

AMANDA DE SOUZA ASSUNÇÃO

**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE ENTRE ANIMAIS E DE PROTOCOLOS
DE INCUBAÇÃO EM ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO *IN SITU* EM BOVINOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A851a
2017
Assunção, Amanda de Souza, 1992-
Avaliação da variabilidade entre animais e de protocolos de
incubação em estudos de degradação in situ em bovinos /
Amanda de Souza Assunção. – Viçosa, MG, 2017.
ix, 51f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Edenio Detmann.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.47-51.

1. Bovinos - alimentação e rações. 2. Digestibilidade.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Programa de Pós-graduação em Zootecnia. II. Título.

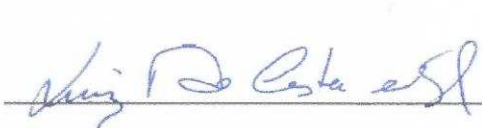
CDD 22.ed. 636.0855

AMANDA DE SOUZA ASSUNÇÃO

**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE ENTRE ANIMAIS E DE PROTOCOLOS
DE INCUBAÇÃO EM ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO *IN SITU* EM BOVINOS**

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

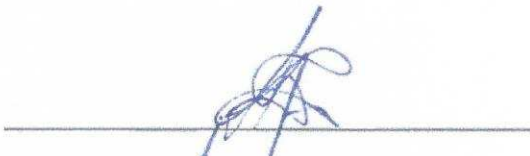
APROVADA: 20 de julho de 2017.



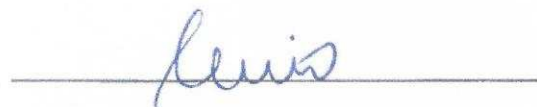
Luiz Fernando Costa e Silva



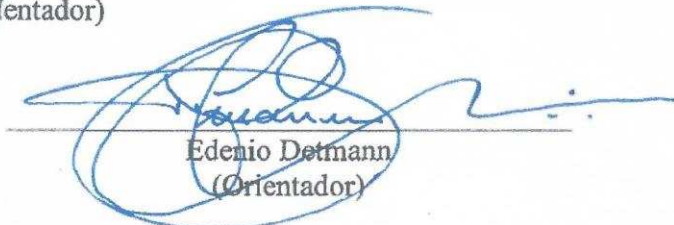
Paulo Roberto Cecon



Marcos Inácio Marcondes
(Coorientador)



Cláudia Batista Sampaio



Edenio Detmann
(Orientador)

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo, pelo dom da vida e pelas pessoas que colocou no meu caminho.

Aos meus pais Ivan Assunção Arruda e Marly de Souza Assunção, por serem minha fonte de inspiração, pelo exemplo de retidão, amor e carinho.

Aos meus irmãos Iara e Bruno, com vocês tenho a certeza de que nunca vou estar sozinha e unidos somos muito mais fortes.

Ao Carluírez, por sonhar junto comigo, por ser sempre presente, mesmo com a distância e por me incentivar a crescer profissionalmente.

Aos amigos Cris, Larissa, Tadeu, Malber, William, Giselle, João, Marcinha, Erick, Luiz Fernando, Aline e Carol, que me ajudaram efetivamente na realização deste trabalho e por garantirem bons momentos de descontração em Viçosa. Às minhas queridas amigas Jéssica e Susana, que continuam firme comigo nessa caminhada.

Às meninas da microbiologia Claudinha, Elsa, Sophia e Débora, por toda a ajuda prestada e tempo despendido.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, por tornarem possível a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Edenio Detmann, por todo tempo despendido, atenção e ensinamentos. Serei sempre grata.

Aos professores do Departamento de Zootecnia, por todos os ensinamentos. Em especial, aos que aceitaram participar desta banca Cláudia Sampaio e Marcos Marcondes. E ao professor do Departamento de Estatística Paulo Cecon.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia, pela ajuda prestada.

Ao CNPq, INCT-Ciência Animal e FAPEMIG, pelo financiamento do projeto.

BIOGRAFIA

AMANDA DE SOUZA ASSUNÇÃO, filha de Ivan Assunção Arruda e Marly de Souza Assunção, nasceu em Ubá, MG, em 31 de agosto de 1992.

Em 2011 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, colando grau em janeiro de 2016.

Em 2016 ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 20 de julho de 2017.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	5
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

RESUMO

ASSUNÇÃO, Amanda de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Avaliação da variabilidade entre animais e de protocolos de incubação em estudos de degradação *in situ* em bovinos.** Orientador: Edenio Detmann. Coorientadores: Marcos Inácio Marcondes e Sebastião de Campos Valadares Filho.

Objetivou-se avaliar a variabilidade entre animais com relação à taxa de degradação da fração insolúvel potencialmente degradável da matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN) e estabelecer o número mínimo de animais e um perfil padronizado de tempos de incubação para ensaios de degradação ruminal *in situ* com bovinos para alimentos produzidos em condições tropicais. Foram avaliadas três forragens e quatro concentrados, respectivamente: cana-de-açúcar *in natura*, silagem de milho, feno de capim Tifton 85, farelo de soja, milho grão, casca de soja e farelo de algodão. Foram utilizadas cinco novilhas Nelore, com peso corporal inicial médio de $328 \pm 9,8$ kg, fistuladas no rúmen, alimentadas *ad libitum* com dieta basal composta por feno de capim Tifton 85 e concentrado comercial, com relação volumoso:concentrado de 80:20 com base na MS. Foram conduzidas sequencialmente três baterias de incubação, nas quais foram avaliados os alimentos de acordo com a seguinte disposição: bateria 1 – cana-de-açúcar, silagem de milho e feno de Tifton 85; bateria 2 – farelo de soja e milho grão; e bateria 3 – farelo de algodão e casca de soja. Em cada bateria todos os alimentos foram incubados em todos os animais. Os sacos para incubação foram confeccionados em tecido náilon (porosidade 50 μ m). Os alimentos foram processados em moinho de facas com peneira de porosidade 2 mm e acondicionados nos sacos na proporção de 20 mg de MS por cm^2 de superfície. Os tempos de incubação utilizados foram: 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 240 horas, para as amostras de forragem; e 0, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72, 96, 120 e 144 horas, para amostras de concentrado. Os resíduos da incubação das amostras de forragem foram analisados quanto aos teores de MS e FDN e os resíduos de incubação das amostras de concentrado foram analisados quanto teores de MS e PB. Os perfis de degradação foram interpretados por modelos não lineares fixos ou mistos, nos quais considerou-se a influência aleatória de animais sobre a taxa de degradação da fração insolúvel potencialmente degradável. Posteriormente, os modelos foram ajustados considerando-se todas as combinações possíveis dos animais experimentais em grupos de quatro, três e dois animais, buscando-se verificar qual o número mínimo de animais a serem

utilizados para ensaios de incubação *in situ*. Os perfis foram comparados no tocante ao comportamento das estimativas das taxas de degradação e das variâncias entre animais sobre a taxa de degradação e variância residual, utilizando-se como referência o ajustamento com todos os animais ($n = 5$). Posteriormente, modelos foram ajustados aos dados de degradação para cada alimento e cada componente em sua forma completa (com todos os tempos de incubação) e sob diferentes formas reduzidas (diferentes combinações de tempos) de forma a definir o número mínimo e o posicionamento dos pontos para que os perfis sejam ajustados sem comprometimentos da exatidão e precisão das estimativas dos parâmetros dos modelos. As análises estatísticas foram realizadas por intermédio dos procedimentos NLIN e NLMIXED do SAS 9.4. O ajustamento por modelo fixo ou misto conduziu a estimativas similares ($P > 0,34$) das taxas de degradação. Contudo com a consideração da variação aleatória entre animais sobre a taxa de degradação, verificou-se redução da variância residual sobre as frações degradadas da MS e PB ou frações não degradadas da FDN variando de 11,9 a 46,7%. A variação no número de animais não afetou drasticamente as estimativas médias de taxa de degradação, variância entre animais sobre a taxa de degradação e variância residual, porém o que se observou foi que com menor número de animais, ampliou-se a dispersão das estimativas das características avaliadas, com a observação de valores com grande afastamento das estimativas médias considerando-se todas as possíveis combinações entre animais. A utilização de três animais é recomendada pela minimização do risco da influência de efeitos aleatórios extremos de animal sobre a taxa de degradação. O esquema de mínimo de incubação sugerido para estudos de degradação da MS e da PB de concentrados deve se basear nos tempos: 0, 3, 6, 12, 24, 30, 48, 72 e 96 horas. Para o estudo da degradação da MS de forragens, os tempos de incubação sugeridos são: 0, 3, 6, 12, 24, 30, 48, 72 e 120 horas. A avaliação do perfil de degradação da FDN de forragens deve seguir os tempos de incubação obtidos para o estudo da degradação da MS, acrescido do tempo 240 horas.

ABSTRACT

ASSUNÇÃO, Amanda de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Evaluation of the variability among animals and incubation protocols for *in situ* degradation studies in cattle.** Adviser: Edenio Detmann. Co-Advisers: Marcos Inácio Marcondes and Sebastião de Campos Valadares Filho.

The aim of this work was to evaluate the variability among animals with regard the degradation rate of the potentially degradable insoluble fraction of dry matter (DM), crude protein (CP), and neutral detergent fiber (NDF) and to establish the minimum number of animals as well as to provide a standardized profile of incubation times for ruminal *in situ* degradation assays with cattle for feeds produced in the tropics. Seven feeds were evaluated, being three forages – sugarcane, corn silage, and Tifton 85 hay – and four concentrates – soybean meal, ground corn, soybean hulls, and cottonseed meal. Five ruminally cannulated Nellore heifers, averaging 328 ± 9.82 kg of with mean initial body weight, had *ad libitum* access to a basal diet composed by Tifton 85 hay and commercial concentrate in a ratio of 80:20 on DM basis. The samples were arranged into three sequential groups for incubation: group 1 – sugarcane, corn silage, and Tifton 85 hay; group 2 – soybean meal and ground corn; group 3 – soybean hulls and cottonseed meal. In each group, all samples were incubated into all animals. Nylon bags (50- μ m porosity) were individually identified and used in this study. The feeds were ground in a knife mill to pass through a 2-mm screen sieve and placed into the nylon bags (20 mg DM per cm^2 of surface). The incubation times were: 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168, and 240 h for forage samples; and 0, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72, 96, 120, and 144 h for concentrates samples. The incubation residues of forages were analyzed with regard DM and NDF contents whereas the incubation residues of concentrates were analyzed regarding DM and CP contents. The degradation profiles were interpreted by using fixed or mixed nonlinear models, where the random influence of animals on the degradation rate of potentially degradable insoluble fraction was considered. Additionally, models were adjusted considering all possible combinations of experimental animals using groups of four, three, and two animals aiming to verify the minimal number of animals to be used for *in situ* incubation assays. The profiles were compared regarding the estimates of degradation rates, variances among animals on the degradation rate, and residual variance by using as reference the adjustment with all animals ($n = 5$). Moreover, models were adjusted to data of degradation for each feed and each component using all incubation time and different

reduced schemes (different combination of incubation times) aiming to define the minimal number and disposition of incubation times to adjust profiles without compromising accuracy and precision of the estimates of the model parameters. Statistical analyses were performed by using the NLIN and NLMIXED procedures of SAS 9.4. The adjustment by fixed or mixed models led to similar estimates ($P>0.34$) of degradation rates. However, considering the random variation among animals on the degradation rate, there was a decreasing of the residual variance on the DM and CP degraded fractions or NDF undegraded fractions ranging from 11.9 to 46.7%. The variation in the number of animals did not drastically affect the average estimates of degradation rates, variance among animals on the degradation rate, and residual variance. However, it was observed that smaller number of animals increased the dispersion of the estimates of the characteristics, with the observation of values with great deviations from the average estimates obtained considering all possible combinations among animals. The use of three animals is recommended by minimizing the risk of the influence of extreme random animal effects on the degradation rate. The minimal incubation scheme suggested for the degradation studies of DM and CP concentrates is based on the times: and 0, 3, 6, 12, 24, 30, 48, 72, and 96 h. For the degradations studies of forages, the suggested incubation times are: 0, 3, 6, 12, 24, 30, 48, 72, and 120 h. The evaluation of degradation profiles of the NDF of forage should follow the incubation times recommended for the study of DM degradation, including an incubation point at 240 hours.

Introdução

A digestibilidade constitui a principal característica na definição do valor nutritivo dos alimentos (Huhtanen et al., 2006). Sua quantificação pode ser realizada por métodos *in vivo*, *in vitro* e *in situ*. Entre estes, o método *in vivo* é considerado padrão. Contudo, sua aplicação demanda grande número de animais e requer grande quantidade de alimentos para fornecer aos mesmos (Harmon & Richards, 1997). Além disso, procedimentos adicionais exigidos no método *in vivo*, como coletas fecais, tornam o método mais oneroso e laborioso. Estas características fomentam a utilização de outros métodos, como os métodos *in situ* e *in vitro*.

Os métodos *in vitro* aplicados a animais ruminantes têm por objetivo simular as condições físicas, químicas e microbiológicas do rúmen (Warner et al., 1956), predizendo com precisão a digestibilidade *in vivo* (Huhtanen et al., 1994). Contudo, a desvantagem primária do método *in vitro* é a sua franca diferença em relação ao ambiente *in vivo* (Mertens, 2005).

Por sua vez, os métodos *in situ* são amplamente utilizados para a avaliação de características da cinética de degradação ruminal (i.e., extensão e taxa de degradação; Mertens, 2005). Estes métodos vêm sendo considerados como referência para a avaliação da degradação de alimentos ou componentes dos alimentos em diferentes sistemas nutricionais (AFRC, 1993; NRC, 2001; Valadares Filho et al., 2016). A utilização do

método *in situ* permite o contato do alimento com o ambiente ruminal, sendo considerado a simulação mais fidedigna do ambiente ruminal em comparação ao ambiente *in vivo* quanto às condições de temperatura, pH, tamponamento e populações microbianas. No entanto, existem informações contraditórias no que diz respeito ao uso de animais isolados ou grupo de animais, devido a possíveis interferências de características intrínsecas ao animal na degradação do alimento, e nos tempos de incubação a serem utilizados para estimação verossímil dos parâmetros da cinética de degradação ruminal de alimentos ou componentes específicos dos alimentos.

Resultados obtidos em condições tropicais apontam que existem influências do animal sobre parâmetros da degradação *in situ* de alimentos (Sampaio et al., 2014), o que indicaria que a avaliação do perfil de degradação *in situ* obtido com um único animal poderia levar a estimativas viesadas, principalmente no tocante à taxa de degradação. Características intrínsecas ao animal podem ser ressaltadas quando animais homogêneos recebendo a mesma dieta apresentam desempenho diferente. Apesar da dieta ser considerada o fator de maior impacto sobre a diversidade microbiana no rúmen (Tajima et al., 2001; Reis et al., 2016), existem efeitos intrínsecos ao animal hospedeiro sobre a estrutura das populações microbianas (Weimer et al., 2010; Jami & Mizrahi, 2012), o que poderia justificar o uso de grupos de animais para avaliação acurada da degradação ruminal de alimentos *in situ*. Contudo, não há consenso na literatura quanto ao número de animais necessários para avaliação da degradação *in situ* de alimentos (e.g., um animal – Tomich & Sampaio, 2004; dois animais - NRC, 2001; três animais – Mehrez & Ørskov, 1977; Ruiz & Ruiz, 1992; Åkerlind et al., 2011).

Por outro lado, não existe direcionamento unificado na literatura quanto ao esquema temporal de incubação (i.e., número e disposição dos tempos de incubação; Tabela 1), apesar desta característica dos procedimentos *in situ* poder afetar a estimabilidade dos parâmetros dos modelos utilizados para a descrição do perfil de degradação (Mertens, 2005).

Tabela 1 - Exemplos de recomendações de número e disposição dos tempos de incubação para avaliação de diferentes tipos e componentes de alimentos por procedimentos *in situ*

Tipo	Componente ¹	Tempos	Disposição (horas)	Referência ³
Forragens	PB	8	0, 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72	1
Concentrados	PB	7	0, 2, 4, 8, 16, 24 e 48	1
---	R ²	9	0, 2, 4, 8, 12, 20, 32, 48, 64	2
---	L ²	9	0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 72 e 96	2
Forragens	MS e FDN	9	0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 e 96	3
Concentrados	MS	7	0, 1, 2, 3, 5, 8, 16 e 32	4
Forragens	PB	9	0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120	5
Concentrados	PB	8	0, 2, 4, 8, 16, 24, 48 e 72	6

¹ PB, proteína bruta; R, componentes de rápida digestão; L, componentes de lenta digestão; MS, matéria seca; FDN, fibra em detergente neutro.

² Estas recomendações se baseiam em um esquema mínimo de tempos, considerando a exigência de avaliação de três tempos de incubação para cada parâmetro a ser estimado no modelo.

³ 1, NRC (2001); 2, Mertens (2005); 3, Trujillo et al. (2010); 4, Seifred et al. (2015); 5, Machado et al. (2013); 6, Menezes et al. (2017).

Apesar de propostas de padronização quanto ao número e disposição dos tempos de incubação existirem em regiões não tropicais (e.g., NRC, 2001; Mertens, 2005), não foram encontrados estudos conduzidos com este objetivo visando à avaliação de alimentos produzidos sob condições tropicais, os quais, espera-se, possam se comportar de forma peculiar quanto à dinâmica de degradação ruminal (Detmann et al., 2008a).

Desta forma, definiram-se como objetivos nesta dissertação:

1. Avaliar a variabilidade entre animais com relação à taxa de degradação da fração insolúvel potencialmente degradável da matéria seca, proteína bruta e fibra em detergente neutro de alimentos produzidos em condições tropicais; e
2. Estabelecer o número mínimo de animais e esquema padronizado de tempos de incubação para ensaios de degradação ruminal *in situ* com bovinos para alimentos produzidos em condições tropicais.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Os procedimentos para fistulação e manejo de animais foram previamente avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (protocolo nº 20/2017).

Caracterização dos alimentos

Foram avaliadas três forragens e quatro concentrados, respectivamente: cana-de-açúcar *in natura* (*Saccharum* sp.), silagem de milho (*Zea mays*), feno de capim Tifton 85 (*Cynodon* sp.), milho grão, casca de soja, farelo de algodão e farelo de soja.

As amostras de cana-de-açúcar e silagem de milho foram secas em estufa com ventilação forçada (55°C) e, em conjunto com as demais amostras, processadas em moinho de facas com peneira de porosidade 2 mm. Posteriormente, metade das amostras moídas foi novamente processada em moinho de facas com peneira de porosidade 1 mm.

A partir das alíquotas processadas a 1 mm, todas as amostras foram analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS) utilizando o método de titulação de Karl Fischer (Bruttel & Schlink, 2006); nitrogênio, por intermédio do método de Dumas (método AOAC 968.06; Windham, 1998) utilizando-se analisador Vario EL III (Elementar Equipamentos, Langenselbol, Alemanha); matéria orgânica (MO; método INCT-CA M-001/1) e lignina

pelo método da hidrólise ácida (método INCT-CA F-005/1), conforme métodos preconizados por Detmann et al. (2012); e fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) segundo recomendações de Mertens (2002), com o uso de α -amilase termoestável (Termamyl 2X; Novozymes), mas com omissão do uso de sulfito de sódio. Nenhum procedimento de correção para cinzas e proteína contaminantes da FDN foi adotado. Os teores de proteína bruta (PB) foram obtidos pela multiplicação do teor de N por 6,25 (Tabela 2).

Tabela 2 – Teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e lignina dos alimentos avaliados nos procedimentos de incubação *in situ*

Alimentos	MS	MO	PB	FDN	Lignina
	g/kg	g/kg MS			
Cana de açúcar	303,0	970,8	35,9	514,5	52,1
Silagem de milho	287,1	914,9	111,6	372,9	33,1
Feno de Tifton	877,7	928,5	113,6	770,6	54,2
Farelo de soja	889,8	939,6	542,5	164,7	2,6
Milho grão	883,2	987,9	104,6	104,8	2,1
Casca de soja	886,0	955,1	196,7	651,9	19,1
Farelo de algodão	940,4	940,9	465,4	363,5	89,3

Incubação ruminal

As incubações foram conduzidas em cinco novilhas da raça Nelore, com peso corporal médio inicial de $328 \pm 9,8$ kg, fistuladas no rúmen. As novilhas foram mantidas em baias individuais com piso emborrachado, comedouro e bebedouro, tendo acesso irrestrito a água e mistura mineral (90 g P/kg). Os procedimentos de fistulação dos animais foram realizados 30 dias anteriormente ao início do experimento.

As novilhas foram alimentadas *ad libitum* com dieta basal composta por feno de capim Tifton 85 e concentrado comercial peletizado com relação volumoso concentrado de 80:20 com base na MS. O concentrado foi composto por milho moído, farelo de soja, farelo de trigo, ureia, sulfato de amônia, minerais e bicarbonato de sódio. A dieta apresentou teor médio de 120 g PB/kg de MS e foi fornecida diariamente às 6h00 e 18h00. Os animais foram adaptados à dieta experimental por 14 dias antes do início das incubações (Machado et al., 2016).

Foram conduzidas, sequencialmente, três baterias de incubações, nas quais foram avaliados os alimentos de acordo com a disposição: bateria 1 – cana-de-açúcar, silagem de milho e feno de Tifton 85; bateria 2 – farelo de soja e milho grão; e bateria 3 – farelo de algodão e casca de soja. Em cada bateria, os alimentos foram incubados em todos os animais simultaneamente.

Os sacos para incubação foram confeccionados com tecido náilon (Sefar Nitex; Sefar, Suíça) com porosidade de 50 μ m com as dimensões de 8×15 cm. Em cada saco, foram condicionados aproximadamente 6 g de amostra seca ao ar processada em peneira de porosidade 2 mm (NRC, 2001), perfazendo a proporção aproximadamente de 20 mg de MS por cm^2 de superfície (Nocek, 1988).

Os tempos de incubação utilizados foram: 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 240 horas, para as amostras de forragem; e 0, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72, 96, 120 e 144 horas, para as amostras de concentrado. A quantidade total de sacos variou em função de cada tempo de incubação, a fim de se obter resíduo suficiente para as análises laboratoriais posteriores. Para amostras de forragem, um saco foi incubado em cada animal para cada alimento nos tempos de 0 a 48 horas e dois sacos foram incubados para cada alimento nos tempos de 72 a 240 horas. Para as amostras de concentrado, um saco foi incubado para cada alimento nos tempos 0 e 3 horas, dois sacos nos tempos de 6 a 12 horas, três sacos no tempo 18 horas, quatro sacos nos tempos de 24 a 36 horas e cinco sacos nos tempos de 48 a 144 horas.

Os sacos foram dispostos no rúmen em ordem inversa quanto ao tempo de incubação, de modo que a retirada dos sacos do rúmen ocorreu simultaneamente (Nocek, 1988). Os sacos referentes ao tempo 0 foram inseridos no rúmen dos animais por tempo suficiente para sua hidratação. Após a retirada do rúmen, todos sacos foram lavados em água corrente para retirada do excesso de resíduos externos aos sacos e, posteriormente, lavados em máquina de lavar tipo “tanquinho” por 5 ciclos de 1 minuto cada (Vanzant et al., 1998; NRC, 2001). Os sacos foram então transferidos para estufa com ventilação forçada a 55°C por 72 horas. Após esse período, os sacos foram retirados da estufa, deixados por 30 minutos para entrarem em equilíbrio com a umidade relativa do ar e depois pesados.

Os resíduos da incubação das amostras de forragem foram analisados quanto aos teores de MS, PB e FDN e os resíduos de incubação das amostras de concentrado foram

analisados quanto teores de MS e PB. Foram utilizados os mesmos métodos descritos para a análise das amostras.

Avaliações do ambiente ruminal

No dia anterior ao início de cada bateria de incubação, amostras de conteúdo ruminal foram coletadas às 6h00, 12h00, 18h00 e 24h00 para avaliação do pH e das concentrações de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) e de ácidos graxos voláteis (AGV; acetato, propionato e butirato). As amostras foram coletadas manualmente na interface líquido:sólido do ambiente ruminal, filtradas por camada tripla de gaze e submetidas à avaliação do pH por intermédio de potenciômetro digital. Em seguida, uma alíquota de 40 mL de líquido ruminal foi separada, fixada com 1 mL de H₂SO₄ (500 mL/L) e congelada (-20°C) para análise da concentração de NAR, a qual foi realizada utilizando-se o método colorimétrico de reação catalisada por indofenol (método INCT-CA N-006/1; Detmann et al., 2012). Uma segunda alíquota de 20 mL de líquido ruminal foi fixada com 5 mL de ácido meta-fosfórico (250 g/L) e congelada (-20°C). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (12000 × g, 10 min., 4°C) e o sobrenadante tratado como descrito por Siegfried et al. (1984). As concentrações de AGV foram avaliadas por intermédio de cromatografia líquida de alta performance (Shimadzu HPLC classe VP series, modelo SPD 10A; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) usando-se coluna de fase reversa (fase móvel de ácido *o*-fosfórico 0,15 M) com detector ultravioleta (210 nm). Os resultados de pH, NAR e AGV foram expressos como média diária.

No segundo dia após o início de cada bateria de incubação, amostras de fluido ruminal foram coletadas às 8h00 para avaliação da osmolaridade. As amostras foram

coletadas manualmente na interface líquido:sólido do ambiente ruminal e filtradas por camada tripla de gaze. A osmolaridade foi estimada por crioscopia (crioscópio modelo MK 540, ITR, Esteio, RS, Brasil). O cálculo da osmolaridade foi realizado pela seguinte equação:

$$Osmolaridade\left(mOsmol/L\right)=\frac{\Delta T_c}{K_c}\times 1000 \quad (1);$$

em que: ΔT_c = temperatura no ponto de congelamento do fluido ruminal; e $K_c = 1,86^\circ\text{C mol}^{-1}\text{kg}^{-1}$ (constante crioscópica da água).

No terceiro dia após o início das incubações, amostras de conteúdo ruminal foram coletadas três horas após a alimentação matinal dos animais para avaliação da atividade específica de produção de amônia (AEPA). As amostras foram coletadas manualmente na interface líquido:sólido do ambiente ruminal e filtradas por camada tripla de gaze. A AEPA foi quantificada segundo método descrito por Bento et al. (2016).

As médias das diferentes características ruminais obtidas ao longo das baterias de incubação foram padronizadas ($\mu = 0$; $\sigma^2 = 1$) e avaliadas por intermédio de procedimento de agrupamento utilizando-se o procedimento CLUSTER do SAS 9.4. O agrupamento foi baseado no método UPGMA utilizando-se a distância quadrática média como medida de dissimilaridade.

Avaliações da variabilidade entre animais quanto à taxa de degradação dos alimentos

A avaliação da variabilidade entre animais foi centrada sobre a taxa de degradação, assumindo-se o pressuposto de a dimensão das frações indegradável e potencialmente degradável serem características inerentes aos alimentos (Detmann et al., 2008b).

Contudo, para verificação da validade desta condição, foram realizadas análises de variância dos resíduos obtidos nos tempos 0 e nos maiores tempos de incubação para cada alimento para MS e PB, e no maior tempo de incubação para cada forragem para FDN. O tempo de incubação 0 foi analisado por ser considerado uma aproximação direta do limite entre a fração solúvel e a fração insolúvel da MS e da PB. Por sua vez, assume-se que o último tempo de incubação seja uma aproximação para o limite entre as frações potencialmente degradável e indegradável para todos os componentes aqui avaliados.

As análises de variâncias (ANOVA) foram conduzidas independentemente para cada tempo de incubação (tempos 0 e final), tipo de alimento (forragem ou concentrado) e componente avaliado (MS, PB e FDN), segundo o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + AL_i + A_j + \varepsilon_{ij} \quad (2);$$

em que: Y_{ij} = observação obtida no alimento i no animal j ; μ = constante geral; AL_i = efeito do alimento i (fixo); A_j = efeito do animal j (aleatório), pressuposto NID $(0, \sigma_a^2)$; e ε_{ij} = erro aleatório não observável, pressuposto NID $(0, \sigma_e^2)$.

As ANOVA foram conduzidas por intermédio do procedimento MIXED do SAS 9.4. A significância do componente de variância associado à variação entre animais foi avaliada por intermédio do escore Z de Wald (Littell et al., 2006), adotando-se $\alpha = 0,05$. Antecipa-se que nenhuma das avaliações conduzidas de acordo com o modelo (2) apontou variabilidade entre animais, confirmando o pressuposto previamente adotado para as avaliações que serão descritas a seguir.

Por intermédio da inspeção gráfica dos resíduos de incubação, optou-se pela utilização de modelo exponencial de primeira ordem (Ørskov & McDonald, 1979) para

descrição do perfil de degradação da MS e da PB e por modelo gama-2 tempo-dependente (Van Milgen et al., 1991) para descrição do perfil de degradação da FDN. Desta forma, os modelos foram ajustados aos perfis completos de cada alimento e fração, considerando-se, contudo, os mesmos como modelos mistos pela inclusão de parâmetro associado à variabilidade aleatória entre animais sobre a taxa de degradação da fração insolúvel potencialmente degradável. As seguintes equações foram utilizadas:

$$D_{ij} = A + B \times [1 - e^{-k(\pm u_i) \times t_j}] + \varepsilon_{ij} \quad (3);$$

$$R_{ij} = B \times [1 + \lambda(\pm u_i) \times t_j] \times e^{-\lambda(\pm u_i) \times t_j} + I + \varepsilon_{ij} \quad (4);$$

em que: D_{ij} = fração degradada da MS ou PB obtida no animal i no tempo de incubação j (g/100 g); A = fração solúvel (g/100 g); B = fração insolúvel potencialmente degradável (g/100 g); k = taxa fracional de degradação da MS e PB (h^{-1}); u_i = parâmetro associado ao efeito aleatório do animal i sobre k ou λ , pressuposto de distribuição normal assintótica, com média 0 e variância σ_a^2 ; t_j = tempo de incubação j ; R_{ij} = resíduo não degradado da FDN obtido no animal i no tempo j (g/100 g); λ = parâmetro taxa tempo-dependente relativo à degradação da FDN (h^{-1}); I = fração indegradável (g/100 g); e ε_{ij} = erro aleatório não observável pressuposto ser de distribuição normal assintótica independente de u_i , com média 0 e variância σ_e^2 .

Ressalta-se que os concentrados não foram avaliados no tocante à degradação da fibra devido à baixa contribuição deste componente na maioria dos alimentos concentrados e à dificuldade de obtenção de resíduos de incubação que permitissem a avaliação adequada do resíduo de FDN. Por outro lado, durante a condução do experimento percebeu-se que os resíduos aparentemente não degradados da PB de forragens apresentavam comportamento

biologicamente implausível, possivelmente atribuído ao baixo teor de PB nos alimentos e à alta representatividade da contaminação por compostos nitrogenados microbianos (Figura 1). Processo de correção para contaminação foi realizado baseado nas equações propostas por Machado et al. (2013). Contudo, esta correção parece ter alterado a variação aleatória dos dados, culminando na obtenção de estimativas negativas para a variância entre animais sobre a taxa de degradação. Este comportamento, por incorrer em resultados ilógicos (i.e., variâncias negativas), fez com que se omitisse a avaliação dos perfis de degradação da PB de forragens.

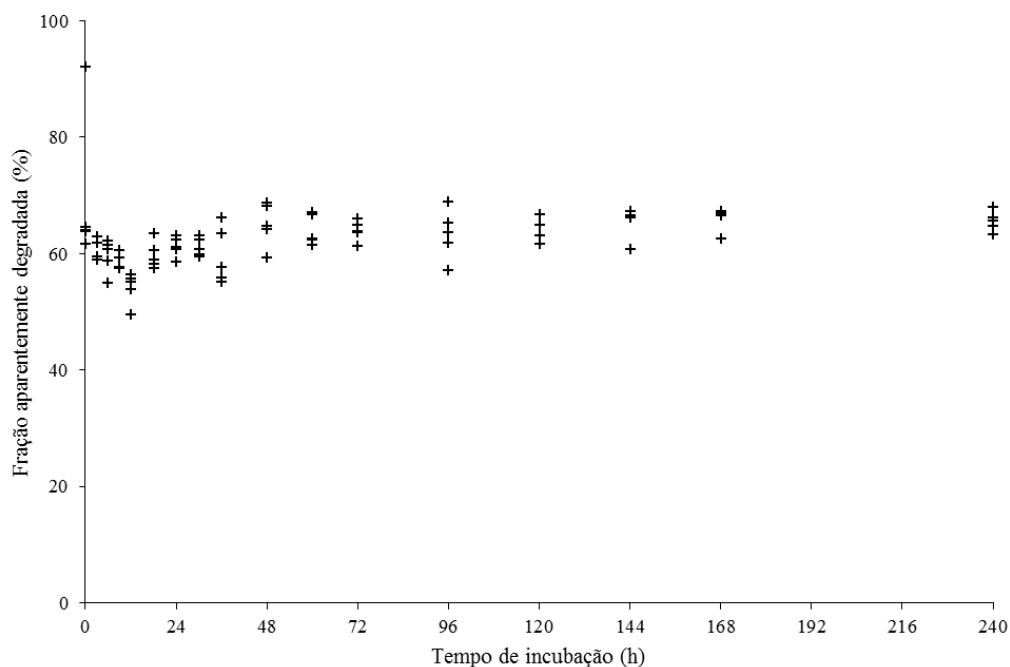


Figura 1 – Exemplo de comportamento da fração aparentemente degradada da proteína bruta de alimento volumoso (cana-de-açúcar) em função dos tempos de incubação. Os pontos apresentados em cada tempo correspondem aos diferentes animais utilizados.

Inicialmente, os modelos (3) e (4) foram ajustados aos dados omitindo-se a variação aleatória entre animais sobre a taxa de degradação (modelo fixo) por intermédio do procedimento NLIN do SAS 9.4. Os ajustamentos se basearam no método iterativo de *Gauss-Newton*. As estimativas iniciais das frações para o ajustamento iterativo se basearam nas informações dos resíduos de incubação obtidos no tempo 0 e no máximo tempo de incubação utilizado. Por sua vez, a estimativa inicial para os parâmetros k e λ foram obtidas por intermédio da opção *grid search* do procedimento NLIN.

A solução obtida por intermédio do modelo fixo foi utilizada como estimativa inicial para o ajustamento das equações (3) e (4) (modelos mistos) utilizando-se o procedimento NLMIXED do SAS 9.4. Os ajustamentos foram realizados utilizando-se o método de integração de primeira ordem para a máxima verossimilhança sobre os efeitos aleatórios (Beal & Sheiner, 1982) com a técnica de otimização *Dual Quasi-Newton*. A significância do componente de variância associada ao efeito de animais sobre a taxa de degradação foi avaliada por aproximação assintótica à distribuição t de *Student*. Em função do número de animais ($n = 5$), as significâncias para este componente de variância foram declaradas com $P < 0,10$. Adicionalmente, a qualidade dos ajustes dos modelos fixo e misto aos dados foi avaliada por intermédio do critério de informação de Akaike (AIC; Akaike, 1974; Kaps & Lamberson, 2004).

Após os ajustamentos, as taxas de degradação (k e λ) obtidas por intermédio do ajustamento por modelo fixo e aleatório foram comparadas por intermédio do ajustamento de modelo de regressão linear simples, utilizando-se as seguintes hipóteses:

$$H_0 : \beta_0 = 0 \text{ e } H_a : \beta_0 \neq 0 \quad (5);$$

$$H_0 : \beta_1 = 1 \text{ e } H_a : \beta_1 \neq 1 \quad (6).$$

As taxas de degradação obtidas por ajustamento por modelo fixo e aleatório foram consideradas iguais quando ambas as hipóteses de nulidade não foram rejeitas ($P > 0,05$).

Avaliação do número mínimo de animais para ensaios de degradação in situ

Para avaliação do comportamento dos perfis de degradação, notadamente com relação ao comportamento das taxas de degradação (k e λ), procedeu-se ao ajustamento das equações (3) e (4) sobre todas as combinações possíveis dos cinco animais utilizados em grupos de dois (10 combinações), três (10 combinações) e quatro (5 combinações) animais. Todos os ajustamentos foram realizados considerando-se a variação aleatória entre animais sobre a taxa de degradação utilizando-se o procedimento NLMIXED do SAS 9.4 como previamente descrito.

Os perfis foram comparados no tocante ao comportamento das estimativas das taxas de degradação (k ou λ), variância entre animais sobre a taxa de degradação e variância residual utilizando-se como referência o ajustamento com todos os animais ($n = 5$).

Estabelecimento de esquema temporal mínimo de incubação

A avaliação para o estabelecimento de um esquema temporal mínimo foi inicialmente realizada sobre os perfis de degradação da MS de todos os alimentos, segundo a sistemática apresentada abaixo.

De forma inicial, procedeu-se ao ajustamento dos perfis considerando-se todos os tempos de incubação (17 tempos para forragens e 15 tempos para concentrados). Neste

ajustamento foram estimados os intervalos de confiança assintóticos ($1 - \alpha = 0,95$) para os parâmetros A, B e k (Equação 3). Optou-se por se utilizar ajustamento por modelo fixo segundo o procedimento NLIN do SAS 9.4, conforme previamente descrito. Esta opção se justificou devido aos intervalos de confiança serem mais estreitos em relação àqueles produzidos pelo ajustamento por modelo misto, o que atribui maior sensibilidade aos procedimentos de detecção de distorções nos perfis de degradação em função da omissão tempos de incubação.

Em primeira instância, objetivou-se ao estabelecimento de um tempo final de incubação. Desta forma, os tempos foram gradativamente retirados, um a um, a partir do último tempo utilizado neste estudo (240 horas para forragens e 144 horas para concentrados). Este processo se repetiu até que, ao menos uma das estimativas dos parâmetros A, B ou k obtidas com o esquema reduzido fosse encontrada fora dos respectivos intervalos de confiança assintóticos estimados com o conjunto total de tempos de incubação utilizados no estudo. Desta forma, este ponto foi mantido no perfil, uma vez que sua retirada causaria distorção no perfil de degradação ajustado.

Após a definição do ponto final, procedeu-se à retirada de pontos intermediários no perfil visando ao aumento do intervalo entre tempos de incubação. Um tempo de incubação foi considerado não necessário quando sua retirada não comprometeu as estimativas dos parâmetros A, B e k (Equação 3) em relação aos intervalos de confiança assintóticos estabelecidos com o conjunto total de tempos de incubação. Priorizou-se a retirada de pontos nos terços médio e final do perfil de incubação, uma vez que entende-se que há necessidade de maior número de tempos no perfil inicial do perfil para correta estimação da

taxa de degradação e, quando pertinente, da latência discreta (não considerada neste estudo devido ao comportamento de degradação dos alimentos avaliados).

A partir da definição do esquema mínimo de incubação para avaliação da degradação da MS de concentrados, procedeu-se à avaliação do esquema mínimo de incubação para PB estes alimentos. Neste caso, optou-se pela verificação da adequação do esquema mínimo obtido para MS também para a avaliação da PB. Os perfis foram ajustados considerando-se o conjunto total de tempos de incubação, com a respectiva definição dos intervalos de confiança assintóticos ($1 - \alpha = 0,95$) para os parâmetros A, B e k (Equação 3). Em seguida, os perfis foram novamente ajustados considerando-se os esquemas mínimos de incubação obtidos na avaliação da degradação da MS. Caso as estimativas dos parâmetros A, B e k estivessem contidas nos intervalos de confiança assintóticos construídos com base no perfil ajustado com o conjunto total de tempos de incubação, a conclusão seria de que os esquemas mínimos para avaliação da degradação da MS poderiam ser também utilizados para avaliação da degradação da PB.

Procedimento similar foi adotado para a definição do esquema mínimo de incubação para avaliação da degradação da FDN de volumosos. Os ajustamentos foram realizados inicialmente considerando-se todo o conjunto de tempos de incubação, com a respectiva definição dos intervalos de confiança assintóticos ($1 - \alpha = 0,95$) para os parâmetros B, I e λ (Equação 4). Em seguida, os perfis foram novamente ajustados considerando-se os esquemas mínimos de incubação obtidos na avaliação da degradação da MS. Caso as estimativas dos parâmetros B, I e λ estivessem contidas nos intervalos de confiança assintóticos construídos com base no perfil ajustado o conjunto total de tempos de incubação, concluir-se-ia pela adequação no uso do esquema mínimo. Contudo, antecipa-se

que tal comportamento não foi observado ($P < 0,05$), um possível reflexo da falta de exatidão para estimação da fração indegradável da FDN com períodos curtos de incubação, o que é suportado pelos resultados apresentados por outros autores em condições tropicais (Casali et al., 2008; Valente et al., 2011).

Desta forma, com vistas à otimização do processo, procedeu-se à inclusão de um tempo adicional de incubação ao esquema mínimo para avaliação da degradação da FDN. Este ponto foi escolhido de forma a atender os critérios de inclusão nos intervalos de confiança descrito acima para todas as forragens utilizadas neste estudo.

Em todos os casos, as variâncias residuais obtidas com o conjunto total de pontos de incubação e com os esquemas mínimos foram comparadas por intermédio da estatística F de Snedecor-Fisher ($\alpha = 0,05$).

Resultados e Discussão

Comparação entre aproximações por modelos fixo ou misto

Não foram verificados efeitos de variação entre animais ($P > 0,20$) quanto ao valor das frações não degradadas no tempo de incubação 0 e no maior tempo de incubação utilizados neste estudo (Tabela 3).

Tabela 3 – Avaliação da variabilidade entre animais no tocante às frações não degradadas obtidas nos tempos inicial (0 hora) e finais (144 horas para concentrados e 240 horas para forragens) em função do tipo de alimento e do componente avaliado

Grupo de Alimentos	Componente ¹	Tempo (h)	Valor P ²
Forragens	MS	0	0,888
		240	0,209
	FDN	240	0,308
Concentrados	MS	0	0,818
		144	0,836
	PB	0	0,868
		144	0,605

¹ MS, matéria seca; FDN, fibra em detergente neutro; PB, proteína bruta.

² Valor P relativo ao componente de variância entre animais (Equação 1) obtido pelo escore Z de Wald.

A avaliação destes tempos foi realizada considerando que seus valores constituem aproximação para as regiões limítrofes entre as frações solúvel e insolúvel (tempo 0) e entre das frações potencialmente degradável e indegradável (maior tempo de incubação). Esse comportamento reforça a hipótese de as frações dos diferentes componentes avaliados serem características intrínsecas aos alimentos (Detmann et al., 2008b) e suporta a decisão tomada neste trabalho de centrar as avaliações quanto à variabilidade aleatória entre animais sobre a taxa de degradação dos diferentes componentes.

Para todos os perfis de degradação estudados, com exceção da PB para a casca de soja, foram obtidos ajustamentos com estimativas numéricas maiores que zero para a variância entre animais sobre a taxa de degradação (Tabela 4). Contudo, a despeito das peculiaridades de cada método de ajustamento, não foram verificadas diferenças ($P > 0,34$) nas estimativas das taxas de degradação obtidas pela aproximação por modelo fixo ou misto (Figura 2). Este comportamento é justificado pelo fato de as esperanças matemáticas dos parâmetros para ambas as aproximações serem similares (Wang & Zuidhof, 2004; Aggrey, 2009).

Desta forma, a principal diferença entre aproximações residiu sobre a precisão das avaliações. Dos 13 perfis ajustados com a obtenção de valores numéricos não nulos para a variância entre animais sobre a taxa de degradação, apenas um propiciou componente de variância diferente de zero ($P < 0,08$; cana-de-açúcar/FDN; Tabela 4). Em primeira instância, este comportamento poderia indicar que não há variabilidade entre animais quanto à taxa de degradação.

Tabela 4 - Características do processo de estimação dos parâmetros associados à taxa de degradação (k ou λ , h^{-1}) em diferentes alimentos e componentes em função de ajustamento por modelo fixo ou misto considerando-se a variação aleatória entre animais

Alimento	Modelo Fixo ¹			Modelo Misto ²					$\Delta(\%)$
	k/ λ	EP	σ^2_ϵ	k/ λ	EP	σ^2_a	Valor P	σ^2_ϵ	
	Matéria Seca								
Cana-de-açúcar	0,0171	0,00093	1,90	0,0169	0,00168	$3,57 \times 10^{-6}$	0,513	1,49	21,6
Silagem de milho	0,0256	0,00123	4,61	0,0257	0,00146	$4,61 \times 10^{-6}$	0,235	3,75	18,7
Feno de Tifton	0,0266	0,00126	8,74	0,0264	0,00170	$9,55 \times 10^{-6}$	0,154	6,17	29,4
Farelo de soja	0,0492	0,00440	48,75	0,0511	0,00607	$1,30 \times 10^{-4}$	0,313	34,50	29,2
Milho grão	0,0492	0,00272	19,74	0,0482	0,00392	$7,20 \times 10^{-5}$	0,219	10,53	46,7
Casca de soja	0,0280	0,00198	27,11	0,0281	0,00204	$6,13 \times 10^{-6}$	0,214	23,18	14,5
Farelo de algodão	0,0300	0,00230	16,88	0,0303	0,00251	$6,87 \times 10^{-6}$	0,330	14,87	11,9
	Proteína Bruta								
Farelo de soja	0,0418	0,00392	88,28	0,0421	0,00405	$2,90 \times 10^{-5}$	0,408	73,59	16,6
Milho grão	0,0342	0,00335	25,71	0,0361	0,00447	$4,60 \times 10^{-5}$	0,355	19,78	23,1
Casca de soja	0,0362	0,00402	19,61	0,0360	0,00322	0	---	19,61	---
Farelo de algodão	0,0794	0,00537	32,73	0,0825	0,00778	$1,32 \times 10^{-4}$	0,399	27,13	17,1
	Fibra Insolúvel em Detergente Neutro								
Cana-de-açúcar	0,0438	0,00161	8,47	0,0438	0,00170	$1,40 \times 10^{-5}$	0,078	6,57	22,4
Silagem de milho	0,0523	0,00186	18,46	0,0524	0,00264	$2,90 \times 10^{-5}$	0,248	13,57	26,5
Feno de Tifton	0,0588	0,00200	12,91	0,0591	0,00320	$5,20 \times 10^{-5}$	0,143	7,93	38,6

¹EP, erro padrão de k ou λ ; σ^2_ϵ , variância residual.

²EP, erro padrão de k ou λ ; σ^2_a , variância associada à variação aleatória entre animais sobre k ou λ ; Valor P, significância associada à hipótese de nulidade $\sigma^2_a = 0$; σ^2_ϵ , variância residual; $\Delta(\%)$, contribuição da variabilidade entre animais sobre a variância residual considerando o ajustamento por modelo fixo. Este valor foi calculado como a redução percentual obtida em σ^2_ϵ com a mudança para o ajustamento por modelo misto.

Contudo, há de se ressaltar que existe uma dificuldade intrínseca à avaliação direta da significância da variabilidade entre animais sobre a taxa de degradação por intermédio da aproximação assintótica da distribuição t de *Student* devido ao tamanho da amostra utilizada neste estudo. Neste estudo, a avaliação da significância foi realizada utilizando-se apenas 4 graus de liberdade.

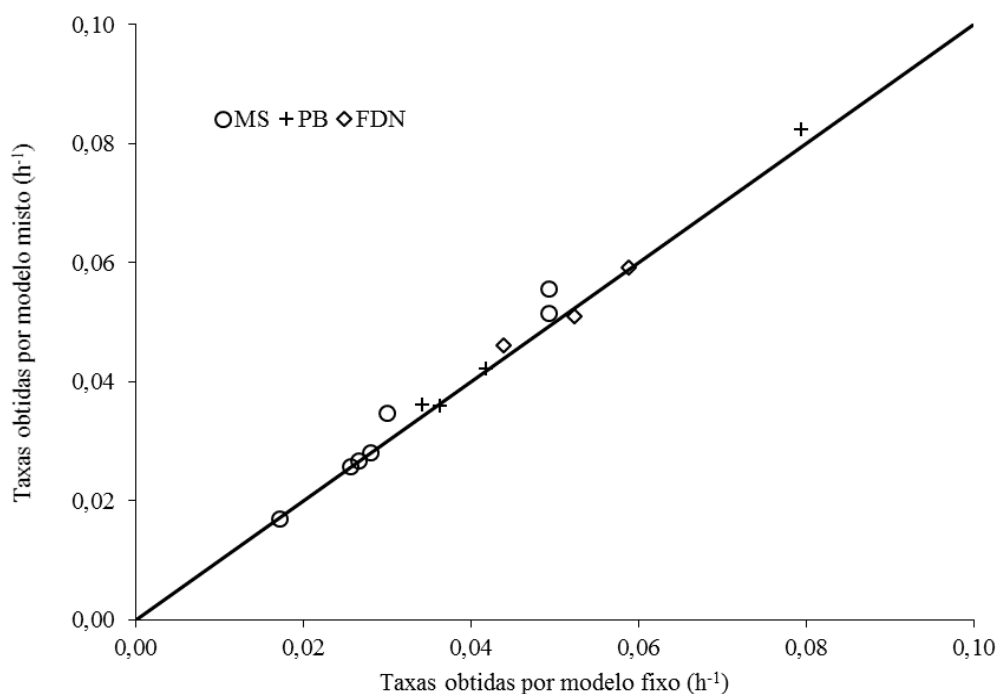


Figura 2 – Relação entre os valores de taxa de degradação estimados por modelo não linear fixo ou misto para matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN) dos diferentes alimentos [$\hat{Y} = -0,00007 - 1,037 \times X$; $r^2 = 0,98$; $s_{XY} = 0,002$; Valor P ($\beta_0 = 0$): 0,964; Valor P ($\beta_1 = 1$): 0,342; a linha contínua representa a relação de igualdade].

No entanto, a presença efetiva da variabilidade entre animais pode ser indiretamente percebida pela dimensão da variância residual, a qual expressa a variação aleatória de origem desconhecida em relação aos valores de frações degradadas (MS e PB) ou não degradadas (FDN). Com a consideração da variação aleatória entre animais sobre a taxa de degradação, verificou-se redução da variância residual das frações para todos os perfis ajustados (Tabela 4). Este comportamento decorre de que na aproximação por modelo fixo a variabilidade entre animais é considerada como variação de origem desconhecida, sendo, portanto, incorporada à variância residual.

Uma vez que a taxa de degradação define a dimensão das frações degradadas ou não degradadas ao longo dos tempos, e havendo variação entre animais sobre este parâmetro, seria esperado que esta variação, ao não ser considerada, compusesse a variação considerada de origem desconhecida na aproximação por modelo fixo. Contrariamente, na aproximação por modelo misto, esta variabilidade passa a ser considerada de origem conhecida e contemplada no modelo, o que incorre em aumento da precisão das avaliações com a redução da variância residual. Neste caso, a redução na variância residual mostra, diretamente, a influência de animais sobre os valores de frações degradadas ou não degradadas ao longo do tempo. Assim, de acordo com os resultados deste estudo, a variação entre animais contribuiu com 11,9 a 46,7% (média de 24,3%) da variação aleatória total sobre os valores de frações degradadas ou não degradadas ao longo dos tempos de incubação (Tabela 4). Vanzant et al. (1998), ao compilaram resultados de estudos conduzidos em condições não tropicais, apontaram contribuição média de 40% da variação entre animais sobre a variação aleatória sobre os valores de frações degradadas.

A taxa de degradação constitui uma função intrínseca do substrato e do meio de digestão (Mertens, 2005) e sua expressão depende da intensidade de ação microbiana sobre o substrato (Michalet-Doreau & Ould-Bah, 1992). Em termos de ambiente ruminal, entende-se por condições de meio todos os fatores que afetam a atividade dos sistemas enzimáticos microbianos sobre os substratos, como: pH, minerais, compostos nitrogenados (amônia e peptídeos), ácidos graxos de cadeia ramificada, etc. (Leng, 1990).

O alimento constitui potencial fornecedor de substratos para o crescimento microbiano. Assim, as condições de meio mostram-se inter-relacionadas às características do alimento (Detmann et al., 2008b). Contudo, neste trabalho, tanto a dieta basal como os alimentos incubados foram constantes entre animais. Desta forma, a variabilidade entre animais quanto à taxa de degradação parece ser reflexo de características aos próprios animais. Muitos aspectos do meio ruminal são influenciados diretamente pelo animal (e.g. liberação de tampões, manutenção de temperatura, reciclagem de nitrogênio, etc.) (Detmann et al., 2015). Além disso, existem efeitos intrínsecos ao animal hospedeiro sobre a estrutura das populações microbianas no rúmen (Weimer et al., 2010; Jami & Mizrahi, 2012), o que poderia justificar a variabilidade entre animais no tocante à taxa de degradação. Destaca-se que os animais utilizados neste estudo eram homogêneos e variações atribuídas a efeitos de tamanho corporal, grupo genético e maturidade fisiológica não são passíveis de influência sobre os resultados.

Contudo, a redução na variância residual poderia ser parcialmente atribuída à consideração (i.e., adição) de mais um parâmetro aos modelos (parâmetro u , Equações 3 e 4), o que penalizaria o modelo pelo maior uso de graus de liberdade para avaliação da variação de origem conhecida, reduzindo os graus de liberdade residuais. Desta forma,

avaliação mais coesa da adequabilidade de diferentes modelos ao mesmo conjunto de dados deve ser realizada considerando-se não só a estimativa da variação residual, mas também o investimento em número de parâmetros para o correto ajustamento (Akaike, 1974). Neste sentido, a inclusão do parâmetro u nas aproximações por modelo misto gerou ganhos consistente em termos de ajustamento, uma vez que as estimativas de AIC foram inferiores às aquelas obtidas com a aproximação por modelo fixo para todas as avaliações realizadas (Figura 3).

Desta forma, considerando-se a ausência de influências sobre as estimativas da taxa de degradação (Figura 2), a vantagem evidente da aproximação por modelo misto consiste na redução da variância residual (Tabela 4). Nesse sentido, vantagens efetivas em termos de utilização da aproximação por modelos mistos seriam observadas caso os ensaios de incubação estivessem atrelados a um delineamento experimental no qual se objetiva a comparação estatística entre alimentos. Nesses casos, a variância residual constitui elemento central para a comparação entre alimentos e sua redução ampliaria a precisão dos processos de comparação. No entanto, a despeito desse ganho em precisão, para o caso de ensaios nos quais objetiva-se apenas estimar as características da cinética de degradação de alimentos, sem comparações estatísticas entre alimentos, ambas as aproximações poderiam ser utilizadas, pois possuem exatidão similar (Figura 2). Essa recomendação se baseia no fato de a aproximação por modelo fixo possuir menor complexidade e obtenção de convergência mais simples nos algoritmos iterativos atualmente disponíveis, o que pode constituir uma vantagem operacional, pois mostra-se menos sensível ao uso de valores iniciais não ótimos.

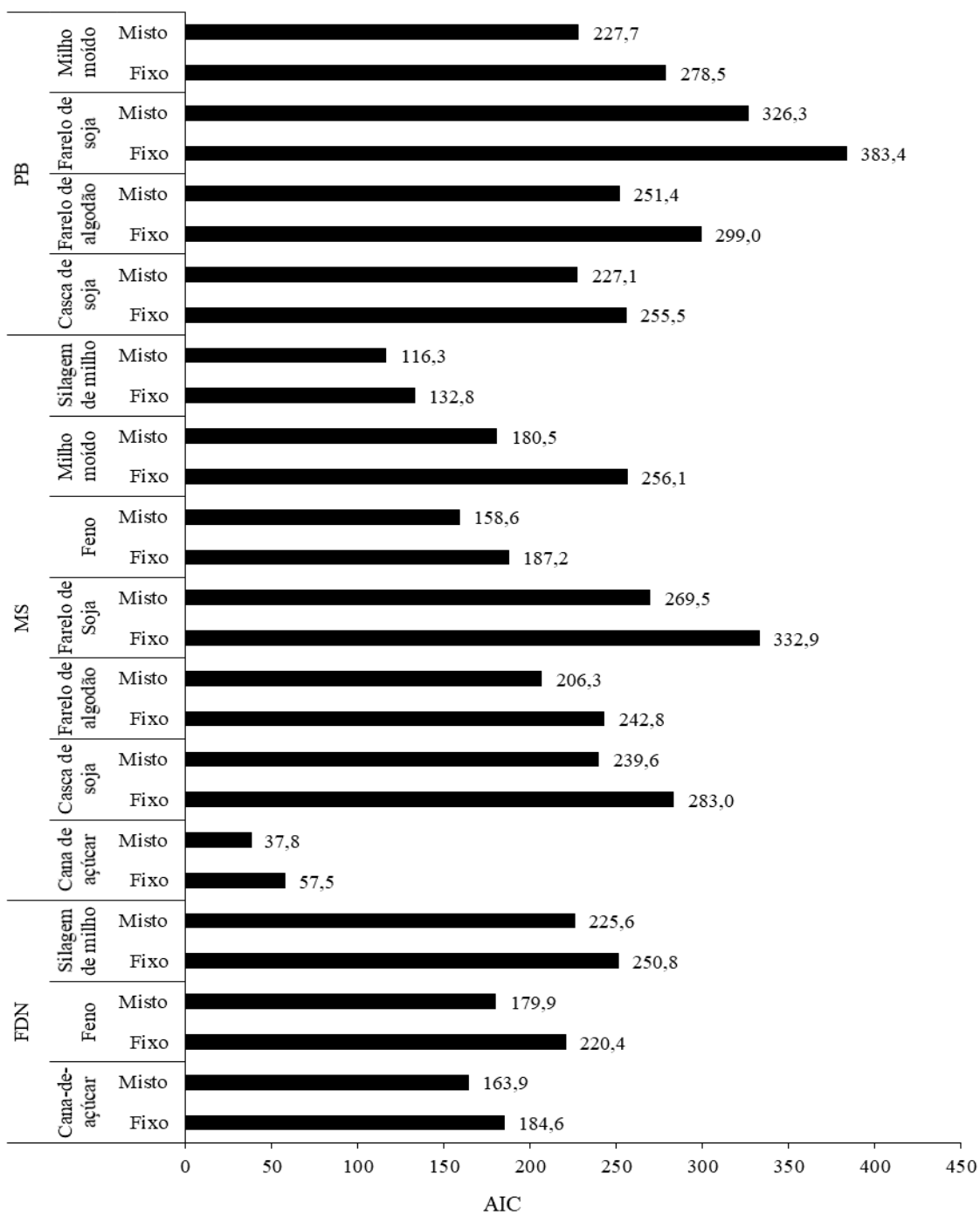


Figura 3 - Comportamento do critério de informação de Akaike (AIC) para os perfis ajustados de degradação da matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN) para os diferentes alimentos por intermédio de modelo fixo ou misto.

Avaliação do número de animais utilizados nos procedimentos de incubação

O comportamento dos perfis de degradação ajustados considerando-se diferente número de animais foi similar para todos os alimentos e componentes avaliados. Desta forma, apenas exemplos dos resultados relativos à avaliação da degradação da MS para o farelo de algodão é apresentado na Figura 4.

A variação no número de animais não afetou drasticamente as estimativas médias da taxa de degradação, variância entre animais sobre a taxa de degradação e variância residual. Este comportamento contraria os resultados apresentados por outros autores (Mehrez & Ørskov, 1977; Vanzant et al., 1998; Zanton & Heinrichs, 2009) que apontaram aumento na precisão como aumento no número de animais.

No entanto, apesar do comportamento médio, o que se observou foi que com menor número de animais, ampliou-se a dispersão das estimativas das características avaliadas, com a observação de valores com grande afastamento das estimativas médias considerando-se todas as possíveis combinações entre animais (Figura 4).

Este comportamento mais vez uma corrobora a influência da variabilidade entre animais sobre a degradação ruminal dos alimentos, notadamente sobre a taxa de degradação (Tabela 4). A avaliação do perfil das características físico-químicas do ambiente ruminal (Tabela 5) revelou que, apesar de pequeno, o grupo de animais utilizado neste estudo se mostrou heterogêneo em termos de características de fermentação ruminal.

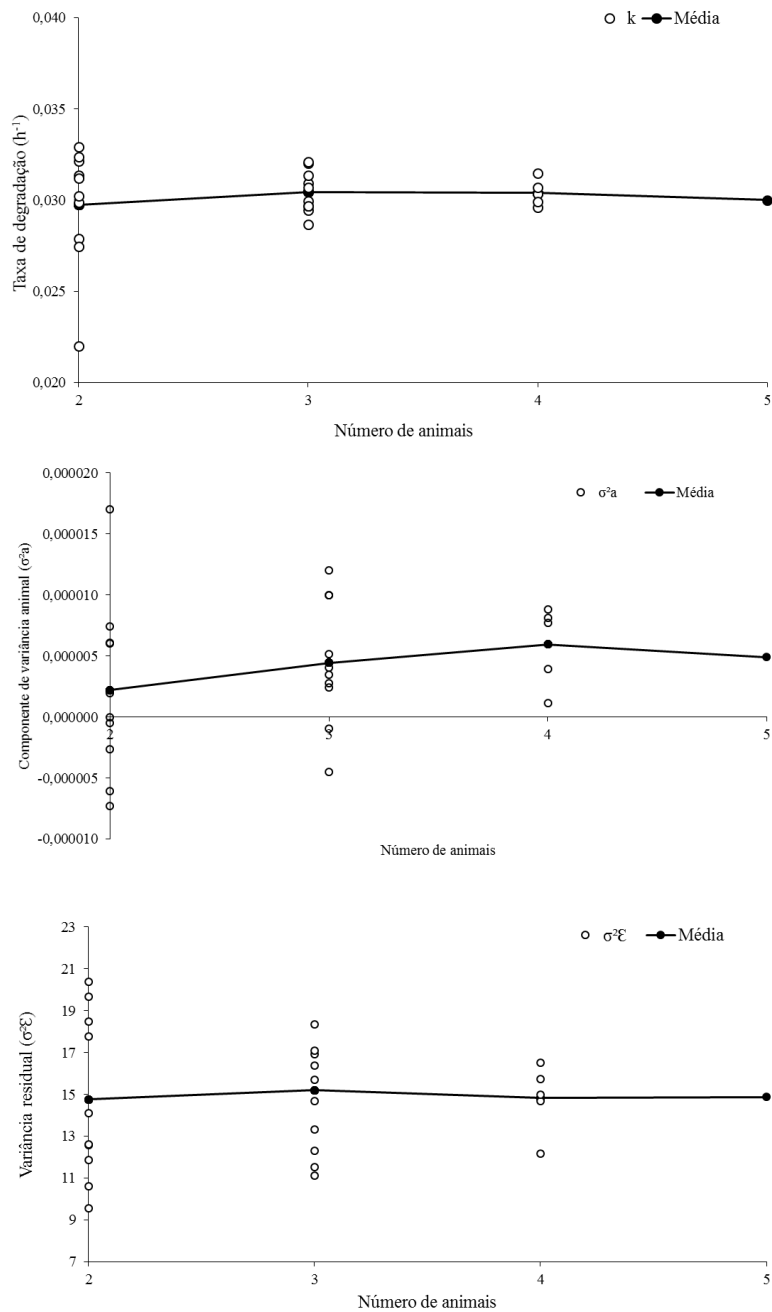


Figura 4 - Variação das estimativas da taxa de degradação da fração insolúvel potencialmente degradável da matéria seca (k), da variância associada ao efeito de animal sobre k (σ^2_a) e da variância residual (σ^2_ϵ) para os perfis de degradação do farelo de algodão em função do número de animais.

A análise de agrupamento indicou que os cinco animais podem ser agrupados em três grupos distintos com relação às características de fermentação ruminal, como indicado pelo corte arbitrário efetuado em 65% da máxima distância de agrupamento demonstrada na Figura 5. Isto corrobora que a não consideração da variabilidade entre animais, principalmente pela utilização de um único animal, no estabelecimento de ensaios de degradação *in situ* pode incorrer em viés sobre as estimativas dos parâmetros cinéticos, principalmente sobre a taxa de degradação.

Tabela 5 - Caracterização média ao longo do experimento das características do ambiente ruminal dos diferentes animais utilizados para realização dos procedimentos de incubação *in situ*

Item ¹	Animal				
	1	2	3	4	5
OSM	290,30	315,90	314,70	294,00	295,80
AEPA	5,56	8,36	6,09	6,85	6,77
pH	5,71	5,50	6,17	5,20	6,10
NAR	5,67	5,07	6,39	4,51	7,87
ACET	54,60	67,60	55,00	66,80	64,50
PROP	12,30	16,30	12,50	16,50	14,40
BUT	10,20	13,30	9,80	11,90	11,10

¹ OSM, osmolaridade (mOsmol/L); AEPA, atividade específica de produção de amônia (nmol NH₃/mg proteína microbiana/minuto); pH, pH ruminal; NAR, nitrogênio amoniacal ruminal (mg/dL); ACET, PROP, BUT, concentração dos ácidos acético, propiônico e butírico, respectivamente (mmol/L).

Os efeitos aleatórios de animais podem se manifestar de forma positiva ou negativa sobre a taxa de degradação. O grande entrave reside sobre o fato de esta percepção só ser possível *a posteriori*, ou seja, após a realização do estudo, e com a utilização de mais de um animal, uma vez que os efeitos aleatórios constituem variabilidades, somente perceptíveis com a aplicação do princípio experimental da repetição.

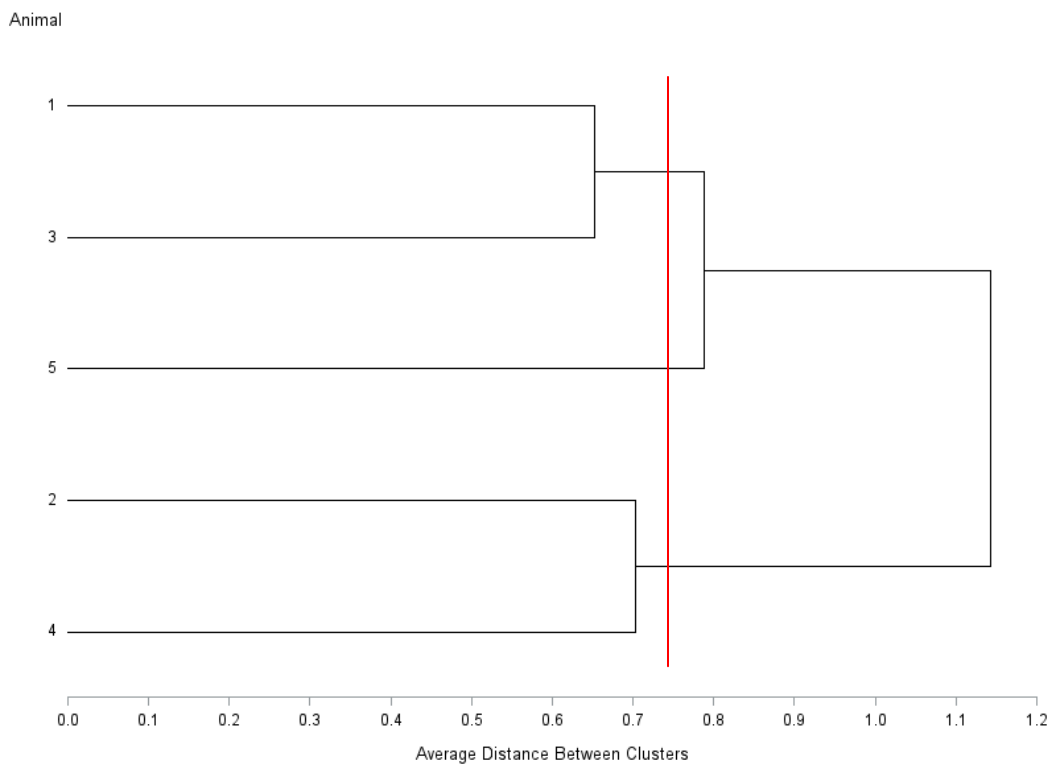


Figura 5 - Procedimento de agrupamento dos animais utilizados nos procedimentos de incubação *in situ* com base nas características demonstradas na Tabela 5. A linha vermelha corresponde ao corte arbitrário em 65% da máxima distância de agrupamento ($0,65 \times 1,143 = 0,743$).

A dispersão das características aqui avaliadas (Figura 4) indica que o uso de pequeno grupo de animais pode comprometer tanto a exatidão como a precisão dos ensaios de degradação por uma questão de risco de obtenção de estimativas distantes do que seria esperada com maior número de animais. Caso apenas dois animais sejam utilizados, o risco da influência de animais com efeitos aleatórios extremos, tanto positivos como negativos, se amplia. Isto levou inclusive à estimação de variâncias negativas associadas à variabilidade entre animais sobre a taxa de degradação, o que constitui uma incoerência matemática e demonstra problemas quanto à convergência caso modelos mistos precisem ser utilizados.

Considerando a pouca influência do número de animais sobre as estimativas médias (Figura 4), a dimensão do risco da obtenção de valores extremos para taxa de degradação e para os componentes de variância foi estimada a partir das estimativas obtidas com as diferentes combinações de animais de acordo com os fundamentos do Teorema do Limite Central (Casella & Berger, 2010), no qual pressupõe-se que amostras de estimativas de parâmetros de distribuições não normais tendam a apresentar distribuição normal. Utilizou-se como estimativa média da distribuição a estimativa de cada parâmetro obtida com a utilização dos cinco animais e a variância entre estimativas obtidas com o uso de dois, três ou quatro animais. Para cada avaliação estimou-se a probabilidade de obtenção de valores distantes em mais ou menos 10% do valor obtido com a utilização de todos os animais (Figura 6; Tabela 6). Adicionalmente, devido à ocorrência de componentes de variância associados ao efeito de animais sobre a taxa de degradação negativos (Figura 4), calculou-se qual a probabilidade de este comportamento ser observado com o uso de dois, três ou quatro animais (Tabela 6).

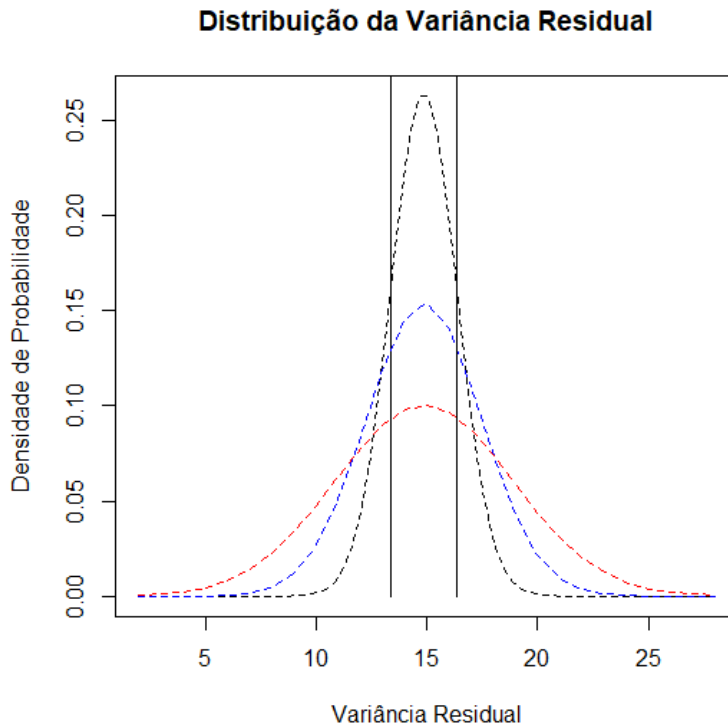


Figura 6 – Exemplo de distribuição de probabilidade de acordo com o Teorema do Limite Central para a variância residual da degradação da MS do farelo de algodão em função do número de animais [linhas tracejadas: negro = 4 animais; azul = 3 animais; vermelha = 2 animais; as linhas verticais delimitam a região para $P(0,9 \times \sigma^2_{\epsilon} < \sigma^2_{\epsilon} < 1,1 \times \sigma^2_{\epsilon})$].

Devido à dispersão superior aos demais perfis ajustados, a avaliação da degradação da PB do milho grão apresentou comportamento atípico (Tabela 6), sendo esta omitida das demais discussões neste tópico. De forma geral, na medida em que se ampliou o número de animais, os riscos de viés e perda de precisão se reduziram (Tabela 6; Figura 7), um possível reflexo de efeito da diluição de efeitos aleatórios extremos em um grupo maior de animais com efeitos aleatórios menos dispersos e mais próximos da média populacional (assumida como zero; Equações 3 e 4).

Tabela 6 - Probabilidades para obtenção de estimativas de taxa de degradação [$k/\lambda(\pm 10\%)$], variância do erro [$\sigma^2_\epsilon(\pm 10\%)$] e componente de variância associado ao efeito de animais sobre a taxa de degradação [$\sigma^2_a(\pm 10\%)$] maiores ou menores em 10% em relação ao obtido com a utilização de cinco animais e para obtenção de componentes de variância associado ao efeito de animais negativos [$\sigma^2_a(<0)$] em função do número de animais utilizado

Alimento	$k/\lambda(\pm 10\%)$			$\sigma^2_\epsilon(\pm 10\%)$			$\sigma^2_a(\pm 10\%)$			$\sigma^2_a(<0)$		
	2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4
Matéria Seca												
Cana-de-açúcar	0,82	0,94	>0,99	0,47	0,74	0,86	0,14	0,16	0,21	0,04	0,02	<0,01
Silagem de milho	0,53	0,98	>0,99	0,55	0,74	0,93	0,08	0,09	0,13	0,17	0,13	0,06
Feno de Tifton	0,79	0,94	0,99	0,27	0,44	0,63	0,10	0,12	0,16	0,10	0,07	0,02
Farelo de soja	0,45	0,67	0,83	0,16	0,26	0,39	0,09	0,13	0,18	0,13	0,05	0,01
Milho grão	0,51	0,70	0,92	0,18	0,27	0,39	0,13	0,17	0,28	0,05	0,02	<0,01
Casca de soja	0,77	0,94	>0,99	0,37	0,50	0,70	0,08	0,11	0,16	0,17	0,08	0,02
Farelo de algodão	0,64	0,99	>0,99	0,29	0,44	0,67	0,05	0,08	0,12	0,25	0,17	0,07
Proteína Bruta												
Farelo de soja	0,62	0,77	0,94	0,24	0,39	0,56	0,08	0,13	0,25	0,16	0,05	<0,01
Milho grão	0,14	0,13	0,16	0,22	0,25	0,30	0,00	0,00	0,00	0,49	0,49	0,50
Farelo de algodão	0,33	0,99	>0,99	0,22	0,34	0,50	0,10	0,18	0,53	0,10	0,01	<0,01
Fibra Insolúvel em Detergente Neutro												
Cana-de-açúcar	0,89	0,99	>0,99	0,26	0,66	0,83	0,08	0,10	0,13	0,14	0,10	0,05
Silagem de milho	0,79	0,94	>0,99	0,30	0,50	0,71	0,10	0,13	0,18	0,12	0,06	0,01
Feno de Tifton	0,77	0,92	>0,99	0,26	0,39	0,57	0,11	0,13	0,26	0,08	0,05	<0,01

De forma particular, a probabilidade de se obter valores de taxa de degradação próximos ao que foi obtido com o uso de cinco animais se ampliou na medida em que ampliou o número de animais utilizados. Contudo, não se percebeu uma diferenciação clara entre a utilização de três ou quatro animais, cujas probabilidades mostraram-se, em média, próximas entre si e iguais ou superiores a 0,9 (Figura 7). Desta forma, em ensaios conduzidos com o objetivo principal de se estimar o valor da taxa de degradação, a utilização do mínimo de três animais incorreria baixo risco de obtenção de valores extremos e demasiadamente afastados dos valores esperados. Esse comportamento corrobora as recomendações de Mehrez & Ørskov (1977; três animais), Ruiz & Ruiz (1992; três animais) e Åkerlind et al. (2011; três animais). Contudo, entende-se que as recomendações quanto ao número de animais realizadas por Tomich & Sampaio (2004; um animal), NRC (2001; dois animais) não se mostram adequadas para condições tropicais.

As recomendações aqui apresentadas, embora direcionadas a ensaios de degradação *in situ* constituídos por uma única bateria de incubação, podem ser estendidas a ensaios com arranjos distintos. Em função da necessidade de avaliação simultânea de grande número de alimentos, alguns autores têm utilizado delineamentos experimentais, especificamente quadrados latinos (Casali et al., 2008; Machado et al., 2013; Menezes et al., 2017), nos quais os alimentos são divididos em grupos em número igual ao número de animais e incubados de forma alternada entre os mesmos em períodos consecutivos. Nestes ensaios, apesar de haver o controle do efeito da variabilidade entre animais, o risco da influência de efeitos aleatórios discrepantes com o uso de baixo número de animais se mantém. Assim, também para este tipo de ensaio, a recomendação de utilização de, no mínimo, três animais parece pertinente.

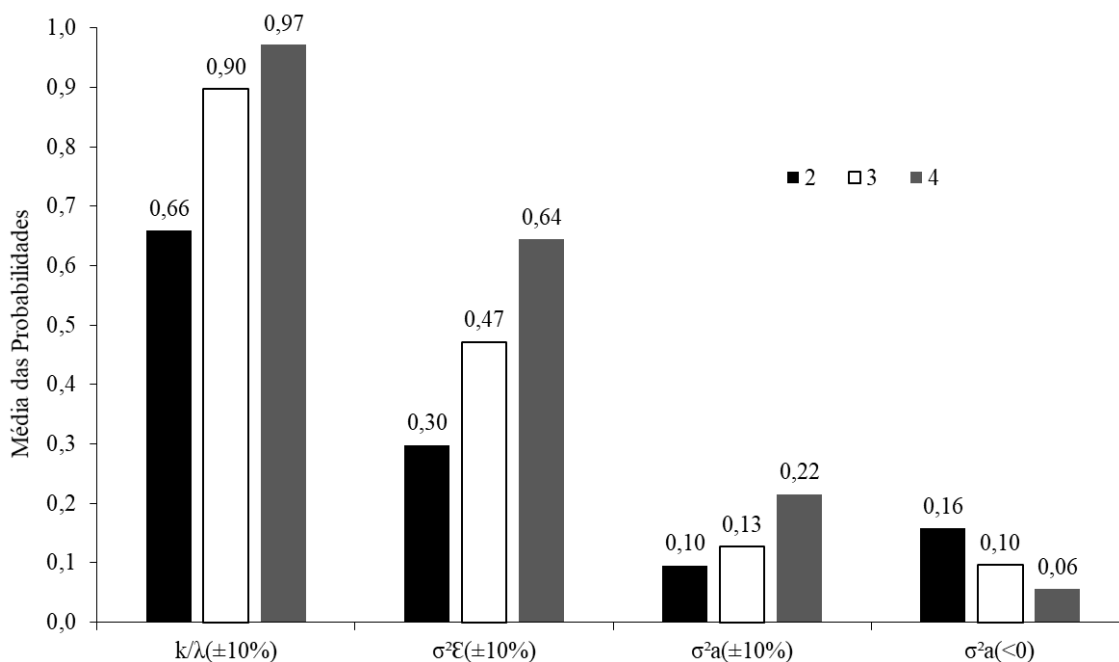


Figura 7 – Médias das probabilidades para obtenção de estimativas de taxa de degradação [$k/\lambda(\pm 10\%)$], variância do erro [$\sigma^2_{\epsilon}(\pm 10\%)$] e componente de variância associado ao efeito de animais sobre a taxa de degradação [$\sigma^2_a(\pm 10\%)$] maiores ou menores em 10% em relação ao obtido com a utilização de cinco animais e para obtenção de componentes de variância associado ao efeito de animais negativos [$\sigma^2_a(< 0)$] em função do número de animais utilizado.

Contudo, de forma diferente em relação ao comportamento para a taxa de degradação, as probabilidades médias relacionadas aos componentes de variância (Figura 7) não permitiram estabelecer um número mínimo de animais para utilização em ensaios de degradação. Para os três casos analisados, uma relação linear foi observada na medida em que o número de animais se elevou, ampliando-se a probabilidade de obtenção de

componentes de variância mais próximos ao obtido com cinco animais e reduzindo-se a probabilidade de obtenção de componente de variância negativo associado ao efeito de animais sobre a taxa de degradação. Assim, considerando-se ensaios nos quais comparações estatísticas entre alimentos consistirão do objetivo principal, a recomendação a ser retirada deste trabalho, embora não conclusiva, indica que o aumento do número de animais reduz a chance de obtenção de valores de componentes de variância extremos e que poderiam comprometer os processos comparativos.

Definição de esquema mínimo de tempos de incubação

Os esquemas mínimos de incubação obtidos para avaliação dos perfis de degradação da MS foram definidos, tanto para forragens como para concentrados, com nove tempos de incubação (Tabela 7). Ressalta-se que, dentro de cada tipo de alimento, houve convergência nos tempos utilizados para incubação, o que demonstra características de rusticidade das proposições a serem retiradas deste estudo. A utilização dos esquemas mínimos produziu estimativas dos parâmetros da cinética de degradação da MS similares ($P > 0,05$) aos obtidos com o conjunto total de pontos de incubação, sem afetar as estimativas de variância residual ($P > 0,11$; Tabela 8). Isto evidencia similaridade tanto em termos de exatidão, como de precisão.

Tabela 7 - Relação dos tempos selecionados para o estabelecimento de esquema de incubação reduzido para estudos de degradação *in situ* da matéria seca de forragens e concentrados

Alimento	Tempos de incubação (h) ¹																
	0	3	6	9	12	18	24	30	36	48	60	72	96	120	144	168	240
Forragens																	
Cana de açúcar	x	x	x	-	x	-	x	x	-	x	-	x	-	x	-	-	-
Silagem de milho	x	x	x	-	x	-	x	x	-	x	-	x	-	x	-	-	-
Feno de Tifton	x	x	x	-	x	-	x	x	-	x	-	x	-	x	-	-	-
Concentrados																	
Farelo de Soja	x	x	x	-	x	-	x	x	-	x	-	x	x	-	-	-	-
Milho grão	x	x	x	-	x	-	x	x	-	x	-	x	x	-	-	-	-
Casca de soja	x	x	x	-	x	-	x	x	-	x	-	x	x	-	-	-	-
Farelo de algodão	x	x	x	-	x	-	x	x	-	x	-	x	x	-	-	-	-

¹ (x), tempos selecionados; (-), tempos omitidos.

Tabela 8 – Estimativas dos parâmetros do perfil de degradação da matéria seca, proteína bruta e fibra em detergente neutro dos diferentes alimentos considerando-se os esquemas de incubação completo e reduzido

Alimento	Esquema Completo					Esquema Reduzido ¹					Valor P ²
	A	B	I	k/λ	σ ² _ε	A	B	I	k/λ	σ ² _ε	
Matéria Seca											
Cana de açúcar	48,53	26,09	-	0,0171	1,90	48,65	26,88	-	0,0159	2,48	0,151
Silagem de milho	47,34	39,19	-	0,0256	4,61	47,72	38,41	-	0,0258	5,60	0,224
Feno de Tifton	21,67	54,16	-	0,0266	8,74	22,35	54,18	-	0,0261	11,88	0,118
Farelo de Soja	32,05	69,12	-	0,0492	48,75	31,87	72,73	-	0,0442	42,17	0,690
Milho grão	28,45	71,21	-	0,0492	19,74	28,25	73,34	-	0,0461	23,32	0,263
Casca de soja	22,82	76,27	-	0,0280	27,11	23,42	78,57	-	0,0262	26,12	0,544
Farelo de algodão	33,48	53,94	-	0,0300	16,88	32,17	55,33	-	0,0308	15,15	0,642
Proteína Bruta											
Farelo de Soja	14,14	88,83	-	0,0418	88,28	17,15	87,16	-	0,0406	91,08	0,445
Milho grão	51,71	49,51	-	0,0342	25,71	52,65	50,60	-	0,0314	32,44	0,190
Casca de soja	58,59	37,45	-	0,0362	19,61	59,53	36,48	-	0,0357	24,24	0,212
Farelo de algodão	24,71	73,32	-	0,0794	32,73	25,04	73,79	-	0,0770	48,64	0,069
Fibra em Detergente Neutro ³											
Cana de açúcar	-	46,92	53,08	0,0438	8,47	-	47,78	52,22	0,0448	7,58	0,656
Silagem de milho	-	70,43	29,57	0,0523	18,46	-	70,22	29,78	0,0535	20,05	0,365
Feno de Tifton	-	66,52	33,48	0,0588	12,91	-	66,36	33,64	0,0615	16,59	0,159

¹ A, fração solúvel (g/100 g); B, fração insolúvel potencialmente degradável (g/100 g); k ou λ, parâmetros associados à taxa de degradação da fração insolúvel potencialmente degradável (h⁻¹); I, fração indegradável (g/100 g); σ²_ε, variância residual.

² Valor P referente à comparação entre variâncias residuais obtidas com os esquemas completo e reduzido.

³ Após o ajustamento, as estimativas das frações B e I foram ajustadas conforme recomendação de Waldo et al. (1972).

A definição de nove tempos de incubação converge ao que foi afirmado por Mertens (2005), o qual definiu que, para se garantir a estimabilidade do modelo, seriam necessários ao menos três tempos de incubação para cada um dos parâmetros da cinética de degradação. Os modelos utilizados para definição dos esquemas mínimos de incubação foram constituídos por apenas três parâmetros (B, k ou λ , e A ou I). Desta forma, alerta-se que, para o caso de o modelo ser composto por mais de três parâmetros associados à cinética de degradação, os esquemas aqui sugeridos poderão ou deverão ser acrescidos de mais tempos de incubação.

Os esquemas mínimos de incubação definido para MS foram igualmente efetivos para avaliação do perfil de degradação da PB de concentrados (Tabela 7). Desta forma, um único esquema de incubação pode ser utilizado para avaliação adequada do perfil de degradação da MS e da PB de alimentos concentrados.

Para o caso da avaliação da degradação da FDN de volumosos, a utilização dos esquemas mínimos definidos para MS produziram estimativas das frações B e I diferentes ($P < 0,05$) do que foi observado com o conjunto total de tempos de incubação, principalmente devido à superestimação da fração indegradável da FDN (dados não mostrados). Desta forma, optou-se pela manutenção do esquema mínimo definido para a MS com o acréscimo de um tempo adicional correspondente a período mais longo de incubação, de forma a permitir a correta estimação da fração indegradável da FDN. Optou-se por avaliar, entre os tempos longos, aquele que pudesse ser utilizado para todas as forragens avaliadas neste estudo, produzindo-se uma recomendação geral. Este tempo adicional foi estabelecido em 240 horas. Sua inclusão garantiu a similaridade das

estimativas dos parâmetros B, I e λ ($P>0,05$) e da variância residual ($P>0,15$) em relação à utilização do conjunto completo de pontos de incubação (Tabela 8).

A principal diferença entre os esquemas mínimos propostos neste estudo e aqueles ressaltados na literatura para condições não tropicais reside sobre a localização do último tempo a ser utilizado no esquema de incubação. Neste trabalho, foi apontado 96 e 120 horas para o estudo da degradação da MS de concentrados e volumosos, respectivamente (Tabela 7), e 240 horas para a FDN de forragens.

A proposta de padronização de estudos de degradação *in situ* da PB sugerida pelo NRC (2001) se baseia em esquemas de incubação com tempo máximo estabelecido em 48 e 72 para concentrados e forragens, respectivamente. Por outro lado, a proposta de padronização para avaliação *in situ* de componentes de rápida (e.g., PB) e lenta (e.g., FDN) degradação apresentada por Mertens (2005) se baseia em tempo máximo de incubação de 64 e 96 horas, respectivamente. Ambas as propostas não se mostram adequadas frente aos resultados obtidos neste estudo.

As observações (i.e., tempos de incubação) relativas ao final do processo de degradação são críticas para o adequado estabelecimento da extensão da degradação (Mertens, 2005). Neste sentido, o uso de tempos demasiadamente curtos pode levar à superestimação da fração indegradável e, conseqüentemente, subestimação da fração potencialmente degradável dos alimentos. É provável que alimentos produzidos em condições tropicais e não tropicais apresentem diferenças na dinâmica de degradação ruminal (Detmann et al., 2008a). Essa diferença parece justificar a necessidade de incubações mais longas para alimentos produzidos nos trópicos.

Recomendação para procedimentos de incubação in situ

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, uma proposta de padronização de procedimentos de incubação *in situ* para avaliação da dinâmica de degradação em condições tropicais foi apresentada (Tabela 9). Outros aspectos dos procedimentos, os quais não foram avaliados neste trabalho, foram baseados principalmente nas compilações de informações apresentadas por Nocek (1988), Michalet-Doreau & Ould-Bah (1992), Madsen & Hvelplund (1994), Vanzant et al. (1998), Hvelplund & Weisbjerg (2000), NRC (2001), Mertens (2005) e Åkerlind et al. (2011).

A proposição de composição de dieta se baseou no fornecimento de uma dieta equilibrada, com diversidade da composição de alimentos e sem restrições nutricionais que comprometam o crescimento microbiano (Tabela 9). Os animais devem ser adaptados à dieta basal por, no mínimo, 14 dias antes do início da incubação (Machado et al., 2016) para buscar alcançar uma condição de *steady state* no ambiente ruminal, necessária à adequada estimação dos parâmetros da cinética de degradação (Mertens, 2005).

A estrutura de dieta proposta visa agregar ao que tem sido recomendado em estudos recentes na tentativa de padronização de ensaios de digestão ruminal *in vitro* no Brasil (Silva et al., 2017; Camacho, 2017). Isto propiciaria maior padronização de métodos alternativos aos sistemas *in vivo* para avaliação de digestão no país. Contudo, variações podem ocorrer caso o ensaio de degradação seja direcionado a uma condição dietética específica. Nestes casos, faz-se necessário a devida justificação para esta alteração.

Tabela 9 - Procedimentos sugeridos para padronização de estudos de degradação *in situ*

Item	Recomendação
Dieta dos animais	
Composição	Relação volumoso:concentrado de 80:20, com base na MS, contendo de 100-120 g PB/kg MS. Reportar a composição.
Nível de alimentação	<i>Ad libitum</i> . Reportar os valores de consumo (g/kg PC) e as médias de pH e de concentração de NAR (mg/dL).
Frequência de alimentação	Ao menos duas vezes ao dia. Fornecer mistura mineral e água à vontade.
Alimento avaliado	
Composição química	Reportar, ao menos, as concentrações de MS, MO, PB e FDN, indicando os métodos laboratoriais utilizados.
Secagem	Para volumosos, secagem em estufa ventilada com temperatura de 55 a 60°C ou liofilização.
Processamento	Moagem em peneiras de porosidade 2 mm.
Sacos	
Material	Náilon.
Porosidade	40-60 μ .
Acondicionamento de amostra	20 mg MS/cm ² de superfície.
Procedimentos de incubação	
Número de animais	Mínimo de três
Número de sacos por tempo	Variável em função do resíduo necessário para análises químicas.
Posição dos sacos no rúmen	Ventral.
Inserção/remoção	Inserir os sacos gradualmente e retirá-los simultaneamente.
Tempo 0	Imergir os sacos no conteúdo ruminal tempo suficiente para hidratação e retirá-los.
Tempos de incubação	MS e PB para concentrados: 0, 3, 6, 12, 24, 30, 48, 72 e 96 horas. MS e PB para forragens: 0, 3, 6, 12, 24, 30, 48, 72 e 120 horas. FDN para forragens: idem MS e PB, acrescido de 240 horas.
Lavagem	Lavagem em água corrente para retirada do excesso de resíduos externos aos sacos, seguida de lavagens em lavadora tipo “tanquinho” (5 lavagens sequenciais de 1 minuto).
Correção para contaminação microbiana	Necessária para avaliação da degradação da PB de forragens. Utilizar equação proposta por Machado et al. (2013). Não é necessária para avaliação da degradação da PB de concentrados.
Estrutura do modelo matemático	Utilizar modelo adequado ao comportamento exibido pelos resíduos de incubação. Parâmetros sugeridos para MS e PB: frações A e B e taxa de degradação. Estudo do perfil baseado na fração degradada. Parâmetros sugeridos para FDN: frações B e I e taxa de degradação. Estudo do perfil baseado na fração não degradada.
Método de ajustamento	Modelo fixo. Ajustar modelo misto com a consideração da variação aleatória entre animais sobre a taxa de degradação caso o estudo esteja atrelado a um delineamento experimental.

Recomendações quanto ao nível de alimentação dos animais utilizados na incubação são variáveis na literatura, na qual indica-se alimentação em nível de manutenção (Vanzant et al., 1998), restrita acima da manutenção (Hvelpund & Weisbjerg, 2000) ou *ad libitum* (Nocek, 1988). Vanzant et al. (1998) indicaram que as influências do nível de alimentação sobre os resultados de estudos *in situ* não são tão claras. Desta forma, a proposição de alimentação *ad libitum* aqui apresentada se baseia no fato de isto permitir o fornecimento contínuo de novos substratos e garantir a continuidade do crescimento microbiano. O uso de alimentação *ad libitum* também agrega a estudos recentes de degradação *in situ* em bovinos conduzidos em condições tropicais (Machado et al., 2013; Menezes et al., 2017).

A recomendação do tecido náilon com porosidade de 40-60 μm agrega às recomendações internacionais de uma forma em geral (Nocek, 1988; Michalet-Doureau & Ould-Bah, 1992; Vanzant et al., 1998; NRC, 2001). Ressalta-se que tecidos como o tecido não-tecido, 100 g/m²) e o F57 (Ankom), embora recomendados para avaliação de compostos indigestíveis (e.g., FDN indigestível) em procedimento de incubação única, não devem ser utilizados para avaliação de perfis de degradação. Esses tecidos apresentam menor taxa de troca entre os meios interno e externo aos sacos e tendem a subestimar a taxa de degradação (Valente et al., 2011).

A moagem das amostras tem o propósito de criar uniformidade no substrato e o aumento no tamanho de partículas tende a ampliar a variabilidade dos resultados. Em termos gerais, a definição por tamanho de partículas é preferível em relação a uma abertura de peneira, mas, na prática, isto é difícil de ser operacionalizado (Michalet-Doureau & Ould-Bah, 1992). Em compilação de dados da literatura Michalet-Doureau & Ould-Bah (1992) recomendaram tamanho de partículas no intervalo de 1,5 a 3,0 mm. Vanzant et al.

(1998), também em compilação de literatura, encontraram o valor modal de 2,0 mm, o qual constituiu sua recomendação para procedimentos *in situ*, sendo esta foi adotada pelo NRC (2001). Esta foi a base da recomendação apresentada neste estudo (Tabela 9).

Os procedimentos de lavagem dos sacos se faz necessário para retirada de resíduos oriundos do ambiente ruminal. Contudo, como alertado por Madsen & Hvelpund (1994), a padronização dos procedimentos de lavagem só seria possível com o uso de máquinas de lavar. Vanzant et al. (1998) afirmaram que a remoção de fluido ruminal contaminante segue um modelo de difusão simples. Assim, sua remoção estaria mais relacionada ao número de lavagens e ao volume de água utilizado do que ao tempo dispendido em cada lavagem. Contudo, o tempo de exposição e a força dispendidas na manipulação física dos sacos pode ter implicação sobre a perda de pequenas partículas. Estes autores recomendaram, com base em dados da literatura, o procedimento de lavagem adotado e sugerido neste trabalho (Tabela 9). A sugestão de uso de lavadora tipo “tanquinho” se deve à busca por padronização entre procedimentos e ao baixo custo e fácil acesso a este tipo de equipamento.

A disposição dos sacos em ordem reversa em relação aos tempos de incubação, com retirada simultânea está associada à recomendação acima, uma vez que todos os sacos seriam submetidos ao mesmo procedimento de lavagem, o que contribuiria para padronização e aumento da precisão das avaliações.

A despeito da não avaliação do perfil de degradação da PB de forragens neste trabalho, optou-se por se realizar recomendação para este tipo de avaliação considerando-se o mesmo esquema de incubação obtido para o estudo da degradação da MS (Tabela 9).

Justifica-se tal recomendação com base na similaridade dos esquemas para avaliação da degradação da MS e PB em alimentos concentrados.

Para estudos da degradação da PB em alimentos volumosos, faz-se necessária a correção quanto à contaminação microbiana, para a qual recomenda-se a utilização das equações propostas por Machado et al. (2013). A contaminação por compostos nitrogenados microbianos não é considerada significativa no estudo da degradação da PB de alimentos concentrados (Menezes et al., 2017), não sendo, portanto, necessária.

Conclusão

O uso de modelos mistos nos quais se considera a influência aleatória de animais sobre a taxa de degradação amplia a precisão das estimativas de degradação de forragens e concentrados. Contudo, não são observados incrementos sobre a exatidão. O mínimo de três animais é recomendado para estudos de degradação ruminal *in situ* com bovinos.

Propostas de esquemas mínimos relacionados a número e disposição dos tempos de incubação para avaliação da dinâmica de degradação ruminal de alimentos produzidos em condições tropicais em bovinos são apresentadas.

Uma proposta de padronização de procedimentos para ensaios de incubação ruminal *in situ* para bovinos foi apresentada com base nos resultados obtidos neste trabalho em na compilação de informações da literatura.

Referências Bibliográficas

- AGGREY, S.E. Logistic nonlinear mixed effects model for estimating growth parameters. **Poultry Science**, v.88, p.276-280, 2009.
- ÅKERLIND, M.; WEISBJERG, M.; ERIKSSON, T.; TØGERSEN, R.; UDÉN, P.; ÓLAFSSON, B.L.; HARSTAD, O.M.; VOLDEN, H. Feed analyses and digestion methods. In: VOLDEN, H. (Ed.) **NorFor – The Nordic feed evaluation system**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2011. p.41-54.
- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL - AFRC. **Energy and protein requirements of ruminants**. Wallingford: CAB International, 1993. 159p.
- AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v.19, p.716-723, 1974.
- BEAL, S.L.; SHEINER, L.B. Estimating population kinetics. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**, v.8, p.195-222, 1982.
- BENTO, C.P.B.; AZEVEDO, A.C.; GOMES, D.I.; BATISTA, E.D.; RUFINO, L.M.A.; DETMANN, E.; MANTOVANI, H.C. Effect of protein supplementation on ruminal parameters and microbial community fingerprint of Nellore steers fed tropical forages. **Animal**, v.10, p.44-54, 2016.
- BRUTTEL, P.; SCHLINK, R. **Water determination by Karl Fischer titration**. Herisau: Metrohm, 2006. 80p.
- CAMACHO, L.F. **Estudos de métodos para avaliação da digestibilidade *in vitro* de alimentos para ruminantes**. 53f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Viçosa, 2016.
- CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PEREIRA, J.C.; HENRIQUES, L.T.; FREITAS, S.G.; PAULINO, M.F. Influence of incubation time and particles size on indigestible compounds contents in cattle feeds and feces obtained by *in situ* procedures. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.335-342, 2008.
- CASELLA, G.; BERGER, R.L. **Inferência estatística**. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 612p.
- DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S.; HENRIQUES, L.T.; PAULINO, M.F.; MAGALHAES, K.A.; SILVA, P.A.; CHIZZOTTI, M.L. Prediction of the energy on the chemical composition of the feeds under tropical conditions. **Animal Feed Science and Technology**, v.143, p.127-147, 2008a.

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Avaliação de alimentos ou dietas? Uma abordagem conceitual. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 6, 2008, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Departamento de Zootecnia/UFV, 2008b, p.21-52.

DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; CABRAL, L.S.; PINA, D.S.; LADEIRA, M.M.; AZEVEDO, J.A.G. **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora, 2012. 214p.

DETMANN, E.; FRANCO, M.O.; BATISTA, E.D.; REIS, W.L.S.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F. Cinética de digestão e passagem da fibra em ruminantes e sua otimização por meio de estratégias nutricionais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO RÚMEN, 1, 2015, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: UFMT, 2015. (CD-ROM).

HARMON, D.L.; RICHARDS, C.J. Considerations for gastrointestinal cannulation in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2248-2255, 1997.

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

HUHTANEN, P.; NOUSIAINEN, J.; RINNE, M. Recent developments in forage evaluation with special reference to practical applications. **Agricultural and Food Science**, v.15, p.223-293, 2006.

HVELPLUND, T.; WEISBJERG, M.R. *In situ* techniques for the estimation of protein degradability and postrumen. In: GIVENS, D.I.; OWEN, E.; OMED, H.M.; AXFORD, R.F.E. (Eds.) **Forage evaluation in ruminant nutrition**. Wallingford: CABI Publishing, 2000. p.233-257.

JAMI, E.; MIZRAHI, I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. **PLoS One**, v.7, e33306, 2012.

KAPS, M.; LAMBERSON, W.R. **Biostatistics for animal science**. New York: CABI Publishing, 2004. 308p.

LENG, R.A. Factors affecting the utilization of 'poor-quality' forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Review**, v.3, p.277-303, 1990.

LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W.; WOLFINGER, R.D.; SCHABENBERGER, O. **SAS for mixed models**. 2.ed. Cary: SAS Institute Inc., 2006. 814p.

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

- MACHADO, M.G.; DETMANN, E.; MANTOVANI, H.C.; VALADARES FILHO, S.C.; BENTO, C.B.P.; MARCONDES, M.I.; ASSUNÇÃO, A.S. Evaluation of the length of adaptation period for changeover and crossover nutritional experiments with cattle fed tropical forage-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.222, p.132-148, 2016.
- MADSEN, J.; HVELPLUND, T. Prediction of *in situ* protein degradability in the rumen. Results of a European ringtest. **Livestock Production Science**, v.39, p.201-212, 1994.
- MEHREZ, A.Z.; ØRSKOV, E.R. A study of artificial fibre bag technique for determining the dig estibility of feeds in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, v.88, p.645-650, 1977.
- MENEZES, A.C.B.; VALADARES FILHO, S.C.; ROTTA, P.P.; SANTOS, S.A.; PACHECO, M.V.C.; SILVA, B.C.; PUCETTI, P.; ALHADAS, H.M.; DETMANN, E.; CATON, J.S. Does microbial nitrogen contamination affect the estimation of crude protein degradability of concentrate feeds? **Journal of Animal Science**, 2017 (no prelo).
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1239, 2002.
- MERTENS, D.R. Rate and extent of digestion. In: DIJKSTRA, J.; FORBES, J.M.; FRANCE, J. (Eds.) **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. 2 ed. Wallingford: CABI Publishing, 2005. p.13-47.
- MICHALET-DOREAU, B.; OULD-BAH, M.Y. *In vitro* and *in sacco* methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.40, p.57-86, 1992.
- NOCEK, E.J. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2051-2069, 1988.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**, 7.ed. Washington, DC: Academy Press, 2001. 381p.
- ØRSKOV, E.R.; McDONALD, I. The estimation of degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p.499-503, 1979.
- REIS, W.L.S.; DETMANN, E.; BATISTA, E.D.; RUFINO, L.M.A.; GOMES, D.I.; BENTO, C.B.P.; MANTOVANI, H.C.; VALADARES FILHO, S.C. Effects of ruminal and post-ruminal protein supplementation in cattle fed tropical forages on insoluble fiber degradation, activity of fibrolytic enzymes, and the ruminal microbial community profile. **Animal Feed Science and Technology**, v.218, p.1-16, 2016.
- RUIZ, M.E.; RUIZ, S.E. **Ruminant nutrition research: methodological guidelines**. San Jose: Inter American Institute for Cooperation on Agriculture, Latin American Network for Animal Production Systems Research, 1992. 354p.

- SAMPAIO, C.B.; GOMES, D.I.; REGADAS FILHO, J.G.L.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. Variations among animals when estimating the undegradable fraction of fiber in forage samples. **Semina: Ciências Agrárias**, v.5, p.2739-27448, 2014.
- SEIFRIED, N.; STEINGAß, H.; RODEHUTSCORD, M. *In vitro* and *in situ* evaluation of secondary starch particle losses from nylon bags during the incubation of different cereal grains. **Animal Feed Science and Technology**, v.210, p.26-36, 2015.
- SIEGFRIED, B.; RUCKERMANN, B.; STUMPF, R.H. Method for determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. **Landwirtschaftliche Forschung**, v.37, p.298-304, 1984.
- SILVA, T.E.; DETMANN, E.; CAMACHO, L.F.; SALIBA, E.O.S.; PALMA, M.N.N.; VALADARES FILHO, S.C. Comparação de métodos *in vitro* para a quantificação da digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro de forragens e concentrados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2017 (no prelo).
- TAJIMA, K.; AMINOV, R.I.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; BENNO, Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2766-2774, 2001.
- TOMIC, T.R.; SAMPAIO, I.B.M. A new strategy for the determination of forage degradability with an *in situ* technique through the use of one fistulated ruminant. **Journal of Agricultural Science**, v.142, p.589-593, 2004.
- TRUJILLO, A.I.; MARICHAL, M.J.; CARRIQUIRY, M. Comparison of dry matter and neutral detergent fibre degradation of fibrous feedstuffs as determined with *in situ* and *in vitro* gravimetric procedures. **Animal Feed Science and Technology**, v.161, p.49-57, 2010.
- VALADARES FILHO, S.C.; COSTA E SILVA, L.F.; GIONBELLI, M.P.; ROTTA, P.P.; MARCONDES, M.I.; CHIZZOTTI, M.L.; PRADOS, L.F. (Eds.) **Exigências Nutricionais de zebuínos puros e cruzados BR-CORTE**. 3 ed. Viçosa: Suprema Gráfica, 2016. 327p.
- VALENTE, T.N.P.; DETMANN, E.; QUEIROZ, A.C.; VALADARES FILHO, S.C.; GOMES, D.I.; FIGUEIRAS, J.F. Evaluation of ruminal degradation profiles of forages using bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.2565-2573, 2011.
- Van MILGEN, J.; MURPHY, M.R.; BERGER, L.L. A compartmental model to analyze ruminal digestion. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.2515-2529, 1991.
- VANZANT, E.S.; COCHRAN, R.C.; TITGEMEYER, EC. Standardization of *in situ* techniques for ruminant feedstuff evaluation. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2717-2729, 1998.
- WALDO, D.R.; SMITH, L.W.; COX, E.L. Model of cellulose disappearance from the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.55, p.125-129, 1972.
- WANG, Z.; ZUIDHOF, M.J. Estimation of growth parameters using a nonlinear mixed Gompertz model. **Poultry Science**, v.83, p.847-852, 2004.

WARNER, R.G.; FLATT, W.P.; LOOSLI, J.K. Ruminant nutrition, dietary factors influencing development of ruminant stomach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.9, p.788-792, 1956.

WEIMER, P.J.; STEVENSON, D.M.; MANTOVANI, H.C.; MAN, S.L.C. Host specificity of the animal of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near total exchange of ruminal contents. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.5902-5912, 2010.

WINDHAM, W.R. Animal feed. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC (Ed.) **Official Methods of Analysis of AOAC International**. v.1. 16 ed. 4 rev. Gaithersburg: AOAC International, 1998. Paginação descontínua.

ZANTON, G.I.; HEINRICHS, A.J. Evaluation of modeling procedure for fitting *in situ* feed degradation profiles. **Journal of Animal Science**, v.87, p.2080-2088, 2009.