McDonald (1979))*

As Figuras 11 e 12 estão na mesma escala e pode ser graficamente observado que o desaparecimento de material ocorre de maneira mais rápida na técnica *in situ* que na *in vitro*.

Os dados da Figura 12 e da Tabela 4 são referentes à cinética de degradação *in vitro* de um alimento (substrato) usando como inóculo o líquido ruminal de ovinos alimentados exclusivamente com o mesmo alimento. Porém neste ensaio, como mencionado anteriormente, foi testada a especificidade do inóculo ao substrato, testando para tanto, todos os substratos com todos os inóculos.

Na tabela 5, são apresentados os dados médios da cinética de degradação dos três substratos para cada um dos inóculos testados.

Tabela 4. *Parâmetros do modelo de Ørskov & McDonald (1979) para a degradação in vitro da matéria seca dos fenos de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF), utilizando como fonte de inóculo líquido ruminal de ovinos alimentados com o alimento correspondente*

parâmetros*	substratos			epd**
	ALF	BRA	TIF	
<i>matemáticos</i>				
<i>a</i>	167,5 <sup>a</sup>	94,5 <sup>b</sup>	110,0 <sup>b</sup>	8,12
<i>b</i>	467,7 <sup>b</sup>	5293,2 <sup>a</sup>	620,7 <sup>b</sup>	865,00
<i>biológicos</i>				
<i>A</i>	215,3 <sup>a</sup>	158,3 <sup>b</sup>	146,3 <sup>c</sup>	5,32
<i>B</i>	420,3 <sup>b</sup>	5229,7 <sup>a</sup>	584,3 <sup>b</sup>	865,01
<i>A+B</i>	635,0 <sup>b</sup>	5387,7 <sup>a</sup>	730,7 <sup>b</sup>	863,70
<i>c</i>	0,023 <sup>a</sup>	0,001 <sup>c</sup>	0,011 <sup>b</sup>	0,0022
<i>t<sub>0</sub></i>	4,27 <sup>b</sup>	11,91 <sup>a</sup>	4,93 <sup>b</sup>	0,893
<i>p<sub>efet</sub> (k<sub>e</sub> = 0,02 h<sup>-1</sup>)</i>	414,8 <sup>a</sup>	342,0 <sup>b</sup>	334,9 <sup>b</sup>	5,16
<i>p<sub>efet</sub> (k<sub>e</sub> específico)</i>	334,5 <sup>b</sup>	343,5 <sup>a</sup>	334,3 <sup>b</sup>	1,82

\* *a e b: constantes do modelo; A: fração prontamente solúvel (g.kg<sup>-1</sup>); B: fração insolúvel potencialmente fermentecível (g.kg<sup>-1</sup>); A+B: degradabilidade potencial (g.kg<sup>-1</sup>); c: taxa de degradação da fração B (h<sup>-1</sup>); t<sub>0</sub>: tempo de colonização (h); p<sub>efet</sub>: degradabilidade efetiva (g.kg<sup>-1</sup>); k<sub>e</sub>: taxa de escape do rúmen; k<sub>e</sub> específico: taxa real de escape do rúmen, obtida pelos marcadores de digesta, 0,0301; 0,0204 e 0,0244 h<sup>-1</sup>, respectivamente para ALF, BRA e TIF*

\*\* *epd: erro padrão da diferença entre as médias*

<sup>a, b</sup> *médias seguidas por superescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si (P < 0,05)*

Na análise geral dos dados, as constantes  $a$  e  $b$  e os parâmetros biológicos  $A$ ,  $B$ ,  $c$ ,  $A+B$ ,  $t_0$  e  $p_{efet}$  foram influenciadas significativamente ( $P < 0,001$ ) pelo substrato. As mesmas variáveis, com exceção de  $a$ , também foram influenciadas ( $P < 0,05$ ) pelo fonte de inóculo. Os efeitos da interação substrato\*inóculo foram observados nas variáveis  $b$ ,  $B$ ,  $A+B$  e  $p_{efet}$  ( $P < 0,05$ ).

Tabela 5. Médias dos parâmetros do modelo de Ørskov & McDonald (1979) para a degradação in vitro da matéria seca dos substratos, utilizando como fonte de inóculo líquido ruminal de ovinos alimentados individualmente com feno de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF)

parâmetros*	inóculos			epd*
	ALF	BRA	TIF	
<i>matemáticos</i>				
$a$	121,6	124,6	127,7	4,71
$b$	969,1 <sup>b</sup>	2329,1 <sup>a</sup>	845,5 <sup>b</sup>	498,87
<i>biológicos</i>				
$A$	175,5 <sup>a</sup>	177,8 <sup>a</sup>	167,9 <sup>b</sup>	3,08
$B$	915,2 <sup>b</sup>	2297,8 <sup>a</sup>	805,3 <sup>b</sup>	499,41
$A+B$	1090,7 <sup>b</sup>	2475,2 <sup>a</sup>	973,1 <sup>b</sup>	498,66
$c$	0,012 <sup>a</sup>	0,006 <sup>b</sup>	0,013 <sup>a</sup>	0,0013
$t_0$	7,99 <sup>a</sup>	8,65 <sup>a</sup>	5,27 <sup>b</sup>	0,517
$p_{efet}$ ( $k_e = 0,02 h^{-1}$ )	348,4 <sup>a</sup>	361,5 <sup>b</sup>	375,4 <sup>b</sup>	2,98

\*  $a$  e  $b$ : constantes do modelo;  $A$ : fração prontamente solúvel ( $g.kg^{-1}$ );  $B$ : fração insolúvel potencialmente fermentecível ( $g.kg^{-1}$ );  $A+B$ : degradabilidade potencial ( $g.kg^{-1}$ );  $c$ : taxa de degradação da fração  $B$  ( $h^{-1}$ );  $t_0$ : tempo de colonização ( $h$ );  $p_{efet}$ : degradabilidade efetiva ( $g.kg^{-1}$ );  $k_e$ : taxa de escape do rúmen

\*\* epd: erro padrão da diferença entre as médias

<sup>a, b</sup> médias seguidas por superescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si ( $P < 0,05$ )

#### 4.3.3. Degradabilidade ruminal *in situ* vs. *in vitro*

Os dados referentes à cinética de degradação *in vitro*, como os aqui apresentados, são escassos na literatura, e mais raros ainda são aqueles de forrageiras tropicais.

Pelos dados apresentados nas Tabelas 3 e 4, embora haja correlação significativa entre elas ( $r = 0,54$ ;  $P = 0,03$ ), as frações prontamente solúveis (*A*) obtidas pela técnica *in vitro* são ligeiramente inferiores àquelas obtidas pela técnica *in situ*. A razão disso é o tamanho de poros utilizado para separar material “solúvel” e insolúvel. Para a técnica *in situ*, os poros das sacolinhas são maiores (35  $\mu\text{m}$ ) que os poros dos cadinhos sinterizados utilizados na técnica *in vitro*.

O tamanho dos poros da técnica *in situ* permite que material particulado (particularmente as partículas pequenas e de alta densidade) escape das sacolinhas. Isto pode ser visualizado principalmente para o substrato ALF, que apresentou *A* de 288 e 215  $\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente para as técnicas *in situ* e *in vitro*. Por ser leguminosa, as partículas geradas pela moagem de ALF são mais compactas e densas e, portanto, escapam das sacolinhas com maior facilidade, facilidade esta não encontrada na mesma proporção quando os cadinhos sinterizados são utilizados para a separação. Para gramíneas, o formato das partículas geradas pela moagem são mais alongadas, menos compactas e menos densas, fato este devido principalmente às diferenças morfológicas das plantas e aos maiores teores de fibras. (Huntington & Givens, 1995).

Nas duas técnicas, houve uma superestimativa da degradabilidade potencial (*A+B*) do substrato BRA, devido ao ajuste insatisfatório dos dados causado pela baixa taxa de degradação da fração *B* (*c*) (0,014 e 0,001  $\text{h}^{-1}$ , respectivamente para *in situ* e *in vitro*). Embora os dados de *A+B* tenham apresentado correlação entre as técnicas ( $r = 0,76$ ;  $P < 0,001$ ), a superestimativa deste parâmetro foi surpreendentemente grande para a técnica *in vitro*.



Um resumo das correlações obtidas entre as técnicas *in situ* e *in vitro* para estimar a degradabilidade da matéria seca dos alimentos no rúmen (respectivamente, Tabelas 3 e 4) é apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Coeficientes de correlação ( $r$ ) entre os parâmetros ( $n=18$ ) matemáticos ( $a$  e  $b$ ) e biológicos ( $A$ ,  $B$ ,  $A+B$ ,  $c$ ,  $t_0$  e  $p_{efet}$ ) obtidos pelo modelo de Ørskov & McDonald (1979) de ajuste dos dados de degradabilidade *in situ* e *in vitro* da matéria seca dos alimentos testados

<i>in situ</i>	<i>in vitro</i>							
	$a$	$b$	$A$	$B$	$A+B$	$c$	$t_0$	$p_{efet}$
$a$	$r=0,33$ ns							
$b$		$r=0,76$ ***						
$A$			$r=0,54$ *					
$B$				$r=0,78$ ***				
$A+B$					$r=0,76$ ***			
$c$						$r=0,63$ **		
$t_0$							$r=0,35$ ns	
$p_{efet}$								$r=0,60$ **

ns: não significativo ( $P > 0,05$ ); \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$

#### 4.4. Produção de gases

A Tabela 7 apresenta os parâmetros relativos à cinética fermentativa dos alimentos quando incubados com inóculo proveniente de animais alimentados exclusivamente com o mesmo alimento.

Tabela 7. *Parâmetros do modelo de France et al. (1993) e produções relativas de gases dos fenos de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF), utilizando como fonte de inóculo líquido ruminal de ovinos alimentados com o alimento correspondente*

<i>parâmetros*</i>	<i>substratos</i>			<i>epd*</i>
	<i>ALF</i>	<i>BRA</i>	<i>TIF</i>	
$V_f$ (ml.g <sup>-1</sup> MS)	137,8 <sup>b</sup>	256,0 <sup>a</sup>	165,6 <sup>b</sup>	24,71
$b$ (h <sup>-1</sup> )	0,063 <sup>a</sup>	0,018 <sup>c</sup>	0,031 <sup>b</sup>	0,0050
$c$ (h <sup>-1/2</sup> )	-0,297 <sup>a</sup>	-0,101 <sup>b</sup>	-0,142 <sup>b</sup>	0,0303
$t_0$ (h)	6,35	7,52	5,34	1,038
$R1$	0,960 <sup>a</sup>	0,566 <sup>c</sup>	0,817 <sup>b</sup>	0,0545
$R2$	0,778 <sup>a</sup>	0,452 <sup>c</sup>	0,610 <sup>b</sup>	0,0221

\*  $V_f$ : volume final, ou produção potencial de gases; b e c: constantes do modelo;  $t_0$ : tempo de colonização; R1: relação entre as produções de gases após 96 h e  $V_f$ ; R2: relação entre as produções de gases após 48 e 96 h

\*\* epd: erro padrão da diferença entre as médias

<sup>a, b, c</sup> médias seguidas por superescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si ( $P < 0,05$ )

Os tempos de colonização ( $t_0$ ) encontrados para ALF e BRA são semelhantes àqueles observados por Bueno et al. (1999b; 2000) para fenos de alfafa (de 6,1 a 7,1 h) e de braquiária (de 7,0 a 8,3 h).

A taxa de fermentação ( $\mu$ ) deste modelo, diferentemente da taxa de degradação ( $c$ ) de Ørskov & McDonald (1979) varia de acordo com o transcorrer do tempo. A variação de  $\mu$  é demonstrada na Figura 13. Enquanto a taxa de degradação de Ørskov & McDonald (1979) é constante, ou seja, assume que, do início ao final da degradação do alimento, a taxa com que esta ocorre é uniforme. Mas durante este processo, diferentes frações do alimento estão sendo degradadas. Os carboidratos não estruturais, por exemplo, são degradados mais rapidamente que as fibras.

A taxa de fermentação dependente do tempo do modelo de France et al. (1993), por sua vez, representa mais fidedignamente este processo. Como pode ser observado na Figura 13, os alimentos com maior conteúdo celular (energia facilmente fermentecível) possuem inicialmente maiores  $\mu$ . Com o transcorrer do tempo, estes componentes tornam-se escassos e as fontes de energia para fermentação restantes são fermentecíveis com menor velocidade.

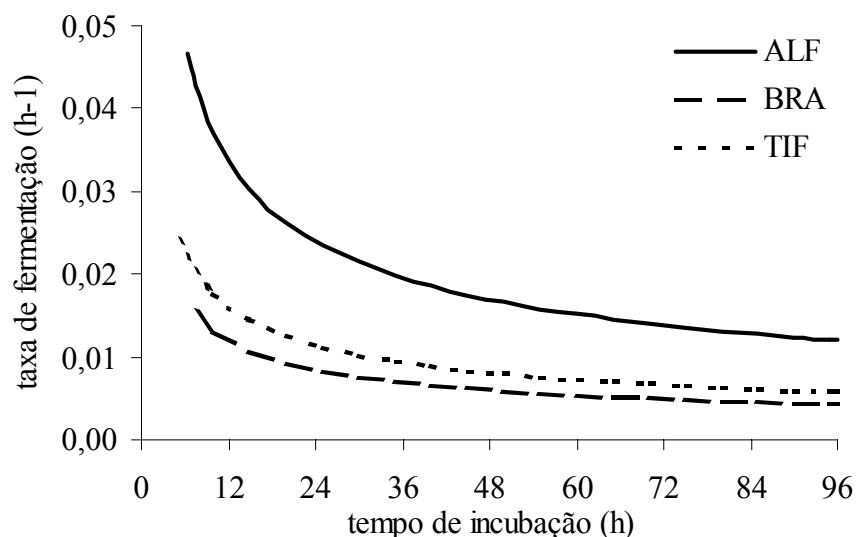


Figura 13. Taxa de fermentação ( $\mu$ ) (France et al.,1993) dos fenos de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF)

O tratamento BRA durante todo o tempo de incubação apresentou as menores taxas de fermentação ( $\mu$ ), indicando as mais baixa quantidade de compostos fermentecíveis. Nogueira Filho et al. (2000) encontrou  $\mu$  para *Brachiaria humidicola* e *Cynodon dactylon* após 6 horas de incubação de 0,016 e 0,022 h<sup>-1</sup> e após 48 h, de 0,020 e 0,028 h<sup>-1</sup>, respectivamente. Os dados apresentados na Figura 13 apontam  $\mu$  após 6 horas de 0,016 e 0,022 h<sup>-1</sup> e após 48 h, de 0,006 e 0,008 h<sup>-1</sup>, respectivamente para BRA e TIF. A rápida diminuição, comparado aos dados de Nogueira Filho et al. (2000), estão relacionados a baixa qualidade dos fenos de gramíneas aqui testados, pois rapidamente foram exauridas as reservas de carboidratos facilmente fermentecíveis.

Outro fato importante sobre  $\mu$  de BRA é que as diminutas taxas durante o período de incubação impossibilitam um bom ajuste dos dados pelo modelo.

Sendo assim, a curva de fermentação de BRA aproxima-se de uma reta (Figura 14) e a produção potencial de gases é superestimada para este alimento. Este fato é confirmado quando se avalia o parâmetro *RI* (Tabela 7).

*RI* é um parâmetro introduzido para estimar se o ensaio de produção de gases foi longo o suficiente para exprimir o potencial fermentativo do alimento e/ou se o modelo de France et al. (1993) conseguiu ajustar os dados a contento. O ideal seria que *RI* se aproximasse da unidade, indicando que o potencial de produção de gases foi atingido durante o ensaio.

Como o potencial de produção de gases ( $V_p$ ) é um valor assintótico estimado, nem sempre é atingido durante este período. O *RI* de BRA, no entanto, foi muito inferior aos demais, mesmo com um tempo relativamente longo para o ensaio (96 h), indicando que o modelo não ajustou-se de modo satisfatório. ALF apresentou o maior *RI* (0,960), ou seja, conseguiu exprimir 96 % de seu potencial durante o ensaio.

Outro parâmetro introduzido para compreender e comparar os alimentos é *R2* (Tabela 7). *R2* representa proporcionalmente quanto da produção total de gases determinada no ensaio (96 h) foi realizada até as 48 h de incubação. Assumindo-se uma taxa de escape ( $k_e$ ) teórica de 0,0208 h<sup>-1</sup>, o tempo médio de retenção no rúmen seria de

aproximadamente 48 h. Sendo assim, seria desejável que a maior parte da fermentação ocorresse dentro deste período, ou seja,  $R_2$  deve ser o mais próximo de 1 para que o alimento seja considerado de boa qualidade do ponto de vista fermentativo.

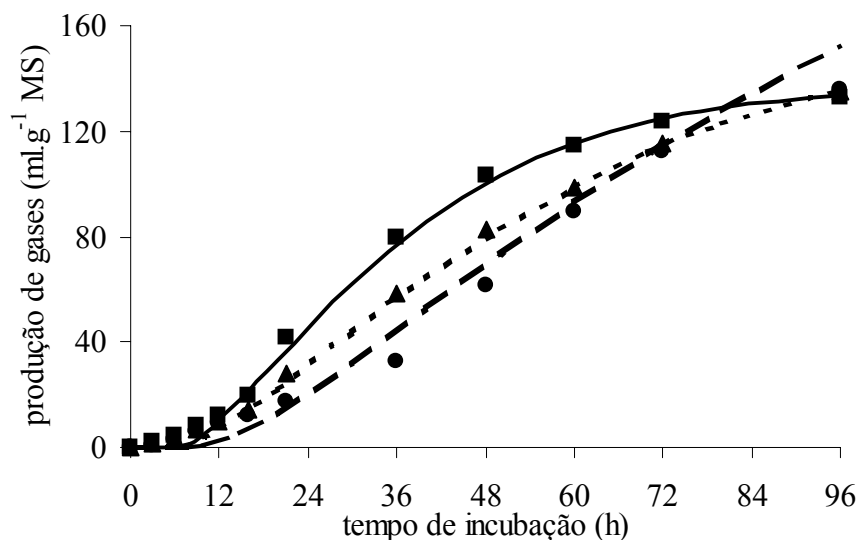


Figura 14. *Perfis da cinética de fermentação in vitro dos fenos de alfafa (□ e linha sólida), de braquiária (● e linha tracejada) e de Tifton-85 (π e linha pontilhada) utilizando como inóculo líquido ruminal de ovinos alimentados exclusivamente com o mesmo alimento testado (os pontos referem-se aos dados médios observados e as linhas, ao ajuste de dados pelo modelo de France et al. (1993))*

O maior valor de  $R_2$  (Tabela 7) foi obtido para ALF seguido de TIF e BRA, sendo eles, 0,78; 0,61 e 0,45, respectivamente, o que reflete as diferentes taxas de fermentação ( $\mu$ ) (Figura 13).

No ensaio de produção de gases, além de testar os substratos, foram testados os inóculos provenientes de animais alimentados exclusivamente com os alimentos testados e a interação entre inóculo\*substrato.

A Tabela 8 apresenta os parâmetros da cinética fermentativa para os inóculos testados.

Tabela 8. *Médias dos parâmetros do modelo de France et al. (1993) e produções relativas de gases dos substratos, utilizando como fonte de inóculo líquido ruminal de ovinos alimentados exclusivamente com feno de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF)*

parâmetros*	inóculos			epd*
	ALF	BRA	TIF	
$V_f$ (ml.g <sup>-1</sup> MS)	161,4 <sup>b</sup>	195,4 <sup>a</sup>	168,2 <sup>ab</sup>	14,27
$b$ (h <sup>-1</sup> )	0,037 <sup>a</sup>	0,030 <sup>b</sup>	0,042 <sup>a</sup>	0,0029
$c$ (h <sup>-1/2</sup> )	-0,171 <sup>b</sup>	-0,164 <sup>b</sup>	-0,208 <sup>a</sup>	0,0303
$t_0$ (h)	5,44	7,99	6,84	0,599
R1	0,819 <sup>a</sup>	0,704 <sup>b</sup>	0,855 <sup>a</sup>	0,0315
R2	0,643 <sup>a</sup>	0,562 <sup>b</sup>	0,647 <sup>a</sup>	0,0128

\*  $V_f$ : volume final, ou produção potencial de gases; b e c: constantes do modelo;  $t_0$ : tempo de colonização; R1: relação entre as produções de gases após 96 h e  $V_f$ ; R2: relação entre as produções de gases após 48 e 96 h

\*\* epd: erro padrão da diferença entre as médias

<sup>a, b</sup> médias seguidas por superescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si ( $P < 0,05$ )

Os inóculos ALF e TIF foram compatíveis na grande maioria dos parâmetros e distinguiram-se de BRA, o pior dentre eles. Os principais parâmetros para este comentário são os valores de R1 e R2.

Não houve interação inóculo\*substrato ( $P > 0,05$ ) para os parâmetros  $V_f$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $t_0$ ,  $R1$  e  $R2$ . Isto indica a independência para a utilização destes inóculos para a avaliação destas forrageiras.

#### 4.5. Parâmetros ruminais

A avaliação do ambiente ruminal através das modificações do pH e do teor de N amoniacal estão demonstrados graficamente nas Figuras 15 e 16.

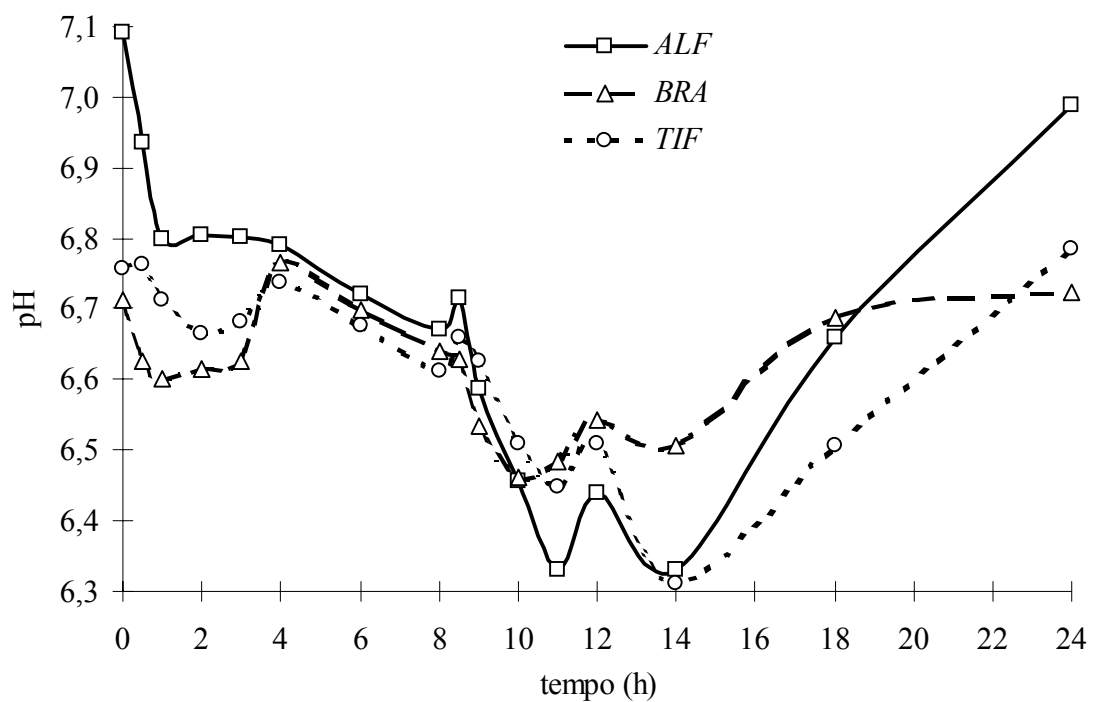


Figura 15. Modificações no pH ruminal, ao longo de 24 horas, de ovinos alimentados com fenos de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF) (observação: os horários 0 e 8 correspondem às duas refeições diárias)

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os valores de pH ruminal pós-prandial dos tratamentos (Figura 15). A única diferença ( $P < 0,05$ ) foi no pH inicial (0 h), medido imediatamente antes do fornecimento da primeira refeição. Para este horário, o pH ruminal dos animais alimentados com ALF foi superior aos demais.

As maiores variações de pH foram observadas para os animais alimentados com ALF. Os valores máximos de pH ruminal foram 7,1; 6,8 e 6,8 e os mínimos, 6,3; 6,4; 6,3, respectivamente para ALF, BRA e TIF.

Estes valores são compatíveis com as recomendações de Mould & Ørskov (1983) para manutenção do pH ruminal entre 6,2 e 7,0, com vistas ao bom desenvolvimento microbiano ruminal (com especial referência às bactérias celulolíticas).

Valores de pH semelhantes foram obtidos por Korndörfer (1999) que também não encontrou diferenças entre os valores de pH ruminal de ovinos alimentados com fenos de braquiária e de alfafa.

Embora o pH ruminal não tenha sido fator limitante ao desenvolvimento da população microbiana, o ambiente ruminal foi afetado negativamente pelo tratamento de menor teor de PB (BRA). Isto pode ser visualizado nas alterações da concentração de N amoniacal no rúmen (Figura 16).

A concentração de N amoniacal foi maior no conteúdo ruminal dos animais alimentados com ALF. A concentração foi mais baixa para os alimentados com BRA. Os três tratamentos apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) em todos os horários, exceto nos horários de 6 e 8 horas, nos quais ALF e TIF não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ), porém, diferiram de BRA ( $P < 0,05$ ).

Pelos resultados, fica ilustrado que alimentos pobres em nitrogênio são incapazes em suprir os microrganismos ruminais para atender suas exigências para desenvolvimento.

Satter & Slyter (1974) apontam valores entre 50 e 80 mg de N amoniacal por litro como concentração mínima necessária para não prejudicar o crescimento microbiano. O NRC (1985) aponta que, embora a concentração ideal de N amoniacal



ruminal necessária para o pleno crescimento microbiano não esteja clara, concentrações acima de 50-100 mg N amoniacal por litro de fluido ruminal não têm efeito na produção de proteína bacteriana. Sendo assim, BRA, em momento algum durante o dia, conseguiu suprir os microrganismos ruminais de N suficiente para seu metabolismo saudável, nem mesmo logo após as refeições (Figura 16). Os demais tratamentos, no entanto, não atingiram a concentração crítica em nenhum dos horários estudados. As mais baixas concentrações de N amoniacal para ALF e TIF foram, respectivamente, 88 e 56 mg.l<sup>-1</sup>.

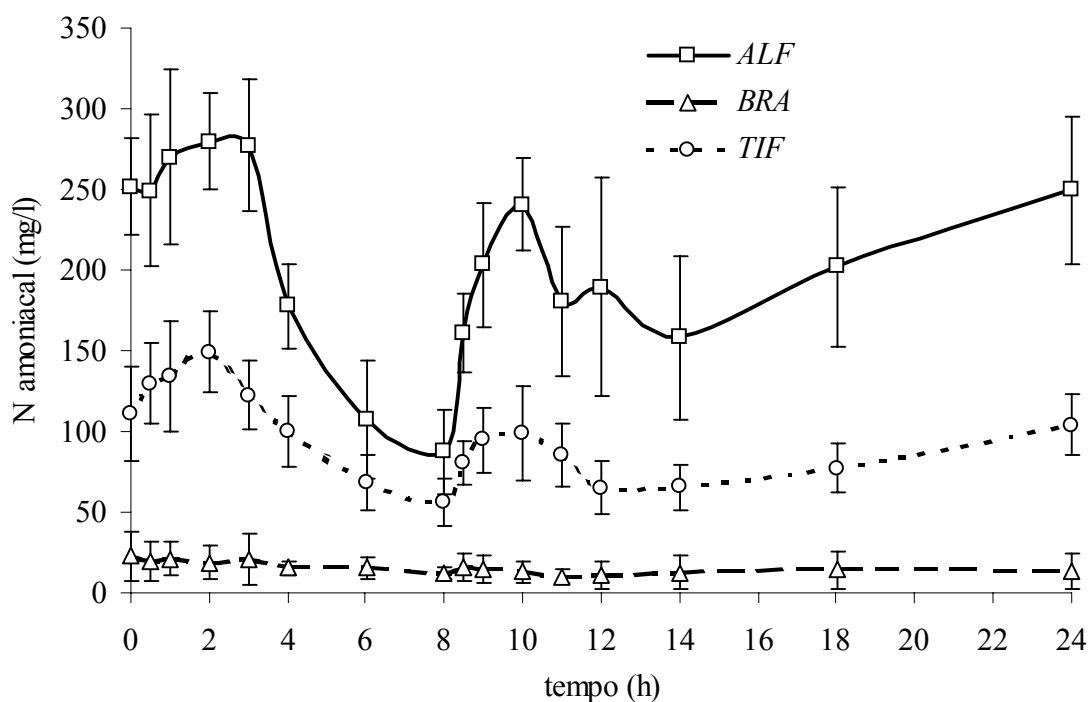


Figura 16. *Modificações na concentração de N amoniacal ruminal, ao longo de 24 horas, em ovinos alimentados com fenos de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF)(observação: os horários 0 e 8 correspondem às duas refeições diárias)*

#### 4.6. Digestibilidade aparente

O consumo de nutrientes durante o ensaio de digestibilidade aparente é apresentado na Tabela 9. Conforme mencionado anteriormente, o oferecimento de alimento durante o ensaio de digestibilidade foi restrito a 90 % do CVMS. Isso foi feito para tentar minimizar a seletividade dos animais e forçá-los a consumir todo o alimento. Ao contrário, ou seja, caso fosse permitida ao animal a seleção, o que se determinaria seria a digestibilidade aparente da fração de maior aceitabilidade do alimento e não do alimento como um todo. Mesmo agindo desta forma, os animais recusaram ingerir certas frações do alimento. O consumo de MS dos tratamentos ALF, BRA e TIF durante este ensaio foi portanto de 80,3; 82,3 e 82,2 % do CVMS, respectivamente.

Tabela 9. *Consumo de nutrientes dos fenos de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF) por ovinos durante ensaio de digestibilidade aparente*

<i>consumo</i> <sup>*</sup> (g.kg <sup>-1</sup> .d <sup>1</sup> )	<i>tratamentos</i>			<i>epd</i> <sup>**</sup>
	<i>ALF</i>	<i>BRA</i>	<i>TIF</i>	
<i>matéria seca</i>	28,5 <sup>a</sup>	15,8 <sup>c</sup>	18,9 <sup>b</sup>	1,16
<i>matéria orgânica</i>	25,8 <sup>a</sup>	14,6 <sup>c</sup>	17,2 <sup>b</sup>	1,08
<i>fibra em detergente neutro</i>	14,9 <sup>a</sup>	12,2 <sup>b</sup>	15,2 <sup>a</sup>	0,77
<i>fibra em detergente ácido</i>	12,0 <sup>a</sup>	7,3 <sup>c</sup>	8,7 <sup>b</sup>	0,57
<i>hemicelulose</i>	2,9 <sup>c</sup>	4,9 <sup>b</sup>	6,5 <sup>a</sup>	0,24
<i>celulose</i>	8,9 <sup>a</sup>	6,0 <sup>c</sup>	6,8 <sup>b</sup>	0,42
<i>proteína bruta</i>	5,4 <sup>a</sup>	0,5 <sup>c</sup>	1,4 <sup>b</sup>	0,16

\* *o consumo medido durante ensaio de digestibilidade não corresponde ao consumo voluntário, pois o nível de oferecimento da alimentação foi de 90 % do CVMS*

\*\* *epd: erro padrão da diferença entre as médias*

<sup>a, b, c</sup> *médias seguidas por superescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si (P < 0,05)*

Se durante o ensaio de consumo voluntário, o CVMS dos tratamentos BRA e TIF não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ), mas ambos foram diferentes do CVMS de ALF ( $P < 0,05$ ), durante o experimento de digestibilidade o consumo de MS foi diferente para os três tratamentos, sendo o maior consumo para ALF e o menor para BRA.

Embora ALF tenha apresentado menor teor de FDN (Tabela 1), com o maior nível de consumo de MS, o consumo de FDN de ALF foi similar ( $P > 0,05$ ) ao de TIF. Como a parede celular de ALF é mais lignificada que a das gramíneas, o consumo de hemicelulose de ALF foi o menor dos três tratamentos ( $P < 0,05$ ).

Na tabela 10, são apresentados os coeficientes de digestibilidade aparente das frações dos alimentos.

Tabela 10. *Coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes dos fenos de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF) para ovinos*

<i>nutrientes</i>	<i>tratamento</i>			<i>epd*</i>
	<i>ALF</i>	<i>BRA</i>	<i>TIF</i>	
<i>matéria seca</i>	0,552 <sup>a</sup>	0,470 <sup>b</sup>	0,446 <sup>b</sup>	0,0214
<i>matéria orgânica</i>	0,569 <sup>a</sup>	0,500 <sup>b</sup>	0,463 <sup>b</sup>	0,0226
<i>fibra em detergente neutro</i>	0,443	0,480	0,468	0,0302
<i>fibra em detergente ácido</i>	0,441	0,445	0,426	0,0279
<i>hemicelulose</i>	0,445	0,527	0,524	0,0545
<i>celulose</i>	0,564	0,557	0,554	0,0348
<i>proteína bruta</i>	0,694 <sup>a</sup>	0,001 <sup>c</sup>	0,500 <sup>b</sup>	0,0497

\* epd: erro padrão da diferença entre as médias

<sup>a, b, c</sup> médias seguidas por superescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si ( $P < 0,05$ )

Os coeficientes de digestibilidade de FDN, FDA, hemicelulose e celulose não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos.

ALF apresentou a maior digestibilidade ( $P < 0,05$ ) das frações MS, MO e PB. A MS e a MO de BRA e de TIF foram digeridas de forma similar ( $P > 0,05$ ), mas a PB de TIF foi digerida mais eficientemente que a de BRA ( $P < 0,05$ ).

A digestibilidade de BRA aproximou-se da nulidade. Cabe aqui enfatizar que BRA era o tratamento de menor teor protéico (apenas  $29 \text{ g.kg}^{-1}$  MS) e que os coeficientes apresentados na Tabela 10 são referentes à digestibilidade aparente. Assim sendo, não implica em dizer que a PB de BRA é praticamente indigestível, e sim, que a quantidade de proteína dietética foi insuficiente para suplantar àquela de origem endógena despendida pelos animais. Estes dados serão melhor esclarecidos quando os dados de balanço de N forem apresentados adiante.

Quando a digestibilidade aparente dos nutrientes é analisada não pelos seus coeficientes, mas pela quantidade de nutrientes digerida diariamente por unidade de peso vivo (Tabela 11), diferenças que outrora não foram detectadas agora são.

Tabela 11. *Quantidades médias de nutrientes digeridos diariamente ( $\text{g.kg}^{-1} \text{ PV.d}^{-1}$ ) por ovinos alimentados com fenos de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF)*

nutrientes	tratamento			epd*
	ALF	BRA	TIF	
matéria seca	15,71 <sup>a</sup>	7,40 <sup>b</sup>	8,44 <sup>b</sup>	0,783
matéria orgânica	14,69 <sup>a</sup>	7,25 <sup>b</sup>	7,95 <sup>b</sup>	0,751
fibra em detergente neutro	6,62	5,85	7,12	0,612
fibra em detergente ácido	5,28 <sup>a</sup>	3,25 <sup>b</sup>	3,71 <sup>b</sup>	0,402
hemicelulose	1,34 <sup>c</sup>	2,57 <sup>b</sup>	3,42 <sup>a</sup>	0,264
celulose	5,02 <sup>a</sup>	3,32 <sup>b</sup>	3,79 <sup>b</sup>	0,345
proteína bruta	3,74 <sup>a</sup>	0,01 <sup>c</sup>	0,72 <sup>b</sup>	0,096

\* epd: erro padrão da diferença entre as médias

<sup>a, b, c</sup> médias seguidas por superescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si ( $P < 0,05$ )

Animais alimentados com ALF digeriram mais FDA que os alimentados com BRA e TIF ( $P < 0,05$ ). Isto pode ser evidenciado pelo fato de que ALF continha mais FDA, em proporção ao FDN, que os demais (Tabela 1).

Na literatura, muitos são os trabalhos sobre a digestibilidade de dietas contendo os fenos aqui estudadas, mas são escassos os que usaram dietas exclusivas destes alimentos, ou seja sem suplementação com concentrados ou com outros volumosos.

Moreira et al. (2001a) obteve, para feno de alfafa, coeficiente de digestibilidade para ovinos de 0,565; 0,579; 0,490 e 0,739, respectivamente para MS, MO, FDN e PB. Os coeficientes de Korndörfer (1999) para feno de alfafa foram de 0,583; 0,570; 0,482; 0,456 e 0,626, respectivamente para MS, MO, FDN, FDA e PB. Estes valores são muito similares aos obtidos para o tratamento ALF (Tabela 10).

Os coeficientes de digestibilidade dos nutrientes de BRA e TIF estão próximos daqueles encontrados na literatura (Korndörfer, 1999; Cabral Filho, 1999), com exceção da digestibilidade da PB de BRA, que foi muito aquém das observadas por Korndörfer (1999).

#### **4.7. Balanço de nitrogênio**

Os resultados utilizados para calcular a quantidade retida de N são apresentados na Tabela 12.

O consumo de N foi maior para o tratamento ALF e menor para o tratamento BRA ( $P < 0,05$ ), como já era esperado com base na composição química e no consumo dos fenos.

A maior excreção fecal de N foi observada para ALF seguida de TIF e BRA, sendo que os três foram diferentes entre si ( $P > 0,05$ ).

Tabela 12. *Quantidades médias de nitrogênio consumido e excretado nas fezes e na urina de ovinos alimentados com fenos de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF)*

<i>quantidades (g.d<sup>-1</sup>)</i>	<i>tratamento</i>			<i>epd*</i>
	<i>ALF</i>	<i>BRA</i>	<i>TIF</i>	
<i>N consumido</i>	35,68 <sup>a</sup>	2,83 <sup>c</sup>	9,05 <sup>b</sup>	2,392
<i>N nas fezes</i>	10,98 <sup>a</sup>	2,79 <sup>c</sup>	4,50 <sup>b</sup>	0,805
<i>N na urina</i>	23,12 <sup>a</sup>	1,98 <sup>c</sup>	6,95 <sup>b</sup>	0,831
<i>N retido</i>	1,56 <sup>a</sup>	-1,94 <sup>b</sup>	-2,38 <sup>c</sup>	0,652

\* *epd: erro padrão da diferença entre as médias*

<sup>a, b, c</sup> *médias seguidas por superescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si (P < 0,05)*

As excreções de N pela urina apresentaram diferenças (P<0,05) para os três alimentos, sendo que a maior excreção foi observada para ALF e a menor para BRA.

ALF foi o único tratamento (P < 0,05) que apresentou balanço positivo de N. Os animais alimentados com BRA e TIF excretaram mais N do que consumiram (balanço negativo) e os resultados apresentados diferiram entre si (P < 0,05). As quantidades observadas são inferiores às encontradas por Moreira et al. (2001a).

#### 4.8. Cinética digestiva

Nas Figuras 17 e 18 são apresentados, respectivamente, os perfis de concentração de Cr e Co nas fezes.

Graficamente, pode-se observar que o aparecimento de Cr e Co nas fezes dos animais alimentados com ALF aconteceu antes dos demais (Figuras 17 e 18). As maiores concentrações de Cr e Co também foram observadas para ALF.

O nível basal de Cr foi semelhante para os três tratamentos, mas o de Co foi

superior para ALF. Estes níveis foram atingidos novamente nas fezes dos animais alimentados com ALF mas rapidamente que nas fezes daqueles alimentados por BRA e TIF.

O que se observa graficamente nas Figuras 17 e 18, pode ser melhor analisado após o refinamento das curvas através do ajuste dos dados pelo modelo de Grovum & Williams (1973). Os resultados dos parâmetros deste modelo são apresentados nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13. *Parâmetros da cinética da fase sólida da digesta de ovinos alimentados com feno de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF)*

parâmetros*	tratamentos			epd**
	ALF	BRA	TIF	
$k_1$	0,0301 <sup>a</sup>	0,0204 <sup>b</sup>	0,0244 <sup>b</sup>	0,00207
$k_2$	0,1429	0,1378	0,1527	0,01020
TT	34,90 <sup>b</sup>	17,36 <sup>a</sup>	17,09 <sup>a</sup>	3,856
$TMR_{pool1}$	33,37 <sup>b</sup>	52,33 <sup>a</sup>	42,21 <sup>ab</sup>	5,799
$TMR_{pool2}$	7,23	7,40	6,62	0,528
TMRT	75,50	77,09	65,92	6,527

\* o modelo utilizado para ajuste dos dados foi o de Grovum & Williams (1973), onde  $k_1$  e  $k_2$ : taxas de trânsito pelos pools 1 e 2; TT: tempo de trânsito;  $TMR_{pool1}$  e  $TMR_{pool2}$ : tempo médio de retenção nos pools 1 e 2; TMRT: tempo médio de retenção total

\*\* epd: erro padrão da diferença entre as médias

<sup>a, b</sup> médias seguidas por superescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si ( $P < 0,05$ )

Cr e o Co começaram a ser detectados nas fezes em concentrações acima das basais a partir da coleta de 12 h após a introdução de Cr-FDN e Co-EDTA. A taxa de recuperação média de Cr e Co neste experimento foi de 82,70 e 50,63 %, respectivamente.

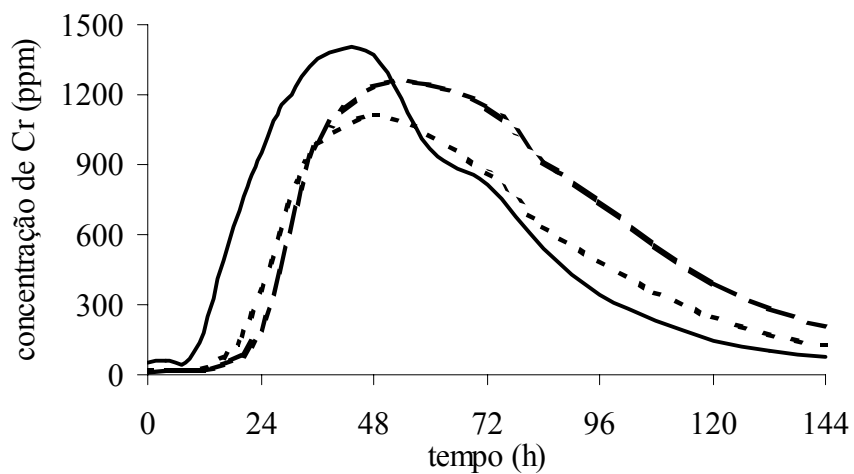


Figura 17. *Perfis de excreção de cromo nas fezes de ovinos alimentados com fenos de alfafa (linha contínua), de braquiária (linha tracejada) e de Tifton-85 (linha pontilhada)*

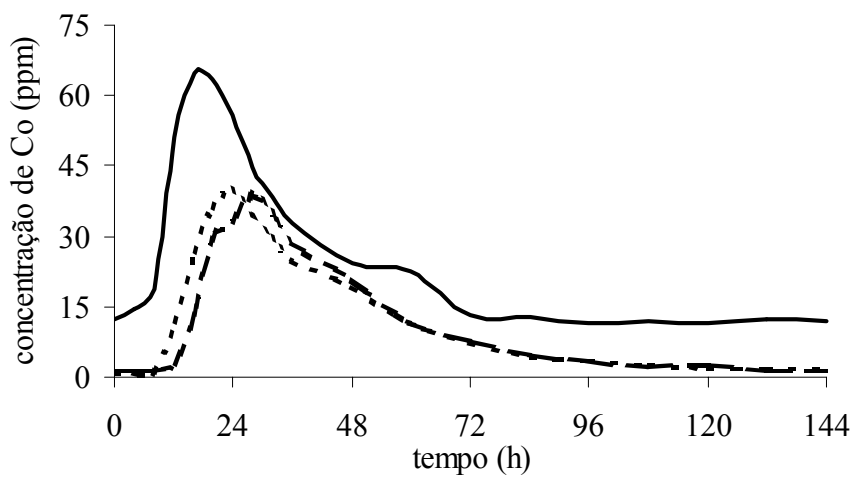


Figura 18. *Perfis de excreção de cobalto nas fezes de ovinos alimentados com fenos de alfafa (linha contínua), de braquiária (linha tracejada) e de Tifton-85 (linha pontilhada)*



Na interpretação deste modelo, há dois compartimentos de mistura que ocasionam detrimento de fluxo, pools 1 e 2. Para efeito de discussão, assumiu-se como pool 1 o rúmen e como pool 2 o ceco.

A taxa de escape de material particulado (Tabela 13) do rúmen ( $k_1$ ) foi maior para ALF. Embora as partículas, geradas após mastigação, de ALF sejam, em teoria, menores, mais densas e mais compactas, estas teriam maiores chances de deixar o rúmen com maior rapidez. Estes dados se comprovaram.

Tabela 14. *Parâmetros da cinética da fase líquida da digesta de ovinos alimentados com feno de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF)*

<i>parâmetros*</i>	<i>tratamentos</i>			<i>epd**</i>
	<i>ALF</i>	<i>BRA</i>	<i>TIF</i>	
$k_1$	0,0276 <sup>b</sup>	0,0324 <sup>ab</sup>	0,0376 <sup>a</sup>	0,00281
$k_2$	0,1396 <sup>c</sup>	0,1891 <sup>b</sup>	0,2595 <sup>a</sup>	0,01900
<i>TT</i>	21,73 <sup>a</sup>	2,91 <sup>b</sup>	4,48 <sup>b</sup>	2,994
<i>TMR<sub>pool1</sub></i>	37,05 <sup>a</sup>	31,21 <sup>b</sup>	27,26 <sup>b</sup>	2,510
<i>TMR<sub>pool2</sub></i>	7,37 <sup>a</sup>	5,33 <sup>b</sup>	4,00 <sup>c</sup>	0,467
<i>TMRT</i>	66,15 <sup>a</sup>	39,45 <sup>b</sup>	35,73 <sup>b</sup>	3,828

\* o modelo utilizado para ajuste dos dados foi o de Grovum & Williams (1973), onde  $k_1$  e  $k_2$ : taxas de trânsito pelos pools 1 e 2; *TT*: tempo de trânsito; *TMR<sub>pool1</sub>* e *TMR<sub>pool2</sub>*: tempo médio de retenção nos pools 1 e 2; *TMRT*: tempo médio de retenção total

\*\* *epd*: erro padrão da diferença entre as médias

<sup>a, b, c</sup> médias seguidas por superescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si ( $P < 0,05$ )

Outra hipótese para explicar tal fato é o maior consumo de ALF. Como o consumo foi maior, para manter um mesmo volume ruminal, o conteúdo ruminal é forçosamente impelido a escapar do rúmen.

Sendo o *TMR* o inverso de  $k$ , o menor *TMR* no rúmen foi observado para ALF, não diferindo, porém, de TIF ( $P > 0,05$ ). Embora tendo trabalhado com o modelo de Dhanoa et al. (1985) para ajuste de seus dados, o *TMR* no rúmen, obtido por Korndörfer et al. (2001), foi de 39,2; 42,0 e 33,4 h, respectivamente para fenos de alfafa e de braquiárias com 28 e 56 dias de idade.

Ainda para a fase sólida, os valores de  $k_2$ , *TMR* no ceco e *TMRT* (Tabela 13) não diferiram significativamente entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ). O maior *TT* foi observado para o tratamento ALF ( $P < 0,05$ ).

Comparando os valores de  $k_1$  para o material solúvel (Tabela 14) àqueles obtidos para a fase sólida (Tabela 13), a situação se inverte. O mesmo foi observado no trabalho de Korndörfer et al. (2001).

Huhtanen & Hristov (2001), utilizando fibra complexada com  $^{15}\text{N}$  como marcador interno para estimar cinética de passagem em bovinos, encontraram  $k_1$  e  $k_2$  para feno de alfafa variando, respectivamente, de 0,035 a 0,044 e de 0,119 a 0,431  $\text{h}^{-1}$ . Detmann et al. (2001), utilizando Cr-FDN para estimar a cinética de passagem em bovinos sob pastejo de braquiária, observou valores de  $k_1$  e  $k_2$ , respectivamente, de 0,047 a 0,071 e de 0,117 a 0,131  $\text{h}^{-1}$ .

#### 4.9. Síntese de proteína microbiana

Os resultados sobre o crescimento microbiano é abordado nos itens abaixo.

Inicialmente, são comentados os resultados do ensaio de trânsito de proteína microbiana, através do uso de  $^{15}\text{N}$  como marcador isotópico, em seguida são apresentados os dados de síntese microbiana propriamente dita, primeiro através da técnica de incorporação in vitro de radiofósforo e por fim através da excreção urinária de derivados de purina.

#### 4.9.1. Trânsito de proteína microbiana

O enfoque dado aos resultados obtidos a partir do uso de  $^{15}\text{N}$  (Tabela 15), não encontrou similares na literatura. Os trabalhos encontrados normalmente versam sobre o uso de  $^{15}\text{N}$  para estimativa de fluxo de proteína microbiana e o enfoque aqui dado foi o de estimativa de trânsito de proteína microbiana.

As principais diferenças foram notadas entre os tratamentos BRA ou TIF e o tratamento ALF. BRA e TIF proporcionaram cinéticas de crescimento microbiano e de trânsito de proteína microbiana entre o rúmen e duodeno muito similares (Tabela 15).

Tabela 15. *Parâmetros da cinética do trânsito de proteína microbiana entre rúmen e duodeno de ovinos recebendo dieta exclusiva de fenos de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF)*

parâmetros*	tratamentos			epd**
	ALF	BRA	TIF	
$k_1$	0,048 <sup>a</sup>	0,027 <sup>b</sup>	0,027 <sup>b</sup>	0,0053
$k_2$	0,518 <sup>a</sup>	0,280 <sup>b</sup>	0,354 <sup>b</sup>	0,0419
TT	9,84 <sup>b</sup>	16,11 <sup>a</sup>	14,11 <sup>a</sup>	1,775
$\text{TMR}_{\text{pool1}}$	21,87 <sup>b</sup>	39,73 <sup>a</sup>	44,06 <sup>a</sup>	4,041
$\text{TMR}_{\text{pool2}}$	1,94 <sup>b</sup>	3,74 <sup>a</sup>	3,24 <sup>a</sup>	0,444
TRMT	33,65 <sup>b</sup>	59,58 <sup>a</sup>	61,41 <sup>a</sup>	3,333

\* o modelo utilizado para ajuste dos dados foi o de Grovum & Williams (1973), onde  $k_1$  e  $k_2$ : taxas de trânsito pelos pools 1 e 2; TT: tempo de trânsito;  $\text{TMR}_{\text{pool1}}$  e  $\text{TMR}_{\text{pool2}}$ : tempo médio de retenção nos pools 1 e 2; TRMT: tempo médio de retenção total

\*\* epd: erro padrão da diferença entre as médias

<sup>a, b</sup> médias seguidas por superescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si ( $P < 0,01$ )

A assimilação do nitrogênio pelos microrganismos no rúmen ( $k_1$ ) foi muito mais rápida ( $P < 0,01$ ) no tratamento ALF, o que ilustra que o nitrogênio deste tratamento é mais disponível que o dos demais. A proteína microbiana produzida da dieta ALF também teve uma passagem ( $k_2$ ) mais rápida do  $pool_1$  para o  $pool_2$  ( $P < 0,01$ ).

Os demais parâmetros também demonstraram um melhor aproveitamento no nitrogênio da dieta ALF quando comparada às demais, o que comprova o maior digestibilidade da proteína deste tratamento.

#### 4.9.2. Incorporação de radiofósforo

Os resultados da produção líquida de proteína microbiana após 8 h de incubação com radiofósforo são apresentados na Tabela 16. A análise de variância mostrou que houve efeito de inóculo ( $P = 0,0089$ ), mas não houve efeito de período, substrato ou da interação substrato\*inóculo ( $P > 0,05$ ).

Tabela 16. *Síntese de proteína microbiana ( $mg\ NM.g^{-1}\ MS$ ) estimada pela incorporação in vitro de radiofósforo a partir dos fenos de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF), usando como inóculo líquido ruminal de ovinos alimentados com os fenos correspondentes*

<i>inóculos</i>	<i>substratos</i>			<i>médias</i>
	<i>ALF</i>	<i>BRA</i>	<i>TIF</i>	
<i>ALF</i>	2,36	2,83	3,05	2,75 <sup>a</sup>
<i>BRA</i>	1,77	1,26	1,28	1,44 <sup>b</sup>
<i>TIF</i>	1,33	1,59	1,49	1,47 <sup>b</sup>
<i>médias</i>	1,82	1,89	1,94	

<sup>a, b</sup> *médias seguidas por superescritos diferentes, na coluna, diferem entre si ( $P < 0,01$ )*

O melhor inóculo, neste caso foi o proveniente dos animais alimentados com ALF. Como o período de incubação é curto (apenas 8 h), diferentemente de outras técnicas *in vitro*, a importância da qualidade do inóculo ganha valor. Para garantir uma atividade microbiana adequada e rápida, o inóculo deve fornecer uma população microbiana em quantidade e em qualidade ideais. Além disto, o inóculo, mesmo sendo os animais doadores sujeitos a jejum prévio à coleta, ainda contém certa quantidade de substrato (solúvel e particulado) que pode fornecer energia inicial para o crescimento microbiano durante o tempo de colonização. Isto provavelmente foi o ocorrido para o inóculo preparado com líquido ruminal proveniente dos animais alimentados com ALF. Os animais alimentados com BRA e TIF, provavelmente por estes alimentos apresentarem menores teores de nutrientes, forneceram líquido ruminal energeticamente mais pobre e, portanto, de menor atividade microbiana inicial.

#### 4.9.3. Derivados de purina

A excreção urinária de DP apresentaram os perfis de compostos descritos na Tabela 17.

Para ovinos, Chen & Gomes (1992) apresentam como proporções aproximadas dos derivados de purina, expressas em porcentagem da soma, os valores na ordem de 60 – 80 % para alantoína, 10 – 30 % para ácido úrico e 5 – 10 % para hipoxantina + xantina. Os dados obtidos para alantoína ficaram, portanto, abaixo do esperado e os de ácido úrico, um pouco acima.

O baixo volume de urina excretada é um indício para a baixa percentagem de alantoína e maior concentração de ácido úrico, conforme salientado por Chen & Gomes (1992).

A absorção de bases púricas no intestino (Tabela 18) demonstra mais uma vez que o teor de PB do alimento tem um forte impacto na geração de proteína microbiana e, por conseqüência, no suprimento de proteína de origem microbiana ao

animal hospedeiro. Os animais alimentados com ALF foram os que apresentaram maior suprimento de proteína microbiana ( $P < 0,05$ ). Embora não tenha havido diferenças ( $P > 0,05$ ) entre os dois tratamentos de menor teor protéico (TIF e BRA), há uma tendência visível de que com o menor teor protéico, os resultados foram ainda mais insatisfatórios, quanto ao fluxo de proteína microbiana.

Tabela 17. Perfis dos derivados de purina, em % do total, excretados via urina por ovinos alimentados com fenos de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF)

derivados de purina	tratamentos			epd*
	ALF	BRA	TIF	
hipoxantina + xantina	5,77 <sup>b</sup>	6,28 <sup>b</sup>	8,41 <sup>a</sup>	0,779
ácido úrico	42,32	40,85	34,39	3,959
alantoína	51,91	52,87	57,20	3,888
total (mmol.d <sup>-1</sup> )	16,23	4,79	6,34	—

\* epd: erro padrão da diferença entre as médias

<sup>a, b</sup> médias seguidas por superescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si ( $P < 0,01$ )

Os resultados de NM obtidos para ALF foram superiores aos de Jetana et al. (2000), obtidos com ovinos alimentados com capim-colonião (*Panicum maximum*) (106 g PB.kg<sup>-1</sup> MS) e concentrado (185 g PB.kg<sup>-1</sup> MS) e que variaram entre 7,8 e 10,8 g.NM.d<sup>-1</sup>. A razão provável para tal superioridade é o menor teor protéico de sua dieta final, embora não tenha sido relatado em seu trabalho, pois os animais foram alimentados com quantidades fixas de concentrado e com volumoso à vontade.

Tabela 18. Absorção de purinas microbianas e síntese microbiana estimadas através da excreção urinária de derivados de purina de ovinos alimentados com feno de alfafa (ALF), de braquiária (BRA) e de Tifton-85 (TIF)

variáveis	tratamentos			epd*
	ALF	BRA	TIF	
<i>absorção de purinas</i>				
$mmol.d^{-1}$	19,3 <sup>a</sup>	4,9 <sup>b</sup>	7,0 <sup>b</sup>	1,67
$\mu mol.kg^{-0,75} PV.d^{-1}$	1172,6 <sup>a</sup>	322,0 <sup>b</sup>	438,3 <sup>b</sup>	75,11
<i>síntese microbiana</i>				
$g.d^{-1}$	14,0 <sup>a</sup>	3,6 <sup>b</sup>	5,1 <sup>b</sup>	1,21
$mg.kg^{-0,75} PV.d^{-1}$	852,5 <sup>a</sup>	234,1 <sup>b</sup>	318,7 <sup>b</sup>	54,60
$mg.kg^{-1} MOD_R$	35,2 <sup>a</sup>	20,3 <sup>b</sup>	24,8 <sup>b</sup>	2,61

\* epd: erro padrão da diferença entre as médias

<sup>a, b</sup> médias seguidas por superescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si ( $P < 0,05$ )

#### 4.10. Correlações entre os parâmetros estudados

Neste item, são apresentados os resultados das correlações ( $n = 18$ ) entre os diversos parâmetros estudados pelas técnicas já mencionadas e os dados obtidos *in vivo*.

Os teores de PB, FDN e FDA, como mencionado por diversas vezes neste trabalho, têm íntima relação com os parâmetros biológicos observados *in vivo*.

Pelos resultados da Tabela 19, pode-se entender melhor que a PB têm um efeito benéfico no consumo e na digestibilidade, enquanto que o teor de fibras acaba por inibir estes parâmetros.

Tabela 19. Coeficientes de correlação ( $r$ ) entre parâmetros químicos e os resultados *in vivo* de consumo voluntário de matéria seca (CVMS, em  $\text{g.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) e de digestibilidade da matéria seca (MSD) e da matéria orgânica (MOD)

<i>parâmetros</i>	<i>CVMS</i>	<i>MSD</i>	<i>MOD</i>
<i>PB</i>	$r = 0,8674$ ***	$r = 0,7342$ ***	$r = 0,6646$ **
<i>FDN</i>	$r = - 0,8250$ ***	$r = - 0,8070$ ***	$r = - 0,7684$ ***
<i>FDA</i>	$r = - 0,7527$ ***	$r = - 0,6940$ **	$r = - 0,6460$ **

ns: não significativo ( $P > 0,05$ ); \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$

Os parâmetros da cinética de degradação tomados de modo isolado não têm forte congruência com os resultados *in vivo* (Tabela 20), com exceção (i) da taxa de desaparecimento do material ( $c$ ), que, de modo superficial, pode ser entendida como a “velocidade” com que a fração fermentecível ( $B$ ) é degradada, e (ii) da fração prontamente solúvel ( $A$ ), que representa, até certo ponto, o conteúdo celular e frações solúveis de fácil e rápido aproveitamento, como açúcares e proteína verdadeira.

Ao analisar os parâmetros da degradabilidade *in situ* de modo mais contextual, ou seja, quando estes parâmetros são agrupados para formar um esboço melhor da qualidade do alimento, como é o caso da degradabilidade efetiva ( $p_{efet}$ ), os resultados da degradabilidade *in situ* estão em concordância com os dados obtidos *in vivo*.

Embora os dados das *in situ* e *in vitro* de degradabilidade ruminal tenham sido compatíveis para grande parte dos parâmetros, conforme apresentado na Tabela 6, os resultados dos parâmetros da cinética de degradação *in vitro* (Tabela 21) apresentaram-se menos congruentes ao dados observados *in vivo* que os da técnica *in situ* (Tabela 20). Porém, quando são comparados os dados da cinética fermentativa,



descrita pela técnica *in vitro* de produção de gases, as correlações com os dados *in vivo* são bem mais consistentes (Tabela 22). O parâmetro  $R^2$  utilizado para comparar diferentes alimentos comportou-se de modo proporcional aos dados *in vivo* e, portanto, podendo ser utilizado para trabalhos futuros como parâmetros de distinção entre alimentos.

Tabela 20. Coeficientes de correlação ( $r$ ) entre parâmetros matemáticos e biológicos da degradabilidade *in situ* e os resultados *in vivo* de consumo voluntário de matéria seca (CVMS, em  $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ ) e de digestibilidade da matéria seca (MSD) e da matéria orgânica (MOD)

parâmetros	CVMS	MSD	MOD
<i>a</i>	$r = 0,5624$ *	$r = 0,5065$ *	$r = 0,4624$ ns
<i>b</i>	$r = -0,3012$ ns	$r = -0,2553$ ns	$r = -0,2266$ ns
<i>A</i>	$r = 0,7777$ ***	$r = 0,8140$ ***	$r = 0,7939$ ***
<i>B</i>	$r = -0,3254$ ns	$r = -0,2946$ ns	$r = -0,2704$ ns
<i>A+B</i>	$r = -0,2122$ ns	$r = -0,1758$ ns	$r = -0,1540$ ns
<i>c</i>	$r = 0,9090$ ***	$r = 0,6942$ **	$r = 0,6255$ **
$t_0$	$r = -0,2418$ ns	$r = -0,1634$ ns	$r = -0,0907$ ns
$P_{efet}$	$r = 0,8655$ ***	$r = 0,7830$ ***	$r = 0,7318$ ***

ns: não significativo ( $P > 0,05$ ); \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$

Tabela 21. Coeficientes de correlação ( $r$ ) entre parâmetros matemáticos e biológicos da degradabilidade *in vitro* e os resultados *in vivo* de consumo voluntário de matéria seca (CVMS, em  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) e de digestibilidade da matéria seca (MSD) e da matéria orgânica (MOD)

<i>parâmetros</i>	<i>CVMS</i>	<i>MSD</i>	<i>MOD</i>
<i>a</i>	$r = 0,7618$ ***	$r = 0,4435$ ns	$r = 0,3840$ ns
<i>b</i>	$r = - 0,4718$ *	$r = - 0,2456$ ns	$r = - 0,1908$ ns
<i>A</i>	$r = 0,6817$ **	$r = 0,4576$ ns	$r = 0,4281$ ns
<i>B</i>	$r = - 0,4718$ *	$r = - 0,2462$ ns	$r = - 0,1916$ ns
<i>A+B</i>	$r = - 0,4659$ ns	$r = - 0,2420$ ns	$r = - 0,1873$ ns
<i>c</i>	$r = 0,6541$ **	$r = 0,3107$ ns	$r = 0,2287$ ns
<i>t<sub>0</sub></i>	$r = - 0,5997$ **	$r = - 0,2508$ ns	$r = - 0,1566$ ns
<i>P<sub>efet</sub></i>	$r = 0,6794$ **	$r = 0,4195$ ns	$r = 0,3762$ ns

ns: não significativo ( $P > 0,05$ ); \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$

Os resultados da estimativa da síntese microbiana a partir da excreção de DP mostraram-se em maior concordância com os resultados *in vivo* que aqueles obtidos a partir da incorporação de  $^{32}\text{P}$  (Tabela 23).

Tabela 22. Coeficientes de correlação ( $r$ ) entre parâmetros matemáticos e biológicos da produção de gases *in vitro* e os resultados *in vivo* de consumo voluntário de matéria seca (CVMS, em  $\text{g.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) e de digestibilidade da matéria seca (MSD) e da matéria orgânica (MOD)

parâmetros	CVMS	MSD	MOD
$b$	$r = 0,7947$ ***	$r = 0,6741$ **	$r = 0,6072$ **
$c$	$r = -0,7634$ ***	$r = -0,6486$ **	$r = -0,5863$ **
$Vf$	$r = -0,5528$ *	$r = -0,3765$ ns	$r = -0,2996$ ns
$R1$	$r = 0,6711$ **	$r = 0,5001$ *	$r = 0,4160$ ns
$R2$	$r = 0,8147$ ***	$r = 0,6295$ **	$r = 0,5540$ *
$t_0$	$r = -0,1303$ ns	$r = -0,0757$ ns	$r = -0,0437$ ns

ns: não significativo ( $P > 0,05$ ); \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$

Dentre os modos de expressar os resultados da síntese microbiana (Tabela 23), no entanto, a quantificação direta ( $\text{g NM.d}^{-1}$  ou  $\text{mg NM.kg}^{-0,75} \text{PV.d}^{-1}$ ) apresentou melhor correlação com os dados *in vivo* que a quantificação proporcional ( $\text{mg NM.kg}^{-1} \text{MOD}_R$ ).

Os resultados dos parâmetros da cinética das fases sólida (Tabela 24) e líquida (Tabela 25) da digesta também se mostraram relacionados aos resultados obtidos nos ensaios *in vivo* de consumo voluntário e de digestibilidade aparente.

Os resultados da cinética de líquidos (Tabela 25), porém, mostraram-se mais próximos aos parâmetros da digestibilidade aparente, enquanto os resultados da cinética de sólidos (Tabela 24) pareceram estar mais ligados aos fatores limitantes do consumo.

Tabela 23. Coeficientes de correlação ( $r$ ) entre síntese de proteína microbiana, estimada a partir da excreção de derivados de purina ( $NM_{dp}$ ) e da incorporação de radiofósforo ( $NM_{P-32}$ ), e os resultados in vivo de consumo voluntário de matéria seca (CVMS, em  $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ ) e de digestibilidade da matéria seca (MSD) e da matéria orgânica (MOD)

parâmetros	CVMS	MSD	MOD
$NM_{dp}$ ( $g \cdot d^{-1}$ )	$r = 0,5655$ *	$r = 0,5927$ **	$r = 0,5426$ *
$NM_{dp}$ ( $mg \cdot kg^{-0,75} \cdot PV \cdot d^{-1}$ )	$r = 0,8953$ ***	$r = -0,7388$ ***	$r = -0,6888$ **
$NM_{dp}$ ( $mg \cdot kg^{-1} \cdot MOD_R$ )	$r = 0,1049$ ns	$r = -0,2675$ ns	$r = -0,3014$ ns
$NM_{P-32}$ ( $mg \cdot g^{-1} \cdot MS$ )	$r = 0,6933$ **	$r = 0,4639$ ns	$r = 0,4191$ ns

ns: não significativo ( $P > 0,05$ ); \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$

Este fato pode ser explicado pelo fato de ser a fração fibrosa (portanto sólida) a maior responsável pela limitação do consumo, principalmente quando o alimento é volumoso. De outro lado, a digestibilidade pressupõe solubilização e este fato pode corresponder a maior relação dos parâmetros da cinética de material solúvel com os resultados dos ensaios de digestibilidade.

Tabela 24. Coeficientes de correlação ( $r$ ) entre os parâmetros da cinética da fase sólida da digesta e os resultados in vivo de consumo voluntário de matéria seca (CVMS, em  $g.kg^{-1}.d^{-1}$ ) e de digestibilidade da matéria seca (MSD) e da matéria orgânica (MOD)

<i>parâmetros</i>	<i>CVMS</i>	<i>MSD</i>	<i>MOD</i>
$k_1$	$r = 0,6823$ **	$r = 0,3842$ ns	$r = 0,3248$ ns
$k_2$	$r = - 0,1061$ ns	$r = - 0,0010$ ns	$r = - 0,0180$ ns
$TT$	$r = 0,7594$ ***	$r = 0,5448$ *	$r = 0,5035$ *
$TMR_{rímen}$	$r = - 0,5501$ **	$r = - 0,2094$ ns	$r = - 0,1589$ ns
$TMR_{ceco}$	$r = 0,1144$ ns	$r = 0,0101$ ns	$r = 0,0291$ ns
$TMRT$	$r = 0,0915$ ns	$r = 0,2316$ ns	$r = 0,2477$ ns

ns: não significativo ( $P > 0,05$ ); \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$

Dada toda esta gama de correlações entre os diferentes parâmetros aqui estudados, fica caracterizada a interdependência de diversos fatores que, ao final, resultarão no desempenho animal.

Tabela 25. Coeficientes de correlação ( $r$ ) entre os parâmetros da cinética da fase líquida da digesta e os resultados in vivo de consumo voluntário de matéria seca (CVMS, em  $\text{g.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) e de digestibilidade da matéria seca (MSD) e da matéria orgânica (MOD)

<i>parâmetros</i>	<i>CVMS</i>	<i>MSD</i>	<i>MOD</i>
$k_1$	$r = -0,3469$ ns	$r = -0,6456$ **	$r = -0,6620$ **
$k_2$	$r = -0,4272$ ns	$r = -0,5469$ *	$r = -0,5700$ *
$TT$	$r = 0,7282$ ***	$r = 0,7302$ ***	$r = 0,6793$ **
$TMR_{rúmen}$	$r = -0,4447$ ns	$r = -0,6483$ **	$r = -0,6560$ **
$TMR_{ceco}$	$r = 0,5340$ *	$r = 0,6638$ **	$r = 0,6648$ **
$TMRT$	$r = -0,4356$ ns	$r = 0,7963$ ***	$r = 0,7670$ ***

ns: não significativo ( $P > 0,05$ ); \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$

## 5. CONCLUSÕES

O consumo voluntário de matéria seca e a digestibilidade aparente dos fenos avaliados foram influenciados pela composição química dos alimentos, pela eficiência microbiana e pelas cinéticas de degradação, fermentação, passagem e digestão, conforme identificado nas correlações encontradas neste trabalho.

Alimentos com baixo teor protéico tiveram efeito prejudicial no aproveitamento de nutrientes por ovinos e na manutenção de um ambiente ruminal saudável. Este fato foi evidenciado pelas variações da concentração de nitrogênio amoniacal ruminal e pelos resultados de digestibilidade aparente.

As técnicas *in situ* e *in vitro* para estimativa da cinética de degradação foram compatíveis, com exceção aos dados referentes a solubilidade inicial e ao tempo de colonização. Quando o enfoque foi o de determinação de tempo de colonização, o modelo exponencial de primeira ordem subestimou os resultados observados.

A cinética fermentativa (produção de gases) descreveu com maior fidelidade a degradação do alimento devido à ação microbiana.

A capacidade de síntese microbiana foi identificada mais eficientemente pela técnica de excreção urinária de derivados de purina. A técnica *in vitro* de incorporação de radiofósforo não conseguiu distinguir os crescimentos microbianos pela degradação dos tratamentos testados.

As técnicas *in vitro* demonstraram forte dependência da qualidade do inóculo, sendo o inóculo proveniente dos animais mais bem alimentados o que apresentou os melhores resultados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL. **The ruminant requirement of ruminant livestock**. Wellington: ARC, 1980. 341p.
- ALEXANDROV, A.N. Effect of ruminal exposure and subsequent microbial contamination on dry matter and protein degradability of various feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v.71, p.99-107, 1998.
- AROEIRA, L.J.M.; SILVEIRA, M.I.; LIZIERE, R.S.; MATOS, L.L. FIGUEIRA, D.G. Degradabilidade no rúmen e taxa de passagem de cana-de-açúcar mais uréia, do farelo de algodão e do farelo de arroz em novilhos mestiços europeu x zebú. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.22, n.4, p.552-64, 1993.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 16.ed. Arlington: AOAC International, 1995. v.1, p.4/1-4/30.
- ATAÍDE JÚNIOR, J.R.; PEREIRA, O.G.; VALADARES FILHO, S.C.; GARCIA, R.; CECON, P.R.; ALVES, M.J. MOREIRA, A.L. Consumo, digestibilidade e desempenho de novilhos alimentados com rações à base de feno de capim-Tifton 85, em diferentes idades de rebrota. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.1, p.215-222, 2001.
- BALCELLS, J.; GUADA, J.A.; CASTRILLO, C.; GASA, J. Urinary excretion of allantoin precursors by sheep after different rates of purine infusion into the duodenum. **Journal of Agricultural Science**, v.116, p.309-317, 1991.
- BEEVER, D.E.; MOULD, F.L. Forage evaluation for efficient ruminant livestock production. In: GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD, R.F.E.; OMED, H.M. (Ed.)



- Forage evaluation in ruminant nutrition.** Wallingford: CAB Publishing, 2000. cap.2, p.15-42.
- BLÜMMEL, M.; STEINGAB, H.; BECKER, K. The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and  $^{15}\text{N}$  incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. **British Journal of Nutrition**, v.77, p.911-921, 1997.
- BOER, G.; MURPHY, J.J.; KENNELLY, J.J. Mobile nylon bag for estimating availability of rumen undegradable protein. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.5, p.977-982, 1987.
- BRODERICK, G.A.; COCHRAN, R.C. In vitro and in situ methods for estimating digestibility with reference to protein degradability. In: THEODOROU, M.K.; FRANCE, J. (Ed.) **Feeding systems and feed evaluation models.** Wallingford: CAB Publishing, 2000. cap.4, p.53-86.
- BRODERICK, G.A.; MERCHEN, N.R. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2618-2632, 1992.
- BUENO, I.C.S.; ABDALLA, A.L.; CABRAL FILHO, S.L.S.; OWEN, E.; MOULD, F.L.; MACHADO, M.C.; GOBBO, S.P. Uso de líquido ruminal e fezes de bovinos e ovinos como fonte de inóculo para a técnica in vitro de produção de gases. (Compact disc). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36. Porto Alegre, 1999a. **Anais.** Porto Alegre: SBZ, 1999.
- BUENO, I.C.S.; ABDALLA, A.L.; CABRAL FILHO, S.L.S.; VITTI, D.M.S.S.; OWEN, E.; MAURICIO, R.M.; GIVENS, I. SUTTON, J.D.; MOULD, F.L. Comparison of inocula from sheep and cattle for the in vitro gas production under tropical conditions. In: ANNUAL MEETING OF THE BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, Scarbourough, 1999b. **Proceedings.** Penicuik: BSAS, 1999, p.151.
- BUENO, I.C.S. Comparação entre técnicas in vitro e in situ de avaliação de braquiária para ruminantes. Piracicaba, 1998. 133p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

- BUENO, I.C.S.; GOBBO, S.P.; ABDALLA, A.L.; CABRAL FILHO, S.L.S. Effect of solid phase of rumen liquor on the inoculum used for in vitro gas production technique. (Compact disc). In: SYMPOSIUM OF GAS PRODUCTION: FERMENTATIVE KINETICS FOR FEED EVALUATION AND ASSESS MICROBIAL ACTIVITY, Wageningen, 2000. **Proceedings**. Penicuiik: BSAS-EAAP, 2000.
- CABRAL FILHO, S.L.S. Avaliação do resíduo de cervejaria em dietas de ovinos através de técnicas nucleares e correlatas. Piracicaba, 1999. 68p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.
- CASTILHO, A.M.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, J.F.C.; LEÃO, M.I.; CASTRO, A.C.G. Degradabilidade ruminal da matéria seca e da proteína bruta de alimentos, utilizando-se a técnica do saco de nylon, em vacas gestantes alimentadas com feno (80%) e concentrado (20%). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.22, n.1, p. 89-98, 1993.
- CHEN, X.B.; GOMES, M.J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – an overview of the technical details**. Occasional publication of the International Feed Resources Unit. Aberdeen: Rowett Research Institute, 1992. 22p.
- CHEN, X.B.; HOVELL, F.D.B.; ØRSKOV, E.R.; BROWN, D.S. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. **British Journal of Nutrition**, v.63, p.131-142, 1990.
- CHERNEY, D.J.R. Characterization of forages by chemical analysis. In: GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD, R.F.E.; OMED, H.M. (Ed.) **Forage evaluation in ruminant nutrition**. Wallingford: CAB Publishing, 2000. cap.14, p.281-300.
- CHESSON, A. Feed characterization. In: THEODOROU, M.K.; FRANCE, J. (Ed.) **Feeding systems and feed evaluation models**. Wallingford: CAB Publishing, 2000. cap.2, p.11-34.
- CSAPÓ, J.; SCHMIDT, J.; MARTIN, T.G. Quantitative determination of protein of

- bacterial origin. **Trends in Analytical Chemistry**, v.20, n.1, p.42-48, 2001.
- DEAVILLE, E.R.; FLINN, P.C. Near-infrared (NIR) spectroscopy: an alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary intake. In: GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD, R.F.E.; OMED, H.M. (Ed.) **Forage evaluation in ruminant nutrition**. Wallingford: CAB Publishing, 2000. cap.15, p.301-320.
- DECHAMPS, F.C. Degradabilidade ruminal da matéria seca e da proteína bruta de alguns alimentos utilizáveis na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.23, n.6, p.898-908, 1994.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T.; VALADARES FILHO, S.C.; EUCLYDES, R.F.; LANA, R.P.; QUEIROZ, D.S. Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1600-1609, 2001.
- DHANOVA, M.S.; SIDDON, R.C.; FRANCE, J.; GALE, D.L. A multi-compartmental model to describe marker excretion patterns in ruminant faeces. **British Journal of Nutrition**, v.53, p.663-671, 1985.
- DOVE, H.; MILNE, J.A. Digesta flow and rumen microbial protein production in ewes grazing perennial ryegrass. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.45, n.6, p.1229-1245, 1994.
- ELLIS, W.C.; MATIS, J.H.; HILL, T.M.; MURPHY, M.R. Methodology for estimating digestion and passage kinetics of forages. In: FAHEY JUNIOR, G.C.; COOLINS, M.; MERTENS, D.R.; MOSER, L.E. (Ed.) **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison: ASA, CSA, SSSA, 1994. cap.17, p.682-756.
- ELLIS, W.C.; POPPI, D.; MATIS, J.H. Feed intake in ruminants: kinetic aspects. In: D'MELLO, J.P.F. (Ed.) **Farm animal metabolism and nutrition**. Wallingford: CAB Publishing, 2000. cap.16, p.335-364.
- FAICHNEY, G. J. The use of markers to partition digestion within the gastro-intestinal tract of ruminants. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF RUMINANT PHYSIOLOGY, 4, Armindale, 1975. **Digestion and metabolism in ruminants**. Armindale: University of New England Publishing Unit, 1975. p.277-291.

- FERRET, A.; PLAIXATS, J.; CAJA, G.; GASA, J.; PRIÓ, P. Using markers to estimate apparent dry matter digestibility, faecal output and dry matter intake in dairy ewes fed Italian ryegrass hay or alfalfa hay. **Small Ruminant Research**, v.33, p.145-152, 1999.
- FORBES, J.M. Physiological and metabolic aspects of feed intake control. In: D'MELLO, J.P.F. (Ed.) **Farm animal metabolism and nutrition**. Wallingford: CAB Publishing, 2000. cap.15, p.319-334.
- FORBES, J.M. **Voluntary intake and diet selection in farm animals**. Wallingford: CAB Publishing, 1995. 544p.
- FRANCE, J.; DHANOA, M.S.; THEODOROU, M.K.; LISTER, S.J.; DAVIES, S.J.; ISAC, D. A model to interpret gas accumulation profiles with in vitro degradation of ruminant feeds. **Journal of Theoretical Biology**, v.163, p.99-111, 1993.
- GOBBO, S.P. Comparações entre procedimentos laboratoriais das técnicas de produção de gases e incorporação de radiofósforo na avaliação in vitro de alimentos para ruminantes. Piracicaba, 2001. 44p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.
- GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fibre analysis (apparatus, reagents, procedures, and some applications)**. Washington: ARS-USDA, 1970. (Agricultural handbook n° 379)
- GROVUM, W.L.; WILLIAMS, V.J. Rate of passage of digesta in sheep. 4. Passage of marker through the alimentary tract and the biological relevance of rate-constants in concentration of marker in faeces. **British Journal of Nutrition**, v.30, p.377-389, 1973.
- HIMMELSBACH, D.S. NMR and other physicochemical techniques for forage assessment. In: GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD, R.F.E.; OMED, H.M. (Ed.) **Forage evaluation in ruminant nutrition**. Wallingford: CAB Publishing, 2000. cap.16, p.321-344.
- HUHTANEN, P.; HRISTOV, A.N. estimating passage kinetics using fibre-bound <sup>15</sup>N as an internal marker. **Animal Feed Science and Technology**, v.92, p.29-41,

2001.

- HUNTINGTON, J.A.; GIVENS, D.I. The in situ technique for studying the rumen degradation of feeds: a review of the procedure. **Nutrition Abstracts and Reviews** (Series B), v.65, p.63-93, 1995.
- JETANA, T.; ABDULLAH, N.; HALIM, R.A.; JALALUDIN, S.; HO, Y.W. Effects of energy and protein supplementation on microbial-N synthesis and allantoin excretion in sheep fed guinea grass. **Animal Feed Science and Tecnology**, v.84, p.167-181, 2000.
- KOBT, A.R.; LUCKEY, T.D. Markers in nutrition. **Nutrition Abstracts and Reviews** (Series B), v.42, p.813-845, 1972.
- KORNDÖRFER, C.M. Eficiência de utilização do feno de *Brachiaria decumbens* na alimentação de ovinos Santa Inês. Piracicaba, 1999. 110p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.
- KORNDÖRFER, C.M.; ABDALLA, A.L.; BUENO, I.C.S.; NASCIMENTO FILHO, V.F.; OWEN, E.; SUTTON, J.D. Estudo da cinética digestiva em ovinos alimentados com braquiária e alfafa, usando a técnica de fluorescência de raios X. **Veterinária Notícias**, v.7, n.2, p. 113-121, 2001.
- KYRIAZAKIS, I.; OLDHAM, J.D. Food intake and diet selection in sheep: the effect of manipulating the rates of digestion of carbohydrates and protein of the foods offered as a choice. **British Journal of Nutrition**, v.77, p.243-254, 1997.
- MACHADO, M.C.; BUENO, I.C.S.; ABDALLA, A.L.; CASTILHO, L.A.; CABRAL FILHO, S.L.S. Degradabilidade ruminal in situ de alimentos para ovinos da raça Santa Inês. (Compact disc) In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38. Piracicaba, 2001. **Anais**. Piracicaba: SBZ, 2001.
- MAURICIO, R.M.; ABDALLA, A.L.; VITTI, D.M.S.S.; OWEN, E.; GIVENS, I.; BUENO, I.C.S.; CABRAL FILHO, S.L.S. Uso de líquido ruminal e fezes como fonte de inóculo para a técnica in vitro de produção de gases. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35. Botucatu, 1998.

- Anais.** Botucatu: SBZ, 1998. p.314-316.
- MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. Semi automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, p.321-330, 1999.
- McALLAN, A.B.; SUTTON, J.D.; BEEVER, D.E.; NAPPER, D.J. Rumen fermentation characteristics and duodenal nutrient flow in lactating cows receiving two types of grass silage with two levels of concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, v.46, p.277-291, 1994.
- McDONALD, I. A revised model for estimation of protein degradability in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, v.96, p.251-252, 1981.
- MEAD, R.; CURNOW, R.N.; HASTED, A.M. **Statistical methods in agriculture and experimental biology**. London: Chapman & Hall, 1993. cap.5, p.59-88: Control of random variation by blocking.
- MENKE, K.H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; STAINGASS, H.; FRITZ, H.; SCHNEIDER, W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuff from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. **Journal of Agricultural Science**, v.93, p.217-222, 1979.
- MERTENS, D.R. Regulation of feed intake. In: FAHEY, G.C.; COLLINS, M.; MERTENS, D.R.; MOSER, L.E. (Ed) **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison: ASA, CSSA, SSSA, 1994. cap.13, p.450-493.
- MOREIRA, A.L.; PEREIRA, O.G.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S.C.; CAMPOS, J.M.S.; MORAES, S.A.; ZERVOUDAKIS, J.T. Consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes da silagem de milho e dos fenos de alfafa e de capim-coastcross, em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.1099-1105, 2001a.
- MOREIRA, A.L.; PEREIRA, O.G.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S.C.; CAMPOS, J.M.S.; MORAES, S.A.; ZERVOUDAKIS, J.T. Produção de leite,

- consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes, pH e concentração de amônia ruminal em vacas lactantes recebendo rações contendo silagem de milho e fenos de alfafa e de capim-coastcross. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.1089-1098, 2001b.
- MOULD, F.L.; ØRSKOV, E.R. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis “in sacco”, dry matter degradation and rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. **Animal Feed Science and Technology**, v. 10, p.1-4, 1983.
- NASCIMENTO FILHO, V.F. **Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (ED-XRF) e por reflexão total (TXRF)**, 1999. [http://panda/apostilas/virgilio/cen-5723/EDXRF\\_TXRF.doc](http://panda/apostilas/virgilio/cen-5723/EDXRF_TXRF.doc) (25 mar. 2002)
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of sheep**. 6.ed. Washington: National Academic Press, 1985. 99p.
- NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; FONDEVILA, M.; URDANETA, A.B.; RONQUILLO, M.G. In vitro microbial fermentation of tropical grasses at an advanced maturity stage. **Animal Feed Science and Technology**, v.83, p.145-157, 2000.
- OETTING, L.L. Avaliação de diferentes marcadores para a determinação da digestibilidade e taxa de passagem do alimento em suínos. Piracicaba, 2002. 57p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.
- ØRSKOV, E.R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of American Science**, v.92, p 449-453, 1979.
- OWENS, F.N.; HANSON, C.F. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2605-2617, 1992.
- PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1063-1073, 1993.
- PEREZ, J.R.O. Sistema para a estimativa de digestibilidade in vitro. In.: SIMPÓSIO

- INTERNACIONAL DE DIGESTIBILIDADE EM RUMINANTES, Lavras, 1997. **Anais**. Lavras: FAEPE; UFLA, 1997. p.55-68.
- POPPI, D.P.; FRANCE, J.; McLENNAN, S.R. Intake, passage and digestibility. In: THEODOROU, M.K.; FRANCE, J. (Ed.) **Feeding systems and feed evaluation models**. Wallingford: CAB Publishing, 2000. cap.3, p.35-52.
- PRESTON, T.R. Biological and chemical analytical methods. In: PRESTON, T.R. **Tropical animal feeding: a manual for research workers**. Rome: FAO, 1995. cap.9, p.191-264.
- RIBEIRO, K.G.; GARCIA, R.; PEREIRA, O.G.; VALADARES FILHO, S.C.; CECON, P.R. Eficiência microbiana, fluxo de compostos nitrogenados no abomaso, amônia e pH ruminais, em bovinos recebendo dietas contendo feno de capim-Tifton 85 de diferentes idades de rebrota. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.2, p.581-588, 2001.
- ROMNEY, D.L.; GILL, M. Intake of forages. In: GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD, R.F.E.; OMED, H.M. (Ed.) **Forage evaluation in ruminant nutrition**. Wallingford: CAB Publishing, 2000. cap.3, p.43-62.
- SAMPAIO, I.B.M. Seleção de pontos experimentais de colheita de material para o estudo de degradação de matéria seca no rúmen. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 27, Campinas, 1990. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1990. p.13.
- SAS INSTITUTE. **The SAS system for windows**. Release 8.01. Cary, 2000
- SATTER, L.D.; SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal of Nutrition**, v. 32, p.194-208, 1974.
- SCHOFIELD, P. Gas production methods. In: D'MELLO, J.P.F. (Ed.) **Farm animal metabolism and nutrition**. Wallingford: CAB Publishing, 2000. cap.10, p.209-232.
- TAMMINGA, S.; CHEN, X.B. Animal-based techniques for the estimation of protein value. In: GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD, R.F.E.; OMED, H.M. (Ed.) **Forage evaluation in ruminant nutrition**. Wallingford: CAB Publishing, 2000.



cap.11, p.215-232.

- THEODOROU, M.K., WILLIAMS, B.A., DHANOA, M.S., MCALLAN, A.B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, p.185-197, 1994.
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Journal of the British Grassland Society**, v.18, p.104-111, 1963.
- UDÉN, P.; COLUCCI, P.E.; VAN SOEST, P.J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. **Journal of Food Science and Agriculture**, v.31, p.625-632, 1980.
- VAN NEVEL, C.; DEMEYER, D.I. Determination of rumen microbial growth in vitro from <sup>32</sup>P labeled phosphate incorporation. **British Journal of Nutrition**, v.38, p.101-114, 1977.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2ed. New York: Cornell University Press, 1994. 476p.
- VAN SOEST, P.J.; WINE, R.H. Use of detergent in the analysis of farmers feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. **Journal of AOAC**, v.50, p.50-55, 1967.
- VERBIC, J.; CHEN, X.B.; MACLEOD, N.A.; ØRSKOV, E.R. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivatives excretion of steers. **Journal of Agricultural Science**, v.114, p.243-248, 1990.
- VITTI, D.M.S.S.; SILVA FILHO, J.C.; ABDALLA, A.L. Phosphorus availability for rumen microorganisms: effect of different sources. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v.7, p.186-187, 1988.
- WILLIAMS, B.A. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD, R.F.E.; OMED, H.M. (Ed.) **Forage evaluation in ruminant nutrition**. Wallingford: CAB Publishing, 2000. cap.10, p.189-214.