

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ESTIMATIVA DO EFEITO ASSOCIATIVO ENTRE CONCENTRADOS E  
VOLUMOSO, ATRAVÉS DE MEDIDA DE DIGESTIBILIDADE “IN SITU” DA  
MATÉRIA SECA E DA FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO.

Ricardo Villas-Boas Ferrari

Médico Veterinário (UFRGS)

Dissertação apresentada como um dos  
requisitos à obtenção do Grau de  
Mestre em Zootecnia

PORTO ALEGRE/ RS, BRASIL

JULHO, 2003.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à minha família, principalmente meus pais pelo apoio e amor incondicional, meu eterno agradecimento e retribuição.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul e CAPES por me proporcionarem a oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.

Ao Professor Ênio Rosa Prates, pela orientação desde os tempos como bolsista de Iniciação Científica, cerca de 8 anos atrás.

Aos bolsistas e colegas que auxiliaram diretamente para a realização do experimento e dissertação.

Aos professores e funcionários do Departamento de Zootecnia.

Aos meus bons amigos (por sorte, faltaria papel pra citar todos os nomes), pela amizade, companheirismo, ajuda, conversas, estudos, cervejadas, risadas e divertimentos em geral.

Às pessoas em geral que me mostraram o como ser e como não ser na vida.

"Quando a gente pensa que sabe todas as respostas, vem a vida e muda as perguntas..."

# ESTIMATIVA DO EFEITO ASSOCIATIVO ENTRE CONCENTRADOS E VOLUMOSO, ATRAVÉS DE MEDIDA DE DIGESTIBILIDADE “IN SITU” DA MATÉRIA SECA E DA FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO <sup>1</sup>

Autor: Ricardo Villas-Bôas Ferrari

Orientador: Ênio Rosa Prates

## RESUMO

O experimento realizado avaliou, através de incubações ruminais de um volumoso misturado a diferentes concentrados, a ocorrência de influência mútua entre esses alimentos. Foi utilizado um animal Hereford fistulado no rúmen, em três períodos experimentais e foram incubados, por 24 horas, os seguintes ingredientes: farelo de soja, farelo de arroz integral, milho integral moído misturados com volumoso (feno de capim coast-cross) nas seguintes proporções de concentrado: 100, 50, 40, 30, 20 e 0%. Foi estudada a degradação da MS e da FDN das misturas, através do desaparecimento de amostra e da análise dos resíduos e amostras. Ao comparar-se as medidas obtidas com as estimadas através do cálculo proporcional das degradabilidades individuais dos ingredientes não se obteve diferença significativa entre a degradabilidade obtida e estimada da MS de nenhum dos alimentos em nenhuma das proporções. A mesma comparação realizada com a FDN mostrou algumas diferenças numéricas entre as medidas observadas e estimadas nas misturas de feno + farelo de soja e feno + milho moído. No entanto, esses resultados não foram estatisticamente significativos ( $P > 0,05$ ) possivelmente pela alta variabilidade da técnica em relação ao pequeno número de repetições testadas. O farelo de arroz utilizado nesse experimento apresentou características muito próximas às encontradas no feno e por isso não houve diferença significativa entre as degradabilidades obtida e estimada na mistura de farelo de arroz com o feno. A técnica “in situ”, da forma como a metodologia foi testada, não foi capaz de mostrar benefícios ou prejuízos estatisticamente significativos a degradação da MS e FDN dos alimentos misturados.

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (97 p.), Julho, 2003.

# ESTIMATION OF ASSOCIATIVE EFFECTS BETWEEN CONCENTRATES AND ROUGHAGE, THROUGH THE "IN SITU" DIGESTIBILITY MEASURE OF DRY MATTER AND NEUTRAL DETERGENT FIBER <sup>1</sup>

Author: Ricardo Villas-Bôas Ferrari

Adviser: Ênio Rosa Prates

## ABSTRACT

The experiment was conducted to assess, through ruminal incubations of mixtures of forage and different concentrates, the occurrence of mutual influences between these feedstuffs. An Hereford steer fistulated was used, in three experimental periods and the following feedstuffs were incubated for 24 hours: soybean meal, rice bran, ground corn mixed with the forage (ground coast-cross hay) in the following proportions of concentrate 100, 50, 40, 30, 20 and 0%. The degradability of DM and NDF of mixtures was studied, through the sample's disappearance and sample and residue analysis. Comparing obtained measures with the estimated by means of proportional calculation of individual degradabilities of feedstuffs showed no significant difference between obtained and estimated DM degradabilities in none of feedstuffs and proportions.

The same comparison was done with the NDF measures showed some numeric differences between estimated and obtained measures in mixtures of ground soybean meal + hay and corn + hay. The rice bran used in this experiment showed characteristics very close to the characteristics found in the studied hay. Because of that, there was no significant difference between estimated and obtained degradabilities in the rice bran and hay mixtures. The "in situ" technique, in the way it was conducted in this experiment, was not able to show benefits or prejudice statistically significant to the DM and NDF degradation of these feedstuffs mixtures.

<sup>1</sup> Master Science Dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (97 p.), July, 2003.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 Suplementação da alimentação de bovinos e os Efeitos Associativos .....	3
2.1.1 Tipos de Efeitos Associativos.....	4
2.1.2 Incidência de Efeitos Associativos .....	5
2.1.2.1 Efeitos Associativos Positivos.....	6
2.1.2.2 Efeitos Associativos Negativos .....	8
2.1.3 Características físicas dos alimentos que influenciam a ocorrência de efeitos associativos .....	11
2.2 Metodologias para estimativa de efeitos associativos .....	12
2.2.1 A técnica de digestibilidade “in vivo” .....	12
2.2.2 Avaliação do consumo de alimentos .....	13
2.2.3 A técnica de digestibilidade “in vitro” de produção de gás ....	14
2.2.4 A técnica de digestibilidade “in situ” .....	16
2.2.4.1 Dieta do animal fistulado.....	19
2.2.4.2 Tecido utilizado para a confecção dos sacos de incubação.....	22
2.2.4.3 Tamanho da amostra.....	24
2.2.4.4 Preparação da amostra a ser incubada .....	25
2.2.4.5 Procedimentos de Incubação .....	26
2.3 Avaliação da fermentação ruminal através da fibra do alimento..	29
2.3.1 Degradação da parede celular pelos microorganismos .....	30
2.3.2 Propriedades físico-químicas da fibra que influenciam a degradabilidade .....	32
2.3.3 Estimativas da fibra e de sua digestibilidade.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	37
3.1 Local de Execução.....	37
3.2 Amostras e Tratamentos.....	37

3.3	Preparação das Amostras .....	38
3.4	Preparação dos Sacos de Incubação .....	39
3.4.1	Preparação do Animal para Incubação .....	39
3.4.2	Período de Incubação .....	40
3.4.3	Procedimentos de Incubação .....	40
3.5	Cálculos Efetuados .....	41
3.5.1	Desaparecimento da MS e da FDN.....	41
3.5.2	Estimativa da Degradabilidade Proporcional Volumoso - Concentrado .....	42
3.5.3	Estimativa dos Efeitos Associativos .....	43
3.6	Delineamento Experimental.....	43
3.7	Análise Estatística.....	44
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1	Caracterização dos alimentos incubados .....	45
4.2	Resultados de Degradação das Misturas .....	51
4.3	Avaliação da Ocorrência de Efeitos Associativos na Degradabilidade da Matéria Seca .....	53
4.4	Avaliação da Ocorrência de Efeitos Associativos na Degradabilidade da Fibra em Detergente Neutro.....	59
4.5	Validação da Metodologia “In Situ” para a estimativa de Efeitos Associativos .....	65
4.5.1	Efeito da dieta fornecida ao animal sobre a degradabilidade “in situ” .....	66
4.5.2	Estudo da cinética de digestão.....	70
5.	CONCLUSÃO .....	73
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74
7.	APÊNDICES .....	83

## RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Teores de MS, MO, PB e FDN dos alimentos testados. Dados expressos na MS. ....	45
Tabela 2. Degradabilidade ruminal dos alimentos estudados após um período de 24 horas de incubação.....	51
Tabela 3. Efeito associativo da degradabilidade da matéria seca das amostras de farelo de soja incubadas no rúmen por 24 horas .....	53
Tabela 4. Efeito associativo da degradabilidade da matéria seca das amostras de farelo de arroz incubadas no rúmen por 24 horas .....	56
Tabela 5. Efeito associativo da degradabilidade da matéria seca das amostras de milho incubadas no rúmen por 24 horas .....	57
Tabela 6. Efeito associativo da degradabilidade da fibra em detergente neutro das amostras de farelo de soja incubadas no rúmen por 24 horas .....	60
Tabela 7. Efeito associativo da degradabilidade da fibra em detergente neutro das amostras de farelo de arroz incubadas no rúmen por 24 horas .....	61
Tabela 8. Efeito associativo da degradabilidade da fibra em detergente neutro das amostras de milho incubadas no rúmen por 24 horas .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

μm	Micrômetro
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
CRF	Carboidratos rapidamente fermentáveis
D.P.	Desvio Padrão
FB	Fibra Bruta
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
g	grama
kg	quilograma
ml	mililitro
mm	milímetro
MO	Matéria Orgânica
MS	Matéria Seca
N	Nitrogênio
NDR	Nitrogênio degradável no rúmen
NDT	Nutrientes digestíveis totais
NNP	Nitrogênio não protéico
°C	Graus Celsius
PB	Proteína Bruta
pH	Potencial de hidrogênio
PV	Peso vivo

## 1. INTRODUÇÃO

Mercados cada vez mais competitivos e um público consumidor mais exigente promovem uma série de adaptações aos processos produtivos a fim de produzir sempre mais quantidade, com maior qualidade, em menor tempo, com menor custo.

Na produção animal, tem-se buscado a aplicação de novas tecnologias que aprimorem a produção de produtos de origem animal e também vegetal. No caso da alimentação de bovinos, uma das técnicas que vem sendo utilizada é a suplementação da alimentação dos animais.

A adição de alimentos concentrados como grãos e seus farelos na dieta de ruminantes, usualmente alimentados à base de alimentos volumosos, causa alterações no equilíbrio ruminal, devido ao aumento significativo de nutrientes mais solúveis no rúmen, principalmente carboidratos rapidamente fermentáveis. A interação entre volumoso e concentrado pode causar o que se chama de efeitos associativos, que promovem uma série de modificações na digestibilidade e consumo de volumosos e também de concentrados pelo animal e, por consequência, no desempenho deste. Esses efeitos podem ser benéficos ou prejudiciais ao consumo e aproveitamento do alimento, dependendo das características dos alimentos combinados, da sua proporção, do nível de consumo e de produção, entre outros aspectos.

Muitos estudos têm sido realizados sobre esses efeitos e várias metodologias – “in vivo”, “in vitro”, produção de gás, etc – têm sido testadas para a sua estimativa. A técnica “in situ”, apesar de apresentar diversas fontes de variação intrínsecas aos seus procedimentos, tem sido largamente utilizada para determinações de degradabilidade devido a sua relativa facilidade e baixo custo de execução.

O adequado conhecimento dos alimentos e suas interações tornam-se cada vez mais imprescindíveis para que se atinja uma alta produtividade do rebanho, uma vez que essas características têm severa influência sobre o consumo e o aproveitamento dos nutrientes pelo animal e conseqüentemente sobre o desempenho produtivo deste.

O experimento dessa dissertação visou estimar esses efeitos através da metodologia “in situ” da digestão da MS e FDN dos alimentos. A expectativa era que houvesse interação entre os alimentos dentro dos sacos incubados e com isso, a degradabilidade dos alimentos misturados fosse diferente a da soma proporcional da degradabilidade individual de cada ingrediente. Além da digestibilidade da Matéria Seca, que avalia a degradação como um todo, avaliou-se a degradação da Fibra em Detergente Neutro pois essa é a fração de relação mais direta com o funcionamento ruminal e a mais influente no consumo voluntário de alimentos pelo animal. O aproveitamento dessa fração é diretamente dependente da degradação pelos microorganismos ruminais.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Suplementação da alimentação de bovinos e os Efeitos Associativos**

A ação fermentativa da flora ruminal confunde, muitas vezes, a predição do desempenho dos animais a partir da composição da dieta. Os progressos obtidos na nutrição de ruminantes são, muitas vezes, baseados em determinações empíricas que desconsideram as interações entre os microorganismos ruminais (Malafaia, 1997).

Volumosos e concentrados têm características bastante diferenciadas, com diferentes proporções de nutrientes e de frações com maior ou menor solubilidade e por isso têm um padrão fermentativo diferenciado no rúmen. Produzem diferentes produtos a partir de diferentes substratos, modificando condições como pH ruminal e proporção entre as diversas espécies de microorganismos. Quando se utiliza a mistura de concentrados e volumosos numa dieta de ruminantes, ocorrem interações entre os alimentos e entre as frações do mesmo no rúmen, originando variações que findam por modificar o consumo e a digestibilidade dos alimentos. Estas interações podem alterar a performance dos animais que consomem uma mistura em relação ao que seria esperado pelo somatório do consumo individual desses alimentos.

Os efeitos associativos são verificados quando a digestibilidade

aparente de uma mistura de alimentos não é igual a soma das digestibilidades dos seus componentes determinados separadamente (Mould, 1988; Van Soest, 1994). Segundo Moe (1979), citado por Hart (1987), o termo efeito associativo descreve uma resposta não linear na utilização de nutrientes quando dois alimentos são misturados.

Os efeitos associativos ocorrem geralmente devido à inclusão de grãos em uma dieta a base de forrageiras, mas há relatos de ocorrência pela ação das forrageiras no consumo voluntário de grãos (Dixon & Stockdale, 1999). A descrição desses efeitos ocorre desde o final do século 19, quando foi documentada a redução na digestibilidade de um feno na presença de amido na dieta (Mould, 1988). Nos primeiros estudos de digestibilidade ruminal foi percebido que a digestibilidade de volumosos grosseiros era reduzida na presença de amido ou de alimentos amiláceos (Burroughs et al., 1950).

Apesar de serem estudados há bastante tempo, os efeitos associativos ainda não são quantificados de forma precisa. Dessa forma, ainda há a procura por métodos precisos, simples e rápidos para estimar a qualidade dos alimentos e os efeitos das interações entre alimentos misturados no rúmen. Segundo Moore & Kunkle (1999), os efeitos associativos devem ser incluídos nos modelos nutricionais.

### **2.1.1 Tipos de Efeitos Associativos**

Os efeitos podem ser benéficos ou prejudiciais ao desempenho dos animais. São considerados positivos, quando o consumo de energia é maior que o esperado, e negativos quando o consumo de energia é menor que o

esperado (Dixon & Stockdale, 1999). Na verdade, os efeitos podem ser considerados positivos quando há um aumento no consumo e/ou aproveitamento do alimento. Da mesma forma, quando há uma redução do aproveitamento e consumo, o efeito é considerado negativo.

Com relação ao consumo, são descritos na literatura os seguintes tipos de efeitos associativos: efeito aditivo, quando o consumo de suplemento se soma ao do volumoso; efeito substitutivo, caracterizado pela redução do consumo de forrageiras devido ao consumo de concentrado, sem melhorar a performance. Quando os dois efeitos supracitados ocorrem simultaneamente, classifica-se efeito como aditivo substitutivo. Existe, ainda, o efeito aditivo com estímulo, em que o consumo de suplemento estimula a ingestão de forrageiras e, por fim, o efeito substitutivo com depressão, quando o suplemento tem menor valor nutritivo do que o volumoso.

Com relação à digestibilidade, até por uma questão de complexidade na diferenciação de qual alimento foi beneficiado ou prejudicado na mistura, acaba-se classificando mais comumente em efeitos positivos, quando há o aumento na degradabilidade da mistura, e negativo quando há redução da degradabilidade da mistura ou de uma fração da mesma.

### **2.1.2 Incidência de Efeitos Associativos**

A incidência de efeitos associativos é determinada por diversas causas conforme a interação entre os alimentos e suas respectivas frações bromatológicas dentro do rúmen, como disponibilidade de energia e nutrientes, principalmente o nitrogênio, bem como da formação de diferentes produtos de

fermentação. O rendimento microbiano é determinado primariamente pela taxa de crescimento que o carboidrato permite e existem poucos dados a respeito da disponibilidade ruminal de carboidratos (Nocek & Russell, 1988). Estudos mostram alta correlação entre consumo de MS com a taxa de digestão dos carboidratos do conteúdo celular e principalmente da parede celular (FDN).

Diversos estudos têm mostrado a ocorrência de benefícios ou prejuízos ao aproveitamento dos alimentos. Joanning et al. (1981) verificaram redução da digestibilidade da MS em 11 pontos percentuais, em dietas de silagem de milho suplementadas com milho em grão. Mould et al. (1983) verificaram, em ovinos, com feno associado à cevada em diversas formas de processamento e diversas proporções, valores de digestibilidade in vivo da MS e da MO diferentes dos estimados a partir de sua degradabilidade isolada. Stumpf Junior & López (1994) verificaram redução no desaparecimento “in situ” da parede celular de feno de capim elefante quando havia suplementação com níveis crescentes de grão de sorgo moído (0, 15, 30 e 45%).

#### 2.1.2.1 Efeitos Associativos Positivos

Para que ocorram os efeitos associativos positivos, a suplementação deve melhorar o meio ruminal para a degradação da celulose (Mould, 1988) sendo mais freqüente quando é adicionado um concentrado a uma forrageira, principalmente quando ocorre a suplementação de energia ou de um nutriente limitante. Outro aspecto que deve ser considerado, pois pode produzir benefícios ao funcionamento ruminal, é a sincronização de liberação e o equilíbrio proporcional entre energia e nitrogênio presente no rúmen.

Se há deficiência na utilização do nitrogênio, pode haver redução da digestibilidade dos carboidratos e se houver carboidrato insuficiente parte da proteína degradada é perdida na forma de amônia (Nocek & Russell, 1988). Dessa forma, a sincronização da liberação de nitrogênio e energia pode tornar-se um importante fator para a otimização do funcionamento ruminal.

Sinclair et al. (1992) concluíram que a sincronização do suprimento de nitrogênio e de energia aos microorganismos pode aumentar a síntese de proteína microbiana no rúmen. No entanto, os resultados de um experimento de Henning et al. (1993) sugerem que a simples melhoria na sincronização da liberação de nitrogênio e energia não é suficiente para aumentar o rendimento microbiano, sendo necessário primeiro alcançar o maior padrão de energia dietética possível e, a partir disso, fornecer nitrogênio suficiente para o total de energia fornecida.

Günthrie & Wagner (1988) encontraram diferença entre as digestibilidades in vivo da MS obtida e estimada com a adição de farelo de soja à forragem, sendo este efeito maior com inclusões de 241 a 603 g MS/dia, para animais com 219 kg de média que tinham acesso livre a feno de campo nativo, mostrando efeito associativo positivo com a suplementação protéica em feno de campo nativo.

Hart (1987) testou a adição de grãos de sorgo em dieta de silagem de sorgo e verificou que a inclusão de 15 e 30% de grãos aumentou a digestibilidade e o consumo de MS digestível da dieta, enquanto que níveis mais altos (45 e 60% de grãos) não causaram essa melhoria no desempenho. Houve aumento na digestibilidade da MS e FDN, mas não na digestibilidade do

amido, PB e hemicelulose.

Moore & Kunkle (1999) fizeram um levantamento de trabalhos onde se estudou a interação entre volumosos e concentrados e verificaram que na maioria dos casos onde houve a suplementação houve aumento no ganho de peso diário, sem que esse ganho fosse diretamente relacionado com a quantidade de NDT consumido. O consumo da forragem foi aumentado pelo suplemento quando havia déficit de nitrogênio em relação à energia disponível (relação NDT:PB maior do que 7). As melhores respostas foram observadas quando foram incluídos nos suplementos altos teores de proteína ou NNP.

#### 2.1.2.2 Efeitos Associativos Negativos

Os efeitos associativos negativos estão diretamente relacionados a perdas na eficiência fermentativa, sendo mais freqüentes nos casos em que os alimentos concentrados estão em grande proporção na dieta (Ospina, 1990) ou então quando há redução de uma fração do alimento devido à presença abundante de outras frações mais solúveis (Joanning et al., 1981).

Woody et al. (1983) mostraram que dietas de silagem de milho contendo 30 a 70% de grão de milho apresentavam ganho de energia líquida 8,9% menor do que o estimado através da combinação dos valores da silagem e do grão isolados.

El-Shazly et al. (1961) propuseram algumas teorias para explicar a freqüente redução da degradabilidade da celulose na presença de amido. Segundo esses autores, a menor degradabilidade da celulose e alguns dos demais efeitos poderia ocorrer basicamente por quatro motivos:

A primeira causa seria a formação de substâncias inibidoras para a digestão da celulose, pelas bactérias amilolíticas.

A teoria mais bem fundamentada parece ser a da competição por nutrientes essenciais entre bactérias amilolíticas e celulolíticas, principalmente nitrogênio, e quando há um aumento na oferta de amido no rúmen as bactérias amilolíticas ficam beneficiadas em relação às celulolíticas, pois o amido é fermentado muito mais rapidamente que as fibras (Dixon & Stockdale, 1999).

Isso explica porque o efeito de inibição é maior quando se utiliza forragem de baixa qualidade do que quando se usa volumoso de melhor qualidade (Burroughs et al., 1950).

Segundo El-Shazly et al. (1961), a competição entre os diferentes grupos de bactéria é o principal motivo para a inibição da degradação de celulose na presença de amido em abundância na ração de ruminantes.

A competição causaria ainda uma quarta causa dos efeitos associativos que é a predominância na quantidade de microorganismos amilolíticos em relação às bactérias que digerem a celulose, devido ao fornecimento de uma dieta com alto teor de amido. Isso foi comprovado por Mould (1983) que observou uma redução nas bactérias celulolíticas de  $10^6$  para  $10^4$  microorganismos celulolíticos/ ml de líquido de rúmen, com a substituição de uma dieta a base de volumoso (100%) por concentrado (cevada 100%). Porém, isso não pode ser aceito como uma causa determinante isoladamente, pois quando se incubou, no mesmo inóculo (mesmo líquido ruminal), amostras de forragem isolada e misturada com concentrados, a amostra com forragem isolada tem degradação normal da celulose, mesmo

que a dieta do animal doador tenha considerável teor de amido.

Outro aspecto, segundo El-Shazly (1961), que seria causador de efeitos associativos seria a redução de pH pela fermentação do amido e com isso a fermentação da celulose seria prejudicada, mas, experimentos com pH controlado (estável) também obtiveram redução da celulólise, o que definiria que o pH reduzido seria forte influência mas não a causa determinante da redução.

A bibliografia mostra resultados controversos a respeito da importância da redução de pH na ocorrência de efeitos associativos. Mould et al. (1983) verificaram que o pH abaixo de 6 inibe completamente a celulólise e que ocorreu uma redução quase total na inibição da taxa de degradação da MS quando o pH foi equilibrado em torno de 6,7. Os autores concluíram que para que não haja redução de degradabilidade de forragens deve-se evitar que o pH chegue abaixo de 6,1, evitando ou reduzindo os efeitos associativos negativos.

No entanto trabalho de Mertens & Loften (1980) mostra que a redução na degradabilidade da FDN com a adição de amido, ocorre mesmo se mantendo o pH das incubações constante a 6,8, mostrando que a redução da degradabilidade da parede celular deve ser limitada também por outros fatores.

Moore & Kunkle (1999) verificaram que o consumo de forragem é normalmente reduzido pela suplementação, especialmente se essa representa mais de 0,7% do PV e quando a forragem tem adequado teor de proteína em relação à energia disponível. Sempre que o consumo de NDT suplementar foi maior do que 0,7% do PV, o NDT observado foi menor do que o esperado. O que indica que com altas inclusões de concentrado na dieta há perturbações

ruminais que prejudicam a fermentação normal, reduzindo o aproveitamento do alimento.

### **2.1.3 Características físicas dos alimentos que influenciam a ocorrência de efeitos associativos**

Processamentos como moagem e peletização, por exemplo, tendem a tornar os carboidratos ainda mais expostos ao ataque microbiano com maior e mais rápida produção de ácidos graxos. Mould et al. (1983) testaram a inclusão de 25, 50, 75 e 100%, de cevada na dieta nas formas inteira, inteira e peletizada, moída e peletizada. A forma moída e peletizada apresentou menor pH ruminal. O maior pH foi verificado com a forma inteira.

A redução no tamanho das partículas de um volumoso diminui o tempo de retenção do alimento no rúmen e, portanto, diminui a digestibilidade. O reduzido período de ruminação faz com que o pH ruminal diminua e haja maior taxa de passagem. Dessa forma, a adição de concentrados a volumosos moídos não causa um efeito considerável sobre a celulólise (Mould, 1988).

A qualidade do volumoso usado na alimentação influencia na intensidade do efeito associativo que poderá ocorrer quando da adição de um suplemento concentrado (Mould et al., 1983). Alimentos volumosos que estimulam mais a ruminação e a salivação tendem a ter a sua digestibilidade menos afetada do que volumosos considerados de melhor qualidade, menos lignificados, uma vez que a maior salivação garante melhor tamponamento do ambiente, reduzindo as variações no pH. Portanto, a conservação do pH ruminal na sua faixa ótima de funcionamento é influenciada pelas

características dos ingredientes, pela composição nutricional, forma de oferecimento, tratamentos anteriores e suas inter-relações. A manutenção do pH é um dos principais fatores para a ocorrência de efeitos associativos.

## **2.2 Metodologias para estimativa de efeitos associativos**

Existe ainda muita dificuldade para se quantificar os efeitos associativos entre alimentos (Moore & Kunkle, 1999). No entanto, inúmeras metodologias têm sido estudadas, testadas e utilizadas para identificar e quantificar esses efeitos.

Grande parte delas são complicadas, dispendiosas e combinam duas ou mais técnicas de pesquisa. As metodologias mais utilizadas no estudo dos efeitos associativos são as determinações de digestibilidade “in vivo” (Joanning et al. , 1981) e consumo (Günthrie & Wagner, 1988) entre outros. O método da digestibilidade “in situ” foi utilizado como auxiliar para a elucidação dos fenômenos ocorridos no rúmen quando da ocorrência de efeitos associativos (Mould & Orskov, 1983; Hart, 1987). Prasad et. al. (1994), Rosales et al. (1998) e Freitas (2001) lançaram mão da técnica “in vitro” de medição da produção de gás, para medição dos efeitos associativos.

Como não há uma metodologia padrão adequada para esta determinação, ainda se procura métodos mais eficazes e de fácil uso para estimar a qualidade dos alimentos para ruminantes e suas interações.

### **2.2.1 A técnica de digestibilidade “in vivo”**

A digestibilidade “in vivo” parece ser a técnica mais adequada para a avaliação dos alimentos, pois fornece os resultados do que realmente ocorre

no organismo animal e dá uma idéia mais próxima dos resultados obtidos na aplicação prática. Porém, essa técnica esbarra no alto custo, necessidade de infra-estrutura (gaiolas metabólicas, animais, grande quantidade de alimento, etc), alta mão de obra, além de ser um processo demorado e portanto de difícil aplicação em rotina.

As metodologias como “in situ” e “in vitro”, buscam usualmente obter resultados mais próximos dos obtidos “in vivo” porém sendo mais baratas, rápidas e menos trabalhosas. Outra limitação da técnica “in vivo” é que essa medida estima unicamente a degradabilidade do alimento no trato digestivo total sendo impossível estimar a degradabilidade ruminal ou intestinal isoladamente. Dessa forma, uma dieta mudar o local de digestão de um alimento e isso pode não ser percebido através dessa técnica.

Joanning et al. (1981) utilizaram medida de degradabilidade “in vivo” através do fornecimento de diferentes misturas de alimentos por um período de adaptação de 21 dias e um período de coleta fecal e de urina de 7 dias. Nesse experimento foi possível identificar forte efeito associativo negativo entre silagem de milho e grão de milho, na proporção de 1:2, respectivamente, pois foi verificada redução na digestibilidade de todos os nutrientes dessas misturas. Nos alimentos isolados, a digestibilidade do amido variou de 97 a 98%, enquanto que nas misturas a digestibilidade do amido ficou em 86%, a FDN e FDA também foram afetadas pela mistura.

### **2.2.2 Avaliação do consumo de alimentos**

Os efeitos associativos têm importante efeito sobre o consumo voluntário de alimentos pelos animais. Experimentos “in vivo” de consumo têm

sido conduzidos como no trabalho de Günthrie & Wagner (1988) a fim de estimar o impacto da suplementação no consumo. Esse tipo de experimento, como os demais experimentos “in vivo” , tem como principais desvantagens o alto custo, necessidade de grande mão de obra e infra-estrutura e o fato de o resultado só ser obtido após a utilização do alimento. No entanto, apresenta os resultados reais, mais aplicáveis a realidade.

Os autores citados anteriormente, realizaram experimento onde alimentavam os animais com feno de campo nativo e forneceram diariamente suplementos com alta proteína, baixa proteína e um baseado em grãos. Eles verificaram aumento na digestibilidade das dietas suplementadas em relação a dieta controle e o consumo de feno foi aumentado ( $p > 0,01$ ). Em um segundo experimento, eles suplementaram o feno de campo nativo com níveis crescentes de farelo de soja e obtiveram crescimento quadrático da digestibilidade e consumo com o aumento da concentração de farelo de soja na mistura.

Mould & Orskov (1983) mediram o consumo de animais recebendo feno com adição de 0, 25, 50, 75 e 100% de cevada, através de pesagem do alimento oferecido e das sobras e verificaram apenas uma pequena redução do consumo nas dietas contendo 100% de cevada (média de 45 g MS/kg<sup>0,75</sup>) em relação às demais (média de 51 g MS/kg<sup>0,75</sup>).

### **2.2.3 A técnica de digestibilidade “in vitro” de produção de gás**

Givens & Gill (1998) relatam que com o avanço das leis de proteção ao bem estar animal e campanhas contra a utilização de animais em

experimentos, as técnicas “in vitro” parecem ser as que devem tomar mais impulso no futuro. No entanto, essas técnicas terão que ser utilizadas em conjunto com modelos matemáticos testados a fim de garantir significado aplicável para os resultados obtidos. As principais preocupações para se evoluir nas técnicas “in vitro” são o efeito da estrutura física do alimento e principalmente, determinar não apenas um valor nutricional, mas o porquê o alimento tem esse valor.

Menke & Steingass (1988) descrevem a técnica “in vitro” de produção de gás onde se mede a dinâmica da fermentação por uma taxa constante de produção de gás a partir de um alimento incubado num inóculo ruminal. Blummel & Orskov (1993) compararam resultados obtidos na técnica de produção de gás com os obtidos na técnica “in situ” e verificaram resultados semelhantes nas duas técnicas.

Rosales et al. (1998) utilizaram a metodologia “in vitro” de produção de gás para medir a digestibilidade de misturas de folhas de diferentes forragens tropicais a fim de estimar a existência de efeito associativo entre elas. Foram comparados os valores obtidos com misturas das diversas forragens na proporção 50:50 com o valor calculado a partir de sua incubação isolada. Nesse experimento, os autores verificaram a ocorrência de efeitos associativos variável conforme o nível de nitrogênio fornecido e com o tempo de incubação. Wood et al. (1998) também utilizaram a técnica de produção de gás para identificação de efeitos associativos entre palha de trigo suplementada com alfafa ou gramínea seca sob alta temperatura, utilizando meios de fermentação rico e ausente em nitrogênio e verificaram a ocorrência

de interação entre os alimentos somente nas amostras incubadas em ambiente pobre em nitrogênio, possivelmente devido ao nitrogênio fornecido pelo suplementos (alfafa e gramínea seca sob alta temperatura).

Freitas (2001) testou a técnica “in vitro” de produção de gás e apesar de conseguir demonstrar a ocorrência de efeitos associativos em algumas amostras conclui que a técnica ainda requer maiores estudos para que seja plenamente confiável pois apresentou resultados diferentes aos observados em outros métodos.

#### **2.2.4 A técnica de digestibilidade “in situ”**

A técnica "in situ" é largamente utilizada e é baseada na incubação de alimentos no rúmen através de uma fístula em animais cirurgicamente preparados. Os alimentos são pesados em sacos confeccionados com materiais indigestíveis e após a incubação, são lavados, secos e pesados e é medido o desaparecimento da amostra através do cálculo da diferença entre os pesos inicial e final. A análise bromatológica da amostra a ser incubada e do resíduo possibilita determinar quanto de cada nutriente ou fração foi digerido pela flora ruminal.

Essa técnica é uma das alternativas mais baratas para a estimativa da degradabilidade dos alimentos e, através da mesma, é possível se realizar um estudo da cinética de fermentação e estimar o consumo de alimentos pelos animais. A técnica é capaz de estimar informação rápida, anterior ao uso do alimento o que não é conseguido com técnicas “in vivo”. Os custos da técnica são estimados em dez vezes menores que os custos das técnicas “in vivo” e

vinte vezes menor que os custos de estudos de medidas de calorimetria através de câmara respiratória (Orskov, 2000). Mould & Orskov (1983) utilizaram a medida de degradabilidade “in situ” para auxiliar na discussão de efeitos associativos provocados pelo fornecimento de dieta com suplementos energéticos.

Nos sacos de incubação, o contato entre a amostra incubada e o meio ruminal é limitado pela área de superfície dos sacos (Lindberg et al. 1984), bem como pelo tamanho dos poros, causando maior acidificação do ambiente dentro dos sacos do que no rúmen. Isso pode ser devido ao acúmulo de ácidos graxos voláteis dentro dos sacos (Marinucci et al. 1992). A população microbiana dentro do saco difere da população encontrada no rúmen, principalmente a população de bactérias celulolíticas (Meyer & Mackie, 1986), mesmo quando os poros do saco são grandes o suficiente para o influxo de protozoários. A atividade dos microorganismos fibrolíticos é menor na amostra contida no saco do que no rúmen (Noziere & Michalet-Doreau, 2000). Essas diferenças podem ser explicadas, entre outros fatores, pelas condições a que o alimento é submetido dentro do saco.

Dessa forma, caso fosse possível se estimar através de misturas diretamente nos sacos e que nesses houvesse uma interação local, parece que a técnica acabaria sendo bem mais rápida e barata.

Orskov (2000) relata ainda que os estudos de ambiente ruminal, como efeitos associativos, através da técnica “in situ”, devem se basear na taxa de degradação constante C, uma vez que a fração solúvel (A) é muito pouco influenciada pelo ambiente ruminal e que a fração (B) forma uma curva

assintótica de potencial de degradabilidade e que esse irá ser atingido de qualquer forma, desde que haja tempo hábil para isso. O estudo de cinética de degradação não aumentaria muito o tempo de determinação da degradabilidade mas aumentaria os custos para uma análise de rotina.

A técnica “in situ” pode vir a se tornar uma alternativa para a estimativa de efeitos associativos. De acordo com Poore et al. (1990), a redução da degradabilidade ruminal da FDN na presença de carboidratos rapidamente fermentáveis, pode não causar alterações no resultado obtido através da técnica “in vivo”, pois pode ocorrer aumento na digestão pós-ruminal da fibra (Brink & Steele, 1985). Orskov & Ryle (1990) sugerem que a técnica “in situ” pode ser uma importante ferramenta para o estudo de efeitos associativos na degradabilidade dos alimentos.

Assim como outros métodos laboratoriais, esse método de avaliação da digestibilidade tem diversas fontes de variação causadas principalmente pela falta de padronização dos procedimentos envolvidos nessa técnica. Essas variações são bastante discutidas nas revisões de Nocek (1988) e de Huntington & Givens (1995; 1997), entre outros. Aspectos relacionados com o saco de incubação como o tipo de material utilizado nos sacos e sua porosidade, tamanho do saco; relacionados como a preparação da amostra, como secagem e moagem e ainda valores que integram os dois itens como a relação tamanho do saco: tamanho da amostra, influenciam fortemente os resultados de degradabilidade. Ainda devem ser considerados: a dieta e a espécie do animal hospedeiro e ainda a variação individual do animal e variação dos períodos.

#### 2.2.4.1 Dieta do animal fistulado

A relação volumoso:concentrado é uma das principais características da dieta a ser controlada, pois altos teores de concentrado tendem a apresentar maior quantidade de carboidratos rapidamente solúveis, o que favorece o crescimento de bactérias amilolíticas, a produção de ácido acético e também láctico, e tende a causar redução do pH ruminal. Dietas com maior teor de volumoso, favorecem as bactérias celulolíticas, causam uma menor taxa de passagem e pH mais próximo da neutralidade.

Segundo Huntington & Givens (1995), a dieta fornecida ao animal pode afetar a degradabilidade "in situ" de um alimento através dos efeitos que provoca no ecossistema ruminal, dos efeitos físicos dessa dieta, do fornecimento de nitrogênio e do efeito da fonte dietética de carboidratos.

Existe uma variação no número de bactérias ruminais no dia a dia. Wilson e Briggs (1955) verificaram que apesar de não modificar a contagem total de microorganismos ruminais, a modificação da dieta pode favorecer uma espécie de bactérias em detrimento de outras. Os autores observaram que essa variação ocorria tanto com grandes como com sutis mudanças na dieta.

Para aplicação da técnica in situ, deve-se verificar se a alteração da flora ocorre de forma idêntica dentro dos sacos de incubação pois há relatos como o de Meyer & Mackie (1986) que mostraram haver diferença entre a população encontrada no rúmen e a encontrada dentro dos sacos de incubação. Esses autores verificaram interação entre a população bacteriana e o tipo de amostra incubada. Em seu experimento, eles verificaram menor concentração de bactérias proteolíticas após 16 horas de incubação em sacos

que continham farinha de peixe do que nos sacos que continham amostras de milho em grão e relacionaram isso a um suprimento inadequado de carboidratos da farinha de peixe para suprir as exigências nutricionais das bactérias.

Um aspecto ainda discutível e pouco estudado é o efeito da dieta em contato com os sacos de incubação que poderiam favorecer a formação de limo na presença de grande quantidade de carboidratos rapidamente fermentáveis, que bloqueariam os poros dos sacos de incubação. Da mesma forma dieta fibrosa poderia ter uma ação abrasiva sobre os sacos aumentando a degradabilidade medida. Esse aspecto foi discutido por Marinucci et al. (1992) e Weakley et al. (1983) .

O atendimento das exigências de nitrogênio das bactérias ruminais é outro aspecto que pode influenciar o resultado da medição da degradabilidade “in situ”. Mehrez e Orskov (1977) sugerem um mínimo de 230 mg de N por litro de líquido ruminal a fim otimizar a degradabilidade “in situ”. O aumento da concentração de N ruminal de 85 para 188 mg/litro causou aumento na taxa de degradação da cevada em experimento de Wallace (1979). No entanto, Ortega et al. (1984) não verificaram modificação da degradabilidade em amostras de farelo de soja, feno de alafa, palha de aveia ou milho com o aumento da concentração de N amoniacal de 48 para 173 mg/litro no rúmen.

Por fim, um dos principais aspectos que podem influenciar o resultado obtido na degradabilidade “in situ” dos alimentos é fonte de carboidratos ou a interação entre os alimentos no rúmen. Ganev et al. (1979) encontraram redução da degradabilidade “in situ” da MS com o aumento da

proporção de concentrados na dieta e sugeriram que amostras com alto teor de FDN são mais susceptíveis a esse efeito. Chademana e Offer (1990) usaram dietas contendo 10, 35 e 65% de concentrado e verificaram que a degradabilidade “in situ” do feno é inversa à proporção de concentrado na dieta, assim como o pH ruminal. No entanto, Figroid et al. (1983) não encontraram diferença significativa na degradabilidade da MS com o aumento no teor de milho na dieta. Weakley et al. (1983) testaram o efeito da proporção de concentrado (milho + farelo de soja) na dieta de alfafa (25, 40, 60 e 80%) e verificaram diferença apenas nas diluições de 25 e 80% de alfafa para degradabilidade do nitrogênio enquanto que a mesma medida da MS só apresentou diferença da proporção de 25% alfafa contra as demais.

Berchielli et al. (1996) testaram a influência na degradabilidade “in situ” da MS de feno de capim coast-cross e milho de diferentes proporções volumoso:concentrado na dieta recebida pelo animal (80:20, 60:40 e 40:60). Em nenhum parâmetro avaliado em nenhum período de incubação foi verificado efeito significativo da variação da dieta na degradabilidade dos alimentos. Esse resultado é semelhante ao obtido por Vilella (1994).

Carey et al. (1993) não verificaram alteração na degradação “in situ” da FDN através da inclusão de níveis moderados de concentrados na dieta, enquanto que, Pordomingo et al. (1991) verificaram que essa inclusão poderia causar benefícios na degradabilidade “in situ” da MO.

Os efeitos da inclusão de carboidratos na dieta na degradabilidade “in situ” são inconsistentes e sugerem que os efeitos provocados pelas diversas fontes de carboidratos são bastante complexos, devido à ocorrência de

interação entre os CRF e os carboidratos estruturais. Por causa disso, pode ser polemizado que a técnica “in situ” pode ser mais susceptível a trocas na composição da dieta e cuidados devem ser tomados para garantir que a degradabilidade de um alimento em uma dieta específica tenha significado coerente.

Huntington & Givens (1995) listam uma série de trabalhos “in situ” onde a maioria dos trabalhos utilizou como dieta basal volumosos puros ou com a adição de um pequena fração de concentrado. Nocek (1988) mostra ser importante que a dieta atinja as exigências nutricionais da flora ruminal e recomenda uma dieta basal contendo uma pequena quantidade de todos os ingredientes a fim de estabelecer uma população microbiana variada.

No entanto, o fornecimento de dieta idêntica ao alimento fornecido ou a indução do efeito associativo no rúmen como um todo, conforme sugerido por Ganev et al. (1979), Orskov (2000) e Chademana e Offer (1990), torna a técnica até certo ponto, inviável para o uso em rotina, uma vez que elevaria os custos, mas principalmente aumentaria tremendamente o tempo necessário para avaliação dos alimentos uma vez que seria necessário dispor não só de amostras pequenas mas de alimento em quantidade suficiente para o fornecimento ao animal e ainda seria necessário um período de adaptação do rúmen a essa nova dieta.

#### 2.2.4.2 Tecido utilizado para a confecção dos sacos de incubação

O tecido utilizado para a confecção dos sacos é um dos principais fatores para variação na técnica “in situ”, pois a porosidade e o tipo de

filamento que constituem esse tecido têm influência direta na permeabilidade aos microorganismos e substratos. Atualmente são descritos mais freqüentemente o uso de dácron, náilon e poliéster na confecção dos sacos de incubação, embora o que pareça ser mais importante é se o tecido é formado por fibras mono ou multifilamentosas (Huntington & Givens, 1995). Ferrari & Prates (1997) testaram sacos de tafetá de náilon e sacos de tela de náilon com tamanho de 17 x 9 cm em até 48 horas de incubação. Os dados obtidos com o tafetá de náilon não foram coerentes mostrando haver retenção de algum contaminante.

A porosidade do tecido parece ser a principal característica a ser considerada na técnica "in situ". Segundo Huntington & Givens (1995), a porosidade deve ser suficiente para permitir o influxo de microorganismos e tampões e permitir a saída dos produtos de fermentação, sem permitir a perda de material não degradado. Parece existir uma tendência de superestimação da degradabilidade a medida que os poros do saco são maiores.

Poros muito pequenos tendem a limitar ou impedir a entrada de microorganismos maiores como fungos e protozoários. Em estudo de Lindberg & Varvikko(1985), sacos com poros de 40  $\mu\text{m}$  apresentaram maior diversidade de colonização do que sacos com poros de 20  $\mu\text{m}$ .

Weakley et ali (1983) compararam tecidos com 5  $\mu\text{m}$  e com 52  $\mu\text{m}$  usando amostras de farelo de soja e de grãos de destilarias e verificaram maior desaparecimento da MS e Nitrogênio, nos sacos de maior porosidade e ainda verificaram que esse efeito se estabelecia desde a primeira hora de incubação.

Lindberg & Varvikko (1982), relataram maior desaparecimento da

matéria seca usando sacos de tecidos com poros de 36  $\mu\text{m}$  seguido pelos sacos com poros de 20  $\mu\text{m}$  e de 10  $\mu\text{m}$ . Nocek (1988) considera uma porosidade entre 40 - 60  $\mu\text{m}$  como um bom tamanho de poro a ser recomendado, embora se encontre na literatura indicações que variam de 20 a 100  $\mu\text{m}$ . No mesmo trabalho, o autor relata diversos experimentos utilizando várias dimensões de sacos. Não se credita grande importância a essa variação, sendo mais importante do que o tamanho do saco, a relação entre o tamanho do saco e da amostra que este contém. O autor define como relação ideal 10 a 20 mg de amostra por centímetro quadrado de superfície de saco.

#### 2.2.4.3 Tamanho da amostra

O tamanho da amostra é outro aspecto que ainda carece de padronização nessa técnica. São encontradas na bibliografia diversas indicações do tamanho ideal de amostra. O tamanho da amostra deve primeiramente ser estimado a fim de que o resíduo seja suficiente para que sejam realizadas análises subseqüentes que forem desejadas, sem que o saco de incubação torne-se muito cheio a ponto de aumentar o tempo de colonização e de prejudicar a fermentação do substrato incubado (Nocek, 1988).

Varga & Hoover (1983) mostraram que para períodos de incubação superiores a 30 horas, amostras de 5 g não produziram resíduos suficientes para se proceder análise de MS e FDN em alguns ingredientes e forragens.

Na verdade, o tamanho da amostra não é medido isoladamente e sim através de sua relação com a área de superfície do saco conforme

discutido no item anterior. As indicações variam basicamente entre 1 e 5 mg/cm<sup>2</sup>, mas são encontrados relatos de até 20 mg/cm<sup>2</sup>, como em Ehle et al. (1982). Nocek (1988) recomendou usar uma relação entre 10 - 20 mg/cm<sup>2</sup> para ser usado em experimentos de avaliação de forragens e concentrados.

Uden & Van Soest (1984) mostraram redução do desaparecimento da MS de 54% para 38% com o aumento da quantidade de amostra de 6,5 para 50 mg/cm<sup>2</sup>. Isso ocorre pois há menor área de superfície, prejudicando a colonização do alimento pelos microorganismos e subestimando a taxa de digestão (Nocek, 1988).

Nocek (1985) mediu o desaparecimento do nitrogênio do farelo de soja utilizando diferentes relações de tamanho de amostra com a área de superfície do saco e a relação de 12,6 mg/cm<sup>2</sup> apresentou resultados mais próximos dos encontrados em experimentos que utilizaram a técnica "in vivo".

Concentrados têm maior densidade e potencial de aglutinação do que as forragens e por isso um excesso de amostra por área de saco é mais prejudicial na análise desses materiais.

#### 2.2.4.4 Preparação da amostra a ser incubada

O processo de secagem das amostras pode influenciar a degradabilidade das mesmas. Normalmente as amostras são secas em estufa de ar forçado a 60 – 70 °C, mas já foram testados o congelamento e o uso de microondas para a secagem de amostras (Smith et al. 1972).

O tamanho de partícula é outro aspecto importante para a degradabilidade uma vez que determina a superfície de ataque para os

microorganismos e influencia diretamente o tempo de colonização do alimento. Discute-se se a amostra dentro do saco deveria mimetizar o tamanho de partícula após a mastigação, ou reproduzir o tamanho de como o alimento é fornecido ao animal (Orskov et al., 1980; Nocek, 1988). Embora não haja uma conclusão de consenso na bibliografia, alimentos moídos mais grosseiramente estão sujeitos a maior variação e tem menor degradabilidade, mas quando muito moídos os alimentos ficam sujeitos a serem perdidos pelos poros do saco.

Esse efeito tende a ser menor em tempos de incubação maiores, como visto por Erwin & Elliston (1959) e por Orskov et. al. (1980). Dessa forma, a redução da área de superfície parece prejudicar a colonização inicial do alimento pelas bactérias ruminais, mas se houver tempo hábil, esse efeito acaba compensado e não há prejuízo na degradação dos alimentos.

O tamanho de partícula descrito na bibliografia, varia entre 1 e 5 mm, normalmente com amostras pré-secas em estufa. Segundo Nocek (1985), o tamanho de partícula deve variar conforme o alimento incubado, sendo recomendado 2 mm para suplementos energéticos e protéicos e 5 mm para grãos inteiros, subprodutos fibrosos e volumosos.

De uma forma geral, os dados mostram que quanto maior é o grau de moagem de uma amostra, maior é a área de superfície, mais fácil fica a colonização microbiana e maior é o desaparecimento da amostra.

#### 2.2.4.5 Procedimentos de Incubação

Durante a execução de um experimento de medida de

degradabilidade “in situ” é realizada uma série de procedimentos que também podem produzir variações no resultado. Entre elas pode-se destacar a seqüência de incubação, a posição do saco dentro do rúmen, a mobilidade, determinada pelos pesos colocados e pelo tamanho da corda de fixação, o processo de lavagem das amostras após a incubação, a contaminação dos sacos, entre outros fatores.

A seqüência de incubação é um fator que já foi estudado como fonte de variação da técnica. Pode-se incubar as amostras agrupadas e retirar cada período em separado ou incubar-se cada período separadamente e retirar as amostras todas juntas. Nocek (1985) relatou menores taxas de degradação no processo de incubação coletiva com retirada isolada das amostras do que na incubação reversa. Entretanto, existem autores, como Teixeira et al. (1997), que relataram não encontrar diferenças entre os procedimentos citados.

O conteúdo ruminal é composto por camadas estratificadas, apesar da constante movimentação ruminal (Van Soest, 1994). A digestibilidade varia dependendo dos locais onde os alimentos se posicionam dentro do rúmen, pois na porção ventral a digestão é maior (Miles, 1951). Dessa forma, a posição de incubação dentro do rúmen deve ser padronizada para que, juntamente com a padronização das dietas, produza resultados com menor variabilidade.

Assim sendo, aspectos que influenciam a mobilidade e o posicionamento dos sacos dentro do rúmen também são importantes na variabilidade dos resultados, por isso, o peso utilizado para que os sacos mantenham-se submersos e o tamanho da corda que prende os sacos podem se tornar importantes. Huntington & Givens (1995) listam uma série de

trabalhos onde os pesos descritos variam entre 150 g e 500 g, embora haja recomendação de até 1 kg. O comprimento da corda de fixação dos sacos variou entre 40 e 70 cm, mas a maioria utilizou cordas com 50 cm. Stritzler et al. (1990) observaram crescimento linear do desaparecimento da MS à medida que se aumentou o comprimento da corda, provavelmente por aumentar a mobilidade dos sacos dentro do rúmen.

Devido ao íntimo contato das amostras incubadas com a flora ruminal, ocorre a contaminação com constituintes dos microorganismos, o que leva a uma redução da degradabilidade aparente (Nocek, 1988).

A contaminação microbiana é mais influente no resultado final em amostras de baixo nível protéico e alto potencial de digestibilidade, enquanto que em alimentos com características inversas a essas a contaminação não tem a mesma importância. Genro & Prates (1997) verificaram aumento considerável na contaminação dos sacos com volumosos após 48 horas de incubação, mostrando que quando se quer estimar a curva de degradabilidade da MS de volumoso, torna-se importante fazer a correção dos dados.

A lavagem dos sacos é outro aspecto que pode causar variação nos resultados obtidos, pois pode ser realizada em máquina de lavar ou manualmente, sendo este método subjetivo. Entretanto, alguns trabalhos mostram pouca ou nenhuma influência da forma de lavagem no resultado de degradabilidade de alimentos (Cherney et al., 1990).

### **2.3 Avaliação da fermentação ruminal através da fibra do alimento**

O teor de FDN é inversamente proporcional à concentração de energia de um alimento (NRC, 2001) e é um indicativo do consumo deste, através da restrição física e química que a FDN exerce, sendo estimado um consumo de 1,2% do peso vivo em FDN (Mertens, 1994).

No entanto, a FDN não é uma entidade química uniforme (Van Soest et al., 1991). Fibra é normalmente o termo usado para designar a parte menos digestível do alimento, representada pela soma de polissacarídeos com ligações glicosídicas, amido resistente e lignina.

A fibra dos alimentos é definida por Van Soest (1994) como a fração do tecido vegetal resistente às enzimas de mamíferos. Segundo Chesson (1986) citado por Grenet, (1991), fibra é o resíduo insolúvel de vegetais volumosos cuja composição varia conforme as condições de sua extração e dos reagentes utilizados.

A fibra pode ser dividida em dois grupos: a fibra insolúvel, formada nos tecidos de sustentação dos vegetais, como os caules, formada pelos componentes da matriz da parede celular (celulose, parte da hemicelulose, lignina, etc); a fibra solúvel é composta por polissacarídeos estruturais hidrossolúveis, como arabinoxilanas, beta-glicanas, pectinas e ainda gomas e mucilagens que em geral são rapidamente disponíveis aos microorganismos ruminais, podendo ser totalmente fermentados (Van Soest et al., 1991). Estes componentes podem aparecer em níveis consideráveis nas dietas a base de grãos de cereais.

Todos os componentes da fração chamada fibra estão distribuídos em quantidades variáveis nos diferentes tecidos das plantas, especialmente nos grãos de cereais (Hoseley, 1990, citado por Picolli, 1997) e variam bastante conforme a espécie, a idade da planta e as condições a que a mesma foi submetida.

Outra dificuldade para utilizar o teor de fibra como estimador de degradabilidade e consumo foi mostrado por Varga e Hoover (1983), quando o conteúdo de FDN foi pouco correlacionado com a sua extensão de digestão. A degradabilidade da FDN, nesse estudo, teve forte correlação positiva com a degradabilidade da MS.

### **2.3.1 Degradação da parede celular pelos microorganismos**

A heterogeneidade dos tecidos vegetais e das paredes celulares em sua composição química e o conseqüente efeito nas propriedades físico-químicas causa uma variação considerável na resistência dos diversos tecidos e plantas ao ataque microbiano (Akin, 1979).

A fermentação da parede celular é um processo relativamente lento e, dessa forma, os microorganismos que exercem essa função no rúmen podem ser carregados pelo fluxo ruminal antes de degradarem a fibra. A fim de evitar isso, esses microorganismos (*Ruminococcus* sp., *Fibrobacter* sp., etc) utilizam o recurso de adesão a planta através de lesões na epiderme da planta ou pelos estômatos da mesma, uma vez que esse fica retido mais tempo no rúmen do que a fase líquida do conteúdo ruminal. A fermentação das partes aéreas das plantas no rúmen só é possível através dessas lesões ou

estômatos.

A primeira barreira à degradação do alimento, principalmente da fibra, é a penetração e adesão do microorganismo ao alimento e dessa forma, a estrutura da fibra influencia a extensão e a taxa de degradação pela microflora, bem como a ligação da lignina com os demais compostos.

Segundo Jung (1989), a taxa e a extensão da degradação microbiana da fração insolúvel da fibra é dependente principalmente do teor de lignina e do seu grau de interação com os outros componentes da parede celular. No entanto, a digestibilidade da parede celular está mais relacionada às características intrínsecas dos seus componentes do que da proporção entre eles (Van Soest, 1994).

As paredes de diferentes tipos de célula têm diferentes composições e são degradadas a diferentes taxas. Os tecidos que contêm apenas a parede celular primária são integralmente degradados em 12 horas de incubação no rúmen e, dessa forma, o que resta após esse período tende a ser a parte mais grossa da parede secundária com alto teor de hemicelulose.

Um trabalho de Grenet & Demarquilly (1987), estudou a evolução da digestão de diferentes frações de alguns tipos de planta: nos caules de gramíneas, o início da degradação ocorreu após 12 horas de incubação e foi completada após 21 horas de incubação. Os tecidos lignificados, como vasos de condução, permaneceram intactos. Nas folhas de gramíneas, o mesófilo foi parcialmente degradado após 12 horas e após 21 horas de incubação foram digeridos a epiderme e o mesófilo, restando apenas a cutícula. Nos caules de leguminosas, a degradação da epiderme e do parênquima se iniciou após seis

horas de incubação e após 12 horas só restou o xilema da planta. Nas folhas de leguminosa, em 3 horas de incubação já restavam apenas os vasos do xilema.

Com esses dados, pode-se verificar que as folhas de leguminosa são as partes da forragem mais rápida e extensamente degradadas no rúmen. O floema parece ser bastante digestível, enquanto que o xilema parece ser praticamente indigestível.

A extensão da degradação ruminal da parede celular depende principalmente do teor de lignificação dos tecidos. Segundo Jarrige (1981), citado por Grenet (1991), a digestibilidade da matéria orgânica de uma forragem é bastante dependente da degradabilidade da parede celular, uma vez que o conteúdo celular é altamente degradável e, dessa forma, varia pouco.

A digestibilidade influencia o aproveitamento e a passagem do alimento pelo rúmen que, por sua vez, tem influência direta no consumo voluntário de alimentos e, portanto, na produção animal.

### **2.3.2 Propriedades físico-químicas da fibra que influenciam a degradabilidade**

Existem algumas características dos alimentos que não podem ser estimadas pela determinação das frações bromatológicas. Algumas propriedades como densidade, capacidade de troca catiônica e tamponante e capacidade de hidratação podem ser muito importantes ou influentes na utilização dos alimentos, ainda mais quando se trata da fibra dos mesmos (Van

Soest, 1994).

Quando um ou mais alimentos são misturados há interação entre eles e algumas dessas características da dieta podem ser modificadas, bem como seus efeitos na degradabilidade (Warpechowski, 1997). Apesar de poder ocorrer interações com efeitos variáveis, ainda há poucos trabalhos a respeito dessas interações entre alimentos misturados (Van Soest et al., 1991).

### **2.3.3 Estimativas da fibra e de sua digestibilidade**

A avaliação do teor de fibra dos alimentos, independentemente da sua disponibilidade e digestibilidade, já envolve uma série de fatores e variações em maior ou menor grau em todas as análises usualmente utilizadas na pesquisa animal.

Os métodos mais utilizados para avaliação de alimentos para animais são a análise de fibra bruta criado por Henneberg e Stohmam em 1865, na estação experimental de Weende e as análises de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) descrito por Goering & Van Soest (1970).

No método de análise de fibra bruta, há solubilização variável da hemicelulose e lignina (Van Soest & Mcqueen, 1973) e, além disso, o método não consegue separar as partes da fibra que são degradadas das que não são degradadas pelos microorganismos ruminais. Dessa forma, o uso dessa análise para a nutrição de ruminantes torna-se pouco significativo para explicar fenômenos digestivos.

No método criado por Goering & Van Soest (1970), existe a

separação da fração do alimento que seria solubilizada no rúmen, restando somente a parede celular através da ação do detergente neutro. A análise com o detergente ácido separa a fração que seria aproveitada pelo animal da que seria perdida nas fezes. Com isso, tem-se uma melhor separação dos compostos insolúveis, porém a parte que foi solubilizada não poderá ser caracterizada.

Na análise com o detergente neutro obtém-se no resíduo a parede celular (lignina, celulose e hemicelulose) e resta ainda alguma contaminação do conteúdo celular (como amido, proteína etc) e minerais. A pectina, embora esteja na parede celular é degradada e, portanto, perdida.

A permanência do amido no resíduo dificulta a filtração do mesmo e provoca aumento no erro analítico, principalmente em amostras que contém alto teor de amido como os concentrados, principalmente o milho. Dessa forma, muitas vezes pode-se lançar mão do uso de amilases a fim de reduzir essa contaminação.

Para se estimar, além da concentração simples de fibra num alimento, a sua disponibilidade e degradabilidade, o processo torna-se ainda mais impreciso, pois a bioquímica da disponibilidade da parede celular não é bem compreendida e não existe uma análise de laboratório que possa isoladamente estimar a degradabilidade de forragens por microorganismos.

Existem técnicas que associam análises de laboratório com experimentos que utilizam enzimas ou bactérias vivas (maior precisão), que fornecem resultados próximos da realidade, mas na verdade, a forma mais completa de avaliar uma dieta é através do fornecimento ao animal com

medições “in vivo”. Essas técnicas têm, no entanto, uma série de dificuldades, basicamente esbarrando em altos custos, grande uso de mão de obra, alto erro experimental.

Os alimentos podem ser divididos em três frações conforme sua disponibilidade (Van Soest, 1994), sendo a fração totalmente disponível representada pelo conteúdo celular que é composto de açúcares, amido, proteína, ácidos orgânicos e lipídios. Essa fração só não é totalmente degradada se a taxa de passagem for mais rápida do que a de degradação.

A segunda fração pode ser considerada a fração parcialmente disponível representada pelos carboidratos estruturais: celulose e hemicelulose. Por fim, tem-se a fração totalmente indisponível representada pela lignina, cutina, produtos de Maillard e tecidos ligados à lignina, como, por exemplo, parte da hemicelulose.

Muitos sistemas de fracionamento consideram as pentoses e o ácido urônico como hemicelulose e as beta-glicosanas obtidas como celulose. Isso pode acarretar em erros, pois as substâncias citadas podem ser encontradas tanto na celulose como na hemicelulose, mesmo que em pequenas proporções em uma delas.

Para ruminantes, o termo fibra indicaria a porção do alimento que tem menor chance de ser utilizada uma vez que passe do rúmen. As proporções de lignina e hemicelulose presentes são os mais importantes fatores de qualidade, mas são fracamente relacionados com o conteúdo de fibra.

Apesar de se verificar muitas etapas nos procedimentos e,

conseqüentemente, muitas fontes de variação nas metodologias da estimativa da fibra e sua degradabilidade, os resultados costumam ser satisfatórios e por isso, são largamente utilizadas.

Quando da ocorrência de influência mútua entre volumosos e concentrados, a alteração da degradabilidade ruminal da fibra é um dos fenômenos mais freqüentemente citadas na literatura (Mertens & Loften, 1980; Poore et al., 1990; Joanning et al., 1981), comprovando a forte dependência da parede celular ao adequado funcionamento ruminal para sua máxima degradação.

A parede celular (FDN) é a fração mais diretamente dependente do funcionamento ruminal para a sua degradação (Armstrong & Smithard, 1979) e, por isso, essa medida tende ser a mais sensível para verificar a ocorrência de fenômenos no rúmen que possam alterar a degradabilidade da parede celular (FDN) dos alimentos e desses como um todo (MS).

O método "in situ" é uma das alternativas para estimativa de degradabilidade ruminal dos alimentos, sendo amplamente utilizado pois permite a estimativa da degradabilidade de cada fração do alimento isoladamente, através da análise bromatológica da amostra inicial e do resíduo de incubação.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de Execução**

O experimento foi realizado no Laboratório de Ensino Zootécnico (LEZO) e no Laboratório de Nutrição Animal (LNA), ambos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de março a outubro de 2002.

#### **3.2 Amostras e Tratamentos**

Foram testados três concentrados: farelo de arroz integral (*Oryza sativa*), milho integral moído (*Zea mays*) e farelo de soja tostado (*Glycine max*); um volumoso: feno de capim Coast-Cross (*Cynodon dactylon*).

As incubações foram realizadas com as seguintes amostras (misturas), representando os tratamentos estudados, com três repetições:

1. Farelo de Soja 100%
2. Milho Integral Moído 100%
3. Farelo de Arroz Integral 100%
4. Feno de Capim Coast-Cross (Volumoso) 100%
5. Farelo de Soja associado ao Volumoso na proporção 50:50
6. Milho Integral Moído associado ao Volumoso na proporção 50:50
7. Farelo de Arroz Integral associado ao Volumoso na proporção 50:50

8. Farelo de Soja associado ao Volumoso na proporção 40:60
9. Milho Integral Moído associado ao Volumoso na proporção 40:60
10. Farelo de Arroz Integral associado ao Volumoso na proporção 40:60
11. Farelo de Soja associado ao Volumoso na proporção 30:70
12. Milho Integral Moído associado ao Volumoso na proporção 30:70
13. Farelo de Arroz Integral associado ao Volumoso na proporção 30:70
14. Farelo de Soja associado ao Volumoso na proporção 20:80
15. Milho Integral Moído associado ao Volumoso na proporção 20:80
16. Farelo de Arroz Integral associado ao Volumoso na proporção 20:80

Foram comparadas as medidas obtidas diretamente com a incubação ruminal das misturas com as estimadas através de cálculo onde se multiplicou a degradabilidade individual de cada ingrediente pela sua proporção na mistura.

### **3.3 Preparação das Amostras**

As amostras individuais de cada alimento foram moídas em moinho do tipo Willey, em peneira de 2 mm e então foram preparados 100 gramas das amostras compostas de volumoso com os concentrados nas proporções especificadas anteriormente.

Essas amostras foram homogeneizadas e conservadas ao abrigo da luz, calor e umidade em frascos bem fechados.

Com as amostras misturadas preparadas, se pesou 5 g de cada amostra em seus respectivos sacos, para a incubação que foi realizada no

início da manhã antes de ser fornecida a alimentação a fim de facilitar o procedimento. Em cada pesagem, se repetia o processo de homogeneização das amostras.

### **3.4 Preparação dos Sacos de Incubação**

Sacos de tecido de poliéster com cerca de 40  $\mu\text{m}$  de porosidade, medindo 17 x 9 cm foram preparados, sendo fechados com selador à base de calor. O tecido foi previamente lavado em máquina de lavar a fim de retirar eventuais impurezas e gomas de fábrica e, depois, seco para que fosse cortado para a confecção dos sacos de incubação.

Em cada saco, foram feitas duas linhas de solda para reduzir o rompimento dos sacos, a perda de amostra e também o desfiamento do tecido das bordas dos sacos, buscando com isso reduzir o erro experimental e a perda de observações dos resultados.

#### **3.4.1 Preparação do Animal para Incubação**

O animal utilizado foi um bovino macho castrado, raça Hereford, que recebeu sete dias antes até o final do período das incubações, alimentação composta de feno de alfafa em quantidade calculada para consumo *ad libitum*. A dieta foi oferecida em duas frações ao longo do dia, às 8:30 e às 16:30. O animal recebeu ainda sal mineral e água também à vontade.

Embora muitos trabalhos relatem a influência da dieta fornecida ao animal para o resultado da medida de degradabilidade “in situ” (Ganev, 1979; Chademana & Offer, 1990), nesse experimento utilizou-se uma única dieta com

fornecimento de nutrientes em abundancia, uma vez que, a fim de disponibilizar uma técnica de rotina, se torna impossível modificar a dieta e realizar um período para adaptação ruminal para cada mistura de alimentos, pois a técnica se tornaria extremamente demorada e apresentaria portanto alto custo de execução. Assim, a mistura de alimentos diretamente dentro dos sacos de incubação gera a expectativa de que os alimentos interajam entre si dentro dos sacos de incubação, formando um microambiente dentro dos mesmos que seja capaz de simular o ambiente ruminal como um todo, como mostraram ser possível Meyer e Mackie (1986) que encontraram diferença na população microbiana dentro dos sacos e no rúmen.

#### **3.4.2 Período de Incubação**

O período de incubação escolhido foi de 24 horas, pois nesse prazo é quando ocorre a degradação da maior parte do concentrado e quando se espera a ocorrência maior de interação entre os alimentos concentrados e o volumoso. Espera-se que não tenha ocorrido uma contaminação excessiva do resíduo e dos sacos. Em períodos de 48 horas ou mais, a tendência é que já tenha ocorrido a degradação completa dos concentrados.

#### **3.4.3 Procedimentos de Incubação**

As amostras foram pesadas e acondicionadas nos respectivos sacos para posterior incubação. Os sacos contendo as amostras foram acondicionados em um único saco de tule, a fim de evitar uma eventual variação de posicionamento quando se utilizam mais de um dos sacos de tule.

Dentro dos sacos de tule foram colocados pesos, para que os sacos se posicionassem crânio-ventralmente no rúmen e se misturassem de forma eficiente com o líquido ruminal. Esses sacos foram presos à cânula por cordas de 60 cm de comprimento a fim de permitir a mobilidade ideal dentro do rúmen.

Após as 24 horas de incubação, as amostras foram retiradas do rúmen através da fístula, também no início da manhã antes do fornecimento da refeição. Os sacos foram mergulhados em água fria para que a atividade microbiana fosse interrompida. A seguir, foram enxaguados em água corrente e, então, os sacos foram lavados em máquina de lavar, em um processo de lavagem delicada que dura cerca de vinte minutos. Após estarem completamente livre de impurezas externas, os sacos foram colocados em estufa a 60°C para serem secos por 48 horas. Os sacos foram retirados da estufa e colocados no dessecador por uma hora para se proceder a pesagem do material não degradado. Desta forma, foi determinada a degradação da Matéria Seca, através da comparação com o peso inicial das amostras (Nocek, 1988).

O resíduo das amostras foi analisado para se obter os resultados de degradação da Fibra em Detergente Neutro dos alimentos, conforme descrito por Goering & Van Soest (1970). O experimento teve três repetições no tempo a fim de se avaliar a variação no resultado da digestibilidade.

### **3.5 Cálculos Efetuados**

#### **3.5.1 Desaparecimento da MS e da FDN**

Nesse experimento, obteve-se valores de degradabilidade da MS e

da FDN dos alimentos isolados (100%) e das diferentes proporções de volumoso: concentrado (50:50, 60:40, 70:30 e 80:20).

A degradação da MS foi determinada através da diferença de peso seco dos alimentos antes e após as incubações.

Os valores de degradabilidade da FDN foram obtidos após a análise laboratorial de FDN do alimento antes e após a incubação, multiplicados, respectivamente, pela quantidade de MS antes e após a incubação, e calculando-se a diferença da quantidade total de FDN no alimento e no resíduo de incubação.

### **3.5.2 Estimativa da Degradabilidade Proporcional Volumoso - Concentrado**

Os dados obtidos com cada alimento foram utilizados para os cálculos de suas proporções. Uma vez que não houvesse interação entre os alimentos dentro dos sacos de incubação poderia se estimar a degradabilidade das misturas através da soma da degradabilidade dos alimentos multiplicados pelas suas respectivas proporções na mistura.

Assim, efetuou-se o seguinte cálculo, tanto para a matéria seca como para a fibra em detergente neutro:

$$DE = (DOV \times PV \times \% \text{ MS ou FDN}) + (DOC \times PC \times \% \text{ MS ou FDN})$$

Onde:

DE = Degradabilidade ruminal estimada

DOV = Degradabilidade ruminal obtida do volumoso

PV = Proporção do volumoso

% MS ou FDN = % de matéria seca ou de fibra em detergente neutro do volumoso e do concentrado

DOC = Degradabilidade ruminal obtida do concentrado

PC = Proporção do concentrado

Dessa forma, estimou-se o desaparecimento proporcional de cada alimento.

### **3.5.3 Estimativa dos Efeitos Associativos**

Utilizando-se os valores de degradação ruminal dos alimentos obtidos em misturas incubadas e nos alimentos incubados separadamente e depois calculados através de proporções, pode-se calcular a ocorrência e a magnitude dos efeitos associativos. Os efeitos associativos foram calculados verificando-se a diferença em pontos percentuais entre o esperado e o obtido.

O resultado desse cálculo mostra se houve benefício ou prejuízo à degradação do alimento. Valores positivos nessa equação indicam uma interação benéfica com maior degradação das misturas do que seria esperado, através da degradabilidade dos ingredientes isolados.

Valores negativos indicam que houve interação entre os alimentos que prejudicou a fermentação dos mesmos pelos microorganismos ruminais e que serão, em princípio, menos aproveitados pelo animal.

### **3.6 Delineamento Experimental**

O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado (DCC) com 16 tratamentos (três concentrados, um volumoso, 5

proporções concentrado:volumoso), com 3 repetições no tempo e 3 determinações por amostra.

### 3.7 Análise Estatística

A avaliação da degradação dos concentrados isoladamente em suas diversas proporções com o feno foi realizada a fim de se obter maior entendimento a respeito do padrão de fermentação dos mesmos, seguindo o modelo abaixo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + E_{ij}$$

Onde:

$Y_{ij}$  = observação  $l$  associada ao  $i$ -ésimo nível de concentrado,  $j$ -ésimo período do experimento e  $k$ -ésima repetição;

$\mu$  = média;

$T_i$  = efeito do  $i$ -ésimo tratamento;

$P_j$  = efeito do  $j$ -ésimo período do experimento;

$E_{ij}$  = erro experimental aleatório observado a cada observação.

Para avaliação dos efeitos associativos propriamente ditos, os dados obtidos em incubação e estimados através de cálculos de proporção foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa "Statgraphics Plus 4.1 for Windows".

A hipótese de nulidade testada foi de que a degradabilidade ruminal "in situ" dos alimentos misturados foi igual a soma proporcional da degradabilidade individual dos componentes.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização dos alimentos incubados

Os alimentos foram analisados para os teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN). Os resultados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Teores de MS, MO, PB e FDN dos alimentos testados. Dados expressos na MS.

Alimento	MS (%)	MO (%)	PB (%)	FDN (%)
Feno Coast-Cross	87,98	93,90	6,81	78,30
Farelo de Soja	85,90	92,68	52,27	19,58
Farelo de Arroz Integral	81,36	84,07	10,37	54,14
Milho Integral Moído	84,83	99,12	8,55	26,05

Os resultados obtidos nas análises das amostras de feno, milho e de farelo de soja estão dentro do esperado. No entanto, a amostra de farelo de arroz integral apresentou resultados na análise bromatológica diferentes dos padrões descritos na literatura (NRC, 2001; MAPA, 2000).

Comparando-se os dados obtidos com os disponíveis na literatura, como por exemplo o NRC de 2001, verifica-se que em todos os alimentos testados, principalmente os concentrados, foram obtidos níveis de FDN relativamente altos.

Isso poderia ter ocorrido pela não utilização de amilase nas análises

desse experimento e pode com isso ter havido uma maior retenção de amido resistente (Van Soest et al., 1991), que é pesado junto com o resíduo retido na análise.

No entanto, quando se verificou a ocorrência de valores de FDN superiores aos encontrados nas tabelas de padrões de matérias-primas (NRC, 2001; MAPA, 2000) as análises foram repetidas com amilase e não houve diferença significativa entre as análises de FDN com e sem o uso de amilase (Apêndice 4). Dessa forma, foram mantidos os resultados obtidos nas primeiras análises realizadas. Não foram estudadas as causas da ausência de diferença dos resultados das análises de FDN do farelo de arroz integral com a aplicação de amilase. As análises com amilase freqüentemente apresentam variabilidade grande, que seria uma fonte a mais de variação no experimento, aumentando o erro experimental. Além disso, há diversos tipos de amilase no mercado que carecem de padronização (Van Soest et al., 1991).

O milho moído e o farelo de soja apresentaram os menores teores de FDN. O milho é um grão extremamente digestível com altos teores de conteúdo celular e pouca parede celular. O farelo de soja conta, normalmente, com teor de casca relativamente baixo e, além disso, a casca de soja é composta por uma parede celular bastante solúvel e degradável, rica em substâncias como a pectina.

O farelo de arroz apresentou nível de FDN maior que o dobro da média apresentada no NRC 2001 que é de 26,1%. O teor obtido de 54,14%, associado ao baixo teor de proteína bruta, baixo teor de MS e à baixa degradabilidade obtida nesse experimento (serão discutidas a seguir), pode ser

um indício de uma alta contaminação desse farelo com cascas e outras impurezas. Essas paredes apresentam baixa degradabilidade pela intensa presença de sílica, um composto indigestível.

A maior alteração dos resultados em relação ao descrito na literatura foi verificada no farelo de arroz e, se isso fosse principalmente devido à retenção do amido, esperava-se que esse efeito fosse maior no milho e em menor grau para o farelo de arroz, diferentemente do que ocorreu. Apesar disso, não se pode descartar a contribuição de uma possível retenção de amido na amostra. Assim essa alta concentração de FDN pode ter sido em parte causada por um artifício da técnica.

Segundo Warpechowski (dados não publicados), ocorre maior variabilidade no teor de FDN do farelo de arroz do que nos outros concentrados estudados, sendo usualmente encontrados valores que variam de 18 a 45%.

Prates (1995) relata que é difícil a comparação de resultados de diferentes estudos que utilizam farelo de arroz integral, pois há variação das características de cada amostra principalmente pelo teor de cascas, que é rico em sílica, lignina e fibra bruta.

Gonçalves (2001) analisou 63 diferentes amostras de farelo de arroz branco e encontrou valores de FDN variando entre 8,45 e 42,84%, com média de 26,98%. Freitas (2001) encontrou 20,42% de FDN no farelo de arroz utilizado em seu experimento.

A presença de cascas em excesso em amostras de farelo de arroz foi descrita por Fonte (1988) e Njie e Reed (1995) como causa para a elevação no teor de FDN desse farelo.

Bertol (1988) relata que o farelo de arroz que apresenta 8% de fibra bruta (FB) contém pouca ou nenhuma casca. O farelo que apresenta 10% de FB contém 6,4% de cascas e quando apresenta 15% de FB contém acima de 20% de cascas.

A hipótese de haver contaminação da amostra utilizada com cascas em excesso, por exemplo, foi reforçada quando se efetuou a medição de cinzas e matéria orgânica das amostras. A amostra de farelo de arroz apresentou teor de MO inferior ao mínimo encontrado por Gonçalves (2001) de 88,88% de MO, onde se verificou teor máximo de 93,84% e média de 91,11%. Müller (2000) utilizou farelo de arroz em seu experimento contendo 87,21% de MO e 10,41% de PB, mas não citou valores de FDN da amostra.

Ibrahim (1987) descreve valores de cinzas de até 40%, mas credita parte desse valor a uma contaminação também com solo. Segundo Barber & Barber (1985), o teor de matéria mineral varia de acordo com o processo envolvido no beneficiamento do arroz e obtenção do farelo e é indicativo do grau de contaminação com cascas.

Assim como os valores obtidos para FDN e MO, o teor de proteína encontrado no farelo de arroz é mais um indicativo de que houve contaminação da amostra, pois apresentou níveis abaixo do normalmente encontrado, que seria em torno de 15,5% (NRC, 2001; MAPA, 2000).

Ibrahim (1987) testou nove variedades de arroz e encontrou valores variando de 13,8 a 15,9% de PB. Gonçalves (2001) encontrou em 65 amostras de farelo de arroz teores de proteína entre 10,97 e 17,64%. Prates (1995) revisou treze bibliografias que mostram níveis que variam de 8,9 a 27,9% de

PB.

O feno de capim Coast-Cross apresentou cerca de 78% de FDN, valor bastante próximo ao encontrado nas tabelas do NRC (2001), de 73,3%.

Os diferentes tipos de farelo de soja podem apresentar níveis de FDN entre 9,8 e 29,7%, conforme a forma de obtenção do mesmo. O teor encontrado nas amostras estudadas é mais próximo do padrão de FDN apresentado pelo farelo de soja “expellers”, que apresenta teor médio de 21,7% de FDN, do que do farelo soja solvente, que apresenta apenas 14,9% de FDN, segundo NRC (2001). O estudo de Freitas (2001) foi realizado com amostra de farelo de soja de 14,53% de FDN.

O milho apresentou teor de parede celular bastante alto, se comparado aos valores descritos no NRC (2001) que fica entre 9,5 e 10,3%. O valor encontrado é muito mais próximo da média apresentada para a mistura de grãos com sabugos e espigas, descrito com nível de 21 – 21,5% de FDN. O teor de FDN das espigas e sabugos é de 86,2% (NRC, 2001), o que varia conforme o grau de contaminação dos grãos com sabugo.

Embora os valores encontrados sejam muito distantes aos propostos no NRC de 2001, parecendo haver intensa contaminação da amostra de milho, com sabugos e espigas, por exemplo, os valores obtidos são muito próximos aos obtidos por Freitas (2001) que, utilizando amilase nas análises de FDN, encontrou teor de FDN de 20,41% para o grão de milho moído. Talvez haja uma diferença no padrão da matéria-prima utilizada nos Estados Unidos e no Brasil.

Variações na análise de FDN principalmente para concentrados são

relativamente freqüentes, pois a técnica é essencialmente dirigida a forragens. Entre outros motivos, os concentrados apresentam considerável teor de amido resistente que pode ficar retida no resíduo, sendo considerada como se fosse parede celular. Além disso apresentam teores de parede celular verdadeira relativamente baixos, tornando essas medidas mais susceptíveis a variações por contaminações.

Os teores de proteína bruta (PB) obtidos foram muito próximos aos descritos na literatura (NRC, 2001; MAPA, 2000), com exceção do farelo de arroz e evidenciam as características básicas dos alimentos estudados.

Verificou-se alto teor de proteína do farelo de soja, essencialmente um suplemento protéico e valores relativamente baixos para o milho, que é um suplemento energético. Os valores encontrados para soja e milho são muito próximos da caracterização encontrada na bibliografia (NRC, 2001) de 49,9% de PB para o farelo de soja e de 8,6% para o milho.

Para o feno, se verificou nível de proteína abaixo dos 7%, chegando ao limite mínimo de nitrogênio para o funcionamento ruminal. O valor encontrado na análise é bastante inferior aos 10,4% encontrados nas tabelas da literatura, porém a variação da composição de forrageiras é bastante freqüente. Como o teor de fibra encontrado também foi mais alto do que o descrito na literatura (NRC, 2001; MAPA, 2000), observa-se uma perda de qualidade do alimento, podendo ser devido às condições ambientais a que a planta foi submetida, a época do corte, idade da planta, condições de armazenagem e de fenação entre outros.

#### 4.2 Resultados de Degradação das Misturas

A degradabilidade “in situ” após incubação de 24 horas dos alimentos isolados é apresentada na Tabela 2 e a partir desses valores, se obteve a degradabilidade estimada das misturas.

Tabela 2. Degradabilidade ruminal dos alimentos estudados após um período de 24 horas de incubação.

Alimento	Degradabilidade da MS (%)	D.P.	Degradabilidade da FDN (%)	D.P.
Feno	31,66	1,5	21,95	2,3
Farelo de Soja	87,02	6,7	65,83	11,6
Farelo de Arroz	44,02	1,3	15,52	3,4
Milho Moído	70,51	5,3	33,93	6,4

A degradabilidade da MS apresentada foi menor para o feno, intermediária para o farelo de arroz, embora esta tenha sido mais baixa do que o esperado, e as maiores degradabilidades foram encontradas no farelo de soja e milho moído, que contêm paredes celulares mais solúveis e mais conteúdo celular proporcionalmente do que o feno e o farelo de arroz. O alto desvio padrão encontrado na degradabilidade da FDN do farelo de soja se deve à alta variação encontrada nas análises de FDN com esse material.

O farelo de arroz usualmente contém considerável teor de cascas, que são ricas em materiais extremamente indigestíveis como a sílica (Van Soest, 1982). A baixa degradabilidade da MS obtida no farelo de arroz parece ser causada pela baixa degradabilidade da FDN, ainda mais porque apresentou alto teor de parede celular e aparentemente contaminada com cascas ou outro contaminante fibroso indigestível.

Os valores encontrados no presente experimento, tanto para teores

de FDN como para degradabilidade dessa fração são muito próximos dos obtidos por Varga & Hoover (1983) que testaram a degradabilidade “in situ” da FDN de diversos alimentos e onde o milho continha 16,7% de FDN e degradabilidade da FDN de 42,3%, enquanto que o farelo de soja apresentou 18,1% de FDN com degradabilidade de 78%.

O feno apresenta a maior parte do material fibroso possivelmente lignificado, por isso apresenta a menor degradabilidade. Ospina (1990) relaciona vários autores que mostraram que a digestibilidade da MO e, conseqüentemente, da MS é fortemente determinada pelos teores de celulose e hemicelulose e da lignificação das mesmas.

A lignina é o principal fator isolado na redução da degradabilidade de um alimento (Van Soest, 1994). A fração indigestível tem entre 33 e 50% de lignina (Coelho da Silva e Leal, 1979). Aparentemente a digestão cessa quando a lignina atinge 33% da parede celular e o aumento de lignina diminui a fração da parede celular potencialmente digestível em proporção à fração indigestível da parede (Lucci, 1997).

Os resultados de digestibilidade “in situ” da MS, em 24 horas de incubação, apresentados por Gonçalves (2001) para o farelo de arroz branco foi de 85,81%, enquanto que para os farelos de arroz parboilizado e desengordurado foram de 95,51% e 69,51%. Gigena (1997) encontrou degradabilidade “in situ”, em 24 horas de 53,16% para o farelo de arroz desengordurado. Dessa forma, o farelo de arroz utilizado nesse experimento parece mesmo apresentar grande contaminação de substância fibrosa não degradável no rúmen, uma vez que os valores obtidos são bastante inferiores

aos descritos anteriormente.

O milho apresenta baixo teor de parede celular que são muito pouco lignificadas e o farelo de soja apresenta parede celular de degradabilidade alta, contendo altos teores de pectina, que é a fração solúvel da parede celular e dessa forma confere ao farelo de soja a maior degradabilidade da FDN. A pectina é rápida e extensivamente degradada no rúmen chegando a 85% (Chesson & Monro, 1982; Titgemeyer, 1992; citados por Merchen e Bourquin, 1994).

A degradabilidade do farelo de soja testado por Brisola et al. (1998) após 24 horas foi de 97,8% sendo que com 12 horas de incubação foi obtido valor de 86,89% de degradação, sendo este o valor mais próximo ao obtido de 87,02% no experimento realizado.

#### **4.3 Avaliação da Ocorrência de Efeitos Associativos na Degradabilidade da Matéria Seca**

As degradabilidades obtidas e as estimadas por cálculos a partir da degradabilidade do alimento incubado puro são apresentadas nas tabelas 3, 4 e 5, onde se informa também a diferença em pontos percentuais.

Tabela 3. Efeito associativo da degradabilidade da matéria seca das amostras de farelo de soja incubadas no rúmen por 24 horas

Proporção de Concentrado	Proporção de Volumoso	Degradabilidade Estimada	Degradabilidade Obtida	Diferença em Pontos Percentuais	R <sup>2</sup>
50 %	50 %	59,31	57,43	- 1,87	0,97
40 %	60 %	53,81	53,63	- 0,18	0,93
30 %	70 %	48,30	47,65	- 0,65	0,96
20 %	80 %	42,79	43,34	+ 0,55	0,92

Os dados de degradabilidade obtidos para MS das misturas de farelo de soja com feno, mostram diferenças entre obtido e estimado muito pequenas. Apesar de farelo de soja e feno apresentarem características bromatológicas bastante diferentes a presença desses juntos dentro do saco parece não ter influenciado a degradação dos mesmos.

O farelo de soja apresentou degradabilidade da MS de 87,02% enquanto que o feno teve degradabilidade de apenas 31,66%. Dessa forma, espera-se que o farelo tenha sido quase que totalmente degradado nas primeiras 24 horas de incubação restando quase que unicamente a parte indigestível deste alimento. A rápida degradação do farelo não prejudicou a degradação do feno como poderia ser esperado pois poderia haver preferência dos microorganismos pelos nutrientes mais prontamente disponíveis do farelo de soja em detrimento do feno.

No entanto, poderia também ocorrer um efeito positivo, uma vez que o farelo é rico em proteína (nitrogênio) e esse poderia auxiliar as bactérias no seu desenvolvimento, se houvesse nitrogênio reduzido no ambiente, já que o nitrogênio usualmente é um nutriente limitante para a fermentação.

Existe forte relação entre os metabolismos ruminais de energia e nitrogênio, pois se ocorre uma deficiência de nitrogênio, pode haver uma redução na digestibilidade do alimento, uma vez que haveria limitação de nitrogênio aos microorganismos que reduziram então sua fermentação. Da mesma forma, se há excesso de nitrogênio em relação à energia disponível, parte deste é perdido na forma de amônia, podendo causar inclusive intoxicações ao ruminante (Nocek & Russell, 1988).

Chamberlain et al. (1985) concluíram que diferentes suplementos de carboidratos têm efeitos distintos sobre a concentração de amônia ruminal, principalmente por modificações na população ruminal. As bactérias celulolíticas dependem do nitrogênio amoniacal liberado na fermentação de componentes da dieta que contém nitrogênio, para a digestão da celulose.

Nocek & Russell (1988), indicam que o “Agriculture Research Council” (1980) recomenda 1,25 g de N degradável no rúmen para 1 megajoule de energia metabolizável. Diversos autores, como Sinclair et al. (1992), discutem ainda a vantagem de se proceder a uma sincronização da liberação de nitrogênio e energia para os microorganismos ruminais a fim de maximizar a captura do nitrogênio degradável no rúmen (NDR) e otimizar a taxa e a eficiência do crescimento microbiano. Porém, Henning et al. (1992) não verificaram vantagem em se buscar uma sincronia de curto prazo de liberação dos nutrientes, uma vez que seja atendido o balanço geral entre N e energia.

Apesar de o feno apresentar valores de proteína bruta de 6,81%, considerados bastante baixos e limítrofes ao nível considerado mínimo para o funcionamento ruminal de 1% de nitrogênio (Van Soest, 1994), parece que a restrição de nitrogênio não ocorreu ou não foi suficiente para causar a depressão do desenvolvimento microbiano. Isso foi causado pelo fornecimento da dieta de alfafa que contém níveis de proteína em torno de 17% de proteína.

Dessa forma, parece que nesse experimento, o nitrogênio não se apresentou como nutriente limitante a ponto de reduzir a fermentação, tampouco a maior solubilidade do farelo de soja comprometeu a fermentação

do feno ou então os dois efeitos podem ter ocorrido paralelamente e se compensado entre eles.

Os resultados obtidos e estimados para a degradabilidade das amostras de farelo de arroz são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Efeito associativo da degradabilidade da matéria seca das amostras de farelo de arroz incubadas no rúmen por 24 horas

Proporção de Concentrado	Proporção de Volumoso	Degradabilidade Estimada	Degradabilidade Obtida	Diferença em Pontos Percentuais	R <sup>2</sup>
50 %	50 %	37,82	36,89	- 0,92	0,66
40 %	60 %	36,60	35,53	- 1,08	0,91
30 %	70 %	35,38	33,72	- 1,66	0,73
20 %	80 %	31,22	33,72	+ 2,49	0,37

Quando se estuda a redução da digestibilidade da FDN pela adição de suplementos com alto teor de gorduras, que seria o caso do farelo de arroz integral, o método “in situ” tende a subestimar a depressão da fermentação da fibra, pois a gordura tende a proteger a fibra do ataque microbiano e esse processo tende a ser menos intenso dentro dos sacos de incubação (Doreau et al., 1991, citados por Nozière & Michalet-Doreau, 2000).

No entanto, a amostra de farelo de arroz parece ter sido uma amostra atípica, conforme amplamente discutido, apresentando na análise bromatológica parâmetros compatíveis com contaminação por cascas ou outro agente insolúvel em detergente neutro, que não contem nitrogênio e que apresenta baixa degradabilidade. Dessa forma, toda a discussão das amostras contendo farelo de arroz desse experimento deve levar em conta essa alteração.

Quando se comparou os valores de degradação individual da MS e da FDN e a composição bromatológica do feno e do farelo de arroz estudados, verificou-se que todos são muito parecidos nos dois alimentos. Assim, parecem coerentes os resultados obtidos nas misturas, já que as amostras eram bastante parecidas e, portanto, não se esperaria efeito associativo entre elas.

A Tabela 5 apresenta os dados obtidos com as amostras contendo as misturas de milho com feno de capim Coast-Cross.

Tabela 5. Efeito associativo da degradabilidade da matéria seca das amostras de milho incubadas no rúmen por 24 horas

Proporção de Concentrado	Proporção de Volumoso	Degradabilidade Estimada	Degradabilidade Obtida	Diferença em Pontos Percentuais	R <sup>2</sup>
50 %	50 %	51,52	48,82	- 2,70	0,95
40 %	60 %	47,57	43,51	- 4,06	0,84
30 %	70 %	43,63	43,15	+ 0,48	0,86
20 %	80 %	39,68	39,17	- 0,49	0,95

Os dados da Tabela acima mostram que não foi possível detectar a ocorrência de efeitos associativos entre o milho e o feno com o uso dessa técnica uma vez que as diferenças entre obtido e estimado foram muito pequenas ou quase nulas. A suplementação do feno com milho moído seria capaz de suprir uma deficiência energética do feno, podendo dessa forma fornecer energia tanto ao ruminante como a flora ruminal que teria assim máximo desempenho, já que o crescimento microbiano é diretamente dependente da disponibilidade de energia no rúmen (Nocek e Russell, 1988). Os produtos finais do metabolismo das proteínas são influenciados pela disponibilidade de carboidratos, já que o crescimento microbiano é dependente

do suprimento de carboidratos fermentáveis (Russell et al., 1983). Dessa forma, poderia se esperar que a adição de milho pudesse aumentar a degradabilidade do feno uma vez que haveria mais energia para o funcionamento das bactérias ruminais.

Da mesma forma, a presença de carboidratos rapidamente fermentáveis pode inibir a degradação de nutrientes menos solúveis e dependendo da extensão desse efeito poderia haver menor fermentação da MS dos alimentos (El-Shazly, 1961).

Diversos trabalhos mostraram, através de outras metodologias, a ocorrência de efeitos associativos em condições de suplementação (misturas) de volumosos com concentrados: Chappell e Fontenot, (1968) observaram que pequenas quantidades de grãos ou de amido estimulam a degradação da fibra. Woody et al. (1983) mostraram que dietas de silagem de milho suplementadas com grão de milho apresentaram energia líquida 8,9% menores do que a estimada pela combinação linear dos ingredientes. Mould & Orskov (1983) verificaram redução da degradabilidade "in situ" da MS com a acidificação do rúmen. Esse efeito foi ainda mais claro quando foi medida a degradabilidade da celulose. Joanning et al. (1981) verificaram efeitos associativos negativos em dietas contendo silagem de milho suplementada com grão de milho, reduzindo a digestibilidade da MS e energia em cerca de 11 pontos percentuais, sendo a digestibilidade da MS esperada de 78,8% e a obtida ficou em 69,9%. Todas as frações dos alimentos foram igualmente reduzidas em relação ao esperado.

Hart (1987) verificou aumento na digestibilidade da MS e da MO com a inclusão de 15 e 30% de grãos de sorgo suplementares à silagem de sorgo.

Porém em níveis de 45 e 60% houve redução dessas digestibilidades.

Através da análise dos dados de degradabilidade da matéria seca das diversas misturas testadas, representadas nas tabelas 3, 4 e 5, verifica-se que através da metodologia utilizada nesse experimento não foi possível detectar influência recíproca entre os alimentos que prejudicassem ou beneficiassem a degradabilidade da MS, uma vez que os resultados mostram que a degradação da mistura ocorreu de forma semelhante ao que foi verificado com os alimentos isoladamente. A expectativa de que ocorressem interações entre os alimentos dentro dos sacos com a formação de um microambiente específico dentro dos mesmos não se confirmou ou, pelo menos, não foi suficiente para que se provocasse uma alteração detectável na degradação das misturas.

#### **4.4 Avaliação da Ocorrência de Efeitos Associativos na Degradabilidade da Fibra em Detergente Neutro**

A digestibilidade da MS dos alimentos, principalmente forragens, depende basicamente do teor e da digestibilidade da parede celular, e 80% da digestão dessa fração ocorre pela ação de microorganismos ruminais, sendo portanto degradabilidade ruminal e o escape da FDN uma importante medida para a estimativa da digestibilidade de forragens (Michalet-Doreau & Nozière, 2000).

A comparação das degradabilidades da FDN obtidas contra as estimadas para cada proporção de mistura de concentrados com o volumoso, mostrou diferenças entre as degradabilidades obtidas e estimadas bastante

grandes quando se misturou milho ou farelo de soja com feno. No entanto, pela alta variabilidade do experimento e pequeno número de amostras utilizadas estatisticamente essas diferenças não foram significativas na análise de variância a 95%.

O farelo de arroz utilizado apresentou características peculiares e possivelmente por apresentar teores de FDN e degradabilidade do FDN muito próximos do feno, apresentou diferenças muito pequenas, não significativas, entre as degradabilidades obtida e estimada através de cálculos.

As Tabelas 6, 7 e 8 apresentam os valores obtidos e estimados para degradabilidade “in situ” da FDN das misturas.

Tabela 6. Efeito associativo da degradabilidade da fibra em detergente neutro das amostras de farelo de soja incubadas no rúmen por 24 horas

Proporção de Concentrado	Proporção de Volumoso	Degradabilidade Estimada	Degradabilidade Obtida	Diferença em Pontos Percentuais	R <sup>2</sup>
50 %	50 %	39,22	26,17	- 13,05	0,97
40 %	60 %	35,71	26,40	- 9,31	0,93
30 %	70 %	32,19	23,72	- 8,47	0,96
20 %	80 %	26,33	25,58	- 0,75	0,92

Os dados da Tabela 6 mostram uma redução da degradação da FDN quando se faz uma suplementação com farelo de soja em níveis a partir de 30%. Esse efeito parece ser maior a medida em que a quantidade de concentrado aumenta na mistura, o que seria compatível com o que foi descrito por Stumpf Junior & López (1994), Poore (1990), entre outros.

Os dados apresentados na Tabela 6, sugerem que o uso de farelo de soja associado ao feno, poderia causar redução da fermentação da parede

celular da mistura, em níveis a partir de 30% de concentrado. No entanto, apesar de ter havido grande diferença numérica entre os valores estimados e obtidos nas amostras contendo 30, 40 e 50% de farelo de soja, esses resultados não foram estatisticamente significativos, pois há considerável variabilidade nessa técnica e seria necessário um maior número de repetições para que talvez se pudesse chegar a um resultado estatisticamente significativo.

Pode-se até supor que há preferência das bactérias pela parede celular do farelo, pois esse é rico em substâncias solúveis, tendo dessa forma uma degradação mais rápida. Existe alta correlação entre atividade de enzimas fibrolíticas e a degradação da parede celular, mas esse efeito parece ser potencializado quando há maior acessibilidade das enzimas aos componentes da parede celular (Nozière et al., 1996). Van Soest (1982) mostrou que a FDN de concentrados tem usualmente maior potencial para digestão do que a FDN de muitas forragens. No entanto fica difícil determinar de qual dos alimentos a fermentação é prejudicada, ou mesmo se há prejuízo nos dois alimentos por igual. A Tabela 7 mostra os dados obtidos com o farelo de arroz integral associado ao feno de gramínea.

Tabela 7. Efeito associativo da degradabilidade da fibra em detergente neutro das amostras de farelo de arroz incubadas no rúmen por 24 horas

Proporção de Concentrado	Proporção de Volumoso	Degradabilidade Estimada	Degradabilidade Obtida	Diferença em Pontos Percentuais	R <sup>2</sup>
50 %	50 %	18,33	21,21	+ 2,89	0,75
40 %	60 %	18,99	20,03	+ 1,04	0,99
30 %	70 %	19,64	18,33	- 1,31	0,91
20 %	80 %	20,30	20,19	- 0,11	0,95

Por ter essas características muito parecidas com o feno testado, parece que ambos tiveram o mesmo comportamento no rúmen, como se fossem um só material. Não se verificou interação ou aditividade, uma vez que as diferenças entre degradabilidades obtidas e estimadas por cálculo foram muito próximas a zero.

Assim como nas medidas de degradabilidade da MS, as medidas da FDN não apresentaram diferenças significativas entre estimado e obtido o que leva a crer que não houve interação local entre os dois alimentos e que ambos tiveram suas frações igualmente degradadas no período de 24 horas de incubação. Esses resultados parecem em parte estar em desacordo com o descrito na literatura, porém, as características apresentadas pela amostra de farelo de arroz utilizadas nesse experimento mostram-se fora do padrão normal.

A comparação dos dados obtidos com os estimados para as misturas contendo milho + feno são mostradas na Tabela 8.

Tabela 8. Efeito associativo da degradabilidade da fibra em detergente neutro das amostras de milho incubadas no rúmen por 24 horas

Proporção de Concentrado	Proporção de Volumoso	Degradabilidade Estimada	Degradabilidade Obtida	Diferença em Pontos Percentuais	R <sup>2</sup>
50 %	50 %	28,00	19,89	- 8,11	0,97
40 %	60 %	26,72	18,34	- 8,38	0,83
30 %	70 %	25,45	21,20	- 4,26	0,94
20 %	80 %	24,18	19,14	- 5,05	0,67

Nas misturas de feno e milho se verificou, a exemplo do ocorrido com as misturas de feno e farelo de soja (Tabela 6), grande diferença nos

resultados obtidos e estimados, porém não houve significância estatística entre as medidas, mais uma vez, possivelmente pela alta variabilidade obtida na técnica em relação ao número pequeno de repetições.

No caso do milho, que é um alimento essencialmente energético, através do alto teor de amido (CRF) contido, obteve-se diferença grande entre obtido e estimado inclusive na amostra que continha apenas 20% de milho, o que levaria a crer que houve seletividade das bactérias pelo conteúdo mais solúvel presente no milho em detrimento das frações mais fibrosas, conforme demonstrado por El-Shazly et al. (1961), Hoover et al. (1986), Mould et al. (1983) entre outros.

Os dados obtidos para degradabilidade da FDN nesse experimento seriam compatíveis com os encontrados por diversos autores utilizando outras técnicas de medida de degradabilidade como Chappell & Fontenot (1968) que mostraram que a digestão da fibra foi afetada negativamente pelo aumento na proporção de concentrados e Joanning et al. (1981) que utilizaram animais alimentados com silagem de milho associada ao grão de milho em níveis de 2,4 e 3,1 vezes a manutenção e observaram redução da digestibilidade da FDN de 7,8 e 13,7 pontos percentuais, respectivamente, do que esperado para dietas contendo silagens maduras e imaturas. Esses autores verificaram que, na ocorrência de efeitos associativos negativos, todas as frações dos alimentos foram igualmente reduzidas em relação ao esperado. No entanto na silagem de milho madura o efeito foi maior na digestibilidade da fibra do que na do amido ou proteína. Esses autores calcularam que o amido contribuía com 59% e a FDN com 26% para a redução da digestibilidade do alimento.

Stumpf Junior & López (1994) avaliaram o desaparecimento “in situ” da parede celular de feno de capim elefante com níveis crescentes de grão de sorgo moído de 0, 15, 30 e 45% do total da dieta e verificaram que a maior degradação da FDN ocorreu no tratamento onde não foi utilizada a suplementação com grãos (42,21%). No tratamento com 15% de grãos, foi verificada degradabilidade de 32,08% e os tratamentos de 30 e 45% de grão de sorgo, apresentaram degradabilidade de 25,83 e 22,66%, respectivamente.

Ospina (1990) apresentou dados de digestibilidade aparente “in vivo” que não apresentaram relação direta com a proporção de farelo de arroz desengordurado suplementar, uma vez que houve maior degradabilidade da FDN no tratamento com 20% de farelo (41,08%), mas não houve diferença significativa entre os tratamentos com 10 e 30% de farelo, que apresentaram degradabilidades de 35,88 e 36,79%, respectivamente.

Poore et al. (1990) testaram dietas contendo 30, 60 e 90% de concentrado onde a digestibilidade potencial aumentava à medida que a proporção de concentrado aumentava. A digestibilidade da MS do trato total obtida foi aumentada mas, a da FDN não foi reduzida com o aumento na inclusão de concentrado. A maior inclusão de concentrado reduziu o pH médio e houve maior número de horas com pH abaixo de 6. A digestibilidade ruminal da FDN não foi afetada pelo aumento de concentrado de 30% para 60%, porém quando se aumentou de 60 para 90% houve redução na degradabilidade ruminal de 57% do feno de alfafa, 72% da palha de trigo e de 34% do grão de sorgo flocado, mostrando que quanto mais diferentes em suas características bromatológicas são os alimentos misturados, tendem a ser

maiores os efeitos de redução de degradação da FDN.

A amplitude da depressão da degradabilidade da fibra depende da variação na atividade fibrolítica microbiana e também da natureza da forragem incubada, mais precisamente da quantidade e natureza dos componentes da parede celular, carboidratos e lignina (Huthanen, 1991). Segundo Hoover (1986), o efeito associativo negativo na degradabilidade da parede celular na presença de carboidratos solúveis pode ser explicada por três causas básicas: a preferência dos microorganismos ruminais pelos carboidratos solúveis frente aos carboidratos estruturais; a redução de pH ruminal devido à rápida fermentação dos carboidratos solúveis; e a competição por nutrientes essenciais favorecendo aos microorganismos que digerem preferencialmente carboidratos solúveis.

#### **4.5 Validação da Metodologia “In Situ” para a estimativa de Efeitos Associativos**

A técnica “in situ”, da forma como foi utilizada nesse experimento, não foi capaz de detectar interação entre os alimentos dentro dos sacos de incubação, através da formação de um ambiente próprio dentro dos mesmos, o que poderia ser possível pois o contato da amostra incubada e o meio ruminal é limitado pelas características dos sacos (Lindberg et al. 1984; Nocek, 1988) e o ambiente formado dentro do saco pode diferir do ambiente ruminal (Marinucci et al. 1992), bem como a população microbiana (Meyer & Mackie, 1986) e sua atividade fibrolítica, que tende a ser reduzida dentro do saco de incubação (Noziere & Michalet-Doreau, 1996).

Alguns aspectos precisam ser estudados mais profundamente a fim de se obter maior confiabilidade nos resultados obtidos, principalmente no que diz respeito à manipulação da dieta fornecida e ao estudo das frações cinéticas do alimento.

#### **4.5.1 Efeito da dieta fornecida ao animal sobre a degradabilidade “in situ”**

A dieta composta por feno de alfafa, sal mineral e água *ad libitum* utilizada nesse experimento parece ter contribuído para que não se verificasse ocorrência de efeitos associativos com a técnica “in situ”. O fornecimento de uma única dieta para todas as incubações visava que a técnica fosse viável para uso em rotina, uma vez que haveria grande redução de tempo, mão de obra e custos, pois a manipulação da dieta para cada incubação como sugerido por Ganev et al (1979), Chademana & Offer (1990) e Orskov (2000) torna a técnica cara, trabalhosa e demorada.

Para que houvesse efeitos associativos, deveria haver a formação de um microambiente dentro dos sacos, com características próprias, diferentes das encontradas no ambiente ruminal como um todo uma vez que a quantidade de amostra incubada é irrisória para a modificação do ambiente ruminal como um todo, com alteração, por exemplo, da proporção de espécies da flora microbiana, da produção de ácidos graxos voláteis e do pH. Esse efeito local é sugerido por Barbosa & Sampaio (1996), em experimento onde incubaram amostras de jaraguá, alfafa, coast-cross e braquiária com dietas de alfafa ou de jaraguá + concentrado e verificaram que a diferença das

degradabilidades total e potencial das amostras de alfafa nas duas dietas foi muito pequena, possivelmente pela formação de microambiente mais favorável aos microorganismos dentro dos sacos de incubação. As taxas de degradação das amostras de jaraguá, coast-cross e braquiária obtidas nesse experimento, quando comparadas com as obtidas com a alfafa, mostram que essas amostras, mesmo sob dieta de alfafa, não foram propícias para a formação de um microambiente favorável à fermentação.

A alteração da flora nem sempre ocorre de forma idêntica dentro dos sacos de incubação e no restante do rúmen. Meyer & Mackie (1986) encontraram diferença na população microbiana dentro dos sacos e no rúmen e essa diferença foi influenciada pelo tipo de amostra incubada.

A influência da dieta fornecida ao animal no resultado da medida de degradabilidade "in situ" foi demonstrada por diversos trabalhos como os de Ganev (1979), Chademana & Offer (1990) e Barbosa & Sampaio (1996). Segundo Nocek (1988), a dieta é fator determinante na quantidade e qualidade dos microorganismos presentes no rúmen e, conseqüentemente, na taxa e extensão da degradabilidade ruminal dos alimentos. Huntington & Givens (1995) relatam que a dieta fornecida ao animal pode afetar a degradabilidade "in situ" de um alimento, pois essa tem efeitos no ecossistema ruminal, efeitos físicos diretos nos sacos de incubação e principalmente o efeito da quantidade e proporção dos diferentes nutrientes como nitrogênio e carboidratos.

No entanto, não foi verificada influência significativa da dieta na degradabilidade "in situ" dos alimentos em outros experimentos, como os de Carey et al. (1993) e Vilella (1994). Berchielli et al. (1996) testaram a influência

na degradabilidade “in situ” da MS de feno de capim coast-cross e milho de diferentes proporções volumoso:concentrado na dieta recebida pelo animal (80:20, 60:40 e 40:60), sem observar diferença significativa entre os tratamentos.

O suprimento de nitrogênio na dieta é fator que influencia diretamente o funcionamento ruminal, uma vez que o adequado balanceamento entre carboidratos e nitrogênio no rúmen é imprescindível para a otimização da fermentação. Mehrez & Orskov (1977) sugerem um mínimo de 230 mg de N por litro de líquido ruminal a fim otimizar a degradabilidade in situ. Wallace (1979) verificou aumento na taxa de degradação da cevada com maior concentração de N ruminal (de 85 para 188 mg/litro).

Da mesma forma, a presença de concentrados na dieta, principalmente quando em grande proporção, acaba por fornecer, usualmente, grande quantidade de carboidratos rapidamente fermentáveis e pode prejudicar a fermentação, principalmente da celulose. A redução da degradação da fibra na presença de carboidratos ou outros nutrientes rapidamente fermentáveis foi demonstrada em muitos trabalhos como em Joanning et al. (1981) e Chademana & Offer (1990) que verificaram redução da degradabilidade “in situ” do feno e do pH ruminal com o aumento de concentrado na dieta (10, 35 e 65%). A preferência das bactérias pelo conteúdo mais solúvel ou o benefício às bactérias que degradam preferencialmente esse tipo de substrato (bactérias amilolíticas) causando assim a redução na degradabilidade da fibra, foi descrito por El-Shazly (1961). Outros trabalhos (Günthrie & Wagner, 1988; Hart, 1987), no entanto, mostraram haver benefícios em alguns casos de suplementação de

feno com concentrados energéticos e protéicos o que também não foi verificado nesse experimento nas medidas de degradabilidade da matéria seca nem nas medidas de degradabilidade da fibra.

No presente experimento, a dieta fornecida continha alto teor protéico. A grande quantidade de nitrogênio fornecida poderia inclusive estar causando uma saturação do ambiente deste nutriente, que acabaria sendo perdido ao invés de ser transformado em proteína microbiana. Nesse caso, as amostras ricas em carboidratos rapidamente fermentáveis (milho moído) incubadas nesse meio rico em nitrogênio, poderiam ter sua degradação beneficiada. Da mesma forma, as amostras de farelo de soja, ricas em proteína poderiam até ser prejudicadas pela entrada de nitrogênio num sistema já saturado desse elemento. No entanto, esses efeitos não foram verificados quando se estudou a degradabilidade da MS, mostrando que se houve algum tipo de benefício ou prejuízo significativo à fermentação, a metodologia empregada não foi capaz de detectar.

A avaliação da degradabilidade da FDN, mostrou uma considerável depressão da fibra na presença de nutrientes mais solúveis. No entanto, essa diferença foi só numérica ou aparente pois não houve diferença estatisticamente significativa. Uma vez que os procedimentos da técnica “in situ” e também de análise de FDN para alimentos concentrados apresentam grande variação, parece ser necessário um maior número de repetições para que alguma diferença possa ser estatisticamente significativa. Embora esse resultado fosse coerente e já tenha sido demonstrado em diversos trabalhos através do uso de outras metodologias como em Joanning et al. (1981), o fato

da análise estatística não ter apresentado diferença entre as médias impossibilita de assumir as diferenças como sendo devidas às fontes de variação testadas e não a variações experimentais.

Uma revisão de Huntington & Givens (1995) contabiliza diversos experimentos “in situ” e a maior parte desses trabalhos utilizou como dieta basal, volumosos puros ou com a adição de uma pequena fração de concentrado. Nocek (1988) afirma ser fundamental atingir as exigências nutricionais dos microorganismos e recomenda uma dieta que contenha todos os ingredientes a serem incubados para que se estabeleça uma flora microbiana variada.

Orskov e Ryle (1990) sugerem que a técnica “in situ” pode ser uma alternativa na estimativa de efeitos associativos. Mehrez & Orskov (1977) afirmam que a técnica “in situ” é apropriada para a avaliação das características intrínsecas dos alimentos, bem como do efeito do ambiente ruminal sobre os mesmos. Porém, da forma como a técnica foi utilizada no presente experimento, torna-se difícil a identificação de efeitos associativos de forma significativa, mostrando assim a necessidade de ajustes, substituições ou alteração de alguns dos procedimentos utilizados na metodologia.

#### **4.5.2 Estudo da cinética de digestão**

Muitos estudos de degradabilidade são feitos com o estudo da cinética de degradação. Através de modelo matemático que representa uma regressão curvilínea da quantidade de amostra desaparecida usualmente representado pela equação  $D(t) = A + B \times [1 - \exp(-C \times t)]$ , pode-se determinar

a quantidade de amostra desaparecida (D) em um tempo (t) ; a fração solúvel e completa e rapidamente degradável (A) que representa a intersecção do eixo y no tempo zero; a fração insolúvel porém potencialmente degradável (B) e a taxa constante de degradação da fração B, representada pela letra “C”.

Segundo Orskov (2000), estudos de ambiente ruminal, como os de efeitos associativos, através da técnica “in situ”, devem se basear na taxa de degradação (C). Esse autor afirma que as frações “A” e “B” são pouco influenciadas pelo ambiente ruminal pois a fração solúvel “A” é rapidamente solubilizada e fermentada, não chegando a sofrer tanto os efeitos de uma mudança no ambiente ruminal. A fração “B” forma uma curva assintótica onde, a partir de um certo ponto, a degradabilidade do alimento se torna estável por mais tempo que dure a incubação pois o material restante é indigestível e a tendência é de que esse platô seja alcançado desde que haja tempo suficiente para a degradação máxima do alimento.

Assim sendo, quando o ambiente ruminal é alterado a fração da equação que pode ser mais facilmente alterada é a taxa de degradação (C), pois em ambiente sub-ótimo a taxa de degradação pode ser prejudicada, ou seja, levaria mais tempo para a curva de degradação alcançar o platô. A linha de intersecção do tempo zero de incubação, bem como o ponto onde a curva torna-se assintótica é bastante similar com qualquer que seja o ambiente ruminal. Deste modo, segundo Orskov (2000), as maiores alterações de degradabilidade de um alimento por alteração do ambiente ruminal se dão, não na sua extensão, mas sim na sua taxa de degradação.

O experimento, conduzido com apenas um horário de incubação,

pode ficar um pouco limitado para a explicação dos resultados. No experimento realizado para essa discussão, utilizou-se apenas um horário fixo de incubação e a redução da fibra verificada, mesmo se fosse significativa, não poderia garantir que esse efeito fosse duradouro, pois poderia ter ocorrido apenas uma redução da taxa de degradação, representada pela redução da degradação nas primeiras 24 horas dentro do rúmen, mas que se houvesse tempo hábil, mas a degradabilidade final do alimento poderia não ser modificada. Assim, não se poderia afirmar que essa redução se prorrogaria a prazos mais longos, de 48, 72, 96 ou 120 horas, que seria o tempo estimado para a degradação máxima possível de volumosos. Além disso, em períodos mais longos de incubação o efeito do concentrado na mistura tende a ser reduzido devido a sua extensa degradação e conseqüente pequena presença quantitativa na mistura após o período estudado pois a maior parte desses alimentos foi degradada em 24 horas de incubação (70,51% para o milho e 87,02% para o farelo de soja). Deste modo, o estudo da taxa de degradação poderia ser mais conveniente para a demonstração de efeitos associativos no presente experimento.

Os dados desse experimento talvez sejam mais úteis para demonstrar os fenômenos fermentativos ruminais, mostrando a preferência inicial de microorganismos por substratos mais solúveis e o conseqüente aumento no tempo de colonização e início de degradação de componentes fibrosos, do que para estimar a redução da degradabilidade propriamente dita.

## **5. CONCLUSÃO**

A técnica “in situ”, da forma como foi testada nesse experimento, não foi capaz de demonstrar interação entre os alimentos testados que proporcionasse benefício ou prejuízo significativo na degradação do alimento como um todo, ou seja, da matéria seca ou da FDN.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL, The nutrient requirements of ruminant livestock. **Commonwealth Agricultural Bureaux**, London, n. 1 (Suppl.), p. 121-181, 1980.

AKIN, D. E. Microscopic evaluation of forage digestion by rumen microorganisms – a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.48, n. 3, p. 701-710, 1979.

ARMSTRONG, D. G.; SMITHARD, R. R. The fate of carbohydrates in the small and large intestines of the ruminant. **Proceedings of Nutrition Society**. Cambridge, v. 38, p. 283-294, 1979.

BARBER, S.; BARBER, C. B. **Rice Bran: an under-utilized raw material**. New York: United Nations Industrial Development Organization, 1985. 251 p.

BARBOSA, G. S. S. C.; SAMPAIO, I. B. M. Efeito da dieta sobre a estimativa dos parâmetros da equação de degradação da matéria seca no rúmen. IN: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33, 1996, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: [s.n.], 1996.

BERCHIELLI, T. T.; FIGUEIRA, D. G.; RODRIGUEZ, N. M. Efeito de Níveis de Concentrado sobre a Degradabilidade “In Situ” da Matéria Seca. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33, 1996, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: p. 39 – 41, 1996.

BERTOL, T. M. **Farelo de arroz integral na alimentação de suínos em crescimento e terminação**. 1998. 133 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Porto Alegre, RS, 1988.

BLÜMMEL, M.; ORSKOV, E. R. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 40, n. 2-3, p. 109-119, 1993.

BRINK, D. R.; STEELE, R. T. Site and extent of starch and neutral detergent fiber digestion as affected by source of calcium and level of corn. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 60, n. 5, p. 1330-1337, 1985.

BRISOLA, M. L.; LUCCI, C. S.; MELOTTI, L. KODAIRA, V. Degradabilidade Ruminal "in situ" da Proteína de Grãos de Soja Extrusados e do Farelo de Soja In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: [s.n.] 1998.

BURROUGHS, W.; GALL, L. S.; GERLAUGH, B. H.; BETHKE, R. M. The influence of casein upon roughages digestion in cattle with rumen bacteriological studies. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 9, n.1, p. 214, 1950.

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

CHADEMANA, I.; OFFER, N. W. The effect of dietary inclusion of yeast culture on digestion in the sheep. **Animal Production**, Rome, v. 50, p. 483 – 489, 1990.

CHAMBERLAIN, D. G.; THOMAS, P. C.; WILSON, W.; NEWBOLD, C. J.; MACDONALD, J. C. The effects of carbohydrate supplements on ruminal concentrations of ammonia in animals given diets of grass silage. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 104, p. 331, 1985.

CHAPPEL, G. L.; FONTENOT, J. P. effect of level of readily-available carbohydrates in purified sheep rations on cellulose digestibility and nitrogen utilization, **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 27, n. 6, p.1709, 1968.

CHERNEY, D. J. R.; PATTERSON, J. A.; LEMENAGER, R. P. Influence of in situ bag rinsing technique on determination of dry matter disappearance. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.73, n.2, p.391-397, 1990.

COELHO da SILVA, J. F.; LEAL, M. I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Livroceres, 1979. 380 p.

DIXON, R.M.; STOCKDALE, R. Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilization. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v.50, n.5, p.757-773, 1999.

EHLE, F. R.; MURPHY, M. R.; CLARK, J. H. In situ particle size reduction and the effect of particle size on degradation of crude protein and dry matter in the rumen of dairy steers. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 65, n. 6, p. 963-971, 1982.

EL-SHAZLY, K.; DEHORITY, B. A.; JOHNSON, R. R. Effect of starch on the digestion of cellulose *in vitro* and in vivo by rumen microorganisms. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.20, n.2, p.268-273, 1961.

ERWIN, E. S.; ELLISTON, N. 3. Rapid method of determining digestibility of concentrates and roughages in cattle. **Journal of Dairy Science**, Albany, v.18, n.3, p. 1518, 1959. Resumo.

FERRARI, R. V.; PRATES, E. R. Estudo de material alternativo para medida de degradabilidade "in situ". In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9, 1997, Porto Alegre, **Livro de resumos...** Porto Alegre : UFRGS, 1997. p. 89.

FIGROID, W.; HALE, W. H.; THEURER, B. An evaluation of the nylon bag technique for estimating rumen utilization of grains. **Journal of Animal Science**, Albany, v.35, n.1, p.113-120, 1972.

FONTE, L. A. M. **Farelo de Arroz integral e desengordurado como suplementos na alimentação de ovinos**. 1988. 125 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 1988.

FREITAS, T. S. **Avaliação de misturas de volumosos de baixa qualidade com concentrados pela técnica de produção cumulativa de gás *in vitro***. 2001. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

GANEV, G.; ORSKOV, E. R.; SMART, R. The effect of roughage or concentrate feeding and rumen retention time on total degradation of protein in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.93, n.3, p.651-656, 1979.

GENRO, T. C. M.; PRATES, E. .R. Contaminação da matéria seca em resíduos de incubação "in situ" em diferentes horários. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34, 1997, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: [s.n.] 1997.

GIGENA, G. H. Degradabilidade ruminal, pós-ruminal e digestibilidade "in vitro" de alimentos concentrados disponíveis no Rio Grande do Sul para ruminantes. 1997. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 1997.

GIVENS, D. I.; GILL, M. Current and future potential of alternative techniques. **British Society of Animal Science**, Lothian, v.22, p.161-171, 1998.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications) **Agricultural Handbook**, Washington, n. 379, ARS, USDA, 1970.

GONÇALVES, M. B. F. **Farelo de arroz integral em dietas para bovinos : valor nutricional e desempenho animal**. 2001. 228 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2001.

GRENET, E. Microbes and Fibre Degradation. In: JOUANY, J.P. **Rumen microbial metabolism and ruminant digestion**. Paris: INRA, 1991. 372 p.

GÜTHRIE, M.J.; WAGNER, D.G. Influence of protein or grain supplementation and increasing levels of soybean meal on intake, utilization and passage rate of prairie hay in beef steers and heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.66, n.6, p.1529-1537, 1988.

HART, S. P. Associative effects of sorghum silage and sorghum grain diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.64, n.6, p.1779-1789, 1987.

HENNING, P. H.; STEYN, D. G.; MEISSNER, H. H. Effect of synchronization of energy and nitrogen supply on ruminal characteristics and microbial growth. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 9, p. 2516-2528, 1993.

HOOVER, W. H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 73, n. 11, p. 2755 – 2766, 1986.

HUNTINGTON, J. A.; GIVENS, D. I. Studies on “in situ” degradation of feeds in the rumen: 1. Effect of species, bag mobility and incubation sequence on dry matter disappearance. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 64, p. 227-241, 1997.

HUNTINGTON, J. A.; GIVENS, D. I. The “in situ” technique for studying the rumen degradation of feeds: A review of procedure. **Nutrition Abstracts and Reviews (Series B)**, Stratford, v. 65, n. 2, 1995.

HUTHANEN, P. Associative effects of feeds in ruminants. **Norwegian Journal of Agricultural Science**, Норвегия, v. 5 (Suppl.), p. 37 – 57, 1991.

IBRAHIM, M. N. M. Rice bran as a supplement for straw based rations. In: RUMINANT FEEDING SYSTEMS UTILIZING FIBROUS AGRICULTURAL RESIDUES – 1986, R.M. Dixon. **Proceedings...** Victoria, p. 3105 – 3114, 1987.

JOANNING, S. W.; JOHNSON, D. E.; BARRY, B. P. Nutrient digestibility depressions in corn silage – corn grain mixtures fed to steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 53, n. 5, p.1095-1103, 1981.

JUNG, H. G. Forage lignins and their effect on fiber digestibility. **Agronomy Journal**, Madison, v. 81, p. 33-38, 1989.

LINDBERG, J. E.; VARVIKKO, T. The effect of bag pore size on the ruminal degradation of dry matter, nitrogenous compounds and cell walls in nylon bags. **Swedish Journal of Agricultural Research**, Stockholm, v.12, p.163-171, 1982.

LINDBERG, J. E.; KASPERSSON, A.; CISZUK, P. Studies on pH number of protozoa and microbial ATP concentrations in rumen incubated nylon bags with different pore sizes. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.103, n.3, p.501-504, 1984.

LUCCI, C. S. **Nutrição e manejo de bovinos leiteiros**. São Paulo: Manole, 1997. 198 p.

MALAFAIA, P. A. M. **Taxas de digestões das frações protéicas e de carboidratos de alimentos por técnicas “in situ”, “in vitro” e de produção de gases**. Viçosa : U F V, 1997.96 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

MAPA. **Normas e padrões de nutrição e alimentação animal**. [S.I.] : Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Depto. de Fiscalização e Fomento da Produção Animal, 2000. Revisão 2000. 153 p.

MARINUCCI, M. T.; DEHORITY, B. A.; LOERCH, S. C. In vitro and in vivo studies of factors affecting digestion of feeds in synthetic fibre bags. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 70, n. 1, p. 296 – 307, 1992.

MEHREZ, A. Z.; ORSKOV, E. R. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 88, n. 3, p. 645-650, 1977.

MERCHEN, N. R.; BOURQUIN, L. D. Processes of digestion and factors influencing digestion of forage-based diets by ruminants. In: FAHEY JR., G. C. (Coord.) **Forage quality, evaluation, and utilization**. Wisconsin: [s.n.], 1994.

MERTENS, D. R.; LOFTEN, J. R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics in vitro. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 49, n. 2, p.192, 1980.

MEYER, J. H. F.; MACKIE, R. I.; Microbial evaluation of the intraruminal in sacculus digestion technique. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, p. 622-629, 1986.

MILES, J. T. Ruminal digestion of some crude fiber constituents. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 34, n. 18, p. 492, 1951. Resumo.

MOORE, J.E.; KUNKLE, W.E. **Associative effects on supplements on utilization of forages**. Disponível em: <http://cnrit.tamu.edu/conf/isnh/post-online/post0058/>. Acesso em: nov. 1999.

MOULD, F.L.; ORSKOV, E.R. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.10, n.1, p.1-14, 1983a.

MOULD, F.L.; ORSKOV, E.R.; MANN, S.O. Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 15-30, 1983b.

MOULD, F.L.; ORSKOV, E.R.; GAULD, S.A. Associative effects of mixed feeds. II. The effect of dietary addition of bicarbonate salts on the voluntary intake and digestibility of diets containing various proportions of hay and barley. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 31-47, 1983c.

MÜLLER, M. **Avaliação da técnica de inóculo fecal para a determinação da digestibilidade "in vitro"**. 2000, 90 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. Washington: National Academy Press, 2001. 381p.

NJIE, M.; REED, J. Potential of crop residues and agricultural by-products for feeding sheep in a Gambian village. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 52, p. 313 – 323, 1995.

NOCEK, J. E. Evaluation of specific variables affecting “in situ” estimates of ruminal dry matter and protein digestion. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 60, n. 5, p. 1347-1358, 1985.

NOCEK, J. E. “In situ” and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 71, n. 8, p. 2051-2069, 1988.

NOCEK, J. E.; RUSSEL, J. P. Protein and energy as an integrated system. Relationships of ruminal protein and carbohydrates availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 71, n. 7, p. 2070 – 2107, 1988.

NOZIÈRE, P.; BESLE, J. M.; MARTIN, C.; MICHALET-DOREAU, B. Effect of barley supplement on microbial fibrolytic enzyme activities and cell wall degradation rate in the rumen. **Journal of Science of Food and Agriculture**, West Sussex, v. 72, p. 235 –242, 1996.

NOZIÈRE, P.; MICHALET-DOREAU, B. In sacco methods. In: D’MELLO, J. P. F. **Farm Animal Metabolism and Nutrition**. London: CABI, 2000.

ORSKOV, E. R. The in situ technique for the estimation of forage degradability in ruminants. In: GIVENS, D. I.; OWEN, E.; AXFORD, R. F. E.; OMED, H. M. **Forage Evaluation in Ruminant Nutrition**. London: CABI, 2000. p. 449 – 474.

ORSKOV, E. R.; DEB HOVELL, F. D.; MOULD, F. Uso de la tecnica de la bolsa de nylon para la valuacion de los alimentos. **Producción Animal Tropical**, Dominicana, v.5, p.313-233, 1980.

ORSKOV, E.R.; RYLE, M. **Energy nutrition in ruminants**. London: Elsevier Science, 1990. 149 p. Chapter 3: Manipulation of rumen fermentation and associative effects.

OSPINA, H. **Utilização de farelo de arroz desengordurado como suplemento de volumosos de baixa qualidade**. 1990. 168 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.

PICOLLI, L. **Determinação de fibra total, insolúvel e solúvel em grãos de cereais**. 1997. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.

POORE M. H.; MOORE, J. A.; SWINGLE, R. S. Differential passage rates and digestion of neutral detergent fiber from grain and forages in 30, 60 and 90% concentrate diets fed to steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 9, p. 2965-2973, 1990.

PORDOMINGO, A. J.; WALLACE, J. D.; FREEMAN, A. S.; GALYEAN, M. L. Supplemental corn grain for steers grazing native rangeland during summer, **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 69, n. 4, p. 1678 – 1687, 1991.

PRASAD, C. S.; WOOD, C. D.; SAMPATH, K. T. Use of in vitro gas production to evaluate rumen fermentation of untreated and urea treated finger millet straw (*Eleusine coracana*) supplemented with different levels of concentrate. **Journal of Science of Food and Agriculture**, West Sussex, v. 65, p. 457 – 464, 1994.

PRATES, E. R. Arroz e cereais de inverno. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 6 , 1995, Piracicaba, **Anais...** Piracicaba: Fealq, 1995. p. 73 - 98.

ROSALES, M. ; GILL, M. ; WOOD, C.D. ; SPEEDY, A.W. Associative Effects in vitro of Mixtures of Tropical Fodder Trees. **British Society of Animal Science**. Lothian, v.22, p.175-177, 1998.

RUSSELL, J. B.; SNIFFEN, C. J.; VAN SOEST, P. J. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 67, n. 9, p. 1725, 1983.

SINCLAIR, L. A.; GARNSWORTHY, P.C.; NEWBOLD, J. R.; BUTTERY, P. J. Effect of synchronizing the rate of dietary energy and nitrogen release on rumen fermentation and microbial protein synthesis in sheep. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 120, p. 251-263, 1992.

SMITH, L. W.; GOERING, H. K.; GORDON, C. H. Relationships of forage compositions with rates of cell wall digestion and indigestibility of cell walls. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 55, n. 7, p. 1140-1147, 1972.

STRITZLER, N.P.; HVELPLUND, T. A.; WOELSTRUP, J. The influence of position in the rumen on dry matter disappearance from nylon bags. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Stockholm, v. 40, p. 363-366, 1990.

STUMPF JUNIOR, W.; LÓPEZ, J. Consumo e digestibilidade do amido do grão de sorgo em ruminantes. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 31, 1994, Maringá. **Anais....** Maringá :SBZ, 1994. p. 708

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

VAN SOEST, P. J; JONES, L. H. P. The effect of silica upon digestibility decline. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.51, n.10, 1644-1648, 1982.

VAN SOEST, P. J.; McQUEEN, R. W. Chemistry and estimation of fibre. **Proceedings of Nutrition Society**, Cambridge, v. 32, n. 3, p. 123 – 130, 1973.

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

VARGA, G. A.; HOOVER, W. H. Rate and extent of neutral detergent fiber degradation of feedstuffs in situ. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 66, n. 10, p. 2109-2115, 1983.

VARVIKKO, T.; LINDBERG, J. E. Microbial nitrogen in nylon bag residues quantified by feed 15N dilution. **British Journal of Nutrition**, London, v. 54, p. 473,1985.

VILELA, G. L.; VALADARES FILHO, S. C.; COELHO DA SILVA, J.E. et al. Degradabilidade "in situ" da matéria seca e da proteína bruta e proteína efetivamente degradada no rúmen, de vários alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.23, n.3, p.342-351, 1994.

WALLACE, R. J. Effect of ammonia concentration on the composition, hydrolytic activity and nitrogen metabolism of the microbial flora of the rumen. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 47, p. 443-455, 1979.

WARPECHOWSKY M. **Efeito da fibra insolúvel da dieta sobre a passagem na trato gastrointestinal de matrizes machos de linhagem de corte intactos, cecectomizados e fistulados no íleo terminal.** 1997. 117 f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 1997.

WEAKLEY, D. C.; STERN, M. D.; SATTER, L. D. Factors affecting disappearance of feedstuffs from bags suspended in the rumen. **Journal of Animal Science**, Albany, v.56, n.2, p.493-506, 1983.

WILSON, M. K.; BRIGGS, C. A. E. The normal flora of the bovine rumen. II. Quantitative bacteriological studies. **Journal of Applied Bacteriology**, Warrington, v. 18, p. 294 – 306, 1955.

WOOD C. D.; MURRAY, A. H.; MOSS, A. R.; GIVENS, D. I. Use of the gas production technique to investigate responses of supplementing low quality forages. 1 . In vitro interactions. **British Society of Animal Science**, Lothian, v.22, p. 92-93, 1998.

WOODY, H. D.; FOX, D. G.; BLACK, J. R. Predicting net energy value of corn silage varying in grain content. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.57, n. 3, p. 710, 1983.

## 7. APÊNDICES

Apêndice 1. Resultados das análises de Matéria Orgânica (MO). (Dados expressos na MS)

Amostra	MO (%)	Média	Desvio Padrão
Milho	98,65	99,12	0,6672
Milho	99,59		
Feno	93,73	93,90	0,2439
Feno	94,07		
Flo Soja	92,73	92,68	0,0691
Flo Soja	92,63		
Flo Arroz	82,77	84,07	1,8400
Flo Arroz	85,37		

Apêndice 2. Resultados das análises de Matéria Seca (MS), Umidade e Proteína Bruta (PB) – Realizadas pelo LNA/UFRGS

Amostra	Base	MS (%)	Umidade (%)	PB (%)
Milho	100% Seco	100		8,55
	Seco Ar	84,83	15,17	7,25
Feno	100% Seco	100		10,37
	Seco Ar	81,36	18,64	8,44
Flo Soja	100% Seco	100		6,81
	Seco Ar	87,98	12,02	5,99
Flo Arroz	100% Seco	100		52,27
	Seco Ar	85,90	14,10	44,90

## Apêndice 3. Resultados das análises de FDN (Dados expressos na MS)

Amostra	FDN (%)	Média (%)	Desvio Padrão
Feno	77,72	78,30	0,82
	77,64		
	78,45		
	79,40		
Milho	27,31	26,05	1,47
	23,98		
	26,12		
	26,81		
F. Arroz	53,91	54,14	0,19
	54,24		
	54,26		
F. Soja	20,06	19,58	1,88
	18,56		
	17,06		
	22,05		
	20,18		

## Apêndice 4. Resultados da repetição das análises de FDN do farelo de arroz com e sem amilase (Dados expressos na MS)

Amostra de Flo. Arroz	FDN (%)	Média	D. Padrão	Diferença das Médias Com e Sem Amilase
COM AMILASE	69,87	69,84	0,0419	2,49 pontos percentuais
COM AMILASE	69,81			
SEM AMILASE	72,77	72,33	0,6328	
SEM AMILASE	71,88			

## Apêndice 5. Degradabilidade da MS obtida e estimada do Farelo de Soja.

Proporção de Concentrado	Réplica	Período	Degradabilidade Estimada	Degradabilidade Obtida
100	A	1	90,7663	90,7663
100	B	1	91,5142	91,5142
100	C	1	94,6187	94,6187
100	A	2	88,7242	88,7242
100	B	2	87,9945	87,9945
100	C	2	90,2251	90,2251
100	A	3	72,1078	72,1078
100	B	3	85,5930	85,5930
100	C	3	81,6052	81,6052
50	A	1	62,3411	63,1212
50	B	1	---	63,4099
50	C	1	63,5719	61,2850
50	A	2	60,5474	57,6744
50	B	2	58,6490	59,7531
50	C	2	60,6980	56,2345
50	A	3	51,1591	48,3431
50	B	3	58,8681	52,6286
50	C	3	---	54,4405
40	A	1	56,6560	---
40	B	1	---	57,1166
40	C	1	57,3625	57,5084
40	A	2	54,9121	53,9163
40	B	2	52,7799	59,3918
40	C	2	54,7926	54,8635
40	A	3	46,9693	44,5339
40	B	3	53,5231	51,5848
40	C	3	---	46,4283
30	A	1	50,9710	52,1677
30	B	1	---	51,4990
30	C	1	51,1531	---
30	A	2	49,2767	48,3177
30	B	2	46,9109	48,0035
30	C	2	48,8872	44,4319
30	A	3	42,7796	47,6984
30	B	3	48,1782	39,1733
30	C	3	---	45,7294
20	A	1	45,2860	46,3497
20	B	1	---	45,4353
20	C	1	44,9438	42,1224
20	A	2	43,6413	43,3243
20	B	2	41,0418	46,8268
20	C	2	42,9818	43,3169
20	A	3	38,5898	42,4764
20	B	3	42,8332	39,8609
20	C	3	---	40,2949

## Apêndice 6. Degradabilidade da MS obtida e estimada do Flo. de Arroz Integral

Proporção de Concentrado	Réplica	Período	Degradabilidade Estimada	Degradabilidade Obtida
100	A	1	44,2752	44,2752
100	B	1	44,0148	44,0148
100	C	1	43,5927	43,5927
100	A	2	44,8573	44,8573
100	B	2	45,2340	45,2340
100	C	2	---	---
100	A	3	44,4271	44,4271
100	B	3	40,9456	40,9456
100	C	3	43,8536	43,8536
50	A	1	39,0955	35,7415
50	B	1	---	38,0686
50	C	1	38,0589	---
50	A	2	38,6140	---
50	B	2	37,2688	41,7575
50	C	2	---	38,6157
50	A	3	37,3187	32,1672
50	B	3	36,5444	34,3621
50	C	3	---	34,2140
40	A	1	38,0596	---
40	B	1	---	---
40	C	1	36,9521	---
40	A	2	37,3653	34,9959
40	B	2	35,6758	37,5231
40	C	2	---	---
40	A	3	35,8970	31,5791
40	B	3	35,6642	35,6547
40	C	3	---	34,4060
30	A	1	37,0237	34,5669
30	B	1	---	35,1932
30	C	1	35,8453	34,3361
30	A	2	36,1166	35,6202
30	B	2	34,0827	36,9129
30	C	2	---	34,9974
30	A	3	34,4754	32,9915
30	B	3	34,7839	---
30	C	3	---	28,2670
20	A	1	35,9877	35,0346
20	B	1	8,8030	36,8034
20	C	1	34,7386	34,1892
20	A	2	34,8680	34,7833
20	B	2	32,4897	33,6050
20	C	2	---	34,3788
20	A	3	33,0537	34,7335
20	B	3	33,9037	30,2010
20	C	3	---	29,7047

## Apêndice 7. Degradabilidade da MS obtida e estimada do Milho Moído.

Proporção de Concentrado	Réplica	Período	Degradabilidade Estimada	Degradabilidade Obtida
100	A	1	76,7941	76,7941
100	B	1	77,4125	77,4125
100	C	1	71,7886	71,7886
100	A	2	68,8210	68,8210
100	B	2	73,1511	73,1511
100	C	2	65,8470	65,8470
100	A	3	69,6372	69,6372
100	B	3	70,8014	70,8014
100	C	3	60,2962	60,2962
50	A	1	55,3550	53,9816
50	B	1	---	51,1412
50	C	1	52,1568	52,2425
50	A	2	50,5958	49,7904
50	B	2	51,2273	44,0143
50	C	2	48,5090	47,6761
50	A	3	49,9238	47,8909
50	B	3	51,4723	45,8134
50	C	3	---	---
40	A	1	51,0672	47,8710
40	B	1	---	50,5884
40	C	1	48,2305	41,7627
40	A	2	46,9508	46,4204
40	B	2	46,8426	42,3652
40	C	2	45,0414	44,8890
40	A	3	45,9811	41,7797
40	B	3	47,6065	36,6908
40	C	3	---	---
30	A	1	46,7793	46,3215
30	B	1	---	45,2540
30	C	1	44,3041	51,1271
30	A	2	43,3057	---
30	B	2	42,4578	41,3028
30	C	2	41,5738	---
30	A	3	42,0384	38,0234
30	B	3	43,7407	41,4168
30	C	3	---	42,2897
20	A	1	42,4915	44,6928
20	B	1	---	41,2892
20	C	1	40,3777	39,8365
20	A	2	39,6607	36,0725
20	B	2	38,0731	38,9168
20	C	2	38,1062	---
20	A	3	38,0957	39,3153
20	B	3	39,8749	38,4117
20	C	3	---	36,5375

## Apêndice 8. Degradabilidade da FDN obtida e estimada do Farelo de Soja

Proporção de Concentrado	Réplica	Período	Degradabilidade Estimada	Degradabilidade Obtida
100	A	2	73,5576	73,5576
100	B	2	71,0391	71,0391
100	C	2	78,6883	78,6883
100	A	3	16,3924	16,3924
100	B	3	61,9663	61,9663
100	C	3	49,0377	49,0377
50	A	2	49,2756	29,8287
50	B	2	46,1590	33,6926
50	C	2	50,9952	27,2693
50	A	3	17,7634	15,7594
50	B	3	41,5034	23,4934
50	C	3	---	26,9563
40	A	2	44,4191	29,0215
40	B	2	41,1829	38,2582
40	C	2	45,4565	30,9258
40	A	3	18,0376	15,0515
40	B	3	37,4108	26,8133
40	C	3	---	18,2910
30	A	2	39,5627	27,7112
30	B	2	36,2069	27,4148
30	C	2	39,9179	21,6773
30	A	3	18,3118	27,1879
30	B	3	33,3182	14,0136
30	C	3	---	24,3117
20	A	2	34,7063	26,4177
20	B	2	31,2309	31,3000
20	C	2	34,3793	26,2334
20	A	3	18,5860	25,3677
20	B	3	29,2256	21,7649
20	C	3	9,8075	22,4158

Apêndice 9. Degradabilidade da FDN obtida e estimada do Farelo de Arroz Integral.

Proporção de Concentrado	Réplica	Período	Degradabilidade Estimada	Degradabilidade Obtida
100	A	2	17,7278	17,7278
100	B	2	18,1958	18,1958
100	C	2		
100	A	3	14,6024	14,6024
100	B	3	9,6128	9,6128
100	C	3	14,1242	14,1242
50	A	2	21,3606	39,1634
50	B	2	19,7373	27,4769
50	C	2		23,3449
50	A	3	16,8684	10,5474
50	B	3	15,3267	13,5301
50	C	3		13,1830
40	A	2	22,0872	20,8295
40	B	2	20,0456	23,8639
40	C	2		
40	A	3	17,3216	14,7793
40	B	3	16,4694	19,9328
40	C	3		18,3997
30	A	2	22,8138	21,8849
30	B	2	20,3539	23,2754
30	C	2		21,2026
30	A	3	17,7748	17,7020
30	B	3	17,6122	
30	C	3		11,3593
20	A	2	23,5403	23,5857
20	B	2	20,6623	22,4291
20	C	2		23,1548
20	A	3	18,2280	21,3491
20	B	3	18,7550	15,5330
20	C	3		15,0368

Apêndice 10. Degradabilidade da FDN obtida e estimada do Milho Moído

Proporção de Concentrado	Réplica	Período	Degradabilidade Estimada	Degradabilidade Obtida
100	A	2	32,4882	32,4882
100	B	2	42,9678	42,9678
100	C	2	25,2233	25,2233
100	A	3	33,8681	33,8681
100	B	3	36,3812	36,3812
100	C	3	---	---
50	A	2	28,7408	25,9222
50	B	2	32,1234	16,4890
50	C	2	24,2627	22,5226
50	A	3	26,5013	19,7748
50	B	3	28,7109	16,5090
50	C	3	---	---
40	A	2	27,9914	26,3236
40	B	2	29,9545	20,3093
40	C	2	24,0705	23,8656
40	A	3	25,0279	16,9795
40	B	3	27,1768	9,3737
40	C	3	---	---
30	A	2	27,2419	---
30	B	2	27,7856	20,9759
30	C	2	23,8784	---
30	A	3	23,5545	17,8566
30	B	3	25,6427	22,5455
30	C	3	---	23,8209
20	A	2	26,4924	14,5145
20	B	2	25,6167	18,7110
20	C	2	23,6863	---
20	A	3	22,0811	22,2617
20	B	3	24,1086	21,0635
20	C	3	---	---

Apêndice 11. ANOVA do efeito associativo da MS do farelo de soja a 20%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	0,4482	0,58	0,5274
Período	2	8,6360	11,08	0,0828
Erro	2	0,7792		
Total	5			

Apêndice 12. ANOVA do efeito associativo da MS do farelo de soja a 30%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	0,6338	0,83	0,4574
Período	2	21,9814	28,95	0,0334
Erro	2	0,7594		
Total	5			

Apêndice 13. ANOVA do efeito associativo da MS do farelo de soja a 40%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	0,0469	0,02	0,9084
Período	2	37,1429	13,43	0,0693
Erro	2	2,7648		
Total	5			

Apêndice 14. ANOVA do efeito associativo da MS do farelo de soja a 50%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	5,2828	5,10	0,1525
Período	2	44,4515	42,89	0,0228
Erro	2	1,0365		
Total	5			

Apêndice 15. ANOVA do efeito associativo da MS do farelo de arroz a 20%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	9,3251	0,59	0,5232
Período	2	4,6391	0,29	0,7735
Erro	2	15,845		
Total	5			

Apêndice 16. ANOVA do efeito associativo da MS do farelo de arroz a 30%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	4,1500	1,48	0,3483
Período	2	5,5630	1,98	0,3356
Erro	2	2,8101		
Total	5			

Apêndice 17. ANOVA do efeito associativo da MS do farelo de arroz a 40%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	1,1664	1,73	0,4139
Período	2	1,8333	2,73	0,3879
Erro	1	0,6724		
Total	1			

Apêndice 18. ANOVA do efeito associativo da MS do farelo de arroz a 50%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	1,2788	0,31	0,6338
Período	2	7,4862	1,81	0,3555
Erro	2	4,1291		
Total	5			

Apêndice 19. ANOVA do efeito associativo da MS do milho moído a 20%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	0,3800	0,97	0,4282
Período	2	7,7815	19,90	0,0479
Erro	2	0,3912		
Total	5			

Apêndice 20. ANOVA do efeito associativo da MS do milho moído a 30%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	0,3408	0,14	0,7485
Período	2	15,0515	5,96	0,1436
Erro	2	2,5245		
Total	5			

Apêndice 21. ANOVA do efeito associativo da MS do milho moído a 40%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	24,7254	5,21	0,1499
Período	2	13,4390	2,83	0,2609
Erro	2	4,7446		
Total	5			

Apêndice 22. ANOVA do efeito associativo da MS do milho moído a 50%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	10,9350	13,08	0,0687
Período	2	12,9458	15,48	0,0607
Erro	2	0,8363		
Total	5			

Apêndice 23. ANOVA do efeito associativo da FDN do farelo de soja a 20%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	0,5550	0,02	0,9002
Período	1	90,5352	4,07	0,2929
Erro	1	22,2312		
Total	3			

Apêndice 24. ANOVA do efeito associativo da FDN do farelo de soja a 30%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	71,7409	3,56	0,3103
Período	1	68,0625	3,38	0,3173
Erro	1	20,1601		
Total	3			

Apêndice 25. ANOVA do efeito associativo da FDN do farelo de soja a 40%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	86,6761	32,23	0,1110
Período	1	205,349	76,35	0,0725
Erro	1	2,6896		
Total	3			

Apêndice 26. ANOVA do efeito associativo da FDN do farelo de soja a 50%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	170,433	5,64	0,2536
Período	1	187,279	6,20	0,2431
Erro	1	30,195		
Total	3			

Apêndice 27. ANOVA do efeito associativo da FDN farelo de arroz a 20%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	0,0121	0,01	0,9348
Período	1	21,9024	19,13	0,1431
Erro	1	1,1449		
Total	3			

Apêndice 28. ANOVA do efeito associativo da FDN farelo de arroz a 30%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	1,7161	0,50	0,6077
Período	1	32,9476	9,63	0,1985
Erro	1	3,4225		
Total	3			

Apêndice 29. ANOVA do efeito associativo da FDN farelo de arroz a 40%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	1,0816	18,78	0,1444
Período	1	19,4481	337,64	0,0346
Erro	1	0,0576		
Total	3			

Apêndice 30. ANOVA do efeito associativo da FDN farelo de arroz a 50%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	8,3232	0,19	0,7364
Período	1	121,33	2,82	0,3422
Erro	1	43,0992		
Total	3			

Apêndice 31. ANOVA do efeito associativo da FDN do milho moído a 20%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	25,452	1,95	0,3958
Período	1	2,0592	0,16	0,7584
Erro	1	13,0682		
Total	3			

Apêndice 32. ANOVA do efeito associativo da FDN do milho moído a 30%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	18,105	15,96	0,1561
Período	1	0,4033	0,36	0,6577
Erro	1	1,1342		
Total	3			

Apêndice 33. ANOVA do efeito associativo da FDN do milho moído a 40%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	70,2244	3,41	0,3161
Período	1	33,4084	1,62	0,4239
Erro	1	20,6116		
Total	3			

Apêndice 34. ANOVA do efeito associativo da FDN do milho moído a 50%

Fonte	GL	QM	Valor F	Pr > F
EST ou OBT	1	65,691	35,26	0,1062
Período	1	4,5582	2,45	0,3621
Erro	1	1,8632		
Total	3			