

ANDRÉ OLIVEIRA CASALI

**PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS *IN SITU* NA AVALIAÇÃO DO TEOR DE  
COMPOSTOS INDIGESTÍVEIS EM ALIMENTOS E FEZES DE 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  
2006

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

T

C334p  
2006

Casali, André Oliveira, 1982-

Procedimentos metodológicos *in situ* na avaliação do teor de compostos indigestíveis em alimentos e fezes de bovinos / André Oliveira Casali. – Viçosa : UFV, 2006. ix, 47f. : il. ; 29cm.

Orientador: Edenio Detmann.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Bovino - Nutrição. 2. Fibras na nutrição animal.  
3. Ruminante - Alimentação e rações. 4. Rúmen.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.2085

ANDRÉ OLIVEIRA CASALI

**PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS *IN SITU* NA AVALIAÇÃO DO TEOR DE  
COMPOSTOS INDIGESTÍVEIS EM ALIMENTOS E FEZES DE 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 : 19 de dezembro de 2006.

---

Prof. Sebastião de C. Valadares Filho  
(Co-Orientador)

---

Prof. José Carlos Pereira  
(Co-Orientador)

---

Prof. Mário Fonseca Paulino

---

Dr<sup>a</sup>. Lara Toledo Henriques

---

Prof. Edenio Detmann  
(Orientador)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial aos meus pais Vicente e Jesuína, meus irmãos Cristiano, Alice, Celina e Cássio, aos meus sobrinhos Gabriel e Pedro e a minha namorada Larissa pelo incentivo recebido.

## **AGRADECIMENTO**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Zootecnia, pelo apoio e incentivo para obtenção desse objetivo; em especial ao Professor Edenio Detmann pela orientação recebida, pelo incentivo e conhecimentos transmitidos durante esses anos de convivência.

À Professora Maura da Cunha e à Kelly da Silva C. Detmann, pela colaboração para a execução das microfotografias eletrônicas.

## **BIOGRAFIA**

André Oliveira Casali, filho de Vicente Wagner Dias Casali e Jesuína Aparecida Valporto Oliveira Casali, nasceu em Ponte Nova, Minas Gerais, em 24 de abril de 1982.

Em março de 2001, ingressou na Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, no curso de Zootecnia, colando grau em 26 de fevereiro de 2005.

Entre fevereiro de 2005 e dezembro de 2006 realizou treinamento de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, desenvolvendo estudos na área de Nutrição de Ruminantes.

## SUMÁRIO

	Página
Resumo	vi
Abstract	viii
Introdução Geral.....	01
Referências Bibliográficas.....	08
Capítulo 1 - Estimação <i>In Situ</i> dos Teores de Fibra em Detergente Neutro Indigestível em Alimentos para Ruminantes em Sacos de Diferentes Tecidos	
Resumo.....	11
Abstract.....	12
Introdução.....	12
Material e Métodos.....	14
Resultados e Discussão.....	17
Conclusões.....	26
Literatura Citada.....	26
Capítulo 2 - Influência do Tempo de Incubação e Estrutura de Partículas sobre os Teores de Compostos Indigestíveis em Alimentos e Fezes Bovinas Obtidos por Procedimento <i>In Situ</i>	
Resumo.....	28
Abstract.....	29
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	31
Resultados e Discussão.....	36
Conclusões.....	44
Literatura Citada.....	44
Conclusões Gerais	47

## RESUMO

CASALI, André Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2006  
**Procedimentos metodológicos *in situ* na avaliação do teor de compostos indigestíveis em alimentos e fezes de bovinos.** Orientador: Edenio Detmann. Co-Orientadores: Sebastião de Campos Valadares Filho e José Carlos Pereira.

A presente dissertação foi elaborada com base em dois experimentos relacionados à avaliação dos teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas. No primeiro experimento, objetivou-se avaliar os teores de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) obtidos por procedimento *in situ* e a perda de partículas fibrosas em meio aquoso de alguns alimentos para ruminantes por intermédio de sacos de diferentes tecidos. Avaliou-se, concomitantemente a estrutura física dos tecidos utilizados. Os alimentos avaliados foram: farelo de trigo (FT), casca de soja (CS), silagem de milho (SM) e feno de capim-braquiária (FB). Foram avaliados os tecidos: nylon (50 µm); F57 (Ankon®); e tecido não-tecido (TNT – 100 g/m<sup>2</sup>). Os alimentos foram moídos (1 mm) e acondicionados em sacos de dimensão de 4 x 5 cm (6 amostras/tecido), obedecendo-se à relação de 20 mg de matéria seca/cm<sup>2</sup> quadrado de superfície. Os sacos foram incubados por 144 horas no rúmen de uma vaca alimentada com dieta mista (30% de concentrado). Posteriormente, os sacos foram retirados, lavados em água corrente até o total clareamento, e tratados com detergente neutro, sendo o resíduo considerado como FDNi. Verificou-se similaridade entre os teores de FDNi obtidos com TNT e F57 (P>0,05), sendo estes superiores aos obtidos com nylon (P<0,05) para os alimentos FT, CS e SM. Para FB, os teores diferiram entre todos os tecidos (P<0,05), sendo os maiores valores observados para F57, os menores para o nylon, tendo o TNT apresentado posição intermediária. A perda de partículas fibrosas em meio aquoso foi avaliada por intermédio da lavagem dos sacos contendo os alimentos em água (39°C) (10 amostras/tecido). Verificou-se perda de partículas (P<0,05) quando empregado o nylon como ambiente para avaliação das amostras, corroborando os menores teores de FDNi obtidos com este tecido. Observou-se, por intermédio de microscopia eletrônica de varredura, que a perda de partículas para o nylon deve ser atribuída à estrutura do tecido e não a possíveis danos causados durante os processos de incubação e extração com detergente. No segundo experimento, objetivou-se avaliar a influência do tempo de incubação *in situ* e da estrutura de partículas sobre as estimativas das

frações indigestíveis da matéria seca (MSi), da fibra em detergente neutro (FDNi) e da fibra em detergente ácido (FDAi). Avaliaram-se amostras de: fubá de milho, casca de soja, farelo de trigo, farelo de soja, farelo de algodão, silagem de milho, capim-elefante, cana-de-açúcar, feno de capim-braquiária, palha de milho, fezes de bovinos alimentados com alto ou baixo nível de concentrados na dieta. As amostras foram processadas em moinho com peneiras de porosidade 1, 2 ou 3 mm, sendo acondicionadas (20mg de matéria seca/cm<sup>2</sup> de superfície) em sacos de tecido não-tecido (100g/m<sup>2</sup>) de dimensão 4 x 5 cm. Os materiais foram divididos em três grupos, sendo cada grupo incubado no rúmen de 3 novilhas mestiças (Holandês x Zebu). O procedimento de incubação foi repetido por três vezes, sendo que, a cada período procedeu-se à incubação dos grupos em animais distintos. Foram utilizados os tempos: 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 e 312 horas. Os teores de MSi, FDNi e FDAi foram avaliados seqüencialmente, sendo os perfis de degradação interpretados por intermédio de modelo logístico não-linear. Verificou-se ausência de efeito do tamanho de partícula sobre as estimativas de MSi, FDNi e FDAi ( $P>0,10$ ). Em relação aos efeitos dos tamanhos de partículas sobre a velocidade de degradação, verificaram-se efeitos significativos ( $P<0,10$ ) para a silagem de milho e fubá de milho no tocante à MS; cana-de-açúcar, silagem de milho e palha de milho para a FDN; e cana-de-açúcar para a FDA. Para estas amostras, o tamanho de partícula associou-se positivamente ao tempo necessário para se estimar a fração indigestível. Tempos de incubação de 240 horas para MS e FDN e de 264 horas para FDA são recomendados para que se obtenham estimativas exatas das frações indigestíveis. O uso de partículas com 2 mm é recomendado em função da maior precisão das estimativas.

## ABSTRACT

CASALI, André Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2006.  
**Methodological procedures for *in situ* evaluation of indigestible compounds contents in cattle feeds and feces.** Adviser: Edenio Detmann. Co-Advisers: Sebastião de Campos Valadares Filho and José Carlos Pereira.

This dissertation was elaborated based on two experiments related to evaluation of indigestible compounds in cattle feeds and feces. In the first experiment, the aim was to evaluate the contents of *in situ* indigestible neutral detergent fiber (iNDF) and the fibrous particles lost in aqueous environment in some ruminant feeds by using bags made with different textiles. The physical structure of the textiles was too evaluated. Samples of wheat bran (WB), soybean hulls (SH), corn silage (CS), and signal grass hay (SGH) were used. The bags for rumen incubation were made with nylon (50  $\mu\text{m}$ ); F57 (Ankon®); e non-woven textile (NWT – 100  $\text{g}/\text{m}^2$ ). The feed samples were ground (1 mm) and put in the bags (4 x 5 cm) (6 bags/textile), according to relationship 20 mg of dry matter/ $\text{cm}^2$  of surface. The bags were incubated in the rumen of a cow fed with a mixed diet (30% of concentrate) during 144 hours. After that, the bags were cleaning with tap water and treated with neutral detergent. The residue was assumed as iNDF. The iNDF contents in WB, SH and CS were similar for F57 and NWT ( $P>.05$ ), being the results lower when nylon was used ( $P<.05$ ). For the SGH samples all textiles produced different results ( $P<.05$ ) being the lower contents obtained with nylon. The fibrous particles lost in aqueous environment was evaluated by cleaning the bags in warm tap water (39°C) (10 bags/textile). The particles lost was significant for nylon ( $P<.05$ ). This lost could be considered the cause of lower iNDF contents obtained by using nylon textile, once the microscopic evaluation did not show that rupture of textile occurred during incubation or neutral detergent extraction. In the second experiment, it were evaluated the effects of *in situ* incubation time and structure of particles on the estimates of indigestible fractions of dry matter (iDM), neutral detergent fiber (iNDF), and acid detergent fiber (iADF). Samples of corn grain, wheat bran, corn silage, elephant grass, sugarcane, signal grass hay, corn straw, and feces obtained from cattle fed high and low concentrate diets were used. The samples were ground through 1 mm, 2 mm, and 3 mm screen sieve and put in 4 x 5 cm non-

woven textile bags (20 mg of dry matter/cm<sup>2</sup> of surface). The samples were divided in three groups, being each group incubated in the rumen of a crossbred heifer. The incubation procedure was conducted three times with the change of groups among animals. It were used the following incubation times: 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, and 312 hours. The contents of iDM, iNDF, and iADF were evaluated sequentially in each bag. The degradation profiles were interpreted by a non-linear logistic model. The size of particles did not influence the estimates of iDM, iNDF, and iADF ( $P>.10$ ). On the other hand, the particles size has altered ( $P<.10$ ) the rumen degradation dynamic rates of DM for corn silage and corn grain; of NDF for sugarcane, corn silage, and corn straw; and ADF for sugarcane. For those samples, the particle size has been positively associated with the incubation time necessary to estimate de indigestible fraction. Incubation times of 240 hours for DM and NDF, and 264 hours for ADF were suggested for obtaining accurate estimates of indigestible fractions. The use of 2 mm particle size can increase the precision of estimates.

## **Introdução Geral**

Grande parte das linhas de pesquisa na área de nutrição de ruminantes centram-se sobre a busca de alternativas para avaliar o valor nutricional de alimentos e/ou dietas, visando a obtenção de estimativas exatas e precisas da disponibilidade de nutrientes e atributos nutricionais, associando-se redução de custos e de labor aos procedimentos experimentais.

A digestibilidade é reconhecidamente um dos principais parâmetros do valor nutritivo. Por definição nutricional, a digestibilidade aparente de um alimento ou dieta compreende a fração ingerida que é aparentemente absorvida durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Contudo, em contexto prático, a estimação de parâmetros de digestibilidade dietética tem como ponto inicial a obtenção de seu complemento, ou seja, a indigestibilidade, porção ingerida não aproveitada durante a passagem pelo trato gastrointestinal (Detmann et al., 2004), naturalmente representada pelas fezes excretadas pelo animal.

Todavia, a obtenção de estimativas de excreção fecal via coleta total de fezes, notadamente em bovinos, constitui processo dispendioso, requerendo controle rigoroso da ingestão e excreção diárias, carecendo, ainda, de adaptação dos animais às gaiolas e às bolsas coletoras, causando desconforto e interferência no comportamento, tornando-se inviável em algumas situações, como por exemplo, em ensaios de pastejo (France et al., 1988; Moore & Sollemberger, 1997).

Alternativamente, têm-se proposto métodos indiretos para estimação de parâmetros de digestibilidade e excreção fecal, destacando-se entre esses o método dos indicadores, o qual apresenta vantagens sobre a coleta total de fezes, a exemplo da simplicidade e conveniência de utilização, podendo proporcionar informações adicionais, incluindo-se a quantidade ingerida de alimentos ou nutrientes específicos, a taxa de passagem da digesta por diferentes segmentos do trato gastrointestinal e a digestibilidade total ou parcial do alimento, dieta ou nutriente específico (Berchielli et al., 2000).

Um indicador consiste de substância ou composto empregado para monitorar aspectos físicos ou químicos da digestão. Este pode ser de natureza externa (exótico aos componentes da dieta), ou interna (constituente dos alimentos) (Detmann et al., 2004). As bases para sua aplicação residem sobre o fato de que, à medida que o alimento transita pelo trato gastrointestinal, a concentração do indicador aumenta progressivamente em função da remoção de componentes da digesta por digestão e absorção (Astigarraga, 1997).

Contudo, para que um indicador seja considerado ideal, este não deve ser absorvido, ou deve ter digestibilidade constante e conhecida; não deve afetar ou ser afetado pelo trato gastrointestinal ou sua população microbiana; deve fluir paralelamente ou ser fisicamente similar ou se associar intimamente com o material a ser avaliado; e deve possuir um método de quantificação rápido e preciso. Nenhum indicador preenche todos estes requisitos, aceitando-se que o grau de tolerância do erro possa diferir de acordo com a variável a ser mensurada (Owens & Hanson, 1992).

Dentre os indicadores externos, diferentes elementos, na forma de sais ou óxidos, são empregados. Contudo, o cromo em sua valência 3+, na forma de óxido crômico ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ), é, sem dúvida, o indicador mais amplamente utilizado na obtenção indireta de estimativas dos parâmetros da digestão, principalmente por apresentar as vantagens de ser facilmente incorporado à dieta, ser analisado com relativa facilidade e apresentar baixo custo (Detmann et al., 2004). No entanto, vários problemas têm sido relatados na literatura com relação ao uso do óxido crômico, como incompleta mixagem com a digesta ruminal (Coelho da Silva et al., 1968), passagem mais rápida pelo rúmen que o material fibroso (Van Soest, 1994) e possibilidade de acúmulo em alguma parte do trato digestivo, com posterior excreção, gerando concentrações médias superestimadas na digesta ou fezes (Schneider & Flatt, 1975, citados por Pereira et al., 1983).

Em contrapartida aos indicadores externos, os indicadores internos apresentam naturalmente algumas das principais características dos indicadores ideais; entre essas a ausência de influência negativa sobre os sistemas digestivos animal e microbiano, uma vez que são constituintes naturais dos alimentos.

Entre os indicadores internos utilizados em ensaios com ruminantes, destacam-se alguns componentes da fração fibrosa dos alimentos, como as frações químicas fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e fibra em detergente ácido indigestível (FDAi) (Penning & Johnson, 1983; Cochran et al., 1986; Lippke et al., 1986; Krysl et

al., 1988; e Resende et al., 1996) e a fração física matéria seca indigestível (MSi) (Huhtanen et al., 1994; Detmann et al., 2001).

Estes indicadores podem ser utilizados tanto na estimação da produção fecal, como na obtenção de estimativas dos coeficientes de digestibilidade e ingestão de alimentos (Penning & Johnson 1983; Lippke et al., 1986; Resende et al., 1996; Ferret et al. 1999; e Berchielli et al., 2000).

Detmann et al. (2001), ao avaliarem os indicadores internos FDAi, FDNi e MSi na estimação do consumo por bovinos em pastejo, verificaram que a FDNi e a MSi produziram as melhores alternativas para a avaliação indireta da digestibilidade da dieta e do consumo de matéria seca, enquanto os valores obtidos pela FDAi apresentaram comportamento variável e superior aos valores obtidos com FDNi e MSi.

De outra forma, Piaggio et al. (1991) relataram problemas com o uso da FDAi, obtida após incubação *in situ* como indicador interno. No entanto, Ítavo (2001) estimou a digestibilidade aparente de gramíneas através de indicadores internos FDNi e FDAi e verificou diferenças significativas entre os indicadores para dietas à base de feno de capim Tifton 85, relatando maior precisão para FDAi.

Berchielli et al. (2000) afirmaram que a FDNi e FDAi apresentaram resultados semelhantes aos da coleta total de fezes ao conduzirem ensaio de digestão com bovinos. Porém, Huhtanen et al. (1994) ao avaliarem a utilização dos indicadores internos MSi, FDNi e FDAi na predição da digestibilidade total de seis diferentes dietas em bovinos evidenciaram que nenhum dos indicadores apresentou resultados considerados plenamente satisfatórios.

Freitas et al. (2002) compararam os indicadores internos FDNi e FDAi obtidos após 144 horas de incubação *in vitro* e *in situ* para estimar a produção fecal e o fluxo duodenal de matéria seca (MS) em novilhos confinados. Os valores estimados de produção fecal, quando associados aos dados de digestibilidade para estimação do consumo e sua comparação com o valor obtido por pesagem direta do total de fezes excretado, permitiram inferir que o indicador mais adequado foi a FDAi.

Detmann et al. (2007), objetivando avaliar a recuperação dos indicadores internos MSi, FDNi e FDAi em ensaio de digestão com ovinos observaram vícios associados a todos os indicadores; contudo, esses somente mostraram-se significativos para a FDAi, o que foi atribuído à menor concentração relativa deste indicador em alimentos e fezes. Ao dissertarem sobre este comportamento, os autores afirmaram que parte dos resultados insatisfatórios quanto à recuperação de indicadores internos

poderiam ser atribuídos a diferenças na estrutura das partículas de alimentos e fezes. Isto poderia conduzir a resultados divergentes quanto ao consumo e excreção dos indicadores caso os métodos de estimação de concentração sejam aplicados de forma inadequada.

As concentrações dos indicadores internos supracitados em amostras de alimentos e fezes podem ser obtidas por procedimentos *in situ* (Ítavo, 2001; Freitas et al., 2002; e Albertini et al., 2005) ou *in vitro* (Lippke et al., 1986; Berchielli et al., 2000; e Freitas et al., 2002). Nestes procedimentos, a fibra excretada nas fezes não representa por si a fração indigestível, fazendo-se necessária a incubação conjunta de amostras fecais, uma vez que qualquer fator que reduza o tempo de exposição ou atividade dos microrganismos fibrolíticos conduz à perda de parede celular potencialmente degradável nas fezes (Minson, 1990).

Segundo Freitas et al. (2002), incubações *in vitro* apresentam como inconveniente o fato de partículas permanecerem aderidas à parede e à tampa do tubo, devido à agitação, ao invés de estarem em contato com o inóculo ruminal. Isso acarretaria aumento do resíduo pós-incubação e superestimaria a quantidade do indicador presente nas amostras.

Este relato concorda com os resultados obtidos por Huhtanen et al. (1994), que relataram que a digestibilidade da matéria seca foi mais acuradamente predita por intermédio de resíduos indigestíveis da fibra obtidos por procedimentos *in situ* em comparação às estimativas produzidas por procedimentos *in vitro*.

Dessa forma, infere-se serem os procedimentos *in situ* capazes de produzir resultados mais adequados das concentrações de indicadores internos em alimentos e fezes. Contudo, a despeito dos aspectos de maior adequação dos métodos *in situ*, divergências ainda são observadas no tocante à forma de implementação e condução de tal método.

O tempo de incubação ruminal representa uma das variáveis de maior influência sobre a representatividade dos resíduos indigeridos em procedimentos de incubação *in situ*. Por definição, a fração indigestível constitui um conceito assintótico, ou seja, representa a fração incapaz de ser aproveitada pelos sistemas enzimáticos microbiano e animal em situação na qual não há limitação no tocante ao tempo de exposição à ação destes sistemas (Mertens, 1993). Dessa forma, o valor real da fração indigestível somente poderá ser verdadeiramente mensurado em procedimentos conduzidos em escala de tempo infinita. Contudo, em termos práticos, os procedimentos *in situ* são

baseados em escalas finitas de tempo, assumindo-se intervalo temporal relativamente elevado de forma que as estimativas obtidas (resíduo indigerido) aproximem-se com grande intensidade do conceito assintótico (resíduo indigestível).

Contudo, não se observa consenso na literatura acerca do tempo de incubação ruminal que melhor represente a fração indigestível das amostras, sendo observados períodos variáveis, como: 96 (Ruiz et al., 2001), 144 (Freitas et al., 2002), 192 (Zeoula et al., 2002 ) e 288 horas (Huhtanen et al., 1994 ).

Segundo relatos de Lippke et al. (1986), estimativas do resíduo indigestível de FDN nem sempre podem ser obtidas com 144 horas de incubação. De outra forma, Zeoula et al. (2002) relataram que a utilização de tempos variáveis de incubação resulta em diferenças nas estimativas de digestibilidade, sendo que períodos curtos de incubação podem não reproduzir a fração real indigestível do alimento.

Berchielli et al. (2005), avaliando os indicadores internos FDN<sub>i</sub> e FDA<sub>i</sub> obtidos por incubação *in vitro* e *in situ*, relataram que a incubação por 144 horas pode não reproduzir a fração total indigestível. Resultados similares foram apresentados por Huhtanen et al. (1994), que sugeriram que períodos de incubação inferiores a 288 horas não permitem quantificar a fração indigestível.

Outros fatores a serem considerados na técnica *in situ* são relacionados ao acondicionamento das amostras a serem incubadas e o tamanho das partículas da amostra.

O nylon tem sido empregado como recipiente padrão (sacos) em procedimentos *in situ* de avaliação de alimentos para animais ruminantes (Nocek, 1997). Contudo, resultados controversos têm sido relatados quanto à eficiência da utilização deste tipo de tecido no processo de estimação de resíduos indigestíveis.

Piaggio et al. (1991), ao avaliarem a FDA<sub>i</sub> obtida por incubação *in situ* (240 horas) como indicador, verificaram recuperação fecal incompleta, o que foi atribuído à perda de partículas pelos poros dos sacos de nylon (50 µm).

De acordo com Huhtanen et al. (1994), a porosidade dos sacos de nylon utilizados para a incubação se relacionou inversamente à acurácia das estimativas de concentração de resíduos indigestíveis, sendo maior em 6 µm do que em 41 µm, relevando ainda alguma influência do perfil das partículas avaliadas.

Contudo, outros tecidos podem ser utilizados para tal finalidade, incorrendo demanda premente para avaliação de aspectos primários de interferência sobre a

exatidão e precisão dos resultados, e de aspectos secundários, envolvendo custos e praticidade operacional.

O surgimento do sistema Ankon® proporcionou maior praticidade e precisão para avaliação dos teores de componentes fibrosos em alimentos, digestas e fezes; uma vez que o recipiente utilizado para acondicionar as amostras pode ainda ser empregado simultaneamente para avaliações *in situ*, sem a necessidade de transferência de amostra de sacos para vidrarias utilizadas em procedimentos rotineiros de avaliação de fibra em laboratório. Os sacos associados ao sistema Ankon® são compostos por fibra sintética insolúvel nos meios ácido e neutro e indegradável, sendo denominados de F57.

Em trabalho visando a comparação de sacos F57 e de nylon para avaliação do teor de fibras em diferentes materiais, Berchielli et al. (2001) encontraram resultados similares entre materiais, com exceção de fezes bovinas, as quais apresentaram baixa recuperação em sacos de nylon o que foi atribuído à perda de amostras pelos poros durante a extração com detergente.

Embora a aplicação do F57 para avaliação do teor de fibra em alimentos apresente perspectivas favoráveis (Berchielli et al., 2001), o alto custo associado a este material pode constituir entrave à sua aplicação rotineira em análise de alimentos. De forma recente, têm-se buscado alternativas a este material na utilização do sistema Ankon® de análises de fibra, dentre as quais destaca-se o tecido não-tecido (TNT – 100g/m<sup>2</sup>).

Nunes et al. (2005), objetivando comparar os teores de FDN e FDA em amostras de alimentos, não verificou diferenças significativas entre as estimativas obtidas via TNT e F57, demonstrando a eficiência do TNT como material alternativo em análises realizadas por intermédio do sistema Ankon®.

Contudo, a despeito da eficiência de materiais alternativos ao nylon em análises de fibra, não foram encontradas na literatura consultada referências no tocante à aplicabilidade destes tecidos na avaliação de compostos indigestíveis, a qual inclui, além da extração com detergentes, períodos prolongados de incubação ruminal. Desta forma, ergue-se a necessidade premente de obtenção de informação desta natureza.

Por outro lado, a eficiência das estimativas obtidas para os teores de compostos indigeridos via sistemas *in situ* está diretamente relacionada à estrutura de partículas dos materiais incubados (Lippke et al., 1986; Huhtanen et al., 1994; Berchielli et al., 2001; e Detmann et al., 2007) e, possivelmente, podem sofrer efeitos de interação entre a estrutura de partículas e o material utilizado na confecção dos sacos.

Segundo Nocek (1988), é difícil estabelecer o tamanho de partículas mais apropriado para estudos *in situ*, uma vez que são escassas as informações em que se associam digestão *in vivo* e *in situ* e tamanho de partícula. O tamanho ou forma de partícula apropriada deveria ser como aquela que é mastigada e se apresenta no rúmen. Contudo, há pouca informação disponível para identificar tamanhos de partículas para um faixa ampla de alimentos.

Nocek (1997) não encontrou diferenças nas taxas de degradação da matéria seca para o farelo de soja moído em 1, 2 ou 5 mm. De outra forma, Van Keyren & Heinermann (1962) não verificaram diferenças no desaparecimento da matéria seca para forragens moídas a 0,28; 0,42; e 0,84 mm.

Contudo, Lippke et al. (1986) afirmaram que a falta de uniformidade de partícula (o que pode ser notado entre alimentos e fezes) nos substratos incubados poderia ser responsável, ao menos parcialmente, pela baixa recuperação fecal de FDNi nas fezes. Este argumento releva a possibilidade de diferentes materiais demandarem diferentes estruturas de partículas para obtenção de estimativas acuradas dos teores de componentes indigestíveis.

No entanto, o estudo dos materiais para confecção dos sacos para incubação ruminal, permitindo menor custo analítico, assim como o tempo de incubação e tamanho de partícula para diversos alimentos, deve constituir alvo de investigações com intuito de sanar os problemas relatados quanto à utilização de resíduos indigestíveis como indicadores, permitindo assim o seu isolamento e posterior estimação da digestibilidade de forma acurada e precisa.

Diante do exposto, definiram-se como objetivos gerais na presente dissertação:

1. Avaliar as perdas de partículas, a integridade física pós-incubação e pós-extração com detergente e as estimativas de componentes indigestíveis de diferentes alimentos ofertados a ruminantes obtidas em procedimento *in situ* utilizando-se sacos confeccionados com os tecidos: nylon (50  $\mu\text{m}$ ), F57 (Ankon®) e tecido não-tecido (TNT – 100 g/m<sup>2</sup>); e 2. Avaliar a influência do tempo de incubação e da estrutura de partículas sobre as estimativas de compostos indigestíveis e sobre a perda de partículas em diferentes alimentos e fezes de bovinos.

## Referências Bibliográficas

- ALBERTINI, T.Z.; REZENDE, L.H.G.S.; SOUZA, A.R.D.L. et al. Indicadores internos na determinação da produção da matéria seca fecal em bovinos: matéria seca, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido indigestíveis. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42, 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005 (CD-ROM).
- ASTIGARRAGA, L. Técnicas para la medición del consumo de ruminantes em pastoreo. In: SIMPÓSIO SOBRE AVALIAÇÃO DE PASTAGEM COM ANIMAIS, 1997, Maringá. **Anais...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1997. p.1-23.
- BERCHIELLI, T.T.; ANDRADE, P.; FURLAN, C.L. et al. Avaliação de indicadores internos em ensaios de digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.830-833, 2000.
- BERCHIELLI, T.T.; SADER, A.P.O.; TONANI, F.L. et al. Avaliação da determinação da fibra em detergente neutro e da fibra em detergente ácido pelo sistema ANKON. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1572-1578, 2001.
- BERCHIELLI, T.T.; OLIVEIRA, S.G.; FEITOSA, W. et al. Estimativas da produção fecal e digestibilidade total em bovinos por meio de indicadores. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42, 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005 (CD-ROM).
- COCHRAN, R.C.; ADAMS, D.C.; WALLACE, J.D. et al. Predicting digestibility of different diets with internal markers: evaluation of four potential markers. **Journal of Animal Science**, v.63, p.1476-1483, 1986.
- COELHO DA SILVA, J.F.; CAMPOS, J.; CONRAD, J.H. Uso de óxido crômico na determinação da digestibilidade. **Experientiae**, v.8, p.1-23, 1968.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T. et al. Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1600-1609, 2001.
- DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F. et al. Avaliação da técnica dos indicadores na estimação do consumo por ruminantes em pastejo. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, n.45, p.40-57, 2004.
- DETMANN, E.; SOUZA, A.L.; GARCIA, R. et al. Avaliação do vício de “tempo longo” de indicadores internos em ensaios de digestão com ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2007 (no prelo).
- FERRET, A.; PLAIXATS, J.; CAJA, G. et al. Using markers to estimate dry matter digestibilities, faecal output and dry matter intake in dairy ewes fed Italian ryegrass hay or alfalfa hay. **Small Ruminant Research**, v.33, p.145-152, 1999.

- FRANCE, J.; DHANOA, M.S.; SIDONS, R.C. et al. Estimating the fecal producing by ruminants from faecal marker concentration curves. **Journal of Theoretical Biology**, v.135, p.383-391, 1988.
- FREITAS, D.; BERCHIELLI, T.T.; SILVEIRA, R.N. et al. Produção fecal e fluxo duodenal de matéria seca e matéria orgânica estimados através de indicadores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1521-1530, 2002.
- HUHTANEN, P.; KAUSTELL, K.; JAAKKOLA, S. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, p.211-227, 1994.
- ÍTAVO, L.C.V. **Consumo, digestibilidade e eficiência microbiana de novilhos alimentados com dietas contendo vários níveis de concentrado, utilizando diferentes indicadores e períodos de coleta**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001, 100p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- KRYSL, L.J.; GALYEAN, M.L.; ESTELL, R.E. et al. Estimating digestibility and faecal output in lambs using internal and external markes. **Journal of Agricultural Science**, v.111, p.19-25, 1988.
- LIPPKE, H.; ELLIS, W.C.; JACOBS, B.F. Recovery of indigestible fiber from feces of sheep and cattle on forage diets. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.403-412, 1986.
- MERTENS, D.R. Rate and extent of digestion. In: FORBES, J.M., FRANCE, J. (Eds.). **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. Wallingford: CAB Publishing, 1993. p.13-51.
- MINSON, D.J. **Forage in ruminant nutrition**. San Diego: Academic Press, 1990. 483p.
- MOORE, J.E.; SOLLEMBERGER, L.E. Techniques to predict pasture intake. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL SOB PASTEJO, 1997, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. p.81-96.
- NOCEK, J.E. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2051-2069, 1988.
- NOCEK, J.E. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. In: TEIXEIRA, J.C. (Ed.) **Digestibilidade em ruminantes**. Lavras: FAEPE, 1997. p.197-240
- NUNES, C.J.; VELASQUEZ, P.A.T.; CARRILHO, E.N.V.M. et al. Material alternativo para confecção de filtros empregados na metodologia “nylon bag” para a determinação de fibra. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42. 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira De Zootecnia, 2005 (CD-ROM).
- OWENS, F.N.; HANSON, C.F. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2605-2617, 1992.
- PENNING. P.D.; JOHNSON, R.H. The use of internal markes to estimate herbage digestibility and intake. 2. Indigestible acid detergent fiber. **Journal of Agricultural Science**, v.100, p.133-138, 1983.

- PEREIRA, J.C.; GARCIA, J.A., COELHO DA SILVA, F.J. et al. Estudo de digestão em bovinos fistulados, alimentados com rações tratadas com formaldeído e contendo óleo. II. Métodos para estimativa da excreção de matéria seca fecal. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.12, p.429-439, 1983.
- PIAGGIO, L.M.; PRATES, E.R.; PIRES, F.F. et al. Avaliação das cinzas insolúveis em ácido, fibra em detergente ácido indigestível e lignina em detergente ácido indigestível como indicadores internos da digestibilidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.20, p.306-312, 1991.
- RESENDE, K.T.; FURLAN, C.L.; COSTA, R.G. et al. Utilização do colágeno cromatado como indicador em estudos de digestão com caprinos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.25, p.807-813, 1996.
- RUIZ, R.; VAN SOEST, P.J.; VAN AMBURGH, M.E. et al. Use of chromium mordanted neutral detergent residue as a predictor of fecal output to estimate intake in grazing high production Holstein cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.89, p.155-164, 2001.
- VAN KEYREN, R.W.; HEINERMANN, W.W. Study of nylon bag technique for *in vivo* estimation of forage digestibility. **Journal of Animal Science**, v.21, p.340-357, 1962.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2<sup>nd</sup> ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- ZEOULA, L.M.; PRADO, I.N.; DIAN, P.H.M. et al. Recuperação fecal de indicadores internos avaliados em ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1865-1874, 2002.

## Capítulo 1

### **Estimação *In Situ* dos Teores de Fibra em Detergente Neutro Indigestível em Alimentos para Ruminantes em Sacos de Diferentes Tecidos**

**Resumo** - Objetivou-se avaliar os teores de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) obtidos por procedimento *in situ* e a perda de partículas fibrosas em meio aquoso de alguns alimentos para ruminantes por intermédio de sacos de diferentes tecidos. Avaliou-se, concomitantemente a estrutura física dos tecidos utilizados. Os alimentos avaliados foram: farelo de trigo (FT), casca de soja (CS), silagem de milho (SM) e feno de capim-braquiária (FB). Foram avaliados os tecidos: nylon (50 µm); F57 (Ankon®); e tecido não-tecido (TNT – 100 g/m<sup>2</sup>). Os alimentos foram moídos (1 mm) e acondicionados em sacos de dimensão de 4 x 5 cm (6 amostras/tecido), obedecendo-se à relação de 20 mg de matéria seca/cm<sup>2</sup> de superfície. Os sacos foram incubados por 144 horas no rúmen de uma vaca alimentada com dieta mista (30% de concentrado). Posteriormente, os sacos foram retirados, lavados com água corrente até o total clareamento desta, e tratados com detergente neutro, sendo o resíduo considerado como FDNi. Verificou-se similaridade entre os teores de FDNi obtidos com TNT e F57 (P>0,05), sendo estes superiores aos obtidos com nylon (P<0,05) para os alimentos FT, CS e SM. Para FB, os teores diferiram entre todos os tecidos (P<0,05), sendo os maiores valores observados para F57, os menores para o nylon, tendo o TNT assumido posição intermediária. A perda de partículas fibrosas em meio aquoso foi avaliada por intermédio da lavagem dos sacos contendo os alimentos em água (39°C) (10 amostras/tecido). Verificou-se perda de partículas (P<0,05) quando empregado o nylon como ambiente para avaliação das amostras, corroborando os menores teores de FDNi obtidos com este tecido. Observou-se, por intermédio de microscopia eletrônica de varredura, que a perda de partículas para o nylon deve ser atribuída à estrutura do tecido e não a possíveis danos causados durante os processos de incubação e extração com detergente.

**Palavras-Chave:** F57, nylon, sistema Ankon, tecido não-tecido

## ***In Situ* Estimation of Indigestible Neutral Detergent Fiber Contents in Ruminant Feeds by Using Bags Made with Different Textiles**

**Abstract** – The aim of this work was to evaluate the contents of *in situ* indigestible neutral detergent fiber (iNDF) and the fibrous particles lost in aqueous environment in some ruminant feeds by using bags made with different textiles. The physical structure of the textiles was too evaluated. Samples of wheat bran (WB), soybean hulls (SH), corn silage (CS), and signal grass hay (SGH) were used. The bags for rumen incubation were made with nylon (50  $\mu\text{m}$ ); F57 (Ankon®); e non-woven textile (NWT – 100 g/m<sup>2</sup>). The feed samples were ground (1 mm) and put in the bags (4 x 5 cm) (6 bags/textile), according to relationship 20 mg of dry matter/cm<sup>2</sup> of surface. The bags were incubated in the rumen of a cow fed with a mixed diet (30% of concentrate) during 144 hours. After that, the bags were cleaning with tap water and treated with neutral detergent. The residue was assumed as iNDF. The iNDF contents in WB, SH and CS were similar for F57 and NWT ( $P > .05$ ), being the results lower when nylon was used ( $P < .05$ ). For the SGH samples all textiles produced different results ( $P < .05$ ) being the lower contents obtained with nylon. The fibrous particles lost in aqueous environment was evaluated by cleaning the bags in warm tap water (39°C) (10 bags/textile). The particles lost was significant for nylon ( $P < .05$ ). This lost could be considered the cause of lower iNDF contents obtained by using nylon textile, once the microscopic evaluation did not show that rupture of textile occurred during incubation or neutral detergent extraction.

**Key Words:** Ankon system, F57, nylon, non-woven textile

### **Introdução**

A recuperação de frações indigestíveis do alimento constitui a base para a definição de indicadores internos, que são utilizados convenientemente em estudos nos quais são necessárias estimativas de digestibilidade (Van Soest, 1994).

Além de representar a fração fibrosa insolúvel indigestível dos alimentos (Detmann et al., 2004), a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) vem sendo utilizada como indicador interno, estimada com base em procedimentos de incubação ruminal *in situ* ou *in vitro* em tempos superiores a 120 horas.

Contudo, incubações *in vitro* podem apresentar como inconveniente a aderência de partículas ao tubo, evitando o contato destas com o inóculo ruminal, acarretando aumento irreal do resíduo pós-incubação (Freitas et al., 2002). Este relato concorda com os resultados obtidos por Huhtanen et al. (1994), que verificaram que a digestibilidade da matéria seca *in vivo* foi mais acuradamente predita por intermédio de resíduos indigestíveis da fibra obtidos por procedimento *in situ*, em comparação às estimativas produzidas por procedimento *in vitro*.

Desta forma, infere-se serem os procedimentos *in situ* capazes de produzir resultados mais verossímeis das concentrações de indicadores internos em alimentos e fezes. Contudo, a despeito dos aspectos de maior adequação dos métodos *in situ*, divergências ainda são observadas no tocante à forma de implementação e condução de tais métodos.

O nylon tem sido empregado como recipiente padrão (sacos) em procedimentos de incubações *in situ* (Nocek, 1997). Contudo, resultados controversos têm sido relatados quanto à eficiência da utilização deste tipo de tecido no processo de estimação de resíduos indigestíveis.

Piaggio et al. (1991), ao avaliarem a concentração de resíduos fibrosos indigestíveis obtida por incubação *in situ* (240 horas), verificaram recuperação fecal incompleta, o que foi atribuído à perda de partículas pelos poros dos sacos de nylon (50  $\mu\text{m}$ ).

O surgimento do sistema Ankon® para avaliação do teor de fibra proporcionou maior praticidade e precisão para avaliação dos resíduos fibrosos indigestíveis, uma vez que o recipiente utilizado para a incubação *in situ* pode ser empregado simultaneamente para avaliação da fibra residual, sem a necessidade de transferência de amostra dos sacos para as vidrarias utilizadas em procedimentos rotineiros de avaliação de fibra em laboratório. Os sacos associados ao sistema Ankon® são compostos por fibra sintética insolúvel nos meios ácido e neutro, sendo denominados de F57.

Embora a aplicação do F57 para avaliação do teor de fibra em alimentos apresente perspectivas favoráveis (Berchielli et al., 2001), o custo associado a este material pode constituir entrave à sua aplicação rotineira em análise de alimentos. De forma recente, têm-se buscado alternativas a este material na utilização do sistema Ankon® de análise de fibra, dentre as quais destaca-se o tecido não-tecido (TNT), com gramatura 100g/m<sup>2</sup>.

Contudo, diante da perspectiva de utilização de vários tecidos para realização de procedimentos *in situ* de estimação das concentrações de resíduos indigestíveis, gera-se demanda premente para avaliação de aspectos primários de interferência sobre a exatidão e precisão dos resultados, e de aspectos secundários, envolvendo custos e praticidade operacional.

Desta forma, objetivou-se avaliar as perdas de partículas, a integridade física pós-incubação e pós-extração com detergente e as estimativas dos teores de FDNi de diferentes alimentos ofertados a ruminantes obtidas em procedimento *in situ* utilizando-se sacos confeccionados com os tecidos nylon (50 µm), F57 (Ankon®) e tecido não-tecido (TNT – 100 g/m<sup>2</sup>)

### **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido nas dependências dos Laboratórios de Animais e de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Foram utilizadas amostras de farelo de trigo, casca de soja, silagem de milho e feno de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf.), todas coletadas no município de Viçosa-MG. A escolha destes alimentos visou propiciar a avaliação de concentrados ricos em fibra solúvel (farelo de trigo) e insolúvel (casca de soja) e volumosos de média (feno de capim-braquiária) e alta qualidade (silagem de milho). As amostras de silagem de milho foram pré-secas em estufa com ventilação forçada (60°C/72 horas), e, posteriormente, em conjunto com as demais amostras, processadas em moinho de facas com peneira de porosidade 1 mm.

As amostras foram quantificadas quanto aos seus teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% p/p), segundo métodos descritos por Silva & Queiroz (2002). As avaliações das concentrações de fibra em detergente neutro (FDN) seguiram os protocolos sugeridos por Mertens (2002), omitindo-se, no entanto, a correção quanto às cinzas insolúveis em detergente neutro (CIDN). A composição química dos alimentos pode ser observada na Tabela 1.

Para avaliação dos teores de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), os alimentos foram acondicionados em sacos confeccionados com os tecidos: nylon, com

porosidade de 50  $\mu\text{m}$ ; F57 (Ankon®); e tecido não-tecido (TNT) (100g/m<sup>2</sup>). Foram utilizadas seis repetições de cada alimento para cada material.

Os sacos de nylon e TNT foram confeccionados com as dimensões 4 x 5 cm. As amostras foram acondicionadas, em todos os sacos, seguindo-se a relação de 20 mg de MS por centímetro quadrado de superfície (Nocek, 1988).

Tabela 1 - Composição química dos alimentos

Item	Alimento			
	Farelo de Trigo	Casca de Soja	Silagem de Milho	Feno de Braquiária
MS <sup>1</sup>	86,53	90,30	33,97	89,92
MO <sup>2</sup>	93,74	90,27	95,19	92,88
PB <sup>2</sup>	15,30	11,16	6,70	6,95
EE <sup>2</sup>	2,72	1,12	4,07	1,43
FDN <sup>2</sup>	45,64	81,21	47,64	82,49
FDA <sup>2</sup>	12,26	62,37	28,44	35,83
Lignina <sup>2</sup>	3,51	4,06	7,19	8,74

<sup>1/</sup> % da matéria natural. <sup>2/</sup> % da matéria seca.

Posteriormente, os sacos foram incubados por 144 horas (Detmann et al., 2001) no rúmen de uma vaca mestiça (Holandês x Zebu) alimentada com dieta mista (30% de concentrado com base na MS, sendo a silagem de milho fornecida como único volumoso). Após este período, os sacos foram retirados, lavados com água corrente até o total clareamento desta, submetidos à extração com detergente neutro (Mertens, 2002), em equipamento analisador de fibra Ankon®, e lavados com água quente e acetona. Após esse tratamento, os sacos foram, seqüencialmente, secos em estufa de ventilação forçada (60°C/72 horas) e em estufa não-ventilada (105°C/45 minutos), sendo acondicionados em dessecador e pesados.

Os sacos de todos os tecidos foram lavados e secos de forma similar ao acima descrito anteriormente à incubação para que se obtivessem as taras.

Os teores de FDNi obtidos com os sacos confeccionados com diferentes materiais foram avaliados por intermédio de análise de variância, de forma independente para cada alimento, segundo delineamento inteiramente casualizado, considerando-se três materiais para confecção dos sacos e seis repetições por material. As médias foram comparadas por intermédio do teste de Scheffé ( $\alpha = 0,05$ ) (Steel et al., 1997).

Para a avaliação da integridade dos tecidos após as diferentes etapas analíticas foram avaliados, concomitantemente aos procedimentos de incubação, três sacos “em

branco” para cada material. O primeiro saco somente foi submetido aos procedimentos para obtenção das taras. Por sua vez, o segundo saco foi também submetido aos procedimentos de incubação e lavagem, sendo o terceiro saco submetido a todo o processo analítico, incluindo-se a extração com detergente. Posteriormente, amostras do tecido de cada saco foram submetidas à avaliação por microscopia eletrônica de varredura (Silveira, 1998).

Após secagem (105° C/45 min), fragmentos dos tecidos de todos os sacos foram fixados com cola carbono em suportes metálicos e cobertos com uma camada de ouro (20 nm), sendo então avaliados em aumentos de 30, 100 e 200x em microscópio eletrônico de varredura (DSEM 962, Zeiss Co.). Todos os procedimentos de microscopia foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), em Campos dos Goytacazes-RJ.

Um segundo procedimento de avaliação dos tecidos foi conduzido visando-se a avaliação das perdas de partículas fibrosas insolúveis nos diferentes alimentos.

Trinta amostras de cada alimento foram acondicionadas em sacos dos diferentes tecidos (10 amostras/tecido), obedecendo-se às mesmas relações descritas anteriormente. Os sacos foram então lavados em água morna (aproximadamente 39°C) até o total clareamento desta, sendo então tratados com detergente neutro (Mertens, 2002), empregando-se equipamento Ankon® para avaliação de fibras, segundo procedimentos descritos anteriormente.

Paralelamente, cinco amostras de cada alimento foram quantificadas quanto ao teor de FDN empregando-se sistema *reboiler* e cadinhos filtrantes (porosidade grossa), segundo o método oficial descrito pela AOAC International (Mertens, 2002), omitindo-se, contudo, a correção para os teores de CIDN.

Para os teores de FDN obtidos pelos diferentes tecidos foram construídos intervalos de confiança ( $1-\alpha = 0,95$ ) (Steel et al., 1997). Para o caso da média dos teores de FDN obtida via método AOAC estar inclusa nos respectivos intervalos de confiança, concluiu-se pela ausência de perdas significativas de partículas fibrosas pelo material ( $P>0,05$ ). Em caso contrário, inferiu-se que perdas significativas foram observadas ( $P<0,05$ ).

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados por intermédio do programa SAS (*Statistical Analysis System*) (Littell et al., 1991).

## Resultados e Discussão

As médias para os teores de FDNi obtidos com os diferentes tecidos são apresentadas na Tabela 2. Verificou-se similaridade entre os teores obtidos com TNT e F57 ( $P>0,05$ ), sendo estes, contudo, superiores aos obtidos com o nylon ( $P<0,05$ ) para o farelo de trigo, casca de soja e silagem de milho.

Comportamento similar foi também observado por Nunes et al. (2005), ao compararem os teores de FDN e FDA em amostras de alimentos obtidas por intermédio de sacos de TNT e F57. Estes autores não observaram diferenças entre tecidos, indicando a possibilidade do uso do TNT como material alternativo para análise de fibra.

Tabela 2 – Médias e coeficientes de variação (CV) para os teores de fibra em detergente neutro indigestível (% da matéria seca) obtidos com sacos confeccionados com diferentes materiais em diferentes alimentos

Alimento	Material <sup>1</sup>			Valor-P <sup>2</sup>	CV(%)
	TNT	F57	Nylon		
Farelo de Trigo	14,20a	14,43a	10,41b	<0,0001	6,3
Casca de Soja	5,58a	7,06a	2,09b	0,0028	34,4
Silagem de Milho	25,34a	25,37a	15,76b	<0,0001	10,2
Feno de Braquiária	33,59b	36,70a	26,35c	<0,0001	4,6

<sup>1/</sup> Médias na linha, seguidas por letras diferentes, são diferentes pelo teste de Scheffé ( $P<0,05$ ). <sup>2/</sup> Níveis descritivos de probabilidade para o erro tipo I associados à hipótese de nulidade referente à similaridade entre materiais.

Por outro lado, para o feno de capim-braquiária, os teores diferiram entre todos os tecidos ( $P<0,05$ ), sendo os maiores valores observados para F57, os menores para o nylon, sendo que o TNT assumiu posição intermediária entre estes (Tabela 2). No entanto, a despeito da diferença significativa, verificou-se maior proximidade entre os valores fornecidos por F57 (36,70%) e TNT (33,59%), em comparação àquele fornecido pelo nylon (26,35%), o que corrobora a similaridade entre estes tecidos verificada para o farelo de trigo, para a casca de soja e para a silagem de milho.

Por intermédio da avaliação dos erros-padrão, verificou-se que os tecidos TNT e F57 produziram resultados similares em termos de precisão experimental, sendo estes, contudo, menos precisos do que os resultados obtidos com o nylon (Tabela 3).

Embora a estimação dos teores de FDNi seja rotineiramente empregada em experimentos de digestibilidade e consumo a pasto em ruminantes (Detmann et al.,

2001), a elevada variabilidade entre procedimentos laboratoriais, associada à natureza químico-biológica heterogênea da FDN, não permite a fixação de um padrão analítico capaz de aferir a exatidão das estimativas obtidas. Desta forma, a comparação direta entre estimativas não permite, de forma concreta, afirmar sobre a veracidade dos resultados obtidos, limitando as inferências à comparação em relação à precisão dos diferentes métodos.

Tabela 3 - Erros-padrão da média dos teores de fibra em detergente neutro indigestível obtidos com sacos confeccionados com diferentes materiais para diferentes alimentos

Alimento	Material		
	TNT	F57	Nylon
Farelo de Trigo	1,007	0,902	0,428
Casca de Soja	1,792	2,391	0,083
Silagem de Milho	3,511	1,592	0,677
Feno de Braquiária	1,679	1,289	1,437

Diversos autores (Hvelplund & Weisbjerg, 2000; Berchielli et al., 2001) têm apontado a perda de partículas como o principal fator de comprometimento sobre a exatidão de procedimentos de avaliação de alimentos *in situ*. Tal perda pode conduzir à obtenção de valores superestimados de digestibilidade, visto que a fração perdida freqüentemente é associada ou confundida com a fração rapidamente degradável e prontamente solúvel no ambiente ruminal.

Neste contexto, realizou-se procedimento secundário de avaliação da eficiência dos tecidos por intermédio da submissão dos sacos contendo os alimentos à lavagem em água com temperatura equivalente à observada no conteúdo ruminal (39°C). Sob a pressuposição de a FDN ser completamente insolúvel em água (Van Soest, 1994), esperar-se-ia similaridade entre os teores estimados pelos diferentes tecidos com aqueles obtidos via cadinhos filtrantes, por intermédio do método oficial de análise (Mertens, 2002), caso não ocorressem perdas de partículas.

Embora se entenda que a avaliação dos tecidos por tal procedimento não permita simular totalmente os eventos que ocorrem durante o processo de incubação ruminal, pressupôs-se que a avaliação de perda de partículas da fração fibrosa insolúvel constituísse indicativo indireto da exatidão das estimativas de FDNi obtidas.

Na Tabela 4 são apresentadas as médias, com seus respectivos intervalos de confiança, para os teores de FDN para os diferentes alimentos. Caso o teor de fibra em

detergente neutro obtido por intermédio do método oficial (Mertens, 2002) esteja contido no intervalo de confiança gerado para o teor médio obtido com os diferentes tecidos, pode-se inferir a respeito da similaridade entre teores ( $P>0,05$ ) e, conseqüentemente, concluir-se que a perda de partículas é não-significativa.

Tabela 4 - Médias, desvios-padrão (s) e limites inferiores (LI) e superiores (LS) do intervalo de confiança com 95% de probabilidade para o teores de fibra em detergente neutro (% da matéria seca) obtidos com sacos confeccionados com diferentes materiais para diferentes alimentos

Método	Item	Alimento			
		Farelo de Trigo	Silagem de Milho	Feno de Braquiária	Casca de Soja
Convencional	Média (%)	45,64	47,64	82,49	81,21
F57	Média (%)	47,18	49,00	82,27	82,22
	s	1,867	1,596	0,671	2,289
	LI	45,46	47,53	81,79	80,58
	LS	48,91	50,48	82,75	83,85
TNT	Média (%)	45,50	<b>45,74</b>	81,89	80,77
	s	3,010	<b>1,161</b>	0,878	1,796
	LI	43,35	<b>44,85</b>	81,15	79,48
	LS	47,66	<b>46,63</b>	82,62	82,05
Nylon	Média (%)	<b>43,27</b>	<b>41,93</b>	<b>80,95</b>	<b>76,26</b>
	s	<b>2,055</b>	<b>2,838</b>	<b>0,696</b>	<b>0,596</b>
	LI	<b>41,80</b>	<b>39,90</b>	<b>80,45</b>	<b>75,83</b>
	LS	<b>44,74</b>	<b>43,96</b>	<b>81,44</b>	<b>76,69</b>

Neste contexto, verificou-se similaridade ( $P>0,05$ ) entre os valores fornecidos por intermédio do F57 e aqueles obtidos via método oficial (Mertens, 2002) para todos os alimentos avaliados (Tabela 4).

Comportamento similar ao F57 foi verificado para o TNT com os alimentos farelo de trigo, feno de capim-braquiária e casca de soja. No entanto, divergência entre as estimativas foi observada para os valores obtidos para a silagem de milho, embora se tenha verificado elevada proximidade entre a média dada pelo método oficial (Mertens, 2002) e o limite superior do intervalo de confiança (Tabela 4).

Por outro lado, para o nylon verificaram-se menores teores de FDN ( $P<0,05$ ) em comparação àqueles fornecidos pelo método oficial (Mertens, 2002), indicando perdas significativas de partículas de fibra insolúvel em meio aquoso ( $P<0,05$ ), como o ambiente ruminal. Este comportamento parece justificar os menores teores de FDNi

obtidos com este tecido (Tabela 2), os quais poderiam ser então atribuídos à perda de partículas, e não à maior amplitude de degradação.

Em trabalho visando avaliar a substituição do F57 por sacos de nylon com porosidade de 50  $\mu\text{m}$  em análises de fibra insolúvel, Berchielli et al. (2001) encontraram resultados insatisfatórios para amostras de fezes bovinas, que foram atribuídos à perda de amostra pelos poros do saco de nylon durante a extração com detergente.

Desta forma, a porosidade pode ser considerada como o principal fator que limita a utilização do nylon nos procedimentos para a análise de fibra, e, conseqüentemente, de fibra indigestível.

Segundo Nocek (1988), a porosidade apropriada de um saco constitui ajuste entre limitar o influxo de conteúdo ruminal, não associado com o alimento avaliado, permitindo-se, no entanto, o influxo de populações microbianas para degradação, enquanto que, ao mesmo tempo, limita-se a saída de partículas alimentares não degradadas.

Embora se tenha evidenciado a perda de partículas quando se utiliza o nylon como recipiente para análise de FDN e FDNi, verifica-se através das microfotografias eletrônicas deste tecido que o nylon pré-incubação (Figura 1a) se encontra com a mesma integridade física quando comparado ao estado pós-incubação (Figura 1b) e pós-tratamento com detergente neutro (Figura 1c). Tal fato permite evidenciar que a perda de partículas observada para o nylon deve ser atribuída diretamente à estrutura do tecido e não a possíveis danos durante os processos de incubação e extração com detergente, uma vez que o tecido manteve-se íntegro durante todo o processo de quantificação dos teores de FDNi, como pode ser observado na Figura 1. Resultados similares no tocante à integridade de tecido foram também verificados para o F57 e o TNT (Figuras 2 e 3).

Huhtanen et al. (1994), ao comparem a digestibilidade da MS em bovinos predita por intermédio da FDNi estimada por procedimentos *in situ* utilizando-se sacos de nylon com malha de porosidade 6  $\mu\text{m}$  e 41  $\mu\text{m}$ , verificaram que estimativas mais acuradas foram obtidas com a menor porosidade. Segundo estes autores, a menor exatidão associada à malha com 41  $\mu\text{m}$  foi atribuída à maior perda de partículas não-degradadas.

Logo, associando-se o comportamento obtido por Huhtanen et al. (1994) aos resultados obtidos neste estudo (Tabelas 2 e 4), infere-se que porosidades de 40 a 60  $\mu\text{m}$ , embora recomendadas para estudos *in situ* (Nocek, 1997), não se mostram

apropriadas para avaliação dos teores de fibra insolúvel e resíduos fibrosos indigestíveis em ensaios com ruminantes.

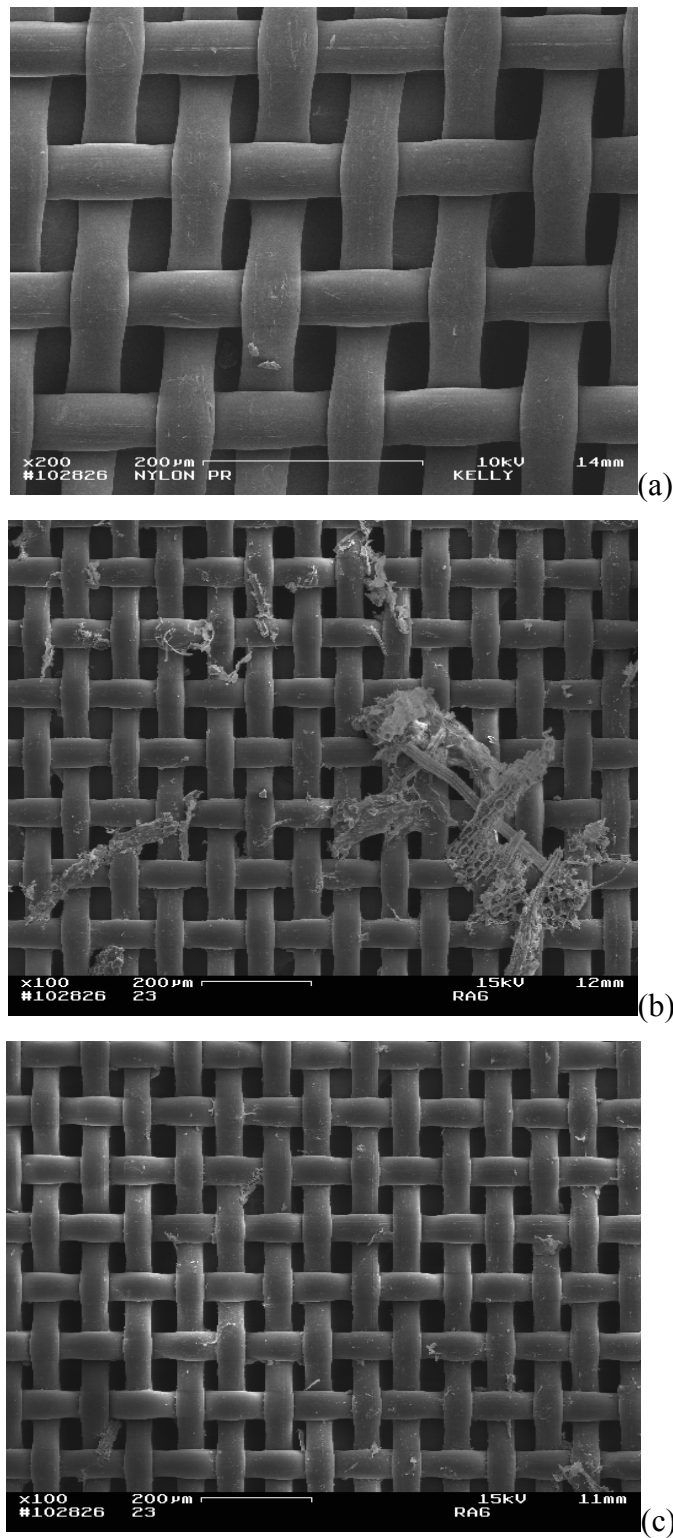


Figura 1 - Microfotografias eletrônicas de varredura do tecido nylon pré-incubação (a) (200x), pós-incubação (b) (100x) e pós-tratamento com detergente neutro (c) (100x).

De forma similar, as microfotografias eletrônicas dos tecidos F57 (Figura 2) e TNT (Figura 3), permitiram evidenciar, assim como no nylon, a preservação de sua integridade física pós-incubação (Figuras 2b e 3b) e pós-tratamento com detergente neutro (Figuras 2c e 3c), quando comparada com o tecido pré-incubação (Figuras 2a e 3a).

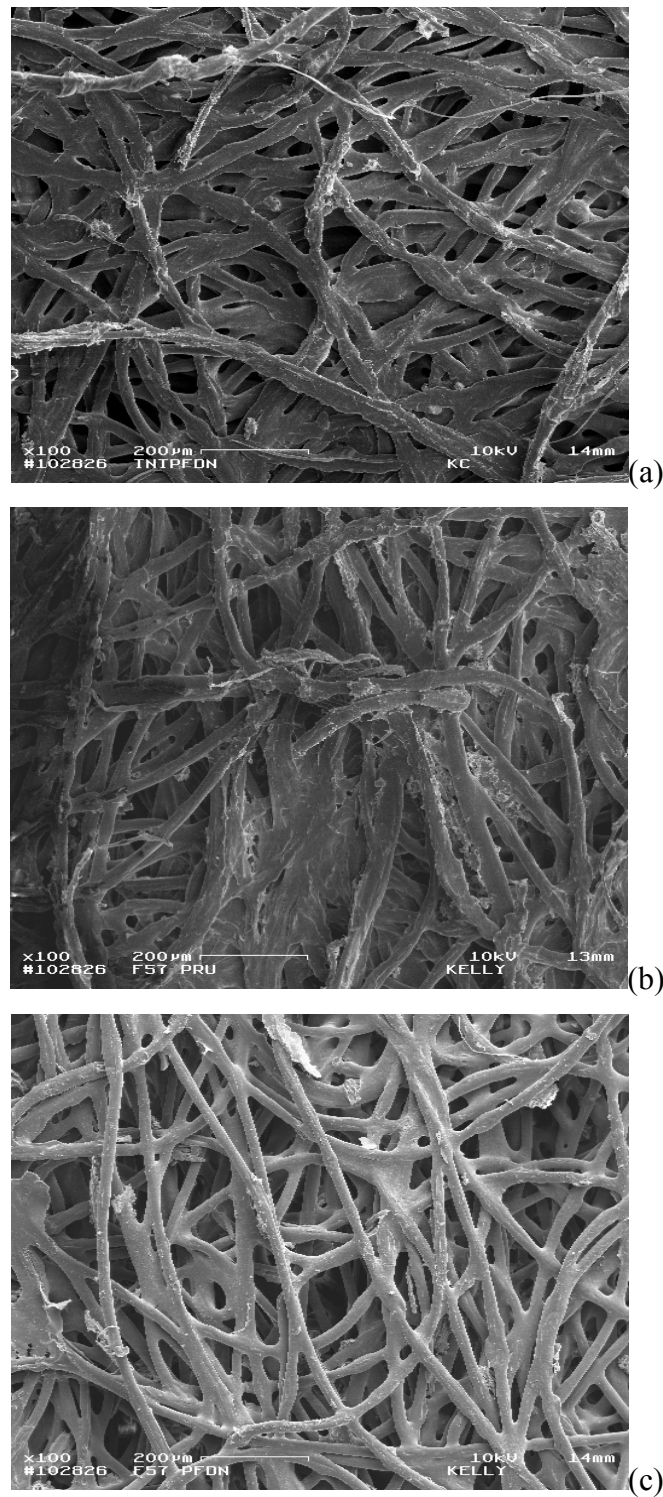


Figura 2 - Microfotografias eletrônicas de varredura do tecido F57 pré-incubação (a) (100x), pós-incubação (b) (100x) e pós-tratamento com detergente neutro (c) (100x).

Os tecidos F57 e TNT apresentam arranjo das malhas bastante semelhantes (Figuras 2 e 3), sendo que a deposição das fibras sintéticas não permite evidenciar regularidade no arranjo geométrico, como observado para o nylon (Figura 1).

Com base nos resultados demonstrados diretamente nas Tabelas 2 e 4, e em análise comparativa ao comportamento verificado para o nylon, pode-se inferir que o arranjo das malhas dos tecidos F57 e TNT conferem estruturas que permitem o influxo de microrganismos para degradar o alimento, enquanto, ao mesmo tempo, limitam a saída de partículas fibrosas não-degradadas.

Em alguns estudos com indicadores internos em ruminantes, têm-se sugerido a utilização da MS indigestível (MSi) como indicador (Huhtanen et al., 1994; Detmann et al., 2001), a qual apresentaria a vantagem de menor custo analítico em comparação a resíduos de fibra indigestível (Detmann et al., 2001). Contudo, segundo Huhtanen et al. (1994), embora a MSi possa produzir resultados exatos, a presença de contaminantes pode vir a comprometer os resultados obtidos. De fato, verificou-se a presença de contaminantes aderidos à malha dos tecidos pós-incubação, mesmo após a lavagem até o total clareamento da água (Figuras 1b, 2b e 3b), sendo estes mais evidentes no nylon (Figura 1b). A presença destes contaminantes indica que cautela deve ser tomada na aplicação da MSi como indicador interno.

Por outro lado, embora com estrutura de malha similar ao F57, a superfície do TNT não apresenta poros em sua totalidade, uma vez que parte da superfície é vedada por calor durante o processo de fabricação do tecido (Figura 4).

Esta estrutura do tecido fez com que no TNT a relação entre MS incubada e superfície fosse superior ao recomendado por Nocek (1988), o que, em tese, poderia comprometer a acessibilidade microbiana. Contudo, por intermédio da comparação entre TNT e F57 (Tabelas 2 e 4) observa-se que tal fato não foi verificado. No entanto, com o intuito de obter-se padrões para os procedimentos *in situ* sugerem-se mais estudos para quantificação exata da superfície efetivamente disponível à passagem microbiana e à saída de produtos da degradação com o uso do TNT.

De forma geral, os tecidos F57 e TNT apresentaram comportamento similar em termos analíticos. No entanto, a despeito da similaridade física verificada entre estes tecidos (Figuras 2, 3 e 4), as pequenas divergências observadas no tocante aos teores de FDN e FDNi (Tabelas 2 e 4) permitem sugerir que cautela ainda deve ser observada

para que se generalize o uso do TNT em procedimentos *in situ*. Neste contexto, mais estudos se fazem necessários para averiguação das causa destas divergências.

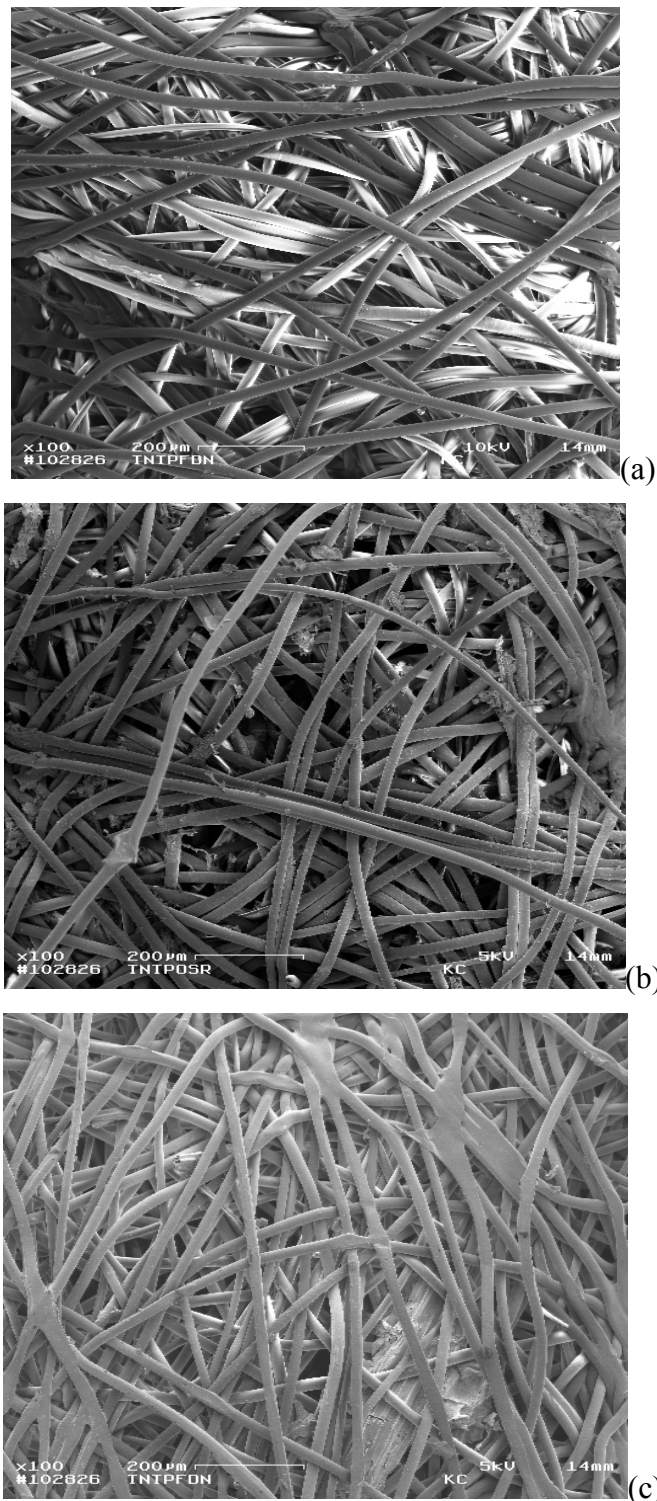


Figura 3 - Microfotografias eletrônicas de varredura do tecido não-tecido pré-incubação (a) (100x), pós-incubação (b) (100x) e pós-tratamento com detergente neutro (c) (100x).

Por outro lado, caso a similaridade analítica entre o F57 e o TNT possa ser confirmada, a avaliação de características secundárias dos procedimentos *in situ* permite apontar prerrogativa ao TNT, em virtude de seu menor custo (US\$ 0,01/saco) em comparação ao F57 (US\$ 2,00/saco).

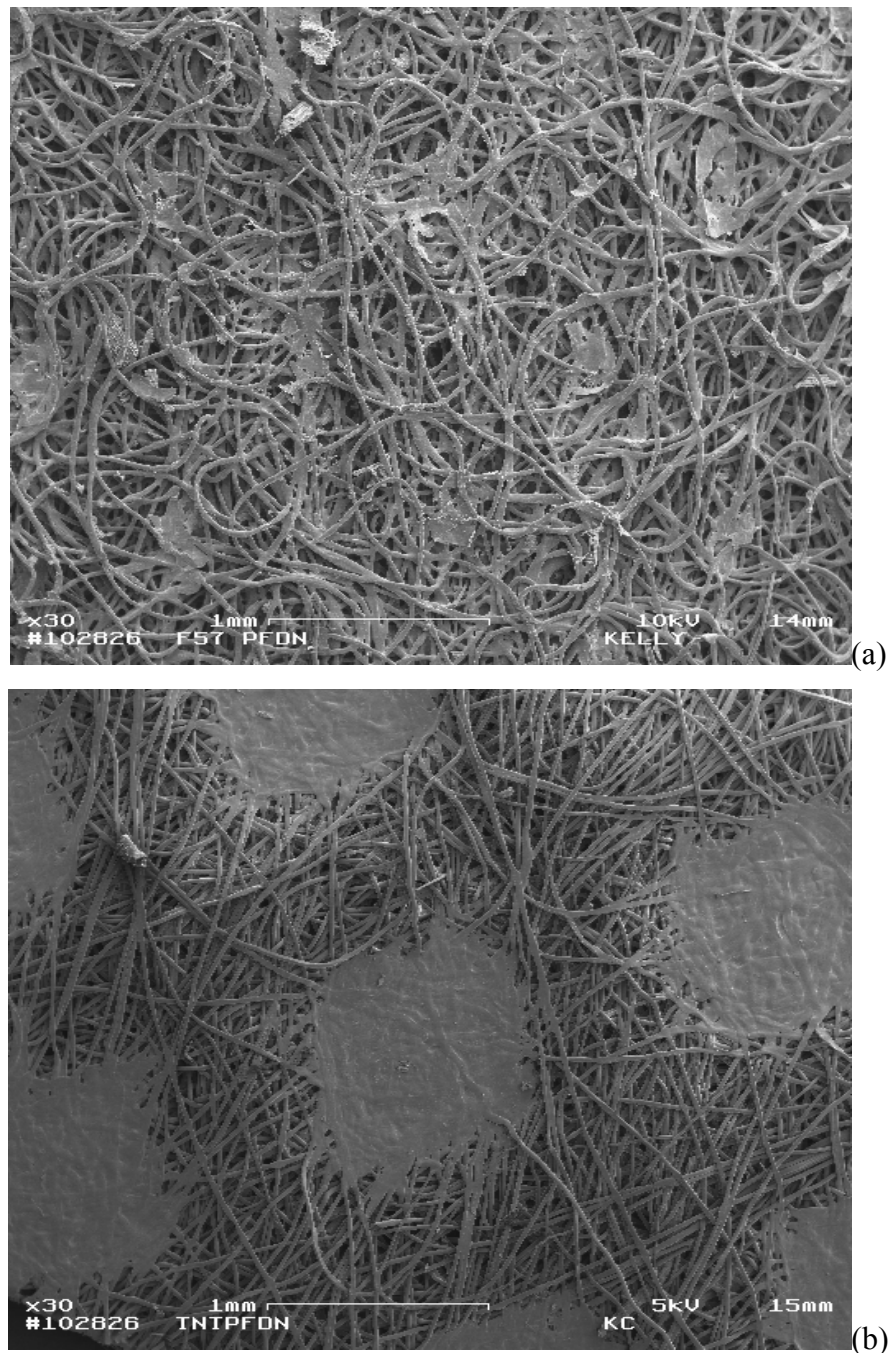


Figura 4 - Microfotografia eletrônica de varredura dos tecidos F57 (a) (30x) e TNT (b) (30x) pós-tratamento com detergente neutro.

## Conclusões

A utilização do tecido F57 é recomendada para a obtenção dos teores de fibra em detergente neutro indigestíveis através da técnica *in situ* em função da exatidão das estimativas obtidas.

Embora tendendo a apresentar resultados similares ao F57, o tecido não-tecido (100 g/m<sup>2</sup>) carece ainda de maiores avaliações para que sua recomendação possa ser realizada de forma geral.

A utilização do nylon em procedimentos similares, embora resulte em maior precisão, conduz a estimativas não-exatas em função de perda significativa de partículas.

## Literatura Citada

- BERCHIELLI, T.T.; SADER, A.P.O.; TONANI, F.L. et al. Avaliação da determinação da fibra em detergente neutro e da fibra em detergente ácido pelo sistema ANKON. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1572-1578, 2001.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T. et al. Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1600-1609, 2001.
- DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F. et al. Avaliação da técnica dos indicadores na estimação do consumo por ruminantes em pastejo. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, n.45, p.40-57, 2004.
- FREITAS, D.; BERCHIELLI, T.T.; SILVEIRA, R.N. et al. Produção fecal e fluxo duodenal de matéria seca e matéria orgânica estimados através de indicadores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1521-1530, 2002.
- HUHTANEN, P.; KAUSTELL, K.; JAAKKOLA, S. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, p.211-227, 1994.
- HVELPLUND, T.; WEISBJERG, M.R. *In situ* techniques for the estimation of protein degradability and postrumen availability In : GIVENS, D.I. ; OWEN, E.; AXFORD, R.F.E. et al. (Eds) **Forage evaluation in ruminant nutrition**. London: CAB International, 2000. p.233-258. 2000.
- LITTELL, R.C.; FREUND, R.J.; SPECTOR, P.C. **SAS System for linear models**. 3rd ed. Cary: SAS Institute Inc., 1991. 329p.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylasetreated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- NOCEK, J.E. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2051-2069, 1988.

- NOCEK, J.E. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. In: TEIXEIRA, J.C. (Ed.) **Digestibilidade em ruminantes**. Lavras: FAEPE, 1997. p.197-240.
- NUNES, C.J.; VELASQUEZ, P.A.T.; CARRILHO, E.N.V.M. et al. Material alternativo para confecção de filtros empregados na metodologia “nylon bag” para a determinação de fibra. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42, 2005, Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005 (CD-ROM).
- PIAGGIO, L.M.; PRATES, E.R.; PIRES, F.F. et al. Avaliação das cinzas insolúveis em ácido, fibra detergente ácido indigestível e lignina em detergente ácido indigestível como indicadores internos da digestibilidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.20, p.306-312, 1991.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análises de alimentos**. Métodos químicos e biológicos. 3ª ed. Viçosa: Editora UFV, 2002. 235p.
- SILVEIRA, M. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SOUZA, W. (Ed.) **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998. p.33-44.
- STEEL, R.G.; TORRIE, J.H.; DICKEY, D.A. 1997. **Principles and procedures of statistics**. A biometrical approach. New York: McGraw-Hill Co., 1997. 666p.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2<sup>nd</sup> ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.

## Capítulo 2

### **Influência do Tempo de Incubação e Estrutura de Partículas sobre os Teores de Compostos Indigestíveis em Alimentos e Fezes Bovinas Obtidos por Procedimento**

#### *In Situ*

**Resumo** - Objetivou-se avaliar a influência do tempo de incubação *in situ* e da estrutura de partículas sobre as estimativas das frações indigestíveis da matéria seca (MSi), da fibra em detergente neutro (FDNi) e da fibra em detergente ácido (FDAi). Avaliaram-se amostras de fubá de milho, casca de soja, farelo de trigo, farelo de soja, farelo de algodão, silagem de milho, capim-elefante, cana-de-açúcar, feno de capim-braquiária, palha de milho e de fezes de bovinos alimentados com alto ou baixo nível de concentrados na dieta. As amostras foram processadas em moinho com peneiras de porosidade 1, 2 ou 3 mm, sendo acondicionadas (20mg de matéria seca/cm<sup>2</sup> de superfície) em sacos de tecido não-tecido (100g/m<sup>2</sup>) de dimensão 4 x 5 cm. Os materiais foram divididos em três grupos, sendo cada grupo incubado no rúmen de 3 novilhas mestiças (Holandês x Zebu). O procedimento de incubação foi repetido por três vezes, sendo que, a cada período procedeu-se à incubação dos grupos em animais distintos. Foram utilizados os tempos: 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 e 312 horas. Os teores de MSi, FDNi e FDAi foram avaliados seqüencialmente, sendo os perfis de degradação interpretados por intermédio de modelo logístico não-linear. Verificou-se ausência de efeito do tamanho de partícula sobre as estimativas de MSi, FDNi e FDAi ( $P > 0,10$ ). Em relação aos efeitos dos tamanhos de partículas sobre a velocidade de degradação, verificaram-se efeitos significativos ( $P < 0,10$ ) para a silagem de milho e fubá de milho no tocante à MS; cana-de-açúcar, silagem de milho e palha de milho para a FDN; e cana-de-açúcar para a FDA. Para estas amostras, o tamanho de partícula associou-se positivamente ao tempo necessário para se estimar a fração indigestível. Tempos de incubação de 240 horas para MS e FDN e de 264 horas para FDA são recomendados para que se obtenham estimativas exatas das frações

indigestíveis. O uso de partículas com 2 mm é recomendado em função da maior precisão das estimativas.

**Palavras-Chave:** fibra em detergente ácido indigestível, fibra em detergente neutro indigestível, matéria seca indigestível

### **Influence of Incubation Time and Particles Structure on Indigestible Compounds Contents in Cattle Feeds and Feces Obtained by *In Situ* Procedure**

**Abstract** – The aim of this work was to evaluate the effects of *in situ* incubation time and structure of particles on the estimates of indigestible fractions of dry matter (iDM), neutral detergent fiber (iNDF), and acid detergent fiber (iADF). Samples of corn grain, wheat bran, corn silage, elephant grass, sugarcane, signal grass hay, corn straw, and feces obtained from cattle fed high and low concentrate diets were used. The samples were ground through 1 mm, 2 mm, and 3 mm screen sieve and put in 4 x 5 cm non-woven textile bags (20 mg of dry matter/cm<sup>2</sup> of surface). The samples were divided in three groups, being each group incubated in the rumen of a crossbred heifer. The incubation procedure was conducted three times with the change of groups among animals. It were used the following incubation times: 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, and 312 hours. The contents of iDM, iNDF, and iADF were evaluated sequentially in each bag. The degradation profiles were interpreted by a non-linear logistic model. The size of particles did not influence the estimates of iDM, iNDF, and iADF ( $P > .10$ ). On the other hand, the particles size has altered ( $P < .10$ ) the rumen degradation dynamic rates of DM for corn silage and corn grain; of NDF for sugarcane, corn silage, and corn straw; and ADF for sugarcane. For those samples, the particle size has been positively associated with the incubation time necessary to estimate the indigestible fraction. Incubation times of 240 hours for DM and NDF, and 264 hours for ADF were suggested for obtaining accurate estimates of indigestible fractions. The use of 2 mm particle size can increase the precision of estimates.

**Key Words:** indigestible acid detergent fiber, indigestible dry matter, indigestible neutral detergent fiber

## Introdução

A digestibilidade constitui um dos principais parâmetros para a avaliação do valor nutritivo dos alimentos consumidos pelos bovinos. Entretanto, sua quantificação por intermédio do método tradicional de coleta total de fezes requer controle rigoroso da ingestão de alimentos e excreção das fezes, tornando o trabalho oneroso e laborioso. Tais circunstâncias demandam a utilização de métodos indiretos, como o método dos indicadores (internos ou externos), o qual apresenta certas vantagens sobre a coleta total de fezes, a exemplo da simplicidade de condução experimental.

Entre os indicadores internos utilizados em ensaios com ruminantes, destacam-se alguns componentes da fração fibrosa dos alimentos, como as frações químicas: fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), (Penning & Johnson, 1983; Cochran et al., 1986; Lippke et al., 1986; Krysl et al., 1988; e Resende et al., 1996) e a fração física matéria seca indigestível (MSi) (Huhtanen et al., 1994; Detmann et al., 2001).

As concentrações dos indicadores internos supracitados em amostras de alimentos e fezes podem ser obtidas por procedimentos *in situ* (Ítavo, 2001; Freitas et al., 2002; e Albertini et al., 2005) ou *in vitro* (Lippke et al., 1986; Berchielli et al., 2000; e Freitas et al., 2002). Segundo Freitas et al. (2002), incubações *in vitro* apresentam como inconveniente o fato de partículas permanecerem aderidas à parede e à tampa do tubo, ao invés de estarem em contato com o inóculo ruminal, acarretando aumento do resíduo pós-incubação, superestimando a quantidade do indicador presente nas amostras.

Este relato concorda com os resultados obtidos por Huhtanen et al. (1994), que observaram que a digestibilidade da matéria seca foi mais acuradamente predita por intermédio de resíduos indigestíveis da fibra obtidos por procedimentos *in situ* em comparação às estimativas produzidas por procedimentos *in vitro*.

Desta forma, infere-se serem os procedimentos *in situ* capazes de produzir resultados mais adequados das concentrações de indicadores internos em alimentos e fezes. Contudo, a despeito dos aspectos de maior adequação dos métodos *in situ*, divergências ainda são observadas no tocante à forma de implementação e condução de tal método.

O tempo de incubação ruminal representa uma das variáveis de maior influência sobre a representatividade dos resíduos indigestíveis em procedimentos de incubação *in*

*situ*, sendo inexistente na literatura consenso acerca do tempo de incubação ruminal que permita melhor representar a fração indigestível das amostras, observando-se períodos variáveis, como: 96 (Ruiz et al., 2001), 144 (Freitas et al., 2002), 192 (Zeoula et al., 2002), 240 (Clipes et al., 2006) e 288 horas (Huhtanen et al., 1994).

Por outro lado, a eficiência das estimativas obtidas para os teores de compostos indigestíveis via protocolos *in situ* está diretamente relacionada à estrutura das partículas dos materiais incubados (Huhtanen et al., 1994; Detmann et al., 2007a). Segundo Nocek (1988), é difícil estabelecer o tamanho de partículas mais apropriado para estudos *in situ*, uma vez que são escassas as informações em que se associam digestão *in vivo*, *in situ* e tamanho de partículas. Assim, há pouca informação disponível para identificar tamanhos de partículas para uma faixa ampla de alimentos.

Diante dos relatos acima, percebe-se a existência de lacunas no conhecimento quanto à padronização nos protocolos para estimação dos teores de compostos indigestíveis em estudos *in situ*, os quais podem incorrer em possíveis falhas na recuperação dos indicadores.

Nesse contexto, objetivou-se avaliar a influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre as estimativas dos compostos indigestíveis MSi, FDNi e FDAi em alimentos e fezes bovinas.

## **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido nas dependências dos Laboratórios de Animais e de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Foram utilizadas amostras de concentrados protéicos e energéticos, volumosos e fezes de bovinos, segundo disposição apresentada na Tabela 1. Todas as amostras foram coletadas no município de Viçosa-MG.

As amostras de volumosos úmidos e fezes foram pré-secas em estufa com ventilação forçada (60°C/72 horas), e, em conjunto com as demais amostras, processadas em moinho de facas com peneiras de porosidade 1, 2 ou 3 mm.

Posteriormente, todas as amostras foram quantificadas quanto aos seus teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% p/p), segundo métodos descritos por Silva & Queiroz (2002). As avaliações no tocante às concentrações de fibra em

detergente neutro (FDN) seguiram os protocolos sugeridos por Mertens (2002), omitindo-se, contudo, a correção no tocante às cinzas insolúveis em detergente neutro. A composição química dos materiais utilizados é apresentada na Tabela 2.

Para avaliação dos teores de componentes indigestíveis, os alimentos e fezes foram acondicionados em sacos de tecido não-tecido (TNT – 100 g/m<sup>2</sup>). Os sacos apresentavam dimensões de 4 x 5 cm. As alíquotas foram acondicionadas, em todos os sacos, segundo a relação de 20 mg de matéria seca por centímetro quadrado de superfície (Nocek, 1988).

Tabela 1 - Materiais utilizados nos processos analíticos

Categoria	Amostra
Concentrados Energéticos	Fubá de Milho
	Casca de Soja
	Farelo de Trigo
Concentrados Protéicos	Farelo de Soja
	Farelo de Algodão
Volumosos	Silagem de Milho
	Capim-Elefante
	Cana-de-Açúcar
	Feno de Capim-Braquiária
	Palha de Milho
Fezes	Fezes Baixo Concentrado (AC) <sup>1</sup>
	Fezes Alto Concentrado (BC) <sup>2</sup>

<sup>1/</sup> Obtidas de bovino recendo 15% de concentrado na dieta, com base na matéria seca. <sup>2/</sup> Obtidas de bovino recendo 50% de concentrado na dieta, com base na matéria seca

Os materiais foram divididos em três grupos, sendo estes incubados no rúmen de três novilhas mestiças (Holandês x Zebu), alimentadas com silagem de capim-elefante e concentrado, na proporção 90:10, com base na MS. O procedimento de incubação foi repetido por três vezes, sendo que, a cada período procedeu-se à incubação dos grupos em animais distintos. Assim, a tomada de informações no campo foi orientada segundo delineamento em quadrado latino 3 x 3. Ao final dos procedimentos de incubação obtiveram-se três amostras para cada material, em cada tamanho de partícula e em cada tempo de incubação.

Foram utilizados os tempos: 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 e 312 horas. Os sacos foram dispostos em ordem reversa quanto ao tempo de incubação, de forma que a retirada dos mesmos ocorresse simultaneamente.

Após a retirada do rúmen os sacos foram lavados com água corrente até o total clareamento desta e imediatamente conduzidos a estufa de ventilação forçada (60°C/72 horas). Após este período, os sacos foram submetidos à secagem em estufa não-ventilada (105°C/45 minutos), sendo retirados, acondicionados em dessecador (20 sacos/dessecador) e pesados (Detmann et al., 2001), obtendo-se a MS não-digerida.

Posteriormente, os sacos foram submetidos ao tratamento com detergente neutro (Mertens, 2002) por uma hora em equipamento analisador de fibra Ankon®. Após este período, foram lavados com água quente e acetona, sendo secos e pesados conforme procedimento anterior. Ao final deste tratamento obteve-se a FDN não-digerida.

Tabela 2 - Composição química dos materiais empregados nas incubações

Material	Componente						
	MS <sup>1</sup>	MO <sup>2</sup>	PB <sup>2</sup>	EE <sup>2</sup>	FDN <sup>2</sup>	FDA <sup>2</sup>	Lignina <sup>2</sup>
Fubá de Milho	87,29	98,47	9,33	3,84	20,91	2,85	0,89
Casca de Soja	88,32	92,90	10,32	0,90	85,11	65,17	4,22
Farelo de Trigo	87,39	95,36	16,64	2,92	38,31	10,17	4,87
Farelo de Soja	88,02	93,60	47,59	0,86	17,60	10,29	2,54
Farelo de Algodão	89,25	92,60	50,34	6,03	23,76	10,16	9,30
Silagem de Milho	35,57	96,40	6,42	3,12	51,07	26,36	6,34
Capim-Elefante	28,89	89,10	4,07	1,52	73,13	43,9	7,40
Cana-de-Açúcar	21,08	93,37	3,50	1,01	50,70	27,43	9,50
Feno de Capim-Braquiária	87,32	94,31	6,80	1,20	77,31	33,59	7,85
Palha de Milho	89,06	97,23	2,27	0,28	89,84	44,46	8,80
Fezes BC	12,47	82,20	7,03	0,87	65,68	33,89	25,00
Fezes AC	16,05	87,85	12,52	1,35	51,94	26,09	20,60

<sup>1</sup>/ % da matéria natural. <sup>2</sup>/ % da matéria seca.

O procedimento descrito para quantificação dos teores de FDN foi novamente realizado, substituindo-se, contudo, o detergente neutro por detergente ácido (Silva & Queiroz, 2002), a fim de estimar-se a massa de FDA não-digerida.

Previamente ao processo de incubação, os sacos foram lavados em detergente neutro (Mertens, 2002) e secos de forma similar ao descrito anteriormente para que se obtivessem as taras.

Os perfis dos resíduos não degradados foram interpretados, inicialmente, de forma independente para cada alimento, em cada tamanho de partícula, segundo o modelo (Van Milgen et al., 1991):

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

em que:  $R_t$  = resíduo não-digerido de MS, FDN ou FDA (%); B = fração insolúvel potencialmente degradável da MS, FDN ou FDA (%); I = fração indegradável (%), a qual representa os teores de MSi, FDNi ou FDAi; k = taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal da fração solúvel potencialmente degradável ( $h^{-1}$ ); e t = tempo de permanência no ambiente ruminal (h).

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

Para cada indicador, obtido em cada alimento procedeu-se à comparação entre os modelos ajustados, de forma a verificar-se os efeitos do tamanho de partícula sobre as estimativas das frações indigestíveis (MSi, FDNi ou FDAi). Os procedimentos estatísticos foram conduzidos por intermédio do teste de identidade de modelos de regressão não-linear descrito por Regazzi (2003), segundo as hipóteses:

$$H_0 : I_{1mm} = I_{2mm} = I_{3mm} \times H_a : \text{não}H_0 \quad (2).$$

Para o caso de não-rejeição da hipótese de nulidade descrita em (2), concluiu-se pela ausência de efeito do tamanho de partículas sobre as estimativas de MSi, FDNi ou FDAi. Em caso contrário, conclui-se pela presença de influência do tamanho de partículas sobre os resíduos indigestíveis.

A homogeneidade entre tempos necessários para o alcance da fração indigestível no tocante ao efeito de diferentes tamanhos de partículas foi avaliada por intermédio do teste de identidade de modelos de regressão não-linear (Regazzi, 2003), segundo as hipóteses:

$$H_0 : k_{1mm} = k_{2mm} = k_{3mm} \times H_a : \text{não}H_0 \quad (3).$$

Sendo o parâmetro k indicador da velocidade de ocorrência dos eventos de degradação ruminal (Van Milgen et al., 1991), a influência do tamanho de partículas sobre as estimativas deste parâmetro indica, indiretamente, diferenças no tempo necessário para o alcance da estimativa da fração indigestível. Desta forma, para o caso de não-rejeição da hipótese de nulidade descrita em (3), concluiu-se que não há influência do tamanho das partículas incubadas sobre o tempo necessário para se estimar a fração indigestível.

Por outro lado, os tempos necessários para que estimativas adequadas dos resíduos indigestíveis sejam obtidas, aqui denominados “tempo crítico” ( $t_c$ ), foram estimados por intermédio das propriedades dos intervalos de confiança assintóticos para o parâmetro I (Equação 1). Este procedimento foi conduzido de forma dependente do

diagnóstico dado pelo teste de identidade de modelos descrito anteriormente. Para o caso de não-rejeição da hipótese de nulidade descrita em (3), um único modelo foi utilizado para todos os tamanhos de partículas. Para o caso de não-aceitação da referida hipótese, modelos distintos para cada tamanho de partícula foram empregados.

As estimativas de tempos críticos ( $t_c$ ) foram obtidas por procedimentos iterativos, sendo consideradas equivalentes ao tempo em que a estimativa do resíduo não-degradado torna-se numericamente idêntica ao limite superior do intervalo de confiança assintótico ( $1-\alpha = 0,95$ ) para o parâmetro I (Figura 1).

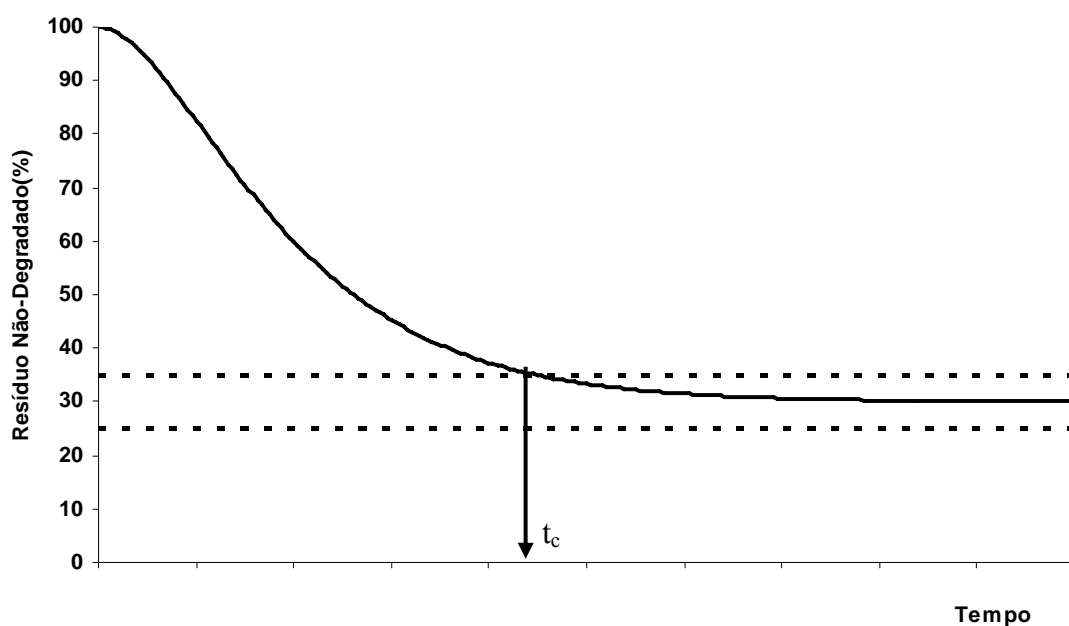


Figura 1 - Exemplo de perfil ajustado para a descrição do resíduo não-degradado em função do tempo (As linhas tracejadas indicam os limites do intervalo de confiança assintótico para a fração indigestível;  $t_c$  = tempo crítico).

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados por intermédio do programa SAS (*Statistical Analysis System*). Antecipa-se que o número elevado de perdas de sacos para os alimentos cascas de soja, farelo de soja e farelo de algodão comprometeu a confiabilidade de alguns perfis de degradação, sendo esses omitidos na apresentação dos resultados e discussão.

## Resultados e Discussão

Na Tabela 3 são apresentados os níveis descritivos de probabilidade para o erro tipo I associados à hipótese de nulidade referente à ausência de efeito do tamanho de partícula sobre a fração indigestível da MS (MSi), FDN (FDNi) e FDA (FDAi). Verificou-se ausência destes efeitos ( $P > 0,10$ ) para todos os materiais avaliados no tocante à FDNi e FDAi. A MSi apresentou comportamento similar, à exceção da cana-de-açúcar ( $P < 0,10$ ).

Tabela 3 - Níveis descritivos de probabilidade para o erro tipo I associados às hipóteses de nulidade para ausência de diferenças entre tamanhos de partículas no tocante à dimensão da fração indigestível

Material	Fração Indigestível		
	MSi	FDNi	FDAi
Capim-Elefante	0,9960	0,9960	0,6179
Feno de Braquiária	0,7001	0,7989	0,6332
Cana-de-Açúcar	<b>0,0071</b>	0,1465	0,3053
Silagem de Milho	0,8454	0,9181	0,4105
Palha de Milho	0,2417	0,8781	0,5401
Fezes (AC)	0,9517	0,9498	0,7796
Fezes (BC)	0,5297	0,5507	0,4759
Casca de Soja	0,8821	0,9802	---
Farelo de Trigo	0,4378	0,9758	0,1402
Farelo de Soja	0,7012	---	---
Fubá de Milho	0,9508	0,6561	0,4411
Farelo de Algodão	0,1916	---	---

A dimensão da fração indigestível constitui característica única e exclusiva do substrato (Ørskov, 2000), não sendo influenciada por condições do meio de fermentação ou por particularidades do material experimental. Diferenças no tocante à fração indigestível entre protocolos de avaliação *in situ* têm sido atribuídas à perda de partículas (Casali et al., 2007).

Neste contexto, o comportamento observado para a FDNi, FDAi e MSi (à exceção da cana-de-açúcar) permite evidenciar a ausência de perda de partículas ( $P > 0,10$ ) para os tamanhos de partículas estudados.

Por outro lado, o comportamento observado para a MSi com a cana-de-açúcar aparentemente indica perdas de partículas ( $P < 0,10$ ). A estimativa da fração indigestível foi superior em 3 mm (32,07%) em comparação a 2 mm (28,63%) e 1 mm (28,51%). Contudo, caso representasse perda real de partículas, este comportamento deveria

refletir sobre as estimativas de FDNi e FDAi, o que não foi verificado ( $P > 0,10$ ) (Tabela 3). Ressalta-se que a fração física MSi é constituída por componentes essencialmente insolúveis, de forma similar às frações químicas FDNi e FDAi.

Embora a utilização da MSi como indicador possa produzir resultados exatos, a presença de contaminantes pode vir a comprometer os resultados obtidos (Huhtanen et al., 1994), uma vez que não se utilizam detergentes para se obter o teor de MSi, impedindo-se assim a retirada de resíduos microbianos por ação aniônica (Van Soest, 1994; Clipes et al., 2006). A presença de resíduos aderidos aos tecidos usados para incubação tem sido verificada em condições tropicais (Casali et al., 2007).

Por ser tratar de material constituído por fibra de baixa qualidade e com alta demanda por tempo de retenção no rúmen para que o processo de degradação ocorra, a cana-de-açúcar poderia mostrar-se mais sensível à presença de contaminantes microbianos. Por outro lado, o menor grau de moagem (3 mm) reduz a superfície específica para degradação microbiana (Nocek, 1997). Desta forma, a maior estimativa de MSi para a cana-de-açúcar moída a 3 mm deve-se, possivelmente, à maior contaminação microbiana.

Na Tabela 4 podem ser observados os níveis descritivos de probabilidade para o erro tipo I associados à hipótese de nulidade para ausência de efeitos dos diferentes tamanhos de partículas em relação à velocidade de degradação ruminal.

Tabela 4 - Níveis descritivos de probabilidade para o erro tipo I associados às hipóteses de nulidade para ausência de diferenças entre tamanhos de partículas no tocante à velocidade de degradação ruminal

Material	Componente		
	MS	FDN	FDA
Capim-Elefante	0,2283	0,3681	0,6959
Feno de Braquiária	0,9489	0,4311	0,4177
Cana-de-Açúcar	0,2863	<b>0,0334</b>	<b>0,0208</b>
Silagem de Milho	<b>0,0117</b>	<b>0,0956</b>	0,1233
Palha de Milho	0,2779	<b>0,0371</b>	0,2825
Fezes (AC)	0,9371	0,9217	0,2449
Fezes (BC)	0,8829	0,9130	0,2536
Casca de Soja	0,4558	0,6663	---
Farelo de Trigo	0,7486	0,2642	0,7171
Farelo de Soja	0,6244	---	---
Fubá de Milho	<b>0,0179</b>	0,1364	0,6437
Farelo de Algodão	0,3251	---	---

Para a MSi, foi observada a não-rejeição dessa hipótese de nulidade para todos os materiais incubados ( $P > 0,10$ ), com exceção da silagem de milho e fubá de milho ( $P < 0,10$ ) (Tabela 4). Comportamento similar foi verificado para a FDNi, somente observando-se efeitos significativos ( $P < 0,10$ ) para a cana-de-açúcar, silagem de milho e palha de milho. Para a FDAi efeitos relativos ao tamanho de partículas foram verificados somente para a cana-de-açúcar ( $P < 0,10$ ).

De forma geral, a ocorrência de efeitos significativos do tamanho de partículas foi mais observada em alimentos fibrosos, em comparação aos alimentos concentrados e fezes (Tabela 4). Embora constituindo as amostras com maior lignificação (Tabela 2), deve-se ressaltar que as fezes constituem material re-incidentes ao ambiente ruminal, o que implica em características distintas dos demais alimentos fibrosos, como a cana-de-açúcar, justificando, portanto, o comportamento distinto em relação a estes materiais.

Verificou-se, para o caso dos alimentos em que ocorreu efeito significativo do tamanho de partículas sobre a velocidade de degradação (Tabela 4), relação diretamente proporcional entre o tamanho da partícula e o tempo crítico ( $t_c$ ) para o alcance da fração indigestível (Tabelas 5, 6 e 7); ou seja, quanto maior o tamanho da partícula, maior o tempo necessário para se estimar acuradamente o teor de compostos indigestíveis. Ressalta-se que, a despeito da influência sobre  $t_c$ , não foram verificados efeitos do tamanho de partículas sobre a dimensão da fração indigestível (Tabela 4).

Ao que tudo indica, o maior  $t_c$  verificado na medida em que se ampliou o tamanho das partículas, parece estar associado à redução da superfície específica para a ação microbiana (Nocek, 1997). Cabe ressaltar que, embora ocorrendo no ambiente ruminal, a dinâmica de redução do tamanho das partículas dos alimentos acondicionados nos sacos é limitada em comparação ao alimento livremente ingerido pelo animal, tornando a ação microbiana sobre a redução das partículas proporcionalmente mais relevante.

O tempo de incubação ruminal representa uma das variáveis de maior influência sobre a representatividade dos resíduos indigeridos em procedimentos de incubação *in situ*. Por definição, a fração indigestível constitui conceito assintótico, ou seja, representa a fração incapaz de ser aproveitada pelos sistemas enzimáticos microbiano e animal em situação na qual não há limitação no tocante ao tempo de exposição à ação destes sistemas (Mertens, 1993). Dessa forma, o valor real da fração indigestível somente poderá ser verdadeiramente mensurado em procedimentos conduzidos em escala de tempo infinita. Contudo, em termos práticos, os procedimentos *in situ* são

baseados em escalas finitas de tempo, assumindo-se intervalo temporal relativamente elevado de forma que as estimativas obtidas (resíduo indigerido) aproximem-se com grande intensidade do conceito assintótico (resíduo indigestível).

Tabela 5 - Estimativas para a taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal ( $k - h^{-1}$ ) e fração indigestível da matéria seca (MSi - % da MS), limite superior do intervalo de confiança assintótico com 95% de probabilidade para a fração indigestível (LS - % da MS) e tempo crítico ( $t_c$ ) para o alcance da fração MSi (h) em função do tamanho das partículas incubadas

Material	Partícula	Parâmetro			
		k	MSi	LS	$t_c$
Capim-Elefante	---	0,0284	37,66	39,68	170,8
Feno de Braquiária	---	0,0389	26,52	28,12	139,1
Cana-de-Açúcar	---	0,0349	29,70	30,97	137,5
Silagem de Milho	1 mm	0,0287	20,27	22,94	156,8
Silagem de Milho	2 mm	0,0244	20,58	23,12	186,7
Silagem de Milho	3 mm	0,0208	19,42	22,74	207,8
Palha de Milho	---	0,0228	19,48	22,36	217,2
Fezes (AC)	---	0,0299	28,00	30,15	154,9
Fezes (BC)	---	0,0259	43,74	46,29	167,8
Casca de Soja	---	0,0350	4,54	6,39	162,1
Farelo de Trigo	---	0,0591	15,29	16,48	87,8
Farelo de Soja	---	0,0538	4,03	6,63	88,4
Fubá de Milho	1 mm	0,0627	3,45	5,21	88,2
Fubá de Milho	2 mm	0,0513	3,03	5,21	104,2
Fubá de Milho	3 mm	0,0503	3,13	5,38	106,6
Farelo de Algodão	---	0,0357	16,23	18,24	138,3
Média	---	---	---	---	144,6
Máximo	---	---	---	---	217,2
Mínimo	---	---	---	---	87,8
CV(%)	---	---	---	---	28,6

Segundo Mertens (1993), estimativas acuradas da fração indigestível seriam obtidas em tempos de incubação iguais a 4,6 vezes a recíproca da taxa representativa da dinâmica de degradação ruminal. Neste contexto, segundo as taxas médias observadas neste estudo ( $0,0377 h^{-1}$  para MS;  $0,0276 h^{-1}$  para FDN; e  $0,0237 h^{-1}$  para FDA), demandar-se-iam os tempos de 122,1, 166,9 e 193,9 horas para se obterem as estimativas de MSi, FDNi e FDAi, respectivamente.

Contrastando-se estes valores com os  $t_c$  médios observados para cada indicador (Tabelas 5, 6 e 7), verifica-se que esta relação, quando baseada nos valores médios da taxa relacionada à dinâmica de degradação ruminal, somente assume valores próximos para a FDAi (4,54), ao passo que, subestimaria as relações necessárias para obtenção de

estimativas da fração indigestível da MS e da FDN (relações de 5,45 e 4,86, respectivamente). Esta divergência torna a recomendação de Mertens (1993) pouco exata para condições tropicais, o que parece refletir questões de diferenças na dinâmica de degradação ruminal entre alimentos produzidos em condições tropicais e não-tropicais (Detmann et al., 2007b).

Tabela 6 - Estimativas para a taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal ( $k - h^{-1}$ ) e fração indigestível da fibra em detergente neutro (FDNi - % da FDN), limite superior do intervalo de confiança assintótico com 95% de probabilidade para a fração indigestível (LS - % da FDN) e tempo crítico ( $t_c$ ) para o alcance da fração FDNi (h) em função do tamanho das partículas incubadas

Material	Partícula	Parâmetro			
		k	FDNi	LS	$t_c$
Capim-Elefante	---	0,0277	44,46	46,94	176,1
Feno de Braquiária	---	0,0401	28,92	30,76	135,5
Cana-de-Açúcar	1 mm	0,0366	49,87	53,70	115,4
Cana-de-Açúcar	2 mm	0,0324	50,71	53,32	144,5
Cana-de-Açúcar	3 mm	0,0248	54,70	58,04	176,6
Silagem de Milho	1 mm	0,0236	29,59	32,98	204,1
Silagem de Milho	2 mm	0,0213	30,62	36,52	196,5
Silagem de Milho	3 mm	0,0188	29,39	32,56	268,6
Palha de Milho	1 mm	0,0294	18,67	24,21	142,5
Palha de Milho	2 mm	0,0225	19,87	25,61	186,9
Palha de Milho	3 mm	0,0203	17,54	24,85	193,6
Fezes (AC)	---	0,0230	40,66	44,00	195,1
Fezes (BC)	---	0,0231	52,56	55,76	186,9
Casca de Soja	---	0,0315	3,24	5,13	177,3
Farelo de Trigo	---	0,0305	29,45	31,72	166,0
Farelo de Soja	---	---	---	---	---
Fubá de Milho	---	0,0353	8,2	10,3	154,5
Farelo de Algodão	---	---	---	---	---
Média	---	---	---	---	176,3
Máximo	---	---	---	---	268,6
Mínimo	---	---	---	---	115,4
CV(%)	---	---	---	---	20,0

De forma geral, os tempos médios obtidos para a obtenção das frações indigestíveis da MS, FDN e FDA (144,6; 176,3; e 191,4 horas, respectivamente), encontram-se em patamares superiores em relação aos tempos comumente empregados para estimação de frações indigestíveis em experimentos de digestibilidade e/ou consumo a pasto (e.g.: 96 horas – Ruiz et al., 2001; 144 horas – Detmann et al., 2001; Ítavo, 2001; Freitas et al., 2002; Detmann et al., 2005). Este comportamento pode

conferir menor exatidão às estimativas de coeficientes de digestibilidade ou de consumo voluntário de pasto.

Esta divergência foi abordada por Berchielli et al. (2005) ao avaliarem os indicadores FDNi e FDAi. Estes autores relataram que os teores desses indicadores foram muito variáveis nos alimentos avaliados, indicando, provavelmente, que incubações nas quais utilizam-se tempos inferiores a 144 podem não resultar em estimativas adequadas da fração total indigestível. Em adição, Huhtanen et al. (1994) sugeriram que períodos de incubação inferiores a 288 horas podem não permitir boa aproximação à fração potencialmente degradável (e, conseqüentemente, indegradável).

Os valores médios de tempo crítico observados (Tabelas 5, 6 e 7) apresentam maior aproximação à proposição de Clipes et al. (2006), que, ao estudarem a fração indigestível dos compostos nitrogenados associados à parede celular em gramíneas tropicais, sugeriram tempos de incubação *in situ* de 240 horas como medida de maior aproximação da fração não-degradada ao real valor da fração indegradável.

Tabela 7 - Estimativas para a taxa relativa à dinâmica de degradação ruminal ( $k - h^{-1}$ ) e fração indigestível da fibra em detergente ácido (FDAi - % da FDA), limite superior do intervalo de confiança assintótico com 95% de probabilidade para a fração indigestível (LS - % da FDA) e tempo crítico ( $t_c$ ) para o alcance da fração FDAi (h) em função do tamanho das partículas incubadas

Material	Partícula	Parâmetro			
		k	FDAi	LS	$t_c$
Capim-Elefante	---	0,0239	46,22	49,08	196,1
Feno de Braquiária	---	0,0353	32,82	35,05	148,1
Cana-de-Açúcar	1 mm	0,0306	55,80	59,15	141,8
Cana-de-Açúcar	2 mm	0,0240	55,26	59,16	174,5
Cana-de-Açúcar	3 mm	0,0173	61,40	69,86	182,5
Silagem de Milho	---	0,0187	30,60	34,64	248,8
Palha de Milho	---	0,0192	14,33	18,76	240,5
Fezes (AC)	---	0,0218	44,34	47,70	207,0
Fezes (BC)	---	0,0194	56,12	60,59	203,0
Casca de Soja	---	---	---	---	---
Farelo de Trigo	---	0,0246	58,70	61,50	188,5
Farelo de Soja	---	---	---	---	---
Fubá de Milho	---	0,0261	27,27	31,19	174,6
Farelo de Algodão	---	---	---	---	---
Média	---	---	---	---	191,4
Máximo	---	---	---	---	248,8
Mínimo	---	---	---	---	141,8

Embora os valores médios indiquem a necessidade do estabelecimento de tempos superiores de incubação aos comumente empregados, há de se ressaltar a grande variabilidade dos tempos críticos entre indicadores e alimentos, indo de 87,8 (MSi - farelo de trigo) a 268,6 horas (FDNi – silagem de milho – 3 mm). Esta variabilidade concorda com os relatos de Detmann et al. (2007a) de que diferentes materiais poderiam demandar protocolos distintos para se estimar a fração indigestível da MS, FDN e FDA.

Para os indicadores MSi e FDNi não foram observados  $t_c$  superiores a 240 horas (Figura 2), sugerindo que este tempo de incubação seria adequado para a obtenção de estimativas exatas destas frações indigestíveis. Cabe ressaltar que a sugestão de protocolos com base nos maiores valores de tempo exigidos propiciam a obtenção de estimativas exatas da fração indigestível mesmo em alimentos que demandam baixos  $t_c$ , uma vez que se propiciará somente maior aproximação ao real valor assintótico. A adoção de tempo único para todas as amostras obtidas em um experimento propiciará maior padronização dos protocolos e melhores comparações dos valores obtidos em diferentes experimentos.

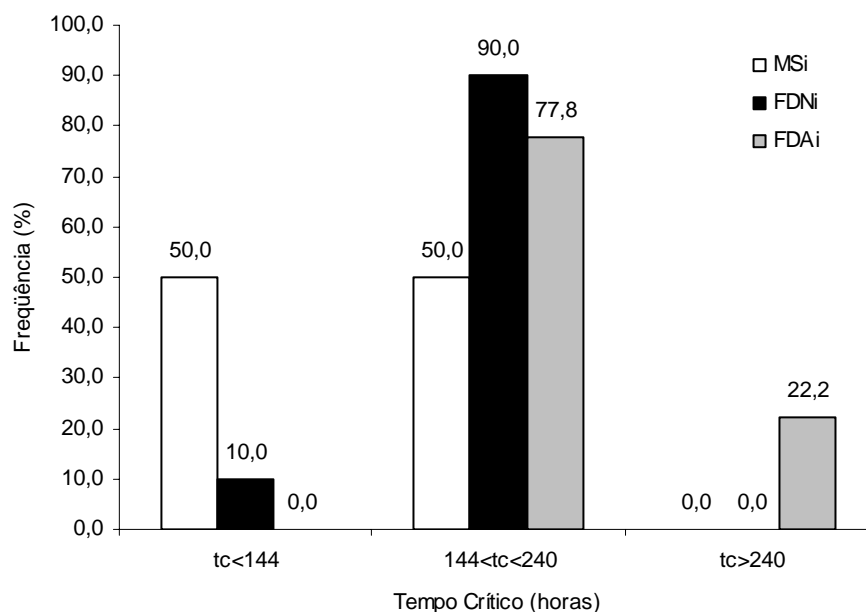


Figura 2 - Frequência de distribuição dos tempos críticos em função dos indicadores MSi, FDNi e FDAi (Obs.: para os alimentos nos quais se verificou efeitos do tamanho de partículas considerou-se para o cálculo das frequências apenas as estimativas de tempo crítico obtidas com 2 mm).

Para a FDAi, em virtude da ocorrência de valores de  $t_c$  superiores a 240 horas (silagem de milho – 248,8 horas; palha de milho – 240,5 horas) (Figura 2) sugere-se a ampliação do tempo de incubação *in situ* em 24 horas em relação aos demais indicadores, gerando-se o protocolo de 264 horas.

Por outro lado, em função da ausência de influência do tamanho de partículas sobre a dimensão das frações indigestíveis (Tabela 3), a escolha do tamanho a compor os protocolos deve se calcar sobre a precisão das estimativas obtidas.

Inspecionando-se os erros-padrão assintóticos para as estimativas das frações indigestíveis, percebe-se que o uso de partículas com 3 mm reduz a precisão dos resultados (Figura 3), possível reflexo da menor superfície específica para ação microbiana. O uso de partículas com 1 e 2 mm conduzem a estimativas similares em termos de precisão (Figura 3).

Neste contexto, em agregação a recentes recomendações para protocolos *in situ* (Hvelpund & Weisbjerg, 2000; NRC, 2001), sugere-se a padronização da preparação de amostras por intermédio do uso de peneiras com porosidade de 2 mm.

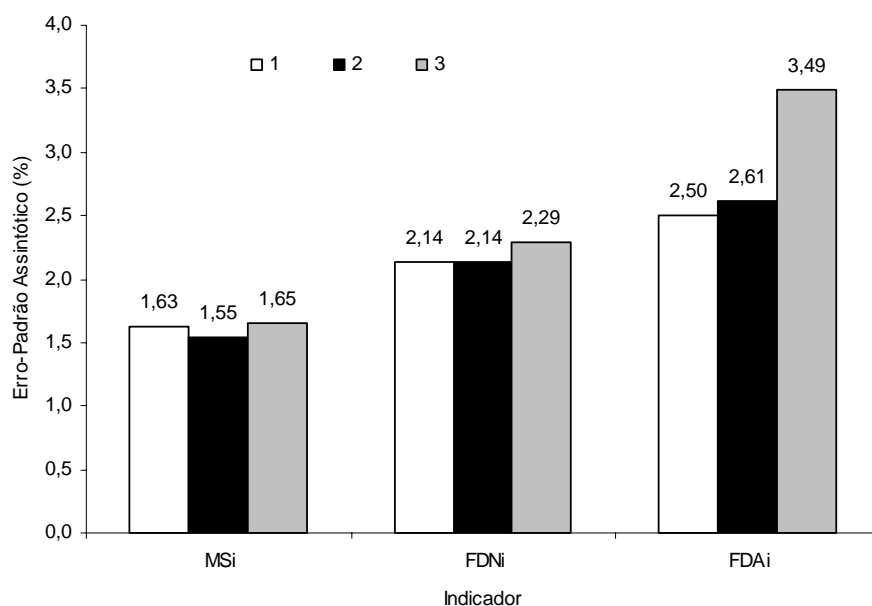


Figura 3 - Comportamento médio do erro-padrão assintótico para a fração indigestível em função do tamanho das partículas incubadas.

## Conclusões

A utilização de partículas de 2 mm em protocolos *in situ* é sugerida em função da maior precisão das estimativas. Utilizando-se sacos confeccionados com TNT, protocolos de estimação *in situ* dos teores de MSi e FDNi devem se basear em tempos de incubação de 240 horas para que se obtenham estimativas exatas das frações indigestíveis. Quando se visa avaliar a fração FDAi, tempos de 264 horas são sugeridos.

## Literatura Citada

- ALBERTINI, T.Z.; REZENDE, L.H.G.S.; SOUZA, A.R.D.L. et al. Indicadores internos na determinação da produção da matéria seca fecal em bovinos: matéria seca, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido indigestíveis. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42, 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005 (CD-ROM).
- BERCHIELLI, T.T.; ANDRADE, P.; FURLAN, C.L. et al. Avaliação de indicadores internos em ensaios de digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.830-833, 2000.
- BERCHIELLI, T.T.; OLIVEIRA, S.G.; FEITOSA, W. et al. Estimativas da produção fecal e digestibilidade total em bovinos por meio de indicadores. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005 (CD-ROM).
- CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Estimação *in situ* dos teores de fibra em detergente neutro indigestível em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2007 (submetido).
- CLIPES, R.C.; DETMANN, E.; COELHO DA SILVA, J.F. et al. Evaluation of acid detergent insoluble protein as an estimator of rumen non-degradable protein in tropical grass forages. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.694-697, 2006.
- COCHRAN, R.C.; ADAMS, D.C.; WALLACE, J.D. et al. Predicting digestibility of different diets with internal markers: evaluation of four potential markers. **Journal of Animal Science**, v.63, p.1476-1483, 1986.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T. et al. Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1600-1609, 2001.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; CECON, P.R. et al. Níveis de proteína em suplementos para terminação de bovinos em pastejo durante o período de transição seca/águas: Consumo voluntário e trânsito de partículas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.1371-1379, 2005.
- DETMANN, E.; SOUZA, A.L.; GARCIA, R. et al. Avaliação do vício de “tempo longo” de indicadores internos em ensaios de digestão com ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2007a (no prelo).

- DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S. et al. Prediction of the energy value of cattle diets based on the chemical composition of the feeds under tropical conditions. **Animal Feed Science and Technology**, 2007b (in press).
- FREITAS, D.; BERCHIELLI, T.T.; SILVEIRA, R.N. et al. Produção fecal e fluxo duodenal de matéria seca e matéria orgânica estimados através de indicadores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1521-1530, 2002.
- HUHTANEN, P.; KAUSTELL, K.; JAAKKOLA, S. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, p.211-227, 1994.
- HVELPLUND, T; WEISBJERG, M.R. *In situ* techniques for the estimation of protein degradability and postrumen availability In : GIVENS, D.I. ; OWEN, E.; AXFORD, R.F.E. et al. (Eds.) **Forage evaluation in ruminant nutrition**. London: CAB International, 2000. p.233-258.
- ÍTAVO, L.C.V. **Consumo, digestibilidade e eficiência microbiana de novilhos alimentados com dietas contendo vários níveis de concentrado, utilizando diferentes indicadores e períodos de coleta**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001, 100p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- KRYSL, L.J.; GALYEAN, M.L.; ESTELL, R.E. et al. Estimating digestibility and faecal output in lambs using internal and external markers. **Journal of Agricultural Science**, v.111, p.19-25, 1988.
- LIPPKE, H.; ELLIS, W.C.; JACOBS, B.F. Recovery of indigestible fiber from feces of sheep and cattle on forage diets. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.403-412, 1986.
- MERTENS, D.R. Rate and extent of digestion. In: FORBES, J.M.; FRANCE, J. (Eds.). **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. Wallingford: CAB Publishing, 1993. p.13-51.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7 ed. Washington: Academic Press, 2001. 381p.
- NOCEK, J.E. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2051-2069, 1988.
- NOCEK, J.E. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. In: TEIXEIRA, J.C. (Ed.) **Digestibilidade em ruminantes**. Lavras: FAEPE, 1997. p.197-240.
- ØRSKOV, E. R. The *in situ* technique for the estimation of forage degradability in ruminants. In : GIVENS, D.I. ; OWEN, E.; AXFORD, R.F.E. et al. (Eds.) **Forage evaluation in ruminant nutrition**. London: CAB International, 2000. p.175-188.
- PENNING. P.D.; JOHNSON, R.H. The use of internal markers to estimate herbage digestibility and intake. 2. Indigestible acid detergent fiber. **Journal of Agricultural Science**, v.100, p.133-138, 1983.
- REGAZZI, A.J. Teste para verificar a igualdade de parâmetros e a identidade de modelos de regressão não linear. **Revista Ceres**, v.50, p.9-26, 2003.

- RESENDE, K.T.; FURLAN, C.L.; COSTA, R.G. et al. Utilização do colágeno cromatado como indicador em estudos de digestão com caprinos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.25, p.807-813, 1996.
- RUIZ, R.; VAN SOEST, P.J.; VAN AMBURGH, M.E. et al. Use of chromium mordanted neutral detergent residue as a predictor of fecal output to estimate intake in grazing high production Holstein cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.89, p.155-164, 2001.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análises de alimentos**. Métodos químicos e biológicos. 3<sup>a</sup> ed. Viçosa: Editora UFV, 2002. 235p.
- SOUZA, G.S. **Introdução aos modelos de regressão linear e não-linear**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. 505p.
- Van MILGEN, J.; MURPHY, L.L.; BERGER, L.L. A compartmental model to analyze ruminal digestion. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.2515-2529, 1991.
- Van SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2<sup>nd</sup> ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- ZEOULA, L.M.; PRADO, I.N.; DIAN, P.H.M. et al. Recuperação fecal de indicadores internos avaliados em ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1865-1874, 2002.

## Conclusões Gerais

A partir dos resultados obtidos nesta dissertação, destacam-se como principais conclusões e implicações:

1. A utilização do tecido F57 é recomendada para a obtenção dos teores de fibra em detergente neutro indigestíveis através da técnica *in situ* em função da exatidão das estimativas obtidas. Embora tendendo a apresentar resultados similares ao F57, o tecido não-tecido (100 g/m<sup>2</sup>) carece ainda de maiores avaliações para que sua recomendação possa ser realizada de forma geral. A utilização do nylon em procedimentos similares, embora resulte em maior precisão, conduz a estimativas não-exatas em função de perda significativa de partículas.

2. A utilização de partículas de 2 mm em protocolos *in situ* é sugerida em função da maior precisão das estimativas. Utilizando-se sacos confeccionados com TNT, protocolos de estimação *in situ* dos teores de MSi e FDNi devem se basear em tempos de incubação de 240 horas para que se obtenham estimativas exatas das frações indigestíveis. Quando se visa avaliar a fração FDAi, tempos de 264 horas são sugeridos.