**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Impacto da variabilidade populacional na degradabilidade ruminal
in situ em touros alimentados com forragens de baixa qualidade**

Janaina Rosolem Lima

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba
2015**

Janaina Rosolem Lima
Zootecnista

**Impacto da variabilidade populacional na degradabilidade ruminal *in situ* em
touro alimentados com forragens de baixa qualidade**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ GUSTAVO NUSSIO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Lima, Janaina Rosolem

Impacto da variabilidade populacional na degradabilidade ruminal *in situ* em touros alimentados com forragens de baixa qualidade / Janaina Rosolem Lima. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
115 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Análises multivariadas 2. Dieta com alta fibra 3. Fibra de baixa qualidade 4. Taxa fracional de degradação I. Título

CDD 636.2084
L732i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

*Com amor, dedico este trabalho aos meus
queridos pais, Celso Lima e Sandra Lima, cujo
incentivo e ensinamentos me fizeram chegar até
aqui!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida e por todas as pessoas que Ele colocou em meu caminho, pois foram elas que me ajudaram a entender o quanto eu ainda posso melhorar como pessoa, ser humano. Senhor, obrigada por todos os momentos difíceis, na execução do trabalho ou na relação com as pessoas, que vivi neste período que estive na pós-graduação.

Agradeço imensamente a minha família, pois foram eles que me ensinaram a batalhar para conseguir o melhor na vida, agir com responsabilidade e nunca desistir. Todos, sempre estiveram muito presentes na minha formação acadêmica e pessoal, são meu amparo e minha felicidade. Obrigada por nunca me deixarem pensar, nem sequer por um breve momento, que eu estava sozinha nesta caminhada.

Ao meu noivo Wesley Santos pela companhia, ajuda nos trabalhos de campo, amizade e, acima de tudo, sua contribuição para o meu crescimento pessoal, nesta fase tão importante da minha vida. **Te amo!!**

A minha querida amiga Lilian Elgalise pelos conselhos, ajuda com a estatística e discussões envolvendo este trabalho, tudo isso me ajudou a realizá-lo na forma em que está apresentado. Sua amizade é muito importante para mim, pois com você não aprendi apenas princípios acadêmicos, mas lições para a vida. Obrigada!!!

Ao Prof. Luiz Gustavo Nussio pela orientação e ensinamentos despendidos a mim e aos meus colegas de trabalho.

Aos amigos do QCF, pois o que seriam dos nossos trabalhos se não fôssemos um grupo? Agradeço a todos os que contribuíram para realização desta tese, seja em esforço de campo, ajuda no laboratório, risadas, “prosas” de ânimo pelos corredores e claro, os desentendimentos. Quero agradecer ao Álvaro (Juvenal) cuja ajuda foi muito além da parte de campo, foi também de amizade e companheirismo. Aos amigos Letícia, Daniel (principalmente por sua paciência), João Meneghel (100-kina criancinha), Janielen, Cristiano, Greici, João Pedro, Max, Juliana Fernandes, Paula, Juliana (UDESC), João Daniel, Maity, Adir, Mateus (Biribol) e Pedro.

Aos amigos que ficaram na fazenda Santo Antônio da Areia, pela ajuda e compreensão.

Ao técnico do laboratório de Bromatologia da ESALQ/USP, Carlos César, pela imensa ajuda na execução das análises de fibra e risadas descontraídas no dia-a-dia.

EPÍGRAFE

*Se você conhece o inimigo e
conhece a si mesmo, não precisa
temer o resultado de cem batalhas.*

*Se você se conhece, mas não
conhece o inimigo, para cada
vitória ganha sofrerá também uma
derrota. Se você não conhece nem o
inimigo nem a si mesmo, perderá
todas as batalhas...*

Sun Tzu

(A arte da guerra)

*Concedei-nos Senhor,
serenidade necessária, para aceitar
as coisas que não podemos
modificar, coragem para modificar
aquelas que podemos e sabedoria
para distinguirmos umas das
outras.*

Reihold Niebuhr

SUMÁRIO

RESUMO 11	
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 Estudos <i>in situ</i>	27
2.2. Variabilidade entre animais	30
2.3 Fibra e comportamento ingestivo em ruminantes.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Local e período experimental	37
3.2 Animais utilizados no experimento	37
3.2.1 Seleção dos animais	37
3.2.2 Animais selecionados para as incubações.....	39
3.3 Cirurgia de implantação de cânulas nos animais	40
3.4 Comportamento ingestivo.....	41
3.5 Dieta 1 – Feno de Coast-cross moído	42
3.6 Dieta experimental 2 – Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	43
3.7 <i>In situ</i> 45	
3.8 Pesagens dos animais	47
3.9 Análises bromatológicas.....	47
3.9.1 Caracterização dos substratos e farelo de soja.....	47
3.9.2 Análises químicas nos resíduos de incubação <i>in situ</i>	48
3.10 Análises estatísticas	49
4 RESULTADOS	53
4.1 Dieta com feno de Coast-cross	53
4.2 Comportamento ingestivo dos bovinos canulados alimentados com feno de Coast-cross.	70
4.3 Coeficiente de variação como medida de precisão em ensaios <i>in situ</i> – primeira incubação <i>in situ</i>	72
4.4 Dieta com bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	73

4.5 Comportamento ingestivo dos bovinos canulados alimentados com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	91
4.6 Coeficiente de variação como medida de precisão em ensaios <i>in situ</i> – segunda incubação <i>in situ</i>	93
5 DISCUSSÃO.....	95
5.1 Parâmetros <i>in situ</i>	95
5.2 Variabilidade da população de bovinos	97
5.3 Comportamento ingestivo	102
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107
REFERÊNCIAS	109

RESUMO

Impacto da variabilidade populacional na degradabilidade ruminal *in situ* em bovinos alimentados com forragens de baixa qualidade

Estudos *in situ* comumente são conduzidos com pequeno número de animais, existindo poucos trabalhos enfocando o impacto da variabilidade animal sobre seus resultados. O objetivo deste estudo foi explorar o efeito da variabilidade animal sobre as taxas fracionais de degradação (kd) de MS, FDN, FDA e CEL de forragens. Foi conduzido experimento utilizando trinta novilhos Nelore portadores de cânula ruminal ($372 \pm 16,02$ kg P.V.). Dieta 1, todos os animais receberam dieta contendo 100% feno de Coast-cross + sal mineral, ambos *ad libitum*. Na Dieta 2, todos os animais receberam dieta com 88% de bagaço de cana *in natura*, 8% de farelo de soja, 2,8% de premix mineral e 1,2% de uréia. Em ambos os períodos foram incubadas amostras de feno de Coast-cross (Fc) (7,31% PB; 78,24% FDN; 40,92% FDA), bagaço de cana-de-açúcar (BAG) (3,04% PB; 90,31% FDN; 69,36% FDA) e feno Tifton-85 (Ft) (13,32% PB; 73,27% FDN; 39,29% FDA) em sacos de poliamida (10 cm x 20 cm; 30 ± 10 µm porosidade) nos tempos 0, 12, 24, 48, 72 e 144 h. Os sacos foram suspensos no saco ventral do rúmen em ordem reversa e removidos simultaneamente no tempo zero. Os teores de MS, FDN, FDA e lignina nos resíduos foram determinados por química líquida e a CEL foi calculada por subtração do teor de lignina da fração do FDA. A cinética de degradação ruminal de MS, FDN, FDA e CEL foram calculadas de acordo com o modelo não linear $Y(t) = a + b(1 - e^{(-kd \times t)})$; onde $t \geq 0$. As atividades de comportamento ingestivo (ingestão, ruminação, ingestão de água e ócio) foram registradas em intervalos de 10 minutos durante 24 horas. Análise de Componentes Principais foi utilizada para determinar a correlação entre substratos; Análise Fatorial para caracterizar a população de animais ($P < 0,05$); Análise de Agrupamento e Contrastes Multivariados para compor grupos dentro da população ($P < 0,01$) e Análise de Correlação Canônica para determinar correlação entre kd e comportamento ingestivo ($P < 0,01$). Simulação entre número de animais e coeficiente de variação (CV) foi realizada na tentativa de estimar a quantidade adequada de repetições para estes estudos. As médias de kd para MS, FDN, FDA e CEL foram: 3,26; 3,29; 3,44 e 3,54 para Fc; 3,74; 3,88; 4,07 e 4,49 para Ft; e 2,67; 2,68; 2,58 e 2,65 para BAG respectivamente. Foram compostos três níveis de kd para Fc e Ft (alto, médio e baixo) e quatro para BAG (alto, médio alto, médio baixo e baixo). O CV é adequado para mensuração da precisão do ensaio, sendo mais indicado o índice de variação (IV). Em ambas as fases, para todos os substratos, não houve correlação entre kd e comportamento ingestivo. As diferentes correlações de kd entre substratos para as duas fases, demonstra a influência da dieta ofertada sobre o kd. O estudo da variabilidade e o IV indicam que o número de animais é dependente do substrato avaliado, porém o estudo da variabilidade demonstra que os indivíduos que compõe este número são distintos entre dietas.

Palavras-chave: Análises multivariadas; Dieta com alta fibra; Fibra de baixa qualidade; Taxa fracional de degradação

ABSTRACT

Impact of animal variability on *in situ* ruminal degradability in bulls fed low quality forages

In situ studies are general carried out with a few number of animals and there are few trials that inquire the impact of animal variability on these results. The aim of this study was to investigate the effect of animal population variability on fractional disappearance rate (kd) of DM, NDF, ADF and cellulose (CEL). Experiment using thirty ruminally cannulated Nellore bulls (372 ± 16.02 kg BW) was carried over. In phase 1, all animals received 100% Coast-cross hay with mineral mix *ad libitum*. In period 2, all animals received a diet containing 88% sugarcane bagasse, 8% soybean meal, 2.8% mineral mix and 1.2% urea (DM basis). In both trials, representative samples of Coast-cross hay (CCH – 7.31% CP, 78.24% NDF, 40.92% ADF), sugarcane bagasse (BAG – 3.04% CP, 90.31% NDF, 69.36% ADF) and Tifton-85 hay (TH – 13.32% CP, 73.27% NDF, 39.29% ADF) were incubated in polyamide-bags (10 cm × 20 cm; 30 ± 10 µm pore size) for 0, 12, 24, 48, 72, and 144 h. Bags were suspended in the rumen ventral sac before at feeding in reverse order and removed simultaneously at time zero. Residual DM, NDF, ADF, and lignin were determined by wet chemistry. Cellulose (CEL) was calculated as ADF minus lignin. Ruminal degradation kinetics of DM, NDF, ADF, and CEL were calculated using a nonlinear model $Y(t) = a + b(1 - e^{(-kd \times t)})$; where $t \geq 0$. Feeding behavior parameters (eating, ruminating, water drinking and idling) were recorded every 10 minutes during 24 h. Principal component analysis was used to determine correlation of variables among substrates. Factorial Analysis was used to characterize animal population ($P < 0.05$), Cluster with Multivariate Contrasts ($P < 0.01$) to analyze differences in kd groups and Multivariate Canonical correlation analysis ($P < 0.05$) to correlate kd with feeding behavior parameters. A simulation with number of animals was done against coefficient of variation (CV) to determinate optimum number of animals in an *in situ* assay. The kd (average) of DM, NDF, ADF, and CEL were: 3.26, 3.29, 3.44 and 3.54 for CCH; 3.74, 3.88, 4.07 and 4.49 for TH; and 2.67, 2.68, 2.58 and 2.65 for BAG, respectively. There was no correlation among substrates in both periods. Were found three groups of kd for CCH and TH (high, medium and low) and four groups for BAG (high, medium-high, medium, and low). CV is not adequate to measure experimental precision, instead it, variation index is indicated (VI). In both incubations phases, there was no relationship between feeding behavior and kd, for all incubated forages sources. The kd correlations among substrates between two incubation phases were different, indicating influence of the diet on kd. Variability investigation and VI parameter indicate that the number of animals necessary in these trials is affected by the substrate incubated. However, the variability investigation suggests that probably different animals compose this number.

Keywords: Fractional disappearance rate; High fiber diet; Low quality fiber; Multivariate statistics

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Disponibilidade de massa seca da forragem *B. brizantha* em cada um dos cinco piquetes utilizados entre os meses de maio a setembro na fazenda Santo Antônio da Areia no estado do Mato Grosso em método de pastejo contínuo.....39
- Figura 2 – Distribuição de frequência das taxas fracionais de degradação das porções analisadas de cada substrato durante a primeira incubação *in situ*, com bovinos recebendo dieta exclusiva de feno de Coast-cross.....54
- Figura 3 – Correlação entre as variáveis taxas fracionais de degradação dos três substratos ocorridas na primeira incubação *in situ* durante alimentação dos bovinos com dieta exclusiva de feno de Coast-cross60
- Figura 4 – Representação da dispersão dos animais em relação à degradação de bagaço de cana-de-açúcar e feno de Tifton-85 na primeira incubação *in situ* durante a alimentação dos bovinos com feno de Coast-cross.....63
- Figura 5 – Representação da dispersão dos animais em relação à degradação do feno de Coast-cross e feno de Tifton-85 na primeira incubação *in situ* durante a alimentação dos bovinos com feno de Coast-cross64
- Figura 6 – Representação da dispersão dos animais em relação à degradação do feno de Coast-cross e bagaço de cana-de-açúcar na primeira incubação *in situ* durante a alimentação dos bovinos com feno de Coast-cross.....64
- Figura 7 – Agrupamento dos indivíduos utilizando as taxas fracionais de degradação de MS, FDN, FDA e celulose do substrato feno de Coast-cross por meio do método de Ward, durante a primeira incubação *in situ* com alimentação dos bovinos exclusivamente com feno de Coast-cross66
- Figura 8 – Agrupamento dos indivíduos utilizando as taxas fracionais de degradação de MS, FDN, FDA e celulose do substrato bagaço de cana-de-açúcar por meio do método das Médias, durante a primeira incubação *in situ* com alimentação dos bovinos exclusivamente com feno de Coast-cross.....67
- Figura 9 – Agrupamento dos indivíduos utilizando as taxas fracionais de degradação de MS, FDN, FDA e celulose do feno de Tifton-85 por meio do método das Médias, durante a primeira incubação *in situ* com alimentação dos bovinos exclusivamente com feno de Coast-crossalta degradação68

Figura 10 – Comportamento ingestivo dos bovinos canulados após alimentação com dieta composta exclusivamente por feno de Coast-cross.....	71
Figura 11 – Coeficientes de variação médios das taxas fracionais de degradação, por substrato, em função do número de animais durante a primeira incubação <i>in situ</i> com alimentação dos bovinos com dieta composta exclusivamente por feno de Coast-cross	72
Figura 12 – Índice de variação médio das taxas fracionais de degradação, por substrato, em função do número de animais na primeira incubação <i>in situ</i> durante alimentação dos bovinos com dieta exclusiva de feno de Coast-cross	73
Figura 13 – Distribuição de frequência das taxas fracionais de degradação das porções analisadas de cada substrato durante a segunda incubação <i>in situ</i> , com os bovinos alimentados com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar	75
Figura 14 – Correlação entre as variáveis taxas fracionais de degradação dos três substratos ocorridas na segunda incubação <i>in situ</i> durante alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar	81
Figura 15 – Representação da dispersão dos animais em relação à degradação de bagaço de cana-de-açúcar e feno de Tifton-85 na segunda incubação <i>in situ</i> durante a alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar	84
Figura 16 – Representação da dispersão dos animais em relação à degradação de bagaço de cana-de-açúcar e celulose de feno de Coast-cross na segunda incubação <i>in situ</i> durante a alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar	85
Figura 17 – Representação da dispersão dos animais em relação à degradação de feno de Tifton-85 e celulose de feno de Coast-cross na segunda incubação <i>in situ</i> durante a alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar	86
Figura 18 – Agrupamento dos indivíduos utilizando as taxas fracionais de degradação de MS, FDN, FDA e celulose do substrato feno de Coast-cross por meio do método de Ward, durante a segunda incubação <i>in situ</i> com alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar	87

- Figura 19 – Agrupamento dos indivíduos utilizando as taxas fracionais de degradação de MS, FDN, FDA e celulose do substrato bagaço de cana-de-açúcar por meio do método de Ward, durante a segunda incubação *in situ* com alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar88
- Figura 20 – Agrupamento dos indivíduos utilizando as taxas fracionais de degradação de MS, FDN, FDA e celulose do substrato feno de Tifton-85 por meio do método de Médias, durante a segunda incubação *in situ* com alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar89
- Figura 21 – Comportamento ingestivo dos bovinos após alimentação com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar92
- Figura 22 – Coeficiente de variação médio das taxas fracionais de degradação, por substrato, em função do número de animais durante a segunda incubação *in situ* com alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar93
- Figura 23 - Índice de variação médio das taxas fracionais de degradação, por substrato, em função do número de animais na segunda incubação *in situ* durante alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar.....94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições ambientais durante o período experimental na ESALQ/USP em Piracicaba.....	37
Tabela 2 – Descrição dos piquetes e animais utilizados para o período experimental conduzido na fazenda Santo Antônio da Areia localizada em Rondonópolis – MT em junho/2012.....	38
Tabela 3 – Registro do escore corporal dos bovinos canulados durante todo o período experimental.....	42
Tabela 4 – Composição do feno de Coast-cross fornecido aos bovinos canulados como primeira dieta experimental	43
Tabela 5 – Composição das dietas de transição e avaliação fornecidas durante o período experimental de utilização de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> para os bovinos canulados.....	44
Tabela 6 – Composição dos substratos incubados durante os dois ensaios <i>in situ</i> realizados com os bovinos canulados.....	45
Tabela 7 – Descrição das variáveis fração solúvel (A), fração potencialmente degradável (B), fração indigestível (C), degradação efetiva (Deg _{Ef}), degradação potencial (Deg _{Pot}) e taxa fracional de degradação (kd) durante alimentação exclusiva com feno de Coast-cross	56
Tabela 8 – Influência do substrato sobre a fração solúvel (A), fração potencialmente degradável (B), fração indigestível (C), degradação efetiva (Deg _{Ef}), degradação potencial (Deg _{Pot}) e taxa fracional de degradação (kd) das porções FDN, FDA, CEL e hemicelulose durante a primeira incubação <i>in situ</i> com alimentação com dieta exclusiva de feno de Coast-cross.....	57
Tabela 9 – Influência do substrato sobre a fração solúvel (A), fração potencialmente degradável (B), fração indigestível (C), degradação efetiva (Deg _{Ef}), degradação potencial (Deg _{Pot}) e taxa fracional de degradação (kd) da matéria seca durante a primeira incubação <i>in situ</i> com alimentação exclusiva de feno de Coast-cross.....	58

Tabela 10 – Escores das variáveis taxas fracionais de degradação formadoras dos três componentes principais durante a primeira incubação <i>in situ</i> com alimentação dos bovinos com dieta exclusiva de feno de Coast-cross .	59
Tabela 11 – Participação de cada variável dentro dos modelos dos fatores na segunda incubação <i>in situ</i> durante a alimentação dos bovinos com dieta exclusiva de feno de Coast-cross	62
Tabela 12 – Médias de kd para as frações MS, FDN, FDA e CEL entre os grupos de níveis desempenho formados pelas análises multivariadas com os bovinos alimentados com dieta exclusiva de feno de Coast-cross	69
Tabela 13 – Atividades de ingestão, ruminação, ócio e consumo de água dos bovinos recebendo dieta exclusiva de feno de Coast-cross	70
Tabela 14 – Descrição das variáveis fração solúvel (A), fração potencialmente degradável (B), fração indigestível (C), degradação efetiva (Deg _{Ef}), degradação potencial (Deg _{Pot}) e taxa fracional de degradação (kd) durante a alimentação com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar	76
Tabela 15 – Influência do substrato sobre a fração solúvel (A), fração potencialmente degradável (B), fração indigestível (C), degradação efetiva (Deg _{Ef}), degradação potencial (Deg _{Pot}) e taxa fracional de degradação (kd) dos substratos na segunda incubação <i>in situ</i> durante a alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar.....	78
Tabela 16 – Escores das variáveis taxas fracionais de degradação dentro dos três componentes principais durante a segunda incubação <i>in situ</i> com alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar	80
Tabela 17 – Participação de cada variável dentro dos modelos dos fatores na segunda incubação <i>in situ</i> durante a alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar	83
Tabela 18 – Médias de kd para as frações MS, FDN, FDA e CEL entre os grupos de níveis desempenho formados pelas análises multivariadas com os bovinos alimentados com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar ..	90
Tabela 19 – Atividades de ingestão, ruminação, ócio e consumo de água de bovinos recebendo dieta contendo de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A – fração solúvel
B – fração insolúvel potencialmente degradável
C – fração indigestível
CEL – celulose
CELb – celulose do bagaço de cana-de-açúcar
CELft – celulose do feno Tifton-85
CELfc – celulose do feno Coast-cross
CP1 – componente principal 1
CP2 – componente principal 2
CP3 – componente principal 3
Deg_{Ef} – degradação efetiva
Deg_{Pot} – degradação potencial
FDA – fibra em detergente ácido
FDAb – fibra em detergente ácido do bagaço de cana-de-açúcar
FDAft – fibra em detergente ácido do feno Tifton-85
FDAfc – fibra em detergente ácido do feno Coast-cross
FDN – fibra em detergente neutro
FDNb – fibra em detergente neutro do bagaço de cana-de-açúcar
FDNft – fibra em detergente neutro do feno Tifton-85
FDNfc – fibra em detergente neutro do feno de Coast-cross
HEM – hemicelulose
HEMb – hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar
HEMft – hemicelulose do feno Tifton-85
HEMfc – hemicelulose do feno Coast-cross
kd – taxa fracional de degradação
kd CEL – taxa fracional de degradação da celulose
kd FDA – taxa fracional de degradação de fibra em detergente ácido
kd FDN – taxa fracional de degradação de fibra em detergente neutro
kd MS – taxa fracional de degradação da matéria seca
kp – taxa fracional de passagem
LIG – lignina
MS – matéria seca
MSb – matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar
MSft – matéria seca do feno Tifton-85
MSfc – matéria seca do feno Coast-cross

1 INTRODUÇÃO

Estudos *in situ* são utilizados para descrição quantitativa dos processos digestivos e metabólicos, sendo seus resultados utilizados para inferir a digestibilidade e extensão da degradação ruminal dos nutrientes e suas variações em resposta às mudanças no ambiente ruminal. Estas informações são importantes no desenvolvimento de modelos mecanísticos para predição de desempenho animal (LÓPEZ et al., 2000). Sistemas de avaliação de rações para ruminantes como o National Research Council (NRC) (sistema americano) e o The Nordic Feed Evaluation System (NorFor) (sistema europeu) assumem premissas em modelos para calcular a digestibilidade dos nutrientes ingeridos pelos animais.

As variáveis de degradabilidade ruminal são advindos de experimentos *in situ* conduzidos em diferentes institutos de pesquisa sob diversas condições experimentais, originando grande variabilidade entre resultados (ALI et al., 2012). Mesmo existindo esta variabilidade, a técnica *in situ* provê contato íntimo do ingrediente com o ambiente ruminal, tornando mais fidedignas as mensurações relacionadas ao perfil de degradação. Entretanto, a técnica possui o viés de não possibilitar que os ingredientes sejam submetidos a todos os eventos relacionados à digestão como mastigação, ruminação e passagem (NOCEK, 1988). Sob este aspecto, seria interessante que os procedimentos anteriores à incubação fossem padronizados, o que minimizaria as diferenças de tempo e local entre os experimentos realizados.

As características dos animais também possuem impacto nos resultados provenientes destes ensaios e deveriam ser levadas em consideração como fonte adicional de variação. Vanzant et al. (1998) demonstraram que, entre as fontes de variação em estudos desta natureza, cerca de 40% pode ser atribuída a efeitos do animal. Dessa forma, o impacto do animal sobre a variabilidade de resultados é minimizado quanto maior o número de repetições envolvidas no estudo. Por outro lado, seria conveniente adotar menor número de repetições, pois isso acarretaria em menos animais submetidos a procedimentos cirúrgicos e também menos mão de obra. Entretanto, como assegurar que o número de repetições é adequado?

O fator repetição é premissa básica para a experimentação, pois diminui o erro experimental maximizando a confiabilidade dos dados obtidos. Dessa forma,

alternativa mais coerente consiste em utilizar o menor número de animais que assegure precisão e exatidão ao experimento.

Para chegar a esse número, ou próximo dele, seria de grande valia a possibilidade de correlacionar parâmetros do *in situ*, como por exemplo, taxas fracionais de degradação, com características do animal passíveis de serem mensuradas antes da cirurgia, como por exemplo, comportamento ingestivo. Sabe-se que a ingestão e ruminação possuem influência sobre o ambiente ruminal (população microbiana) o qual, por sua vez, define a velocidade e extensão da degradação do material ingerido (Nikkhah, 2013; Rodríguez et al., 2008). Se existisse possibilidade em selecionar animais com base no comportamento ingestivo, poder-se-ia aumentar a probabilidade de obtenção de população o mais heterogênea possível, de forma a representar o máximo de variabilidade com o mínimo de repetições. Logo, número de repetições e conhecimento da distribuição da variabilidade destas, pode ajudar a selecionar os indivíduos que integrarão o estudo e assim diminuir possíveis erros incorporados aos valores médios obtidos.

Nesse contexto, é vista a importância da utilização de ferramentas estatísticas que proporcionem determinação do número adequado de repetições em experimentos desta natureza. Parâmetro comum em experimentação é o “coeficiente de variação - CV”, utilizado como forma de verificar a variação/precisão dos dados, sendo conveniente obter os menores valores de CV possíveis. Pimentel-Gomes (2000) propõe faixas de aceitação para o coeficiente de variação como sendo baixos quando inferiores a 10%, médios entre 10 a 20%, altos entre 20 a 30% e muito altos quando superiores a 30% independente do perfil experimental. Porém, sabe-se que CV é característico da variável, denotando ser influenciado pela cultura estudada, heterogeneidade de condições ambientais ou população, tamanho de parcela, entre outros (GARCIA, 1989; MOHALLEM et al., 2008).

O conhecimento da variabilidade existente na população animal permite escolha de menor/mínimo número de repetições para conduzir o ensaio. Estudos são necessários para mensurar a extensão da variabilidade advinda do número de repetições (animais) sobre os parâmetros de degradação ruminal *in situ* dos substratos incubados, juntamente com a escolha da melhor ferramenta estatística para mensurar precisão destes experimentos. Este trabalho buscou responder como a variabilidade de determinada população está distribuída e a dimensão da influência desta variabilidade sobre resultados de taxa fracional de degradação. Ao

mesmo tempo, foi estudada a possibilidade de correlacionar taxas fracionais de degradação com variáveis do comportamento ingestivo, objetivando obter ferramenta para seleção de animais a serem utilizados em ensaios desta natureza.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estudos *in situ*

Esta técnica foi utilizada pela primeira vez em 1938 em ovelhas. Porém, somente com o modelo matemático proposto pelos pesquisadores Orskov e McDonald em 1979, foi possível trabalhar dados de taxa de fluxo e mais tarde, avaliar a degradação efetiva dos nutrientes (MS, PB, fibra e amido) (HVELPLUND e WEISBJERG, 2000). O método *in situ* baseia-se no desaparecimento do alimento suspenso no rúmen, sendo sua principal vantagem o íntimo contato do alimento com o ambiente ruminal (NOCEK, 1988). Para isto realiza-se a incubação de sacos que podem ser confeccionados com material poliamida, náilon, poliéster ou tecido não-tecido (TNT) em animais modificados cirurgicamente com cânulas ruminais.

Atualmente a técnica é bastante difundida em estudos de nutrição, além de ser comumente utilizada como referência para validação de outros métodos laboratoriais (HVELPLUND e WEISBJERG, 2000), pois permite determinar a extensão de degradação do alimento, ou nutrientes singulares, e também sua velocidade de degradação, sendo este parâmetro conhecido como taxa de degradação da fração potencialmente degradável (BERCHIELLI et al., 2011). O viés da técnica é impossibilitar que a amostra seja submetida aos processos de mastigação, ruminação e passagem assim como os alimentos ingeridos (TRUJILLO et al., 2010; NOCEK, 1988).

As etapas anteriores a incubação, as que tentam mimetizar os efeitos dos processos de mastigação, ruminação e passagem, não serem padronizadas geram certo desconforto no momento da comparação de dados obtidos de diferentes experimentos. As primeiras opções são a escolha da porosidade do tecido para confecção dos sacos (menores que 15 µm dificultam colonização e maiores que 50 µm aumentam perda mecânica de material potencialmente digestível, porém não solúvel) e dimensões do saco (NOCEK, 1988). Estas duas variáveis acarretam em perdas de partículas durante o manuseio dos sacos ou mesmo dentro do rúmen. Depois dos sacos serem incubados, isso incorre na não mensuração da digestibilidade de partículas que escapam do rúmen antes do tempo necessário para sua potencial degradação (ORSKOV e MCDONALD, 1979).

Outra questão importante está relacionada ao microambiente dentro do saco, principalmente a população microbiana, que tende a diferenciar-se das condições do

ambiente ruminal (principalmente nos horários mais prolongados de incubação). Esta diferença pode ser ocasionada por limitações na superfície de contato (tamanho do saco e porosidade) entre alimento moído e ambiente ruminal (MOHAMED e CHAUDHRY, 2008).

Os microorganismos não contribuem diretamente para a redução do tamanho de partículas do alimento, mas enfraquecem as ligações entre partículas (JUNG e ALLEN, 1995) facilitando a quebra pela ação mecânica do rúmen. Kramer et al. (2013) observaram que a ação microbiana contribui com a modificação do tamanho das partículas do alimento e citam trabalho que encontrou participação desta ação como sendo de 17%, o que acarretou em correlação linear entre proporção de perdas de partículas e aumento do tempo de incubação. Com esta ação expressiva sobre a modificação das partículas do substrato, torna-se importante que a população microbiana ruminal, em quantidade e espécies, seja a mais homogênea possível permitindo igualdade de ambientes ruminais entre os horários de incubação.

O perfil da população microbiana (espécies e população de cada espécie) é influenciado pela dieta consumida pelo animal. Em estudos cujo objetivo seja avaliar parâmetros relacionados a fibra, Vanzant et al. (1998) recomendam proporções de volumoso na dieta entre 60 a 70%, pois é esperado que a degradação de fibra seja menos expressiva em animais consumindo alto concentrado quando comparada a animais consumindo dietas a base de forragem. Esses autores sugerem pelo menos dois momentos de alimentação diários, para evitar quedas prolongadas de fornecimento de substrato no rúmen e permitir, desta forma, que as espécies dentro da população mantenham-se constantes.

Além de modificar a dimensão das partículas, a população microbiana influencia diretamente os valores residuais de FDN e FDA, pois os procedimentos analíticos são ineficientes em retirar as bactérias livres dentro das células vegetais e dos espaços intersticiais, ocasionando aumento nos valores destes resíduos e subestimativa de sua degradabilidade (GUEVARA-GONZÁLEZ et al., 2014; ARROYO e GONZÁLEZ, 2013). Maiores discrepâncias são registradas conforme aumento dos horários de incubação e redução do tamanho de partícula, pois incorre em maior colonização. Contudo, a influência da composição da dieta sobre a digestibilidade potencial da fibra ou mesmo da fração indigestível é menos

pronunciada em alimentos de baixa qualidade, ou seja, que possuem alto teor de resíduo indigestível (KRIZSAN e HUHTANEN, 2013).

O processamento da amostra pré-incubação é outra questão de suma importância visto que a intenção é mimetizar a mastigação realizada pelo animal (VANZANT et al., 1998). Partículas menores possuem maior proporção de FDN indigestível:FDN potencialmente digestível do que partículas maiores, logo perdas desse perfil de partículas resultam em erros na estimativa do resíduo indigestível e das demais variáveis de degradação, além de que, partículas maiores possuem maior taxa fracional de degradação (KRAMER et al., 2013). A moagem prévia do substrato gera partículas com grande variação em forma, sendo esta variação mais proeminente em alimentos concentrados frente a volumosos. Por conseguinte, perdas relacionadas à porosidade acarretam maiores prejuízos para alimentos concentrados. Olaisen et al. (2013) incubaram 81 ingredientes concentrados em vacas leiteiras e reportaram grande variação de resultados entre os corrigidos e não corrigidos para perdas de partículas.

Com relação aos alimentos volumosos, diferenças em características de formato de partícula após quebra/degradação entre espécies C3 e C4 também são expressivas, sendo este fenômeno influenciado pelo perfil do arranjo da parede celular das plantas. Porém, Campos et al. (2006) estudando a influência do tamanho de partícula de ingredientes volumosos *in situ* não encontraram diferença entre partículas com 1mm e 2 mm. Kramer et al. (2013) estudaram o perfil das perdas de partículas utilizando alimentos volumosos, concentrados e sub-produtos com sacos de duas porosidades (12 e 38 μ m), onde os mesmos concluíram que há escape incompleto das menores partículas até a etapa pós-lavagem, sugerindo que a duração do tempo de lavagem não influencia nestas perdas, pois não é esperada quebra de partículas durante o processo. Além disso, comentam que não somente o tamanho da partícula *per se*, mas também características como forma, comprimento e densidade interferem nas perdas pelas paredes dos sacos, uma vez que influenciam na livre movimentação das partículas dentro destes microambientes.

Bossen et al. (2008) estudaram o efeito do tamanho de partícula e método de fermentação sobre as características de degradação de FDN e concluíram que o tamanho de partícula obtido de peneiras entre 1 e 8 mm, juntamente com sua distribuição, não gerou efeito sobre degradação do FDN, mas sim a escolha do método de fermentação (*in vitro* ou *in situ*).

Não somente os procedimentos anteriores à incubação, mas também os horários escolhidos para cada perfil de substrato que se deseja incubar merecem atenção. O tempo de incubação para determinação da fração indigestível do FDN é controverso na literatura, sendo as recomendações comumente variando entre 72 horas (Campos et al., 2004), 144 horas (BERCHIELLI et al., 2011) e 288 horas (KRIZSAN e HUHTANEN, 2013). Vieira et al. (2012) estudaram o perfil de degradação da fração insolúvel de várias forragens até o horário 1440 horas (testaram como ponto final os horários 96, 240 e 1440 horas) e concluíram que tempos muito longos de incubação acarretam erros de determinação da fração indigestível e também da taxa fracional de degradação, pois aumentam a chance de contaminação do material dentro do saco e perdas das frações de menor tamanho. Entretanto, essa ocorrência é mais proeminente para substratos de alta degradação.

Além dos já citados, efeitos extrínsecos como característica de animal, local de inserção dos sacos, nível e frequência de alimentação e prática ou não de pré-incubação (VANZANT et al., 1998), juntamente com os protocolos adotados para as análises laboratoriais dos resíduos e substratos também contribuem para variações nos resultados do método. Potencial fonte de variação entre resultados laboratoriais é a utilização de sulfito de sódio em análises sequencias de fibra. GUEVARA-GONZÁLES et al. (2014) estudaram que este reagente ataca a fração lignina, diminuindo sua recuperação e superestimando os valores de digestibilidade.

Olaisen et al. (2013) tentaram propor uma simplificação para o método *in situ* utilizando modelo que contemple o número de horários incubados com o objetivo de diminuir o número de incubações e, por sua vez, o trabalho humano por *in situ*. Os autores concluíram que seria possível fazer essa redução sem perder muita acurácia, embora essa alternativa seria confiável apenas para estimar a degradabilidade efetiva e não os demais parâmetros de degradação.

2.2. Variabilidade entre animais

A existência de variabilidade entre animais e também entre experimentos aumenta as indagações sobre a precisão obtida ao usar simplesmente médias para calcular parâmetros de degradabilidade (HACKMAN et al., 2010), pois as fontes de variação são muitas, como já comentadas no item anterior desta revisão. Há vasta gama de trabalhos focando as diferenças de parâmetros de degradação entre perfis

de ingredientes concentrados e volumosos, cultivares e estágio de maturidade, metodologias de fermentação, características do preparo do *in situ* e espécie animal. Porém, são escassos estudos analisando a magnitude de variabilidade existente dentro da população animal utilizada e como ela influencia os resultados. A maior parte dos trabalhos envolvendo ou comentando a questão do animal como fonte de variabilidade nos resultados de *in situ* referem-se a diferenças entre espécies (CAMPOS et al., 2006; VANZANT et al., 1998; NOCEK, 1988). Porém existe variabilidade vinda do próprio animal dentro da mesma espécie, como atividade proteolítica e status fisiológico (MOHAMED e CHAUDHRY, 2008). Trujillo et al. (2010) recomendam pelo menos 3 animais fistulados para obtenção de dados validados em estudos *in situ*, sendo essa recomendação seja empírica uma vez que os autores não realizaram estudo prévio envolvendo mais que três animais. Vanzant et al. (1998), em revisão sobre a técnica, citam que até 40% da variação nos resultados pode ser atribuída ao fator animal, além da diferença entre dias (para um mesmo animal) e entre as replicatas de sacos incubados. A sugestão dos autores é que o número de animais seja ajustado, porém não há especulação sobre um número.

Ainda hoje, a maioria dos estudos desta natureza utilizam entre 2 a 4 animais canulados no rúmen (ALI et al., 2012; TRUJILLO et al., 2010; HACKMANN et al., 2010; GILBERY et al., 2006). Nos estudos *in situ* não são esperados efeitos do ambiente ruminal sobre os resultados (ALI et al., 2012). Em função do número de animais geralmente utilizados nestes estudos, não é possível realizar análise relacionando a influência de ambientes ruminais sobre a degradabilidade do alimento. Gruninger et al. (2014) investigaram a variabilidade microbiana em ruminantes selvagens do Canadá e concluíram que a variabilidade entre indivíduos é alta, tanto com relação às espécies microbianas quanto as proporções das comunidades que se repetem entre indivíduos. Devido a essa grande variabilidade entre indivíduos, Gruninger et al. (2014) e Durso et al. (2010) alertam sobre a perda de variabilidade ao se trabalhar com *pool* de amostras.

Sabe-se que a composição da dieta possui grande influência sobre o ambiente ruminal. Pitta et al. (2010) relatam que ingredientes que exigem maior tempo de retenção facilitam o maior desenvolvimento de produtos intermediários os quais, por sua vez, propiciam crescimento das comunidades microbianas, aumentando a diversidade. Em dietas com forragem de baixa qualidade predominam

as bactérias *Fibrobacter succinogenes*, que possuem alta atividade de xilanase, porém são ineficientes em utilizar seus produtos. Já a *Butyrivibrio fibrosolvens* é muito ativa em utilizar xilanos e seus produtos de hidrólise. Logo, no caso da fração hemicelulose, sua degradação parece ser otimizada quando estes dois microorganismos atuam conjuntamente (SHINKAI et al., 2010). Isso demonstra que modificações na microbiota alteram a degradação das frações fibrosas.

Não apenas a dieta, mas também características do animal como espécie, idade e sexo modificam a população ruminal. Abrão et al. (2014) avaliaram o perfil da população fúngica do rúmen em 150 animais nelore abrangendo as categorias novilhos, vacas e bezerros recém-desmamados (aproximadamente 8 meses), mantidos em pastagem de *B. brizantha* e *B. decumbens* na época seca do ano (alto teor de lignina). A população de fungos foi diferente entre idades e sexo dos animais, sendo que para vacas foram encontrados 5 perfis de população, 4 perfis para novilhos e 2 perfis para bezerros. A população de fungos é atuante em frações menos degradáveis das plantas, o que favorece a metabolização de tecidos como cutícula e esclerênquima.

Embora bovinos de corte e leite compartilhem da maioria das comunidades bacterianas, a relativa abundância destes grupos entre as duas espécies é distinta (Durso et al., 2010). Dentro de animal, também existe diferença populacional entre comunidades microbianas existentes na fase líquida e as aderidas à partícula de fibra, sendo essa diferença dentro do rúmen menor quando fase líquida e sólida não são tão evidentes (menor formação de “mat”) (Pitta et al., 2010).

O que dificulta a utilização de maior número de animais é a necessidade de grande quantidade de sacos de náilon por substrato incubado e esforço em mão de obra. Isso levou Olaisen et al. (2003) a sugerirem possibilidade de se obter degradabilidade com menor número de pontos de incubação, como forma de minimizar o trabalho e tornar a técnica mais acessível para o uso comercial.

2.3 Fibra e comportamento ingestivo em ruminantes

A estrutura e função da parede celular são controladas pela composição e organização de seus componentes formadores, ao passo que esta composição pode ser diferente entre plantas (também tecidos na mesma planta) resultando em distintas taxas de degradação para o mesmo polissacarídeo estudado. A parede

celular é formada primariamente por polissacarídeos com composição e estrutura variada, incluindo diferenças em ácidos hidroxinâmicos, lignina, proteína, íons e água (HATFIELD, 1993). Relações entre fibra, usando FDN, e ingestão de matéria seca nem sempre são consistentes, pois há grande diferença no perfil de FDN entre forragens. Por isso, a ingestão potencial é dependente não apenas do teor de fibra, mas também de sua estrutura original na planta e a forma que a mesma é quebrada durante os processos de mastigação e digestão (ROMNEY e GILL, 2000). A celulose, por exemplo, devido a estrutura linear de suas microfibrilas, possui regiões amorfas e cristalinas altamente organizadas, sendo a quantidade de cada fração dentro da molécula dependente da origem e perfil da celulose, interferindo na extensão e taxa de degradação desta molécula (HATFIELD, 1993).

A extensão de degradação é uma particularidade do alimento e sua taxa de degradação é influenciada pela idade da planta, manejo de fertilização, relação folha:colmo (KEIM et al., 2013; OGDEN et al., 2005) e o ambiente ruminal. Visto isso, torna-se de suma importância conhecer sua fração solúvel, fração potencialmente digestível e indigestível. A fração fibra é geralmente relacionada com o consumo de matéria seca pelo animal devido ao efeito de enchimento conhecido como “*rúmen fill*”. Este enchimento é a combinação entre volume e tempo que a porção não digerida ocupa e permanece no trato gastrointestinal. Logo, a capacidade de ingestão do animal é a associação destas duas variáveis (TELLER et al., 1993). Este efeito é o maior fator regulador de consumo para animais ingerindo alta quantidade de volumoso, pois o teor de fibra presente na parede celular é insolúvel e ocupa mais espaço do que o conteúdo celular (ROMNEY e GILL, 2000).

A ingestão voluntária é geralmente correlacionada com a quantidade de nutrientes que pode ser extraída do alimento, o que gera resposta química, porém o efeito de dois ou mais AGVs juntos dependerá da sua proporção em relação às necessidades do animal (FORBES, 1996). Os animais cessam a ingestão para limitar o desconforto metabólico ou físico, onde decidem em que ponto as desvantagens de deficiência ou excesso de nutrientes sobressaem-se às vantagens de tentar suprir a exigência de energia (tida como a principal moduladora de ingestão de alimentos) (ROMNEY e GILL, 2000).

Digestibilidade e consumo são os principais componentes que determinam a qualidade de um alimento. Em dietas onde alimentos de baixa qualidade perfazem maior proporção da dieta, a ingestão é deprimida pela taxa de digestão e passagem

da fibra, ou seja, o animal realiza consumo ao nível da capacidade do trato gastrointestinal (ROMNEY e GILL, 2000).

Animais consumindo dietas fibrosas passarão menos tempo ingerindo e maior ruminando e, conseqüentemente, haverá diminuição no consumo de matéria seca (TELLER et al., 1993). Porém, há um limiar para o tempo gasto com ruminação, mesmo ingerindo fibra de baixa qualidade em alta quantidade. A atividade de ruminação permanece em aproximadamente 8 ou 9 horas por dia, sendo a eficácia do controle de ruminação importante na utilização de volumosos (WELCH, 1982).

Não somente o teor de FDN da dieta, mas também sua qualidade (degradabilidade) influencia o tempo total de mastigação. A energia metabolizável perdida para realização da atividade de mastigação tem efeito sobre a produtividade animal, sendo que a posição corporal do animal durante a mastigação também contribui para a magnitude desta perda. Geralmente, quando a mastigação é separada em ingestão e ruminação, a primeira detém a maior proporção da energia gasta.

Para Suzuki et al. (2014) parece haver relação compensatória entre tempo de ingestão e ruminação por unidade de MS, sugerindo que a mastigação total seja evidência mais fidedigna da propriedade física do alimento frente a consideração destes tempos separadamente. Estes autores reportaram aumento da frequência de contração do rúmen durante a ingestão, embora o calor gerado por estas contrações pouco influencia no gasto energético total da atividade, sugerindo que a energia gasta para motilidade do pescoço e tempo que o animal sustenta-se em pé deva ser considerada prioritariamente.

O tempo despendido para mastigação e secreção salivar é influenciado pela natureza da dieta (ELIMAM e ORSKOV, 1984), sendo provavelmente proporcional ao conteúdo de parede celular. A ingestão é controlada por vários fatores conjuntamente, como sinais do sistema nervoso central, sensações orofaríngeas, contrações e distensões gástricas, mudanças na produção de calor e níveis circulantes de metabólitos (ROMNEY e GILL, 2000). Logo, está claro que existe grande número de receptores, em várias partes do trato digestório e órgãos associados, sensíveis aos estímulos físicos e químicos transmitidos ao sistema nervoso central (FORBES, 1996).

A distribuição das moléculas dentro dos tecidos da planta e as ligações entre elas são fatores importantes que afetam a facilidade com que os microorganismos

podem quebrar as células (JUNG e ALLEN, 1995) e com isso diminuir o espaço ocupado no rúmen (ROMNEY e GILL, 2000). Estudos de Welch (1982) demonstram que a densidade da digesta ruminal, intensa em animais ingerindo dietas altamente fibrosas, não é o maior impedimento para a passagem de partículas no orifício retículo-omasal. Este fator é representado pela distribuição tridimensional das partículas de menor tamanho presentes no rúmen. Inicialmente a digesta é estratificada com fibras longas e leves no saco dorsal. À medida que ocorre esta fragmentação, as partículas são reduzidas a determinado tamanho médio e sua gravidade específica aumentada (por meio dos movimentos de ruminação que propiciam hidratação e expulsão do ar), facilitando assim sua proximidade do orifício retículo-omasal.

Outro fator importante que limita digestão é baixo teor de nitrogênio na dieta, pois gera menores concentrações de amônia ruminal, substrato importante para as bactérias celulolíticas. Bhatti et al. (2007) observaram aumento de consumo voluntário quando forneceram 50% feno de gramínea e 50% feno de alfafa (consumo de 2,0% P.V.) frente ao fornecimento de 100% de feno de gramínea (1,6% P.V.) devido ao maior consumo de nitrogênio, que por sua vez melhorou o ambiente ruminal. Para dietas baseadas em pastagens, a taxa de fermentação microbiana é deprimida se a concentração de amônia cair a valores inferiores que 50 mg N.L⁻¹ (WILSON e KENNEDY (1996) citados por ROMNEY e GILL, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e período experimental

O experimento foi conduzido em confinamento localizado em área do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP (latitude 22° 42' 30" sul, longitude 47° 38' 30" oeste, altitude 546 m) na cidade de Piracicaba-SP durante o período de 05 de outubro de 2012 a 08 de abril de 2013.

Na tabela a seguir estão apresentados os dados agrometeorológicos dos meses compreendidos pelo período experimental.

Tabela 1 – Condições ambientais durante o período experimental na ESALQ/USP em Piracicaba

Mês	Temperatura Média (°C)	Umidade relativa (%)	Precipitação média diária (mm)
Outubro/2012	25,5 ± 5,0	64,9 ± 12,0	2,5 ± 7,0
Novembro/2012	24,2 ± 1,7	70,7 ± 11,0	3,3 ± 8,2
Dezembro/2012	26,9 ± 1,6	79,5 ± 8,0	6,2 ± 8,8
Janeiro/2013	24,3 ± 2,2	83,9 ± 8,0	7,5 ± 11,6
Fevereiro/2013	25,8 ± 2,8	82,3 ± 8,0	4,1 ± 6,9
Março/2013	24,9 ± 2,2	82,0 ± 8,0	4,6 ± 9,6

Fonte: <http://www.leb.esalq.usp.br/anos.html>

Nota: ± desvio padrão

3.2 Animais utilizados no experimento

Os animais utilizados neste experimento são provenientes de seleção realizada em fazenda comercial localizada no município de Rondonópolis, estado do Mato Grosso. O estudo foi conduzido em duas etapas distintas: seleção dos animais (Mato Grosso) e incubações *in situ* nos animais selecionados (ESALQ/USP).

3.2.1 Seleção dos animais

A fase de seleção dos animais foi realizada na Fazenda Santo Antônio da Areia, entre maio/2012 e setembro/2012. Em maio foi realizada seleção de 352 bovinos machos, não castrados da raça nelore, com peso vivo cheio entre 300 e 450 kg dentre todo o rebanho da propriedade. Início de junho estes animais foram submetidos a jejum de alimento e água (parcial) por dois dias consecutivos, sendo os pesos registrados a cada 24 horas (balança verificada após lotes de 50 animais

utilizando pesos padrão certificados) para composição do peso médio (WATSON et al., 2012) (Tabela 2).

Houve disponibilidade de cinco piquetes, que para este estudo foram nomeados como branco, azul, vermelho, amarelo e verde, todos formados com *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Os 352 animais foram distribuídos na área considerando-se a disponibilidade de forragem de cada piquete e o peso vivo dos animais (Tabela 2). Os animais receberam brincos na orelha direita com a cor correspondente ao piquete de permanência, e na orelha esquerda um brinco numerado.

Tabela 2 – Descrição dos piquetes e animais utilizados para o período experimental conduzido na fazenda Santo Antônio da Areia localizada em Rondonópolis – MT em junho/2012

Piquete	Área (ha)	Forragem (kg MS)	N. animais	P. V. médio (kg)	Lotação U.A.	kg MS/kg P.V.
Amarelo	45,00	161.370,0	71	390,12	1,37	5,83
Verde	15,20	81.472,0	46	363,38	2,44	4,87
Vermelho	31,90	123.517,8	61	343,78	1,46	5,89
Azul	46,10	199.429,6	94	317,44	1,44	6,68
Branco	60,00	115.440,0	80	241,78	0,72	5,97

O método de pastejo adotado foi lotação contínua com suplementação mineral livre de aditivos sem práticas de adubação de pastagem. Quinzenalmente foi realizado monitoramento da disponibilidade de massa seca utilizando-se armação metálica com dimensões 1,0 m x 0,5 m (0,5 m²) e corte de toda forragem existente dentro da armação ao nível do solo (GUZMAN et al., 1992). Para determinação dos locais de amostragem dentro dos piquetes foram registradas 30 medidas de altura e a forragem coletada (em triplicata) nos seis pontos de altura com maior frequência entre as medidas obtidas.

Na Figura 1 está apresentada a disponibilidade de forragem ao longo do período de seleção dos animais na fazenda comercial em Rondonópolis - MT.

Figura 1 – Disponibilidade de massa seca da forragem *B. brizantha* em cada um dos cinco piquetes utilizados entre os meses de maio a setembro na fazenda Santo Antônio da Areia no estado do Mato Grosso em método de pastejo contínuo

Ao final de setembro os animais foram pesados novamente de acordo com o procedimento relatado anteriormente. Utilizando-se o peso obtido em junho e setembro calculou-se o ganho médio diário (GMD) individual dos animais. Foram então selecionados seis animais por piquete, quatro com o melhor GMD e dois com o pior GMD, totalizando 30 animais.

Estes 30 selecionados permaneceram no piquete azul por três dias para diminuir o estresse sofrido durante os dias de pesagem. Na tarde anterior ao transporte, os animais receberam vitaminas e minerais injetáveis, sendo o transporte realizado em caminhão boiadeiro até Piracicaba-SP (dois dias de viagem).

3.2.2 Animais selecionados para as incubações

Foram utilizados 30 bovinos ($371,1 \pm 36,6$ kg) machos, da raça nelore, não castrados procedentes de fazenda comercial da cidade de Rondonópolis no estado do Mato Grosso. Ao chegarem a ESALQ/USP os animais permaneceram em baia coletiva com área total de 362 m^2 , sendo destes 80 m^2 de área coberta, provida de comedouro com dimensões $20 \text{ m} \times 0,74 \text{ m}$ e piso não cimentado. Foram mantidos neste local por aproximadamente um mês, recebendo feno de Coast-cross (*Cynodon*

dactylon) picado *ad libitum*. Nesta ocasião foram iniciados os procedimentos de domesticação por meio do contato diário com pessoas do grupo de pós-graduação Qualidade e Conservação de Forragens – QCF.

Posteriormente, os trinta animais foram alocados em duplas em baias com 31,89 m² sendo destes, 15,95 m² de área coberta. Todas as baias possuíam piso cimentado, providas de cochos d'água de cimento com volume de 0,094 m³ e área de comedouro de 3,73 m x 0,74 m. O critério de agrupamento dos animais nas baias deu-se com base no último peso vivo obtido na fazenda. A limpeza de dejetos das instalações foi realizada aproximadamente a cada 15 dias, e a lavagem dos bebedouros semanalmente.

3.3 Cirurgia de implantação de cânulas nos animais

Todos os procedimentos envolvendo cuidado e manejo com os animais foram aprovados pela Universidade de São Paulo, Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA (Protocolo nº 2012-14).

No início de novembro de 2012 foi realizada cirurgia para inserção de cânula de borracha (10,16 cm de diâmetro interno – 4 polegadas) no saco dorsal do rúmen de cada animal. Após tricotomia e anestesia do flanco esquerdo com aplicação de lidocaína (“L” invertido), foi realizada incisão no sentido dorso-ventral, iniciada a 4 cm ventralmente aos processos vertebrais e a 4 cm caudalmente à última costela. As camadas de pele, tecido subcutâneo e músculos abdominais oblíquos externo e interno foram incisadas com bisturi, enquanto o músculo abdominal transverso foi divulsionado, seguido por secção do peritônio com tesoura. Imediatamente após a abertura da cavidade abdominal, a face parietal do saco dorsal do rúmen foi suturada à parede abdominal com pontos “U”, usando fios de nylon 0,60 mm. Após a ruminotomia com auxílio de tesoura, a fístula foi ocluída com a cânula de borracha (TURNER e MCILWRAIGTH, 2002). Após cirurgia, foram aplicados antibióticos (Agrovet, marca NOVARTIS) durante sete dias e antiinflamatório (Flunixin, CHEMITEC) por três dias. Foi realizada limpeza diária da fistula com água oxigenada 10 VOL (peróxido de hidrogênio de 3%, marca Rioquímica) e PVPI Riodeine dermo suave tópico (10% iodopolividona que equivale a 1% de iodo ativo, marca Rioquímica) até o final do estudo.

Somente alguns animais foram mantidos em jejum por 24 horas previamente a cirurgia, pois com o avançar do procedimento cirúrgico observou-se que a dieta

(feno Coast-cross moído) não possibilitou trato digestório vazio. Logo, optou-se por fornecimento normal da dieta aos animais ainda a serem canulados, totalizando três dias de procedimento cirúrgico.

3.4 Comportamento ingestivo

O objetivo desta avaliação foi o de pesquisar a existência de correlação entre o comportamento ingestivo do animal e a taxa fracional de degradação ruminal (kd), com a intenção de explorar eventual homogeneidade na população para kd. Para isso, os animais foram observados em intervalos de dez minutos durante período de 24 horas em cada dieta anteriormente as incubações. Os parâmetros avaliados foram os tempos de ingestão de alimento, ruminação, ingestão de água e ociosidade.

O registro das atividades do comportamento animal foi realizado com as luzes do confinamento acesas durante a noite.

Semanalmente, no período compreendido entre 14/12/12 até 28/03/13 foi registrado o escore corporal dos animais, utilizando escala de 1 a 9 (Tabela 3).

Tabela 3 – Registro do escore corporal dos bovinos canulados durante todo o período experimental

Animal	Dieta Feno Coast-cross					Dieta com bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
19	5,0	5,0	4,5	4,5	4,5	4,0	4,0	4,0	3,0	4,0	3,5	3,0
23	4,0	5,0	4,5	4,5	4,5	4,0	4,0	4,0	3,5	4,0	4,0	3,0
31	5,0	4,5	4,5	5,0	5,0	4,5	4,5	4,0	4,0	4,0	3,5	3,0
32	5,0	4,5	4,0	5,0	5,0	4,0	4,5	4,0	4,0	4,0	3,5	3,5
39	4,0	4,5	4,5	4,5	4,5	4,0	4,0	3,5	3,0	3,5	3,5	2,5
41	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	3,5	3,0	3,0	3,5	2,5	3,0
66	5,0	4,5	4,5	4,0	4,0	4,0	3,5	3,5	3,0	3,5	3,5	3,5
71	4,5	4,5	4,5	4,5	5,0	4,0	4,5	4,0	3,5	4,0	4,0	3,5
72	4,0	5,0	4,5	4,5	4,5	4,5	3,5	4,0	3,0	3,5	3,5	3,0
75	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	4,5	4,5	4,0	4,0	4,0	3,5	3,5
78	5,0	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,0	4,0	3,5	3,0
109	5,0	4,5	4,5	4,5	4,5	4,0	4,0	3,5	3,5	4,0	3,0	3,5
146	5,0	4,0	4,0	4,5	4,0	3,0	3,0	2,0	2,5	3,0	3,0	3,5
147	5,0	4,5	4,0	4,5	4,5	4,0	4,0	4,0	4,0	3,5	3,5	3,0
153	5,0	5,0	4,5	4,5	5,0	4,5	4,5	4,0	4,0	3,5	4,0	4,0
162	5,0	5,0	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,0	3,5	3,5	3,0	3,5
166	5,0	5,0	4,5	4,5	4,5	4,0	4,0	4,0	3,5	3,5	2,5	3,0
185	5,0	4,5	4,5	5,0	4,5	4,0	4,0	3,5	3,5	3,5	3,0	3,0
189	4,0	4,5	4,0	4,5	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	3,0	3,5	3,0
195	4,5	4,5	4,0	4,5	4,5	4,0	4,0	3,5	3,5	4,0	4,0	4,0
198	5,0	5,0	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,0	3,0	3,0	3,0	3,0
199	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,0	4,0	3,5	3,5	4,0	3,5	3,0
213	4,0	4,5	4,5	4,5	4,5	4,0	3,5	2,5	3,5	3,0	2,5	2,5
229	4,0	4,0	4,5	4,0	4,0	3,5	3,5	3,0	3,0	3,5	3,0	2,5
252	4,0	4,5	4,0	4,5	4,0	3,5	4,0	3,0	2,5	2,0	2,0	2,5
254	5,0	4,5	5,0	4,5	4,5	4,5	4,0	4,5	3,5	4,0	3,0	3,5
258	3,5	4,0	4,0	4,5	4,5	4,0	4,0	3,5	3,0	3,5	3,0	2,5
306	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,0	4,0	3,5	3,0	2,0	2,0	3,0
336	4,0	4,5	4,5	5,0	5,0	4,0	4,5	4,0	3,5	4,0	4,0	3,5
359	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	4,5	4,5	4,5	4,5

Escala utilizada de 1 a 9.

Nota: 1 - 14/dez 2 - 21/dez 3 - 27/dez 4 - 11/jan 5 - 17/jan
6 - 13/fev 7 - 21/fev 8 - 28/fev 9 - 8/mar 10 - 14/mar
11 - 22/mar 12 - 28/mar

3.5 Dieta 1 – Feno de Coast-cross moído

Desde a chegada dos animais (05/out/2012) até o final do primeiro período de incubação (04/fev/2013) *in situ*, estes foram alimentados com dieta exclusiva de feno Coast-cross moído (*Cynodon dactylon*) (Tabela 4). Esta dieta foi ofertada *ad libitum*

duas vezes ao dia. Foi fornecida mistura mineral comercial (sem aditivos) para consumo a vontade em cocho independente.

Tabela 4 – Composição do feno de Coast-cross fornecido aos bovinos canulados como primeira dieta experimental

Composição do feno de Coast-cross	%, MS
Matéria seca,	97,06
Proteína bruta	7,31
FDN	78,24
FDA	40,92
Celulose	34,27
Lignina	6,65
Hemicelulose	37,32
Matéria Mineral	4,56
Extrato etéreo	0,80
NDT*	43,10

*Kearl (1982)

$$\text{NDT (\%)} = -17,2649 + 1,2120*(\% \text{ PB}) + 0,8352*(\% \text{ ENN}) + 2,4637*(\% \text{ EE}) + 0,4475*(\% \text{ FB})$$

Diariamente, durante as manhãs, as sobras de feno dos cochos de cada baia foram quantificadas para monitoramento do consumo efetuado pelos animais.

3.6 Dieta experimental 2 – Bagaço de cana-de-açúcar *in natura*

Finalizado o primeiro período de incubação *in situ*, foi iniciado em 05/fev/2013 o fornecimento de nova dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar *in natura* até 08/abr/2013 (finalização do experimento). Foram realizadas duas semanas de transição entre a dieta exclusiva de feno de Coast-cross e de utilização de bagaço de cana-de-açúcar (Tabela 5). Após a finalização desta transição, o bagaço de cana-de-açúcar tornou-se o volumoso exclusivo da dieta do novo período de avaliação.

Tabela 5 – Composição das dietas de transição e avaliação fornecidas durante o período experimental de utilização de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* para os bovinos canulados

Item	% da MS
Dieta de transição (semana 1)	
Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	25,02
Farelo de soja	3,22
Sal mineral	1,06
Uréia	0,26
Feno de Coast-cross	70,44
Dieta de transição (semana 2)	
Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	51,51
Farelo de soja	6,63
Sal mineral	2,18
Uréia	0,54
Feno de Coast-cross	39,13
Dieta de avaliação	
Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	88,01
Farelo de soja	8,00
Sal mineral	2,80
Uréia	1,19
Composição de nutrientes na dieta de avaliação	
Matéria seca	55,44
Proteína bruta	10,12
FDN	80,76
FDA	61,65
Hemicelulose	19,11
Matéria mineral	6,27
Extrato Etéreo	0,58
NDT*	46,16

*Kearl (1982)

$$\text{NDT (\%)} = -17,2649 + 1,2120*(\% \text{ PB}) + 0,8352*(\% \text{ ENN}) + 2,4637*(\% \text{ EE}) + 0,4475*(\% \text{ FB})$$

O bagaço foi armazenado em silo superfície onde semanalmente foram amostrados três pontos para ajuste do teor de matéria seca desse volumoso e, por sua vez, da dieta total.

Diariamente a dieta foi misturada em vagão misturador TOTALMIX marca CASALE acoplado com balança de precisão de dois quilos. A alimentação dos animais foi realizada durante as manhãs logo após a quantificação das sobras do ofertado do dia anterior, por volta das 08:00 horas.

3.7 *In situ*

Os ensaios *in situ* foram realizados com incubação dos seguintes substratos: feno de Coast-cross (o mesmo fornecido durante a dieta 1), bagaço *in natura* de cana-de-açúcar (o mesmo utilizado na dieta 2) e feno de Tifton-85 (*Cynodon* spp.). O feno de Coast-cross representou feno de baixa qualidade, ao passo que o de Tifton-85 representou feno de melhor qualidade (Tabela 6).

Tabela 6 – Composição dos substratos incubados durante os dois ensaios *in situ* realizados com os bovinos canulados

Item, % da MS	Feno de Coast-cross	Bagaço de cana-de-açúcar	Feno de Tifton-85
Matéria seca,	97,06	94,85	89,91
Proteína bruta	7,31	3,04	11,03
FDN	78,24	90,31	73,27
FDA	40,92	69,36	39,29
Celulose	34,27	53,96	30,81
Lignina	6,65	15,40	8,48
Hemicelulose	37,32	20,95	33,98
Matéria Mineral	4,56	5,22	8,67
Extrato etéreo	0,80	0,51	1,28
NDT*	43,10	44,93	55,49

*Kearl (1982)

$$\text{NDT (\%)} = -17,2649 + 1,2120*(\% \text{ PB}) + 0,8352*(\% \text{ ENN}) + 2,4637*(\% \text{ EE}) + 0,4475*(\% \text{ FB})$$

Por motivos de custos e volume de mão de obra, foi realizado apenas um ensaio *in situ* durante cada uma das duas dietas ofertadas.

Todos os substratos foram secos em estufa a 55°C por 72 horas e moídos a 5 mm (NOCEK, 1988).

Os sacos (10 cm x 20 cm, entre 12 a 13 mg/cm²) foram confeccionados em tecido de poliamida com porosidade de aproximadamente 30 µm (OLAISEN et al., 2003). Os mesmos foram identificados, secos em estufa a 55°C por período de 48 horas e, posteriormente, tiveram seu peso quantificado para obtenção da tara (CAMPOS et al., 2004). Depois de registrado seu peso seco, os mesmos foram preenchidos com amostras dos substratos citados acima (aproximadamente 5 g de matéria seca) e selados.

Os horários de incubação determinados foram definidos como 0, 12, 24, 48, 72 e 144 horas em quadruplicata por horário para cada substrato. As incubações foram realizadas em ordem inversa, ou seja, iniciaram-se as incubações pelo horário

144 h, seguido 72, 48, 24 e 12 horas com retirada simultânea no tempo zero hora (GILBERY et al., 2006).

Em cada um dos 30 animais, foram inseridos os três substratos simultaneamente. Logo, para cada horário houve incubação de 12 sacos por animal, totalizando 2160 sacos por cada período de incubação *in situ*. Os sacos do tempo zero, após selados, não foram submetidos a imersão em água, sendo já diretamente adicionados aos demais no momento da retirada do conjunto de saquinhos e conjuntamente colocados em baldes de água fria e encaminhados para lavagem em máquina de lavar. A máquina foi preenchida com aproximadamente 45 litros de água e os sacos agitados em ciclo delicado (5 ciclos de 5 minutos cada), sendo a água substituída a cada novo ciclo. Após a lavagem, foram secos em estufa a 55°C por 72 horas e seu peso seco registrado, segundo as recomendações de Campos et al. (2004).

Fórmulas usadas para os cálculos da degradação

Para obtenção dos parâmetros de degradabilidade foi utilizado o modelo de Orskov and McDonald (1979):

$$Y(t) = a + b (1 - e^{-k_d \times t}), t \geq 0$$

Sendo:

$Y(t)$ = degradabilidade potencial estimada, %;

$a + b$ = fração potencialmente degradável;

e = número neperiano (2,7182);

k_d = taxa de degradação (h^{-1});

t = tempo de incubação (h);

Foram calculadas as frações A, B e C para MS, FDN, FDA, CEL e HEM de cada substrato. Em que C é a fração indigestível, A é a fração solúvel e B a fração potencialmente degradável, onde:

C = resíduo do tempo 144 horas;

A = 100% (massa inicial) - resíduo do tempo zero (massa final);

B = 100 – (A + C);

A degradabilidade efetiva foi calculada segundo a equação de Orskov e McDonald (1979) utilizando o programa EXCEL versão 2010, assumindo taxa fracional de passagem (k_p) de 2,5 %/h, segundo recomendação de Ogden et al. (2005) para materiais fibrosos e com baixa ingestão de massa seca.

$$D_{ef} (\%) = A + B [k_d / (k_d + k_p)]$$

A degradabilidade potencial foi calculada segundo Ogden et al. (2005):

$$D_{pot} (\%) = 100 - C$$

3.8 Pesagens dos animais

O peso vivo dos animais foi registrado aos dias 02/fev/2013, com média de $375,5 \pm 15,4$ kg, e 30/mar/2013 para vinte e oito animais (dois foram excluídos do experimento por problemas de condições de saúde) que apresentaram média de $361,0 \pm 14,0$ kg. Optou-se pela não submissão dos animais a jejum prévio de água e alimento durante as 24 horas anteriores ao registro das pesagens devido à baixa condição de escore corporal dos animais (Tabela 3). Alguns animais, principalmente durante o fornecimento da dieta com bagaço de cana-de-açúcar, apresentaram expressiva perda de peso corporal.

3.9 Análises bromatológicas

3.9.1 Caracterização dos substratos e farelo de soja

As avaliações dos teores de matéria seca, matéria mineral, extrato etéreo e fibra bruta (FB) foram realizadas nas amostras dos substratos incubados e no farelo de soja, de acordo com a A.O.A.C. (1975). As análises de FDN e FDA ocorreram segundo Van Soest et al. (1991) e Goering e Van Soest (1970).

A fração proteína bruta foi analisada pelo método de combustão de Dumas (Leco 2000, Leco Instruments Inc, modelo FP-528) segundo os autores Wiles; Gray e Kissling (1998).

Os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados por meio da equação de Kearl (1982):

$$\text{NDT (\%)} = - 17,2649 + 1,2120*(\% \text{ PB}) + 0,8352*(\% \text{ ENN}) + 2,4637*(\% \text{ EE}) + 0,4475*(\% \text{ FB})$$

ENN = extrativo não nitrogenado;

FB = fibra bruta;

3.9.2 Análises químicas nos resíduos de incubação *in situ*

As determinações de FDN, FDA e lignina foram realizadas conforme o método de Van Soest et al. (1991) utilizando sulfito de sódio e α -amilase com base no método sequencial proposto pela ANKON® Fiber Analyser e descrito por Holden (1999).

FDN (corrigido para cinzas)

Após a secagem das replicatas incubadas, em estufa a 65°C, as quadruplicatas foram homogeneizadas e a amostra composta obtida armazenada em potes plásticos identificados. O saco ANKON (tipo F57 Filter bags) foi preparado (em duplicata por amostra composta) e mantido em estufa a 105 °C por no mínimo 12 horas e a tara dos sacos foi registrada. Logo após, foram preenchidos com aproximadamente 0,5 g de amostra e selados.

Os sacos foram mantidos em estufa a 105°C por no mínimo 12 horas e o peso cheio registrado. Após serem retirados da estufa foram conduzidos ao equipamento “Fiber Analyzer” para lavagem em detergente neutro por 1 hora com adição de 15 g de sulfito de sódio e 5 mL de amilase, por lavagem. Após esta 1 hora realizou-se a lavagem dos sacos (ainda no equipamento) com água quente durante 30 minutos (sendo a água renovada a cada 5 minutos). Logo em seguida os sacos ficaram submersos em acetona concentrada para retirar qualquer resíduo de detergente dos sacos. Na sequência, os sacos foram mantidos em estufa a 105°C por no mínimo 12 horas e o peso seco registrado. Após esta secagem os sacos foram calcinados em mufla a temperatura de 550°C. As cinzas obtidas foram utilizadas para correção da fração FDN.

FDA

Após o registro do peso seco da fração FDN, os sacos ANKON foram novamente alocados no equipamento para lavagem com solução detergente ácida. O procedimento de lavagem com a solução e a água foi exatamente o mesmo como descrito para a fração FDN. Após o término da lavagem os sacos foram conduzidos em estufa a 105°C por no mínimo 12 horas e o peso seco registrado.

Lignina (LIG), celulose (CEL) e hemicelulose (HEM)

Para determinação da lignina, após o registro do peso seco da fração FDA os sacos (30 por vez) foram alocados no equipamento “Daisy Incubator” em jarros grandes com 500 mL de ácido sulfúrico 72% durante 3 horas. Após as 3 horas os saquinhos foram lavados nos mesmos jarros com água quente para retirada de resíduos do ácido. Após o término da lavagem os sacos foram conduzidos à estufa a 105°C por no mínimo 12 horas e o peso seco registrado.

As frações celulose e hemicelulose foram obtidas por cálculos utilizando-se os dados de FDN, FDA e lignina, da seguinte forma:

$$\text{Celulose} = \text{FDA} - \text{lignina}$$

$$\text{Hemicelulose} = \text{FDN} - \text{FDA}$$

3.10 Análises estatísticas

Os dados de taxa fracional de degradação da MS, FDN, FDA e celulose, juntamente com as variáveis de comportamento ingestivo, foram utilizados para caracterização da população em cada incubação *in situ*.

Inicialmente, foi utilizada estatística descritiva para demonstração do comportamento geral da população em relação às variáveis estudadas. Dentre os indicadores utilizados na análise exploratória estão média, valores máximo e mínimo, coeficiente de variação, desvio-padrão e erro padrão da média.

Foi realizado teste de Shapiro-Wilk (PIMENTEL-GOMES, 2000) com 5% de nível de significância para verificação da normalidade dos dados. Algumas variáveis da primeira incubação *in situ* não apresentaram normalidade, logo foram transformadas pelo método Box-Cox. Porém, degradação efetiva e potencial de MS e FDA não puderam ser normalizadas, sendo então analisadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (BANZATO e KRONKA, 2006).

As médias de taxa fracional de degradação, frações A, B e C, degradação efetiva e potencial foram obtidas por meio do LSMEANS e seguidamente comparadas pelo teste de TUKEY com 5% de significância, por meio do *proc GLM*.

Foram utilizados métodos de análise multivariada para caracterização das variáveis taxas fracionais de degradação e dos indivíduos. O objetivo foi explorar a correlação entre os substratos incubados, entre taxas fracionais de degradação (independente de substrato) e existência de padrão de degradação na população animal.

Inicialmente foram verificadas as correlações entre as variáveis taxas fracionais de degradação, entre e dentro de substratos, por meio do *proc corr* com o teste de correlação de Pearson em nível de significância de 5%. Este teste de correlação teve o intuito de averiguar se as variáveis taxas fracionais de degradação são bem correlacionadas entre si, condição necessária para sucesso na utilização de análises multivariadas (MANLY, 2008). Nesta investigação a taxa fracional de degradação de hemicelulose não apresentou correlação com as taxas fracionais de degradação de FDA e CEL, o que implicou em diminuição, de forma geral, da correlação entre todas as taxas fracionais estudadas, impossibilitando a execução das análises com sucesso. Em razão disto, esta variável foi excluída das análises multivariadas realizadas com os dados das duas incubações *in situ*.

A análise de componentes principais, por meio do *proc princomp*, foi utilizada para caracterizar as taxas fracionais de degradação, demonstrando graficamente suas correlações entre e dentro de substrato. A Análise de Componentes Principais (ACP) é utilizada para explorar quais variáveis observadas contribuem mais veementemente para explicação da variação total obtida no estudo por meio da criação de novas variáveis não observadas, denominadas componentes principais (JOHNSON e WICHERN, 2002).

A Análise Fatorial, com rotação varimax e normalização de Kaiser por meio do *proc factor*, foram empregadas para adequada caracterização da população. A rotação varimax (rotação ortogonal) maximiza a soma das variâncias dos quadrados das cargas fatoriais de cada variável observada dentro do fator, transformando suas cargas em valores mais próximos ou distantes de zero, logo esta ferramenta facilita a capacidade de interpretação da solução fatorial (MANLY, 2008). A normalização é realizada pelo programa estatístico anteriormente a determinação das cargas fatoriais e garante que todas as variáveis recebam mesmo peso durante a rotação,

mantendo inalterada a variabilidade final explicada para cada variável pelos modelos de fatores (MANLY, 2008).

Os fatores encontrados por substrato foram utilizados para descrição dos animais e devido estes fatores estarem relacionados à degradação dos substratos incubados (kd), foi proposta a formação de grupos homogêneos em níveis de degradação (dentro de cada fator). Para esta formação, serviu-se a Análise de Agrupamento, por meio do *proc cluster*, cujo objetivo da análise é expor a distribuição natural de aglomerações dos indivíduos dentro da população (JOHNSON e WICHERN, 2002), com base nas variáveis de kd estudadas. Para determinação dos grupos foram utilizadas as ligações de Ward (busca a menor variabilidade dentro do grupo) e das Médias (soma de todas as distâncias das ligações entre os indivíduos, dividida pela quantidade de ligações realizadas) (MANLY, 2008).

Após a formação dos grupos, aplicou-se a Análise de Função Discriminante, *proc discrim* em nível de 1% de significância, com distância de Mahalanobis e teste de M de Box (verificação se todos os grupos formados derivam de mesma matriz de covariância). Esta análise tem como propósito aperfeiçoar a separação dos grupos formados (MANLY, 2008) na Análise de Agrupamento.

Para verificação da autêntica formação de grupos distintos, utilizou-se o teste de Lambda Wilks ao nível de 1% de significância (teste aplicado em vetores de médias originados em cada grupo) dentro da ferramenta Contrastes Multivariados. Para isto utilizou-se o *proc GLM* por meio do comando *manova*.

Para sugestão do número adequado de animais requeridos em estudos *in situ* foram realizados sorteios no pacote estatístico utilizando o *proc surveyselect* com alternativa de reposição (para que em cada sorteio todos os animais possuísem a mesma chance de seleção), para formação de grupos com tamanho “n” ($3 \leq n < 30$) de animais. Posteriormente os grupos contendo “n” indivíduos foram plotados graficamente com seus coeficientes de variação médios (média de coeficientes de variação das taxas fracionais de degradação de MS, FDN, FDA, CEL e HEM) (MEIER e LESSMAN, 1971).

Foi estudada correlação multivariada entre as variáveis ingestão de MS (kg), tempos totais de ingestão (min), ruminação (min) e ócio (min), minutos de ingestão por quilograma de MS e minutos de ruminação por quilograma de MS com as variáveis taxas fracionais de degradação calculadas nas duas incubações *in situ*

(análise realizada para cada substrato separadamente) por meio da Análise de Correlação Canônica, *proc cancorr* com 5% de significância.

Todas as análises foram realizadas por meio de utilização do pacote estatístico SAS 9.2.

4 RESULTADOS

4.1 Dieta com feno de Coast-cross

Na análise descritiva dos resultados (Figura 2, Tabela 7) ficou evidente a variabilidade existente dentro da população de animais avaliados quanto a taxa fracional de degradação, seguindo a necessidade de investigação minuciosa sobre os indivíduos e as relações entre as taxas fracionais de degradação.

B) MSb1 FDNb1 FDAb1 CELb1 HEMb1

C) MSft1 FDNft1 FDAft1 CELft1 HEMft1

Figura 2 – Distribuição de frequência das taxas fracionais de degradação das porções analisadas de cada substrato durante a primeira incubação *in situ*, com bovinos recebendo dieta exclusiva de feno de Coast-cross. A) Feno de Coast-cross; B) Bagaço de cana-de-açúcar; C) Feno de Tifton-85. MSfc – MS de feno de Coast-cross, FDNfc – FDN de feno de Coast-cross, FDAfc – FDA de feno de Coast-cross, CELfc – CEL de feno de Coast-cross, HEMfc – HEM de feno de Coast-cross; MSb – MS do bagaço de cana-de-açúcar, FDNb – FDN do bagaço de cana-de-açúcar, FDAb – FDA do bagaço de cana-de-açúcar, CELb – CEL do bagaço de cana-de-açúcar; HEMb – HEM do bagaço de cana-de-açúcar; MSft – MS do feno de Tifton-85, FDNft – FDN do feno de Tifton-85, FDAft – FDA do feno de Tifton-85, CELft – CEL do feno de Tifton-85, HEMft – HEM do feno de Tifton-85.

No teste de “*outliers*” quase todas as taxas fracionais do animal 306 foram consideradas discrepantes, apresentando-se muito inferiores ao restante da população. Logo, nas médias das taxas fracionais de degradação das Tabelas 8 e 9 não constam os dados deste animal.

Tabela 7 – Descrição das variáveis fração solúvel (A), fração potencialmente degradável (B), fração indigestível (C), degradação efetiva (Deg_{Ef}), degradação potencial (Deg_{Pot}) e taxa fracional de degradação (kd) durante alimentação exclusiva com feno de Coast-cross

Variável	Média	Máximo	Mínimo	C.V. (%)	Desvio-padrão
kd (%/h)					
MS	3,17	5,67	0,59	25,82	0,82
FDN	3,21	5,77	0,37	26,55	0,85
FDA	3,37	7,66	0,34	30,84	1,04
Celulose	3,43	6,19	0,24	30,01	1,03
Hemicelulose	3,12	5,74	0,83	32,47	1,01
A (%)					
MS	17,98	28,00	9,92	25,81	4,64
FDN	8,66	16,93	0,14	54,22	4,69
FDA	3,48	16,43	-12,89	236,93	8,24
Celulose	7,88	34,66	-6,82	95,96	7,56
Hemicelulose	7,15	25,61	-11,35	111,31	7,96
B (%)					
MS	50,20	59,47	35,70	13,69	6,87
FDN	58,17	75,75	38,39	19,68	11,45
FDA	59,91	77,45	38,22	18,27	10,94
Celulose	63,30	82,79	38,36	16,92	10,71
Hemicelulose	60,15	81,87	33,56	21,50	12,94
C (%)					
MS	31,82	51,99	17,45	35,03	11,14
FDN	33,18	47,69	19,30	27,24	9,04
FDA	36,61	49,69	20,73	26,27	9,62
Celulose	28,82	43,14	13,96	32,42	9,35
Hemicelulose	32,70	57,20	17,81	39,05	12,77
Deg _{Ef} (%)					
MS	46,21	61,18	29,26	21,92	10,13
FDN	41,75	54,93	32,06	16,03	6,69
FDA	38,19	57,83	26,41	22,72	8,68
Celulose	44,77	65,66	30,32	20,30	9,09
Hemicelulose	40,63	56,96	17,96	28,27	11,49
Deg _{Pot} (%)					
MS	68,18	82,55	48,01	16,35	11,14
FDN	66,82	80,70	52,31	13,53	9,04
FDA	63,39	79,27	50,31	15,17	9,62
Celulose	71,19	86,04	56,86	13,16	9,36
Hemicelulose	67,24	82,19	42,80	18,91	12,72

Tabela 8 – Influência do substrato sobre a fração solúvel (A), fração potencialmente degradável (B), fração indigestível (C), degradação efetiva (Deg_{Ef}), degradação potencial (Deg_{Pot}) e taxa fracional de degradação (kd) das porções FDN, FDA, CEL e hemicelulose durante a primeira incubação *in situ* com alimentação com dieta exclusiva de feno de Coast-cross

Variável	Substrato			EPM	P*
	Feno Tifton-85	Feno Coast-cross	Bagaço		
FDN					
A (%)	8,70 ^b	3,60 ^c	13,90 ^a	0,34	< 0,01
B (%)	70,35 ^a	60,93 ^b	42,64 ^c	0,38	< 0,01
C (%)	21,62 ^c	35,51 ^b	43,29 ^a	0,27	< 0,01
Deg _{Ef} (%)	50,56 ^a	38,82 ^b	35,86 ^c	0,38	< 0,01
Deg _{Pot} (%)	78,26 ^a	64,64 ^b	56,54 ^c	0,30	< 0,01
kd (%/h)	3,85 ^a	3,42 ^b	2,62 ^c	0,10	< 0,01
FDA					
A (%)	6,78 ^b	-7,05 ^c	10,09 ^a	0,58	< 0,01
B (%)	68,91 ^a	65,16 ^b	45,63 ^c	0,71	< 0,01
C (%)	23,68 ^c	41,89 ^b	44,75 ^a	0,41	< 0,01
Deg _{Ef} (%)	49,72 ^a	31,31 ^c	33,54 ^b	0,50	< 0,01
Deg _{Pot} (%)	76,32 ^a	58,11 ^b	55,25 ^c	0,41	< 0,01
kd (%/h)	3,89 ^a	3,56 ^a	2,72 ^c	0,11	< 0,01
Celulose					
A (%)	10,60 ^a	0,29 ^b	10,87 ^a	0,73	< 0,01
B (%)	72,58 ^a	67,69 ^b	51,18 ^c	0,76	< 0,01
C (%)	16,40 ^c	32,42 ^b	38,07 ^a	0,33	< 0,01
Deg _{Ef} (%)	56,81 ^a	39,54 ^b	38,20 ^b	0,53	< 0,01
Deg _{Pot} (%)	83,62 ^a	67,58 ^b	61,92 ^c	0,33	< 0,01
kd (%/h)	4,31 ^a	3,56 ^b	2,70 ^c	0,12	< 0,01
Hemicelulose					
A (%)	3,42 ^b	14,26 ^a	4,16 ^b	0,83	< 0,01
B (%)	75,93 ^a	57,56 ^b	49,20 ^c	1,34	< 0,01
C (%)	20,73 ^c	27,90 ^b	48,60 ^a	0,98	< 0,01
Deg _{Ef} (%)	48,59 ^a	46,99 ^a	26,50 ^b	0,94	< 0,01
Deg _{Pot} (%)	79,05 ^a	72,01 ^b	51,39 ^c	0,98	< 0,01
kd (%/h)	3,83 ^a	3,33 ^b	2,42 ^c	0,14	< 0,01

*Teste F;

Médias obtidas pelo LSMEANS;

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

Kp = 2,5 %/h; Deg_{Ef} (%) = $(A+B*(kd/(kd+Kp)))$; Deg_{pot} (%) = 100 – C

Tabela 9 – Influência do substrato sobre a fração solúvel (A), fração potencialmente degradável (B), fração indigestível (C), degradação efetiva (Deg_{Ef}), degradação potencial (Deg_{Pot}) e taxa fracional de degradação (kd) da matéria seca durante a primeira incubação *in situ* com alimentação exclusiva de feno de Coast-cross

Variável	Substrato			P ²		
	Feno Tifton-85	Feno Coast-cross	Bagaço	Ft vs Fc	Ft vs Bag	Fc vs Bag
	MS					
A (%)	23,10	18,54	12,31	< 0,01	< 0,01	< 0,01
B (%)	57,77	50,55	41,74	< 0,01	< 0,01	< 0,01
C (%)	19,15	30,90	46,06	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Deg _{Ef} (%)	57,63	47,51	33,50	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Deg _{Pot} (%)	80,85	69,10	53,70	< 0,01	< 0,01	< 0,01
kd (%/h) ¹	3,78 ^a	3,37 ^b	2,60 ^c	-	-	-

¹ kd analisado pelo teste paramétrico de Tukey (P ≥ 0,05)

² P – Teste de Mann-Whitney para comparação dos pares

Ft – feno Tifton-85; Fc – feno Coast-cross; Bag – bagaço de cana-de-açúcar

Nota: Kp = 2,5 %/h

$$\text{Deg}_{\text{Ef}} (\%) = (A+B*(kd/(kd+Kp)))*100$$

$$\text{Deg}_{\text{pot}} (\%) = 100 - C$$

De acordo com análise prévia da matriz de correlação envolvendo as 15 taxas fracionais de degradação estudadas, foi observado que a hemicelulose não apresentou correlação com as demais variáveis (a nível de 5% de significância), isso ocorreu devido falta de correlação desta porção com fibra em detergente ácido e celulose. Logo, esta variável foi excluída das análises estatísticas multivariadas que seguem.

Os três primeiros componentes explicam 83% da variação ocorrida nas taxas fracionais de degradação durante a primeira incubação *in situ*, sendo então os mais relevantes e por sua vez os considerados para interpretação desta análise.

Tabela 10 – Escores das variáveis taxas fracionais de degradação formadoras dos três componentes principais durante a primeira incubação *in situ* com alimentação dos bovinos com dieta exclusiva de feno de Coast-cross

Variável	Componentes principais		
	CP1	CP2	CP3
MSfc1	0,27	0,35	0,21
FDNfc1	0,27	0,36	0,20
FDAfc1	0,16	0,41	0,29
CELfc1	0,22	0,37	0,17
MSb1	0,28	-0,33	0,36
FDNb1	0,28	-0,33	0,33
FDAb1	0,28	-0,34	0,22
CElb1	0,29	-0,28	0,06
MSft1	0,34	0,09	-0,32
FDNft1	0,35	0,06	-0,33
FDAft1	0,32	-0,08	-0,37
CELft1	0,32	-0,02	-0,39

MSfc – MS de feno de Coast-cross; FDNfc – FDN de feno de Coast-cross; FDAfc – FDA de feno de Coast-cross; CELfc – CEL de feno de Coast-cross; MSb – MS do bagaço de cana-de-açúcar; FDNb – FDN do bagaço de cana-de-açúcar; FDAb – FDA do bagaço de cana-de-açúcar; CELb – CEL do bagaço de cana-de-açúcar; MSft – MS do feno de Tifton-85; FDNft – FDN do feno de Tifton-85; FDAft – FDA do feno de Tifton-85; CELft – CEL do feno de Tifton-85; CP1 - componente principal 1, nomeado como degradação de feno Tifton-85; CP2 - componente principal 2, nomeado como contraste de degradação de feno Coast-cross e bagaço; CP3 - componente principal 3, nomeado como contraste de degradação de bagaço e feno Tifton-85.

A descrição e identificação dos componentes principais expostos na Tabela 10 são a seguir:

CP 1: MSft1 (0,34) + FDNft1 (0,35) + FDAft1 (0,32) + CELft1 (0,32) – Degradação de feno de Tifton-85.

CP 2: MSfc1 (0,35) + FDNfc1 (0,36) + FDAfc1 (0,41) + CELfc1 (0,37) - MSb1 (0,33) - FDNb1 (0,33) - FDAb1 (0,34) – Contraste em degradação de feno Coast-cross e bagaço de cana-de-açúcar.

CP 3: MSb1 (0,36) + FDNb1 (0,33) - MSft1 (0,32) - FDNft1 (0,33) - FDAft1 (0,37) - CELft1 (0,39) – Contraste em degradação de bagaço de cana-de-açúcar e feno de Tifton-85.

A taxa fracional de degradação da celulose do bagaço de cana-de-açúcar não integra nenhum dos componentes, portanto, nesta primeira incubação *in situ*, pode-se interpretar que esta variável não contribuiu de forma impactante para a variação ocorrida nas taxas fracionais de degradação.

Biplot dos componentes principais	
Variável	Cor de referência
MSfc1	
FDNfc1	
FDAfc1	
CELfc1	
MSb1	
FDNb1	
FDAb1	
CElb1	
MSft1	
FDNft1	
FDAft1	
CELft1	

Figura 3 – Correlação entre as variáveis taxas fracionais de degradação dos três substratos ocorridas na primeira incubação *in situ* durante alimentação dos bovinos com dieta exclusiva de feno de Coast-cross. MSfc – MS de feno de Coast-cross; FDNfc – FDN de feno de Coast-cross; FDAfc – FDA de feno de Coast-cross; CELfc – CEL de feno de Coast-cross; MSb – MS do bagaço de cana-de-açúcar; FDNb – FDN do bagaço de cana-de-açúcar; FDAb – FDA do bagaço de cana-de-açúcar; CELb – CEL do bagaço de cana-de-açúcar; MSft – MS do feno de Tifton-85, FDNft – FDN do feno de Tifton-85; FDAft – FDA do feno de Tifton-85; CELft – CEL do feno de Tifton-85

A Tabela 10 e a Figura 3 evidenciam que as taxas fracionais de degradação de MS, FDN, FDA e CEL, dentro de cada substrato, são muito bem correlacionadas, com exceção da taxa fracional de CEL do bagaço de cana-de-açúcar. Analisando-se a formação dos componentes principais, é visto que a degradação do substrato bagaço de cana-de-açúcar está correlacionada negativamente com a das fontes de feno utilizadas (componentes principais 2 e 3). Isto sugere que animais com bom nível de degradação para qualquer fonte de feno provavelmente não apresentarão o mesmo nível de degradação para bagaço de cana-de-açúcar. Ao mesmo tempo, observa-se falta de correlação entre os substratos feno, sendo possível ocorrer as seguintes combinações de padrão de degradação: alta ou baixa degradação em ambos os fenos ou alta degradação para uma fonte de feno e baixa degradação para a outra fonte.

A Análise de Componentes principais fornece ideia simplista da correlação entre as observações (animais) e as variáveis (taxas fracionais de degradação). Neste estudo isto ocorre de forma mais proeminente, pois para correta interpretação da Figura 3, os três componentes necessitam ser vistos em três dimensões, o que após impressão, torna-se impossível. Devido a isto, para melhor caracterização dos animais com as variáveis serviu-se da análise fatorial, realizada aqui com a retenção de três fatores (Tabela 11 e Figuras 4, 5 e 6).

Tabela 11 – Participação de cada variável dentro dos modelos dos fatores na segunda incubação *in situ* durante a alimentação dos bovinos com dieta exclusiva de feno de Coast-cross

Variáveis	Modelo dos fatores			Comunalidade (%)
	Fator 1	Fator 2	Fator 3	
MSfc1	0,26	0,12	0,88	85,23
FDNfc1	0,26	0,11	0,87	83,80
FDAfc1	0,24	-0,01	0,80	77,12
CELfc1	-0,01	-0,07	-0,88	69,31
MSb1	0,14	0,94	0,14	92,93
FDNb1	0,17	0,93	0,08	88,12
FDAb1	0,27	0,87	0,05	83,19
CELb1	0,42	0,73	0,03	71,97
MSft1	0,88	0,22	0,14	86,76
FDNft1	0,87	0,21	0,30	90,20
FDAft1	0,85	0,32	0,12	84,04
CELft1	0,85	0,17	0,34	85,20

Comunalidade – porcentagem da variação da variável que pode ser explicada pelo modelo de fatores proposto. Fator 1 - Degradação de feno de Tifton-85; Fator 2 - Degradação de bagaço; Fator 3 - Degradação de feno de Coast-cross; MSfc – MS de feno de Coast-cross; FDNfc – FDN de feno de Coast-cross; FDAfc – FDA de feno de Coast-cross; CELfc – CEL de feno de Coast-cross; MSb – MS do bagaço de cana-de-açúcar; FDNb – FDN do bagaço de cana-de-açúcar; FDAb – FDA do bagaço de cana-de-açúcar; CELb – CEL do bagaço de cana-de-açúcar; MSft – MS do feno de Tifton-85, FDNft – FDN do feno de Tifton-85; FDAft – FDA do feno de Tifton-85; CELft – CEL do feno de Tifton-85

A seguir está apresentada a descrição e identificação dos fatores expostos na Tabela 11:

Fator 1: MSft1 (0,88) + FDNft1 (0,87) + FDAft1 (0,85) + CELft1 (0,85) – Degradação de feno de Tifton-85.

Fator 2: MSb1 (0,94) + FDNb1 (0,93) + FDAb1 (0,87) + CELb1 (0,73) – Degradação de bagaço

Fator 3: MSfc1 (0,88) + FDNfc1 (0,87) + FDAfc1 (0,80) - CELfc1 (0,88) – Degradação de feno de Coast-cross

A Análise Fatorial sugere a caracterização dos indivíduos com base na degradação de cada substrato, pois cada fator é formado por todas as variáveis de determinada forragem incubada. Logo, é possível classificar os animais por nível de degradação dentro de cada substrato. Com base nessa classificação, foram originadas as Figuras 4, 5 e 6, cuja visualização fornece conhecimento do nível de

degradação de cada animal. Os animais 19 e 66 não possuem fatores devido a exclusões realizadas no seu banco de dados (*outliers*), logo estes animais não constam nestas figuras.

Figura 4 – Representação da dispersão dos animais em relação à degradação de bagaço de cana-de-açúcar e feno de Tifton-85 na primeira incubação *in situ* durante a alimentação dos bovinos com feno de Coast-cross

Figura 5 – Representação da dispersão dos animais em relação à degradação do feno de Coast-cross e feno de Tifton-85 na primeira incubação *in situ* durante a alimentação dos bovinos com feno de Coast-cross

Figura 6 – Representação da dispersão dos animais em relação à degradação do feno de Coast-cross e bagaço de cana-de-açúcar na primeira incubação *in situ* durante a alimentação dos bovinos com feno de Coast-cross

A análise de fatores apontou os indivíduos superiores e/ou inferiores em desempenho de degradação para cada substrato, porém não é possível separar os animais em grupos, pois dificulta decisão a respeito dos indivíduos próximos ao eixo de origem dos gráficos.

Utilizando estes fatores como critério de caracterização dos indivíduos, pode-se utilizar a Análise de Agrupamento e Função Discriminante para formar grupos de níveis de degradação para cada substrato (Figuras 7, 8 e 9). O agrupamento dos animais dentro do fator 1, relacionado ao feno de Coast-cross, foi segundo o critério de Ward (por menor variabilidade entre indivíduos). Para os substratos bagaço de cana-de-açúcar e feno de Tifton-85 utilizou-se o método das Médias. Foi testado o método de separação por Ward, Médias, Vizinho mais próximo e Vizinho mais distante para cada fator, porém visualmente os que melhor se adequaram aos dados foram Ward e Médias.

Figura 7 – Agrupamento dos indivíduos utilizando as taxas fracionais de degradação de MS, FDN, FDA e celulose do substrato feno de Coast-cross por meio do método de Ward, durante a primeira incubação *in situ* com alimentação dos bovinos exclusivamente com feno de Coast-cross. Grupos de níveis de kd da esquerda para a direita: média degradação (■); alta degradação (■); baixa degradação (■). (A linha pontilhada na horizontal demonstra o critério de distância utilizada para formação dos grupos)

A Análise Discriminante apontou 100% de sucesso na formação dos grupos apresentados na Figura 7. O teste de comparação de vetores de médias por Lambda Wilks, utilizando-se a ferramenta de contrastes multivariados, foi significativo para todos os contrastes, logo, os grupos demonstrados na Figura 7 são diferentes entre si ($P < 0,01$). Observando somente degradação de feno de Coast-cross (Figura 7), pode-se concluir que dentro da população animal estudada, dez indivíduos apresentaram nível de degradação superior (animais 31, 185, 75, 166, 199, 41, 71, 213, 66, 359), nove indivíduos apresentaram nível de degradação médio (animais 19, 195, 109, 336, 78, 229, 254, 72 e 258) e dez indivíduos apresentaram nível de degradação baixo (animais 23, 32, 198, 147, 252, 39, 162, 146, 189 e 153).

Figura 8 – Agrupamento dos indivíduos utilizando as taxas fracionais de degradação de MS, FDN, FDA e celulose do substrato bagaço de cana-de-açúcar por meio do método das Médias, durante a primeira incubação *in situ* com alimentação dos bovinos exclusivamente com feno de Coast-cross. Grupos de níveis de kd da esquerda para a direita: (■) média baixa degradação; (■) média alta degradação; (■) alta degradação; (■) baixa degradação. (A linha pontilhada na horizontal demonstra o critério de distância utilizada para formação dos grupos)

A Análise Discriminante apontou 100% de sucesso na formação dos grupos da Figura 8. O teste de comparação de vetores de médias por Lambda Wilks, utilizando-se a ferramenta de contrastes multivariados, foi significativo para todos os contrastes, logo, os grupos demonstrados na Figura 8 são diferentes entre si ($P < 0,01$). Observando somente degradação de bagaço de cana-de-açúcar (Figura 8), pode-se concluir que dentro da população animal estudada nove indivíduos apresentaram nível de degradação superior (animais 75, 146, 78, 162, 195, 229, 147, 166 e 199), nove indivíduos apresentaram nível de degradação médio alto (animais 31, 336, 185, 66, 72, 153, 213, 32 e 189), sete indivíduos apresentaram nível de degradação médio baixo (animais 19, 41, 109, 258, 252, 254 e 359) e quatro indivíduos apresentaram nível de degradação baixo (animais 23, 198, 39 e 71).

Figura 9 – Agrupamento dos indivíduos utilizando as taxas fracionais de degradação de MS, FDN, FDA e celulose do feno de Tifton-85 por meio do método das Médias, durante a primeira incubação *in situ* com alimentação dos bovinos exclusivamente com feno de Coast-cross. Grupos de níveis de kd da esquerda para a direita: (■) baixa degradação; (■) média baixa degradação; (■) média alta degradação; (■) alta degradação. (A linha pontilhada na horizontal demonstra o critério de distância utilizada para formação dos grupos)

A Análise Discriminante apontou 100% de sucesso na formação dos grupos da Figura 9. O teste de comparação de vetores de médias por Lambda Wilks, utilizando-se a ferramenta de contrastes multivariados, foi significativo para todos os contrastes, logo, os grupos demonstrados na Figura 9 são diferentes entre si ($P < 0,01$). Observando somente degradação de feno de Tifton-85 (Figura 9), pode-se concluir que dentro da população animal estudada três indivíduos apresentaram nível de degradação superior (animais 71, 162 e 185), dez indivíduos apresentaram nível de degradação médio alto (animais 32, 359, 41, 195, 78, 72, 109, 336, 75 e 199), onze indivíduos apresentaram nível de degradação médio baixo (animais 31, 189, 258, 229, 153, 166, 213, 39, 146, 198 e 147) e três indivíduos apresentaram nível de degradação baixo (animais 23, 252 e 254). Os animais 19 e 66 não foram agrupados na Figura 9 de feno de Tifton-85 devido à exclusão de taxas fracionais consideradas “*outliers*”, logo a análise não pôde ser realizada para estes indivíduos.

Tabela 12 – Médias de kd para as frações MS, FDN, FDA e CEL entre os grupos de níveis desempenho formados pelas análises multivariadas com os bovinos alimentados com dieta exclusiva de feno de Coast-cross

%h	Feno de Coast-cross				EPM	P
	Alto	Médio	Baixo			
kd MS	3,89 ^a	3,39 ^b	2,83 ^c		0,06	< 0,01
kd FDN	3,92 ^a	3,38 ^b	2,94 ^c		0,07	< 0,01
kd FDA	3,92 ^a	3,70 ^{ab}	3,07 ^b		0,18	< 0,01
kd CEL	3,94 ^a	3,69 ^a	3,06 ^b		0,11	< 0,01

	Bagaço de cana-de-açúcar				EPM	P
	Alto	Méd. Alto	Méd. Baixo	Baixo		
kd MS	3,00 ^a	2,70 ^b	2,39 ^c	1,83 ^d	0,08	< 0,01
kd FDN	3,05 ^a	2,74 ^b	2,42 ^c	1,75 ^d	0,06	< 0,01
kd FDA	3,04 ^a	3,01 ^a	2,43 ^b	1,86 ^c	0,13	< 0,01
kd CEL	3,05 ^a	2,89 ^a	2,46 ^{ab}	1,88 ^b	0,18	< 0,01

	Feno de Tifton-85				EPM	P
	Alto	Médio alto	Médio baixo	Baixo		
kd MS	4,83 ^a	3,92 ^b	3,43 ^c	2,88 ^d	0,12	< 0,01
kd FDN	4,83 ^a	3,97 ^b	3,54 ^c	2,96 ^d	0,12	< 0,01
kd FDA	4,52 ^a	4,14 ^{ab}	3,78 ^b	2,80 ^c	0,15	< 0,01
kd CEL	5,37 ^a	4,52 ^b	3,98 ^c	3,04 ^d	0,15	< 0,01

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem pelo teste de Tukey (P > 0,05)

kd = taxa fracional de degradação

4.2 Comportamento ingestivo dos bovinos canulados alimentados com feno de Coast-cross.

Tabela 13 – Atividades de ingestão, ruminação, ócio e consumo de água dos bovinos recebendo dieta exclusiva de feno de Coast-cross

Variáveis	Média ± erro padrão
Consumo	
MS, kg/dia	6,88 ± 0,11
MS, % P.V.	1,83 ± 0,03
FDN, kg/dia	5,38 ± 0,08
FDNi, kg/dia	1,91 ± 0,03
FDNi, % P.V.	0,51 ± 0,01
Tempo de Ingestão	
Min/ dia	364,83 ± 13,21
Min/kg MS	53,14 ± 1,85
Min/kg FDN	67,92 ± 2,37
Min/ kg FDNi	191,27 ± 6,67
Tempo de Ruminação	
Min/ dia	589,66 ± 12,38
Min/kg MS	85,99 ± 1,82
Min/kg FDN	109,90 ± 2,33
Min/ kg FDNi	309,50 ± 6,55
Eficiência de ruminação, g FDN/hora	552,87 ± 11,81
Total de mastigação	
Min/ dia	954,81 ± 17,99
Min/ kg MS	139,13 ± 2,58
Min/ kg FDN	177,83 ± 3,29
Min/ kg FDNi	502,04 ± 10,36
Demais atividades	
Ócio, min/dia	475,17 ± 18,44
Ingestão de água, min/dia	10,00 ± 1,75

FDNi = FDN indigestível

Figura 10 – Comportamento ingestivo dos bovinos canulados após alimentação com dieta composta exclusivamente por feno de Coast-cross (setas indicam os momentos de alimentação dos animais). Procedimento realizado com as luzes do confinamento mantidas acesas durante o período da noite.

Para análise de correlação entre comportamento ingestivo e kd, foram consideradas as variáveis consumo de matéria seca (CMS), tempo total de ingestão (Ing), tempo total de ruminação (Rum), minutos de ingestão por quilo de matéria seca (Ing/kgMS), minutos de ruminação por quilo de matéria seca (Rum/kgMS), tempo total de ócio (ócio) do período feno. Com relação às taxas fracionais foram considerados os kd de MS, FDN, FDA e CEL de cada substrato. A análise foi realizada para cada substrato separadamente.

Foi verificado que não houve correlação entre os kd de feno de Coast-cross ($P = 0,42$), feno de Tifton-85 ($P = 0,99$) e bagaço de cana-de-açúcar ($P = 0,99$) e o comportamento ingestivo dos animais.

4.3 Coeficiente de variação como medida de precisão em ensaios *in situ* – primeira incubação *in situ*.

Figura 11 – Coeficientes de variação médios das taxas fracionais de degradação, por substrato, em função do número de animais durante a primeira incubação *in situ* com alimentação dos bovinos com dieta composta exclusivamente por feno de Coast-cross

Os coeficientes de variação médios para feno de Coast-cross, feno de Tifton-85 e bagaço de cana-de-açúcar foram $12,89 \pm 0,33$, $13,80 \pm 1,28$ e $24,98 \pm 0,99$ respectivamente.

Figura 12 – Índice de variação médio das taxas fracionais de degradação, por substrato, em função do número de animais na primeira incubação *in situ* durante alimentação dos bovinos com dieta exclusiva de feno de Coast-cross

4.4 Dieta com bagaço de cana-de-açúcar *in natura*

Os dados aqui apresentados são provenientes de 28 animais, pois no decorrer desta fase do estudo os animais 146 e 306 não demonstraram padrões comportamentais adequados. Estes apresentaram queda brusca de consumo e perda expressiva de escore corporal, sendo necessária transferência de conteúdo ruminal de outros animais e oferta de dieta contendo silagem de milho por vários dias para sua recuperação. Devido a isto, decidiu-se excluir estes dois animais do banco de dados. O animal 31 não possui resultados de taxas fracionais de degradação para feno de Coast-cross nesta fase do experimento devido uma falha no preparo dos sacos a serem incubados onde este substrato não foi preparado para este animal.

Na análise descritiva dos resultados (Figura 13, Tabela 14) tornou-se evidente a variação no desempenho da população, conduzindo em necessidade de investigação minuciosa sobre os indivíduos e os diferentes padrões apresentados para as taxas fracionais de degradação estudadas.

A)

B)

Figura 13 – Distribuição de frequência das taxas fracionais de degradação das porções analisadas de cada substrato durante a segunda incubação *in situ*, com os bovinos alimentados com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar. A) Feno de Coast-cross; B) Bagaço de cana-de-açúcar; C) Feno de Tifton-85. MSfc – MS de feno de Coast-cross, FDNfc – FDN de feno de Coast-cross, FDAfc – FDA de feno de Coast-cross, CELfc – CEL de feno de Coast-cross, HEMfc – HEM de feno de Coast-cross; MSb – MS do bagaço de cana-de-açúcar, FDNb – FDN do bagaço de cana-de-açúcar, FDAb – FDA do bagaço de cana-de-açúcar, CELb – CEL do bagaço de cana-de-açúcar; HEMb – HEM do bagaço de cana-de-açúcar; MSft – MS do feno de Tifton-85, FDNft – FDN do feno de Tifton-85, FDAft – FDA do feno de Tifton-85, CELft – CEL do feno de Tifton-85, HEMft – HEM do feno de Tifton-85.

Tabela 14 – Descrição das variáveis fração solúvel (A), fração potencialmente degradável (B), fração indigestível (C), degradação efetiva (Deg_{Ef}), degradação potencial (Deg_{Pot}) e taxa fracional de degradação (kd) durante a alimentação com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar

Variável	Média	Máximo	Mínimo	C.V. (%)	Desvio-padrão
kd (%/h)					
MS	3,22	5,20	1,64	22,07	0,71
FDN	3,28	5,30	1,71	23,91	0,79
FDA	3,36	5,74	1,46	29,75	1,00
Celulose	3,56	7,23	1,35	32,36	1,14
Hemicelulose	3,32	5,57	1,38	28,51	0,95
A (%)					
MS	20,50	27,19	13,95	22,66	4,65
FDN	9,39	17,87	2,05	49,55	4,65
FDA	6,14	18,07	-25,66	146,70	9,01
Celulose	10,87	41,37	-15,67	79,45	8,64
Hemicelulose	4,39	35,32	-21,37	270,20	11,85
B (%)					
MS	47,88	59,02	37,17	13,82	6,62
FDN	57,25	74,49	37,77	20,26	11,60
FDA	57,13	94,04	36,69	19,98	11,42
Celulose	61,50	97,46	43,36	18,69	11,49
Hemicelulose	62,58	94,17	36,18	21,99	13,76
C (%)					
MS	31,62	48,68	16,50	33,93	10,73
FDN	33,36	46,07	19,42	26,09	8,70
FDA	36,73	48,60	21,20	24,72	9,08
Celulose	27,63	41,03	6,97	34,76	9,61
Hemicelulose	33,03	61,68	16,80	38,32	12,66
Deg _{Ef} (%)					
MS	47,34	61,48	28,87	20,70	9,80
FDN	41,88	55,68	30,43	15,97	6,69
FDA	38,79	57,43	24,13	22,91	8,89
Celulose	46,58	69,04	31,92	21,47	10,00
Hemicelulose	39,60	59,24	12,31	30,67	12,15
Deg _{Pot} (%)					
MS	68,38	83,50	51,32	15,69	10,73
FDN	66,63	80,58	53,93	13,06	8,70
FDA	63,29	78,80	51,40	14,28	9,04
Celulose	72,37	93,03	58,97	13,27	9,61
Hemicelulose	66,97	83,20	38,32	18,90	12,66

Todas as variáveis de taxas fracionais de degradação, fração solúvel (A), fração potencialmente degradável (B), fração não degradável (C), Degradação efetiva (Deg_{Ef}) e Degradação potencial (Deg_{Ef}) apresentaram distribuição normal.

Tabela 15 – Influência do substrato sobre a fração solúvel (A), fração potencialmente degradável (B), fração indigestível (C), degradação efetiva (Deg_{Ef}), degradação potencial (Deg_{Pot}) e taxa fracional de degradação (kd) dos substratos na segunda incubação *in situ* durante a alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar

Variável	Substrato			EPM	Valor P*
	Feno deTifton-85	Feno de Coast-cross	Bagaço		
MS					
A, %	24,50 ^a	22,60 ^b	13,96 ^c	0,34	< 0,01
B, %	56,30 ^a	46,27 ^b	40,99 ^c	0,27	< 0,01
C, %	19,19 ^c	30,72 ^b	44,91 ^a	0,25	< 0,01
Deg _{Ef} , %	58,16 ^a	49,66 ^b	35,05 ^c	0,45	< 0,01
Deg _{Pot} , %	80,80 ^a	69,28 ^b	55,09 ^c	0,25	< 0,01
kd, %/h	3,74 ^a	3,26 ^b	2,67 ^c	0,11	< 0,01
FDN					
A, %	7,75 ^b	5,34 ^c	14,96 ^a	0,43	< 0,01
B, %	70,56 ^a	59,23 ^b	43,14 ^c	0,49	< 0,01
C, %	22,24 ^c	35,43 ^b	42,73 ^a	0,28	< 0,01
Deg _{Ef} , %	50,46 ^a	38,88 ^b	36,35 ^c	0,51	< 0,01
Deg _{Pot} , %	77,76 ^a	64,56 ^b	57,27 ^c	0,28	< 0,01
kd, %/h	3,88 ^a	3,29 ^b	2,68 ^c	0,12	< 0,01
FDA					
A, %	11,56 ^a	-3,39 ^b	12,80 ^a	0,58	< 0,01
B, %	64,46 ^a	62,06 ^a	43,20 ^b	0,73	< 0,01
C, %	24,14 ^c	42,08 ^b	43,64 ^a	0,38	< 0,01
Deg _{Ef} , %	50,38 ^a	31,81 ^c	34,33 ^b	0,67	< 0,01
Deg _{Pot} , %	75,81 ^a	57,32 ^b	56,55 ^b	0,33	< 0,01
kd, %/h	4,07 ^a	3,44 ^b	2,58 ^c	0,15	< 0,01
Celulose					
A, %	13,08 ^a	3,35 ^b	14,24 ^a	0,81	< 0,01
B, %	71,16 ^a	65,02 ^b	49,22 ^c	0,93	< 0,01
C, %	14,85 ^c	31,38 ^b	36,59 ^a	0,32	< 0,01
Deg _{Ef} , %	59,24 ^a	41,89 ^b	39,53 ^c	0,71	< 0,01
Deg _{Pot} , %	85,15 ^a	68,76 ^b	63,41 ^c	0,31	< 0,01
kd, %/h	4,49 ^a	3,53 ^b	2,65 ^c	0,18	< 0,01
Hemicelulose					
A, %	0,78 ^b	14,45 ^a	-3,18 ^c	1,14	< 0,01
B, %	78,21 ^a	57,14 ^b	54,16 ^b	1,20	< 0,01
C, %	21,09 ^c	28,48 ^b	49,12 ^a	0,57	< 0,01
Deg _{Ef} , %	46,49 ^a	46,93 ^a	23,95 ^b	0,97	< 0,01
Deg _{Pot} , %	78,76 ^a	71,52 ^b	50,48 ^c	0,53	< 0,01
kd, %/h	3,72 ^a	3,37 ^{ab}	2,88 ^b	0,17	< 0,01

* Valor do teste F

Médias obtidas pelo LSMEANS

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem pelo teste de Tukey (P ≥ 0,05)

Nota: Kp = 2,5 %/h; Deg_{Ef} (%) = (A+B*(kd/(kd+Kp))); Deg_{pot} (%) = 100 – C

Assim como explicado anteriormente, valores negativos de fração A superestimam a fração B e por sua vez subestimam a degradação efetiva dificultando a interpretação destes parâmetros. A porção hemicelulose, novamente apresentou teores similares entre os substratos (Tabela 6) logo a massa perdida pelos poros dos sacos foi considerada positivamente como fração A.

A variável taxa fracional de degradação de hemicelulose não está incluída nas análises multivariadas de acordo com o explicitado na página 60. Os três primeiros componentes explicam 83% da variação ocorrida nas taxas fracionais de degradação durante a primeira incubação *in situ*, sendo então os mais relevantes e por sua vez os considerados para interpretação desta análise.

Tabela 16 – Escores das variáveis taxas fracionais de degradação dentro dos três componentes principais durante a segunda incubação *in situ* com alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar

Variável	Componentes principais		
	CP1	CP2	CP3
MSfc2	0,30	0,29	0,15
FDNfc2	0,29	0,31	0,22
FDAfc2	0,21	0,02	0,54
CELfc2	0,22	-0,03	0,56
MSb2	0,32	-0,39	-0,02
FDNb2	0,32	-0,34	-0,03
FDAb2	0,29	-0,41	-0,10
CElb2	0,31	-0,37	-0,15
MSft2	0,32	0,28	-0,07
FDNft2	0,34	0,20	-0,11
FDAft2	0,28	0,29	-0,37
CELft2	0,25	0,22	-0,37

MSfc – MS de feno de Coast-cross; FDNfc – FDN de feno de Coast-cross; FDAfc – FDA de feno de Coast-cross; CELfc – CEL de feno de Coast-cross; MSb – MS do bagaço de cana-de-açúcar; FDNb – FDN do bagaço de cana-de-açúcar; FDAb – FDA do bagaço de cana-de-açúcar; CELb – CEL do bagaço de cana-de-açúcar; MS do feno de Tifton-85; FDNft – FDN do feno de Tifton-85; FDAft – FDA do feno de Tifton-85; CELft – CEL do feno de Tifton-85; CP1 - componente principal 1, nomeado como degradação de fibra; CP2 - componente principal 2, nomeado como degradação de bagaço de cana-de-açúcar; CP3 - componente principal 3, nomeado como degradação de celulose de feno de Coast-cross. .

A seguir são apresentadas a descrição e identificação dos componentes principais demonstrados na Tabela 16:

CP1: MSfc2 (0,30) + FDNfc2 (0,29) + MSb2 (0,32) + FDNb2 (0,32) + CELb2 (0,31) + MSft2 (0,32) + FDNft2 (0,34) – Degradação de fibra.

CP2: - MSb2 (0,39) - FDNb2 (0,34) - FDAb2 (0,41) - CELb2 (0,37) – Degradação de bagaço.

CP3: FDAfc2 (0,54) + CELfc2 (0,56) – Degradação de celulose do feno de Coast-cross.

Pode-se interpretar que nesta segunda incubação, as taxas fracionais de degradação de FDA e CEL do feno de Tifton-85 não participaram de forma impactante na variação ocorrida nas taxas fracionais de degradação estudadas.

Biplot dos componentes principais	
Variável	Cor de referência
MSfc2	
FDNfc2	
FDAfc2	
CELfc2	
MSb2	
FDNb2	
FDAb2	
CELb2	
MSft2	
FDNft2	
FDAft2	
CELft2	

Figura 14 – Correlação entre as variáveis taxas fracionais de degradação dos três substratos ocorridas na segunda incubação *in situ* durante alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar. MSfc – MS de feno de Coast-cross; FDNfc – FDN de feno de Coast-cross; FDAfc – FDA de feno de Coast-cross; CELfc – CEL de feno de Coast-cross; MSb – MS do bagaço de cana-de-açúcar; FDNb – FDN do bagaço de cana-de-açúcar; FDAb – FDA do bagaço de cana-de-açúcar; CELb – CEL do bagaço de cana-de-açúcar; MSft – MS do feno de Tifton-85, FDNft – FDN do feno de Tifton-85; FDAft – FDA do feno de Tifton-85; CELft – CEL do feno de Tifton-85

Pela observação da Tabela 16 e Figura 14 pode-se verificar que as taxas fracionais, dentro de substrato, foram correlacionadas entre si, com exceção das taxas fracionais relacionadas a FDA e CEL do substrato feno de Tifton-85. Por meio desta análise é possível constatar que as correlações entre os substratos nesta segunda incubação *in situ* ocorreram de forma distinta da primeira incubação, não ocorrendo contrastes entre os substratos incubados (correlações negativas), pelo contrário, o componente 1 aponta correlação positiva entre eles. Isso significa que animais, nesta segunda incubação, podem apresentar níveis de degradação semelhantes para as três forragens incubadas, ou seja, os animais podem ser simultaneamente de alta a média ou de média a baixa degradação para os três substratos.

A Análise de Componentes principais fornece ideia simplista da correlação entre observações e variáveis. Isto ocorre de forma ressaltada neste estudo devido a consideração de três componentes principais. Para fidedigna interpretação da correlação entre observações e variáveis, a Figura 13 necessita ser visualizada em três dimensões, sendo que na nesta impressão em papel, torna-se impossível. Devido a isto, para melhor caracterização dos animais com as variáveis serviu-se da Análise Fatorial, realizada aqui com a retenção de três fatores.

Tabela 17 – Participação de cada variável dentro dos modelos dos fatores na segunda incubação *in situ* durante a alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar

Variáveis	Modelo dos fatores			Comunalidade (%)
	Fator 1	Fator 2	Fator 3	
MSfc2	0,68	0,16	0,57	81,22
FDNfc2	0,63	0,11	0,63	81,27
FDAfc2	0,10	0,20	0,81	70,47
CELfc2	0,06	0,26	0,83	76,82
MSb2	0,23	0,90	0,27	94,39
FDNb2	0,29	0,87	0,28	91,35
FDAb2	0,21	0,89	0,15	86,81
CElb2	0,30	0,90	0,13	92,51
MSft2	0,81	0,25	0,36	85,18
FDNft2	0,79	0,36	0,31	85,98
FDAft2	0,89	0,24	-0,01	85,90
CELft2	0,79	0,26	-0,05	69,40

Comunalidade – porcentagem da variação relacionada a variável que pode ser explicada pelo modelo de fatores proposto. Fator 1 - Degradação de feno de Tifton-85; Fator 2 - Degradação de bagaço; Fator 3 - Degradação de celulose de feno de Coast-cross; MSfc – MS de feno de Coast-cross; FDNfc – FDN de feno de Coast-cross; FDAfc – FDA de feno de Coast-cross; CELfc – CEL de feno de Coast-cross; MSb – MS do bagaço de cana-de-açúcar; FDNb – FDN do bagaço de cana-de-açúcar; FDAb – FDA do bagaço de cana-de-açúcar; CELb – CEL do bagaço de cana-de-açúcar; MSft – MS do feno de Tifton-85, FDNft – FDN do feno de Tifton-85; FDAft – FDA do feno de Tifton-85; CELft – CEL do feno de Tifton-85

A seguir está apresentada a descrição e identificação dos fatores expostos na Tabela 17:

Fator 1: MSft2 (0,81) + FDNft2 (0,79) + FDAft2 (0,89) + CELft2 (0,79) – Degradação de feno de Tifton-85

Fator 2: MSb2 (0,90) + FDNb2 (0,87) + FDAb2 (0,89) + CELb2 (0,90) – Degradação de bagaço.

Fator 3: FDAfc2 (0,81) + CELfc2 (0,83) – Degradação de celulose do feno de Coast-cross.

A Análise Fatorial sugere a caracterização dos indivíduos com base na degradação de feno de Tifton-85, bagaço de cana-de-açúcar e celulose de feno de Coast-cross. Com base nessa caracterização, foram originadas as Figuras 15, 16 e

17, cuja visualização fornece conhecimento do perfil de degradação de cada animal. O animal 31 não possui score dentro dos fatores devido a não possuir taxas fracionais para feno de Coast-cross.

Figura 15 – Representação da dispersão dos animais em relação à degradação de bagaço de cana-de-açúcar e feno de Tifton-85 na segunda incubação *in situ* durante a alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar

Figura 16 – Representação da dispersão dos animais em relação à degradação de bagaço de cana-de-açúcar e celulose de feno de Coast-cross na segunda incubação *in situ* durante a alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar

Figura 17 – Representação da dispersão dos animais em relação à degradação de feno de Tifton-85 e celulose de feno de Coast-cross na segunda incubação *in situ* durante a alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar

A análise de fatores apontou os indivíduos superiores e/ou inferiores em desempenho de degradação para cada par de fatores, porém não é possível separar os animais em grupos.

Com base nestes fatores como critério de caracterização dos indivíduos, pode-se utilizar a Análise de Agrupamento e Função Discriminante para formar grupos de níveis de degradação para cada fator (Figuras 18, 19 e 20). O agrupamento dos animais para os fatores envolvendo feno de Coast-cross e bagaço de cana-de-açúcar utilizou-se o método de Ward, ao passo que para o fator relacionado ao feno de Tifton-85, utilizou-se o critério das Médias. Foi testado o método de separação por Ward, Médias, Vizinho mais próximo e Vizinho mais distante para cada fator, porém os que melhor se adequaram visualmente aos dados foram Ward e Médias.

Figura 18 – Agrupamento dos indivíduos utilizando as taxas fracionais de degradação de MS, FDN, FDA e celulose do substrato feno de Coast-cross por meio do método de Ward, durante a segunda incubação *in situ* com alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar. Grupos de níveis de kd da esquerda para a direita: (■) alta degradação; (■) média degradação; (■) baixa degradação

O animal 31 não consta nesta análise, pois não foi incubado feno de Coast-cross neste indivíduo durante o segundo *in situ*. A análise discriminante apontou 100% de sucesso na separação dos três grupos. O teste de comparação de vetores de médias por Lambda Wilks, utilizando-se a ferramenta de contrastes multivariados, foi significativo para todos os contrastes, logo, os grupos demonstrados na Figura 18 são diferentes entre si ($P < 0,01$). Observando somente degradação de feno de Coast-cross (Figura 18), pode-se concluir que dentro da população animal estudada onze indivíduos apresentaram nível de degradação superior (animais 19, 66, 153, 185, 213, 72, 252, 39, 71, 147 e 189), treze indivíduos apresentaram nível de degradação médio (animais 23, 195, 32, 162, 41, 109, 229, 75, 198, 199, 336, 78 e 359) e três indivíduos apresentaram nível de degradação inferior (animais 166, 254 e 258).

Figura 19 – Agrupamento dos indivíduos utilizando as taxas fracionais de degradação de MS, FDN, FDA e celulose do substrato bagaço de cana-de-açúcar por meio do método de Ward, durante a segunda incubação *in situ* com alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar. Grupos de níveis de kd da esquerda para a direita: (■) média alta degradação; (■) média baixa degradação; (■) baixa degradação; (■) alta degradação

A análise de função discriminante indicou 100% de sucesso para distribuição dos animais nos níveis desempenhos de alta, média-alta e média-baixa degradação e 90,91% para o grupo de média-baixa degradação, sugerindo o animal 153 ser pertencente ao grupo de degradação inferior ao invés do grupo de média-baixa degradação (Figura 19). Logo, da população animal estudada nesta segunda incubação *in situ* com enfoque no substrato bagaço de cana-de-açúcar, três indivíduos apresentaram maior nível de kd (animais 39, 66 e 185), seis indivíduos apresentaram nível de kd médio-alto (animais 19, 72, 75, 199, 78 e 252), dez indivíduos apresentaram nível de kd médio-baixo (animais 32, 162, 41, 147, 189, 71, 195, 109, 359 e 229) e nove apresentaram menor nível de kd (animais 23, 31, 166, 258, 198, 213, 254, 153 e 336). O teste de comparação de vetores de médias por Lambda Wilks nos contrastes multivariados foi significativo ($P < 0,01$), ou seja, os quatro grupos encontrados (o animal 153 já alocado corretamente) são diferentes em nível de degradação.

Figura 20 – Agrupamento dos indivíduos utilizando as taxas fracionais de degradação de MS, FDN, FDA e celulose do substrato feno de Tifton-85 por meio do método de Médias, durante a segunda incubação *in situ* com alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar. Grupo de kd da esquerda para a direita: () média degradação; () alta degradação; () baixa degradação

Na Figura 20 o animal 32 não foi considerado, por não apresentar um valor de taxa fracional de degradação, porém pela análise de fatores pode-se observar que este animal faz parte do grupo de alta degradação. Foram distribuídos com 100% de sucesso os animais dos grupos média e baixa degradação, ao passo que para o grupo alta degradação foi obtido 92,31%, pois o indivíduo 162 foi apontado como pertencente ao grupo de média degradação, logo, constam treze animais com maior nível de degradação (animais 66, 109, 71, 185, 75, 78, 72, 153, 199, 229 e 195), nove animais com nível de degradação médio (animais 19, 189, 198, 147, 359, 252, 39, 41 e 162) e sete animais com menor nível de degradação (23, 254, 336, 31, 213, 166 e 258) (Figura 20). O teste de comparação de vetores de médias por Lambda Wilks, utilizando-se a ferramenta de contrastes multivariados, foi significativo para todos os contrastes, logo, os grupos demonstrados na análise de agrupamento (com o animal 162 alocado corretamente e o animal 32 incluído no grupo de alta degradação) são diferentes entre si ($P < 0,01$).

Tabela 18 – Médias de kd para as frações MS, FDN, FDA e CEL entre os grupos de níveis desempenho formados pelas análises multivariadas com os bovinos alimentados com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar

%h	Feno de Coast-cross				EPM	P
	Alto	Médio	Baixo			
kd MS	3,55 ^a	3,21 ^b	2,40 ^c		0,11	< 0,01
kd FDN	3,55 ^a	3,27 ^b	2,43 ^c		0,10	< 0,01
kd FDA	3,99 ^a	3,26 ^b	2,26 ^c		0,21	< 0,01
kd CEL	4,28 ^a	3,17 ^b	2,39 ^c		0,17	< 0,01

	Bagaço de cana-de-açúcar				EPM	P
	Alto	Méd. Alto	Méd. Baixo	Baixo		
kd MS	3,74 ^a	3,10 ^b	2,58 ^c	2,12 ^d	0,10	< 0,01
kd FDN	3,93 ^a	3,16 ^b	2,51 ^c	2,14 ^d	0,31	< 0,01
kd FDA	3,93 ^a	2,76 ^b	2,56 ^b	2,02 ^c	0,12	< 0,01
kd CEL	3,97 ^a	3,11 ^b	2,54 ^c	2,04 ^d	0,12	< 0,01

	Feno de Tifton-85			EPM	P
	Alto	Médio	Baixo		
kd MS	4,09 ^a	3,90 ^a	2,90 ^b	0,15	< 0,01
kd FDN	4,35 ^a	4,00 ^a	2,92 ^b	0,17	< 0,01
kd FDA	4,79 ^a	3,88 ^b	2,96 ^c	0,19	< 0,01
kd CEL	5,49 ^a	4,19 ^b	2,91 ^c	0,17	< 0,01

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem pelo teste de Tukey (P > 0,05)

kd = taxa fracional de degradação

4.5 Comportamento ingestivo dos bovinos canulados alimentados com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

Tabela 19 – Atividades de ingestão, ruminação, ócio e consumo de água de bovinos recebendo dieta contendo de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*

Variáveis	Média ± erro padrão
Consumo	
MS, kg/dia	4,52 ± 0,07
MS, % P.V.	1,26 ± 0,04
FDN, kg/dia	3,65 ± 0,03
FDNi, kg/dia*	1,56 ± 0,13
FDNi, % P.V.*	0,43 ± 0,01
Tempo de Ingestão	
Min/ dia	286,43 ± 12,76
Min/ kg MS	65,43 ± 3,18
Min/ kg FDN	79,18 ± 3,85
Min/ kg de FDNi*	185,30 ± 9,01
Tempo de Ruminação	
Min/ dia	421,43 ± 13,43
Min/ kg MS	95,86 ± 3,31
Min/ kg FDN	106,14 ± 3,99
Min/ kg de FDNi*	107,14 ± 9,33
Total de mastigação	
Min/ dia	707,86 ± 14,95
Min/ kg MS	161,29 ± 4,25
Min/ kg FDN	178,59 ± 4,71
Min/ kg de FDNi*	179,59 ± 12,00
Demais atividades	
Ócio, min/dia	728,57 ± 14,90
Ingestão de água, min/dia	3,57 ± 1,17

*FDNi = FDN indigestível referente apenas ao ingrediente bagaço de cana-de-açúcar

Figura 21 – Comportamento ingestivo dos bovinos após alimentação com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar (seta indica momento da alimentação dos animais). Procedimento realizado com as luzes do confinamento mantidas acesas.

Para análise de correlação entre comportamento ingestivo e kd, foram consideradas as variáveis consumo de matéria seca (CMS), tempo total de ingestão (Ing), tempo total de ruminação (Rum), minutos de ingestão por quilo de matéria seca (Ing/kgMS), minutos de ruminação por quilo de matéria seca (Rum/kgMS) e tempo total de ócio (ócio) do período feno. Com relação às taxas fracionais foram considerados os kd de MS, FDN, FDA e CEL de cada substrato. A análise foi feita para cada substrato separadamente.

Foi verificado que não houve correlação entre os kd de feno de Coast-cross ($P = 0,41$), feno de Tifton-85 ($P = 0,06$) e bagaço de cana-de açúcar ($P = 0,16$) com comportamento ingestivo dos animais.

4.6 Coeficiente de variação como medida de precisão em ensaios *in situ* – segunda incubação *in situ*

Figura 22 – Coeficiente de variação médio das taxas fracionais de degradação, por substrato, em função do número de animais durante a segunda incubação *in situ* com alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar

Os coeficientes de variação médios para feno de Coast-cross, feno de Tifton-85 e bagaço de cana-de-açúcar foram respectivamente de $17,96 \pm 0,59$, $22,43 \pm 0,59$ e $26,88 \pm 0,70$.

Figura 23 - Índice de variação médio das taxas fracionais de degradação, por substrato, em função do número de animais na segunda incubação *in situ* durante alimentação dos bovinos com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar

5 DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros *in situ*

A existência de fração A na análise das frações da fibra (Tabelas 7, 8, 14 e 15) são mais associadas a perdas diretas de partículas pelos poros do saco, que pela solubilização de componentes da matéria seca (OGDEN et al., 2005), uma vez que por definição, a fração fibrosa do alimento é insolúvel em água (VAN SOEST, 1991). Huntington e Givens (1997) concluíram que existe influência do tempo total de lavagem e quantidade de água para cada lavagem sobre as perdas de partículas no tempo zero, juntamente com interação entre tempo de lavagem e substrato incubado. No presente estudo a quantidade de água e tempo de lavagem foram utilizados de forma aleatória, uma vez que o critério de lavagem foi principalmente o padrão de coloração da água de enxágue. Os ingredientes fibrosos tipicamente apresentam pequenas perdas de fração A ao perfil de formato e tamanho de partículas geradas após sua quebra (BOSSSEN et al., 2008).

Os resultados dos parâmetros de degradação *in situ* para MS, FDN, FDA, CEL e HEM dos substratos utilizados neste trabalho podem ser considerados abaixo dos relatados na literatura (Guevara-González et al., 2014) (Tabelas 8, 9 e 15). Porém Guevara-González et al. (2014) sugerem cautela ao interpretar-se resultados de FDN provenientes de análises com utilização de sulfito de sódio, pois pode haver efeito contrário ao esperado devido a diminuição da solubilidade das proteínas ligadas a fibra, e desta forma subestimação da degradabilidade da fração FDN. Mould e Robbins (1981) relatam que o sulfito de sódio, adicionado nas análises de FDN, pode propiciar perda de até 22% da porção hemicelulose e provavelmente também lignina e cutina, diminuindo os resíduos de FDN das análises. Os mesmos sugerem sua utilização em ingredientes que foram submetidos a tratamentos térmicos para remoção das proteínas alteradas pelo aquecimento. Arroyo e González (2013) e Guevara-González et al. (2014) encontraram interação entre resíduo de fração fibrosa (FDN e FDA) e correção da colonização microbiana, de forma que a correção dos valores aparentes aumenta a estimativa de degradabilidade. Os primeiros autores trabalharam com feno de *Lolium multiflorum* Lam e encontraram que a colonização subestima a degradabilidade do FDN em 3,34% (consideraram moderado) e 0,48% para FDA (consideraram baixo, porém

significativo), além de que depois dos valores corrigidos a diferença de degradabilidade entre celulose e hemicelulose passou de 5,44% para 14,50%. O presente estudo não considerou a correção dos dados para contaminação microbiana, o que possivelmente contribuiu para os baixos valores dos parâmetros *in situ* das frações fibrosas analisadas.

Com relação ao kd da porção MS das fontes de feno utilizadas neste estudo, os resultados publicados por Ogden et al. (2005), que trabalharam com feno de Tifton-85 e outras gramíneas incubados em novilhos, foram de kd de 5,7%/h relativo à fração B de 72,2%, degradabilidade potencial e efetiva de 81,4% e 59,3%, respectivamente. O feno de Tifton-85 utilizado por estes autores continha em média 3% de lignina, ao passo que as fontes de feno utilizadas no presente ensaio continham 4,87% e 6,25% para os fenos de Tifton-85 e Coastcross respectivamente, o que explica a menor degradabilidade no presente caso.

A taxa e extensão de degradação são influenciadas pela composição das forragens, assim como a natureza das enzimas microbianas e acessibilidade dos polissacarídeos a estas enzimas. A lignina, ao estar presente em estruturas como celulose e hemicelulose (principalmente com a maturidade da forragem) é o maior obstáculo à digestão destes carboidratos, o que eleva a necessidade de tempo e esforço para quebra das partículas (KRAMER et al., 2013; OGDEN et al., 2005; BEEVER e MOULD, 2000). Outra questão interessante é que o impacto da lignina na degradação é mais evidente na parede celular como um todo do que em polissacarídeos individualmente (HATFIELD, 1993), ou seja, os valores de degradação para polissacarídeos presentes na planta serão menores que os mesmos purificados. Rezende et al. (2011) realizaram análises morfológicas de fragmentos de bagaço de cana-de-açúcar demonstrando que sua estrutura é formada por feixes vasculares (xilema e floema) reforçada por células de esclerênquima (altamente lignificadas) embebidas em tecido parênquima. A parede celular é formada prioritariamente por dois carboidratos, celulose e hemicelulose, os quais estão embebidos em matriz de lignina. Esta formação da estrutura de sua fibra explica os menores valores de fração A, B, degradação potencial, efetiva e kd para este substrato e conseqüentemente, maiores valores de fração C em comparação com as fontes de feno (Tabelas 8, 9 e 15).

O baixo teor de PB das dietas pode ter causado limitação aos microorganismos ruminais, gerando baixos valores para os parâmetros de

degradação *in situ* estudados. O desaparecimento da fibra está ligado à massa microbiana aderida nesta fibra, porém isso não ocorre de forma sincronizada devido ao atraso na secreção de enzimas fibrolíticas, que ocorre na presença de celulose e xilanos após algumas horas de incubação, uma vez que as bactérias fibrolíticas utilizam outros substratos (por exemplo, carboidratos solúveis) antes de iniciar a digestão da fibra para otimizar o crescimento microbiano (KOIKE, PAN E TANAKA, 2003). Logo, o baixo teor de PB e energia das dietas podem também ter influenciado no *lag time* de digestão. Gilbery et al. (2006) ofereceram dieta exclusiva de feno de gramínea *Panicum virgatum* L de baixa qualidade (5,1% de PB, 70,7% de FDN e 40,3% de FDA) para vacas leiteiras com composição semelhante ao feno de Coast-cross utilizado no presente estudo. Os mesmos relataram valores baixos para kd de MS, FDN e FDA sendo 2,41, 2,62 e 2,41 %/h respectivamente. Os autores explicaram que isso ocorreu provavelmente pelo baixo teor de amônia produzida no rúmen destes animais (2,75 mM), sendo que os autores recomendam mínimo de 3,5 mM, pois a amônia é de fundamental importância aos microorganismos degradadores de carboidratos estruturais. Valadares et al. (1997) sugerem valores de PB e NDT de 11% e 62,5% em rações de novilhos zebus para que haja otimização da eficiência microbiana, logo maior degradação de material fibroso. Como as duas dietas utilizadas no presente experimento continham baixos valores de PB, provavelmente houve limitação de disponibilidade de nitrogênio amoniacal para os microorganismos ruminais ocasionando baixa degradação das frações fibrosas.

Alta concentração de fibra na dieta, provenientes da mesma fonte de fibra, tipicamente diminui a degradabilidade da MS e aumenta a de FDN devido à melhoria nas condições ruminais para o microorganismos degradadores de fibra (DADO e ALLEN, 1995). No presente experimento, os parâmetros de degradação de FDN e MS foram similares, dentro dos dois períodos, devido às dietas serem compostas de alta porcentagem de volumoso. Logo, a composição da MS das dietas é quase que exclusivamente representada pela fração fibra.

5.2 Variabilidade da população de bovinos

O kd pode ser considerado característica intrínseca do alimento, dependendo de sua composição química, proporção dos diferentes tecidos vegetais, estágio de

maturidade, área de superfície e estrutura da parede celular (LÓPEZ et al., 2000). As figuras de componentes principais (Figuras 3 e 14) demonstram claramente a existência de influência externa na correlação entre os kd dos substratos, pois era esperado que o padrão de correlações observado no primeiro *in situ* se repetisse na segunda incubação *in situ*, entretanto não foi o que ocorreu. Ao modificar a dieta, as correlações de degradação entre os substratos foram alteradas, pois na primeira incubação *in situ* houve correlação negativa entre as fontes de feno e bagaço de cana-de-açúcar enquanto que na segunda incubação os três substratos estão correlacionados positivamente. Isso demonstra o impacto da dieta, e por sua vez da população microbiana formada em cada ambiente ruminal, sobre a degradação dos ingredientes ingeridos, mesmo os coeficientes das análises de Componentes Principais sendo baixos.

Após ingeridos, a degradação dos ingredientes também é afetada por fatores relacionados ao animal (taxa de diminuição do tamanho de partícula e condições ruminais – pH, pressão osmótica, cinética de hidratação, densidade gravimétrica, etc) (LÓPEZ et al., 2000). O modelo para determinação do kd usado neste experimento, o de Orskov e MacDonald (1979), assume que a degradação do substrato em determinado tempo é proporcional ao material potencialmente degradável existente neste tempo e apenas características do substrato limitam a degradação (LÓPEZ et al., 2000). Este modelo não é capaz de descrever a grande diversidade de níveis de degradação apresentados neste estudo (Figuras 2, 7, 8, 9, 13, 18, 19 e 20), pois não contempla mecanisticamente as influências na degradação do substrato e o crescimento microbiano proporcionado pela interação entre dieta e animal (LÓPEZ et al., 2000). Esta interação entre animal e dieta contribui de forma decisiva para a formação da população microbiana, a que por sua vez, determina as taxas fracionais de degradação dos alimentos. Omnoniyi et al. (2014) avaliaram ovelhas consumindo três fontes de forragem. Os autores encontraram alto grau de variabilidade na estrutura das comunidades microbianas ruminais entre indivíduos consumindo mesma forragem e também entre forragens, demonstrando que o efeito de dieta também ocorre para ingredientes de mesmo perfil, por exemplo, entre volumosos. Pitta et al. (2010) forneceram feno de Tifton-85 para novilhos que posteriormente foram transferidos para regime de pastejo em forragem de trigo de inverno (*Triticum aestivum*). Os autores encontraram alta variabilidade na população microbiana entre as duas dietas volumosas, mostrando

adaptação do microbioma ruminal não apenas frente a mudanças bruscas na dieta (por exemplo, alta forragem para alto grão), mas também entre forragens conservadas e frescas e diferenças de qualidade da mesma espécie forrageira. Kong, Teather e Forster (2010) investigaram a população microbiana de quatro vacas holandesas secas consumindo feno de alfafa (*Medicago sativa* L) com suplemento e palha de tritcale (*Triticale hexaploide* Lart) com o mesmo suplemento. O resultado foi que as vacas consumindo feno de alfafa apresentaram riqueza de comunidades microbianas 1,6 vezes maior que as consumindo tritcale, sendo que parte destas comunidades eram de diferentes segmentos filogenéticos.

Estes estudos relatados pela literatura amparam a ocorrência de mudança na diversidade microbiana ao alterar-se a dieta. Portanto é natural que as taxas fracionais de degradação dos substratos incubados sejam diferentes entre os dois períodos de incubação estudados, e que os animais agrupados em determinados grupos de níveis de kd durante o período de oferta de feno de Coast-cross poderiam não constituir um mesmo agrupamento durante o período de fornecimento de dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar, para os mesmo substratos (Figuras 7, 8, 9, 18, 19 e 20). Essa diversidade é devida a variação ocorrente na atividade proteolítica entre animais, e mesmo entre animais de mesma categoria de produção, ocasionada por seu status fisiológico (VANZANT et al., 1998). Mohammed et al. (2012) estudaram a questão da variabilidade entre indivíduos sobre a ocorrência de acidose ruminal em vacas leiteiras durante o período de transição. Os mesmos concluíram que o aparecimento de acidose pode variar entre animais devido a diferenças fisiológicas, comportamentais e microbianas (ruminal) entre eles, sendo esta variação independente do consumo de matéria seca e concentração ou proporção dos ácidos graxos voláteis. O efeito do ambiente externo sobre população microbiana advinda de animais produzidos em mesmo local e instalações é controverso. Kim et al. (2014) confinaram 426 bovinos e forneceram 3 dietas, onde realizaram coletas de fezes em julho e agosto de 2010. O perfil e quantidade das comunidades microbianas encontradas nas fezes apresentaram grande variabilidade entre as duas coletas para as mesmas dietas, demonstrando efeito do ambiente de produção. Durso et al. (2010) encontrou grande variabilidade nas unidades taxonômicas operacionais (OTUs) de animal para animal e concluíram que essa variabilidade não pode ser atribuída a cruzamento, sexo, idade e fatores externos como ambiente e dieta, pois todos foram controlados no experimento. Esses relatos

da literatura demonstram a diversidade biológica existente entre animais até quando mantidos em mesmas condições de produção, ou seja, isso explica a formação dos grupos encontrados nas Análises de Agrupamento.

De qualquer forma, torna-se importante a tentativa de escolher população animal que contemple todos os níveis de degradação (baixo, médio e alto) e assim garantir maior representatividade da amostra. O empecilho em utilizar população com variabilidade desconhecida é selecionar animais representantes de mesmo nível de kd e desta maneira deslocar as médias para valores superiores ou inferiores (Tabelas 12 e 19). Por essa razão os valores de degradação *in situ* devem sempre ser utilizados preferencialmente como dados comparativos para situação específica, que como valores absolutos de referência.

Nas tabelas 12 e 19 pode-se verificar diferenças de aproximadamente 20% a 25% entre os grupos de kd alto e baixo. Logo, ao utilizar-se de valores de kd do presente estudo para o abastecimento de programas de formulação cujas fontes de volumosos fossem algumas destas forragens, poder-se-ia sub ou superestimar as taxas fracionais de degradação.

A taxa de degradação dos nutrientes no rúmen auxilia na predição do fornecimento de energia para o animal, pois remete ao efeito sobre a microbiota ruminal (eficiência de síntese microbiana, mudanças no ambiente ruminal, crescimento de espécies bacterianas e atividade celulolítica) e também para o hospedeiro (composição molar dos ácidos graxos produzidos, taxa de absorção e ingestão de alimento) (LÓPEZ et al., 2000). Assim, quanto maior a exatidão do valor para o kd mais fidedigna será a predição da digestibilidade pelos programas de formulação. Comumente, para averiguar a precisão dos dados obtidos em estudos *in situ* utiliza-se o coeficiente de variação (CV). Pimentel-Gomes (2000) propõe faixas de classificação do coeficiente de variação, onde considera baixos quando inferiores a 10%, médios entre 10 a 20%, altos entre 20 a 30% e muito altos quando superiores a 30%. Os valores de CVs encontrados no presente estudo com as faixas de variação propostas permitiria considerá-los como no limite entre altos a muito altos. No entanto, este parâmetro apresenta importante limitação ao não considerar o número de repetições utilizadas na geração da média (Figuras 11 e 22). Esse fato pode ser comprovado ao comparar-se os resultados de CV do kd do presente estudo (Tabelas 7 e 14) com os reportados por Hackmann et al. (2010), que foram 17,3% para MS, 21,7% para FDN, 29,1% para FDA e 36,2% para HEM. Ambos os estudos

abordam a avaliação do CV sobre kd, no entanto são claramente distintos. Há diferenças importantes entre eles quanto ao número de replicatas de sacos incubados, perfil da dieta basal, tempos de incubação, número e espécie animal. Ainda, Hackmann et al. (2010) compilaram estudos e encontraram que a média de CV para kd foi entre 19,6% a 36,5% sem distinção entre classes de forragens ou fração do alimento analisado (MS e FDN). O presente estudo, juntamente com estes trabalhos publicados, sugere que o CV é característico da variável e não do experimento, indicando que este parâmetro estatístico não seria a melhor opção para balizar a precisão dos ensaios desta natureza. Sob este aspecto, utilizar o índice de variação (IV) como medida de precisão seria mais indicado, pois considera o número de repetições ($IV = CV/raiz(N)$). Ao utilizar deste parâmetro de precisão ao invés do CV, poder-se-ia verificar redução de variação no experimento com o aumento do número de repetições (Figuras 12 e 23).

A Figura 12, referente a primeira incubação *in situ*, sugere número de animais diferente para cada substrato dentro da mesma faixa de IV. Para IV de até 5% torna-se necessário utilizar seis animais para avaliar feno de Coast-cross, nove animais para avaliar feno de Tifton-85 e quinze animais para avaliar bagaço de cana-de-açúcar. Caso a faixa desejada de IV no estudo seja entre 5% e 10%, os novos números de animais são três para feno de Coast-cross, próximo a cinco para feno de Tifton-85 e nove para bagaço. Para IV próximo a 15% o número de animais a serem utilizados é de até três animais para as ambas as fontes de feno e três animais para bagaço de cana-de-açúcar.

A Figura 23, referente à segunda incubação *in situ*, demonstra que para IV desejável de até 5% deve-se utilizar doze animais para avaliar feno de Coast-cross, dezoito animais para feno de Tifton-85 e vinte e quatro animais para bagaço de cana-de-açúcar. Para ensaio experimental cujo objetivo seja obter IV entre 5% e 10%, os números são três animais para feno de Coast-cross, seis animais para feno de Tifton-85 e próximo de oito animais para bagaço de cana-de-açúcar. Caso haja mais flexibilidade na porcentagem do IV, até 15%, são necessários três animais para avaliar as duas fontes de feno e próximo a cinco animais para avaliar bagaço de cana-de-açúcar.

O parâmetro IV demonstrou que em ambas as incubações, a quantidade de animais necessária para avaliação de cada substrato é diferente. Todavia, assim como na avaliação de número de animais por meio do estudo da variabilidade

populacional, a quantidade de animais necessária para avaliar cada substrato foi semelhante entre dietas dentro de cada faixa de IV estipulado.

5.3 Comportamento ingestivo

Ambas as dietas continham alto teor de fibra de baixa qualidade, o que causou déficit de balanço energético nos animais, ocasionando perda de peso e de escore corporal durante as duas fases de alimentação (Tabela 3). Ruminantes consumindo alto teor de parede celular frequentemente são incapazes de ingerir alimento suficiente para suprir sua necessidade energética, devido ao alimento remanescente no trato gastrointestinal (JUNG e ALLEN, 1995). O custo energético da ingestão por unidade de matéria seca geralmente aumenta com o acréscimo de fibra na dieta (mensurada como FDA ou LIG), mesmo não havendo relação direta entre custo energético e ingestão de fibra (SUZUKI et al., 2014). Nas dietas avaliadas neste estudo ocorreu maior tempo dispensado para mastigação, frente a dietas com alto concentrado, aumentando o gasto energético dos animais para esta atividade, que juntamente com a baixa ingestão de energia por unidade de matéria seca culminou em perda de escore corporal. Além disso, em dietas com baixo teor protéico ocorre aumento na perda de calor corporal, gerado pela oxidação de substratos cetogênicos que não podem servir para síntese de proteína, que por sua vez é agravado em ambientes com altas temperaturas (GILL e ROMNEY, 1993).

Os animais avaliados não conseguiram compensar o baixo teor de energia da dieta consumindo mais unidades de matéria seca, pelo contrário, nos dois períodos avaliados os valores observados para consumos foram baixos (Tabelas 13 e 18). Gilbery et al. (2006) fornecendo exclusivamente feno de *Panicum virgatum* L de baixa qualidade para vacas leiteiras observaram consumo de 6,15 Kg MS/dia e 1,19% P.V., semelhantes aos valores encontrados para o período de fornecimento de feno no presente estudo. Bhatti et al. (2007) forneceram exclusivamente feno de gramínea de boa qualidade para novilhos em vários níveis de oferta e verificaram que em oferta restrita os animais apresentaram o menor consumo, 1,6 % do P.V. Este valor, considerado baixo pelos autores, é maior que o demonstrado neste experimento (1,83% P.V. e 1,23% P.V. para as fases de alimentação com feno Coast-cross e bagaço de cana-de-açúcar), pois a fibra do volumoso usado pelos autores era de melhor qualidade, sendo menos restritiva ao consumo de matéria

seca pelos animais. Vale ressaltar que os consumos em porcentagem de peso vivo deste estudo, em ambos os períodos, são baseados em pesagens sem prévio jejum de alimento e água, o que subestimou os valores obtidos.

Gill e Romney (1993) comentam que o consumo é tentativa de manter constante o peso da digesta ruminal e seria maior no início da noite. Porém, quanto mais a dieta ofertada destoa de uma dieta ótima (fornece energia e proteína ao nível da exigência) (ILLIUS e JESSOP, 1996) e maior o nível de produção do animal (DADO e ALLEN, 1995) mais intensa será a depressão do consumo da mesma. Dado e Allen (1995) trabalharam com vacas em início de lactação e sugeriram que há decréscimo de consumo com dietas contendo teor de FDN acima de 28,5%, porém deixam bem claro que isso é dependente da espécie animal e da qualidade da fibra utilizada. Era esperado que estas dietas de baixa qualidade não estimulassem consumo. O tempo de mastigação sofre influência da taxa de quebra das partículas, extensão da digestão da forragem e turnover do rúmen (WECKERLY, 2013) e neste experimento, estes três fenômenos provavelmente ocorreram de forma lenta para ambas as dietas devido a maior dificuldade de processamento da fibra. Bhatti et al. (2007) concluíram que quantidade de partículas de menor tamanho que deixam o rúmen é o maior fator a afetar o consumo voluntário. Isso pôde ser observado durante o manejo das cânulas, onde foi marcante a diferença de perfil da digesta ruminal formada nos dois períodos de alimentação. Durante a alimentação com feno o rúmen permanecia extremamente cheio e denso durante todo o dia, já na alimentação com bagaço não se notava tamanho enchimento e densidade, porém a rejeição dos animais para consumo foi mais perceptível.

Observando os tempos de ingestão e ruminação (Tabelas 13 e 18), provavelmente não houve competição de tempo entre as duas atividades, pois a ruminação permaneceu dentro do tempo normal (próximo a 8 horas) ao passo que o tempo de ingestão foi baixo. Segundo Weckerly (2013) a concorrência entre ruminação e ingestão é mais presumível quando o tempo dedicado a uma das duas atividades se aproxima da quantidade total de tempo que os animais podem dispor aos dois processos conjuntamente (mastigação total). Mendonça et al. (2004) trabalharam com vacas leiteiras e forneceram fibra de cana perfazendo FDN total da dieta de 30%, dieta continha 50% de concentrado, onde as vacas ruminaram 7,71 horas/ dia. Este tempo é próximo aos encontrados neste experimento (9,83 e 7,02 horas, para período feno e bagaço respectivamente) em que os teores de FDN

foram de 78,24% para alimentação com feno e 80,76% para dieta bagaço (Tabelas 4 e 5). Isso mostra que acréscimos na quantidade de fibra indigestível não são efetivos em aumentar o tempo de ruminação para além do intervalo entre 8 a 9 horas por dia. Gordon e McAllister (1970) trabalhando com ovelhas, encontraram tempo máximo de ruminação de nove horas e meia, sendo que os mesmos comentam que este tempo foi acima do usual. Em termos práticos, para animais consumindo dietas de alta fibra, o tempo máximo de ruminação parece estar fixado neste intervalo, e o animal que consegue ruminar maior quantidade de forragem neste espaço de tempo é mais eficiente (WELCH, 1982). Os animais apresentaram maior tempo de mastigação (15,91 horas versus 11,79 horas) e consumo de MS durante a alimentação com feno (Tabelas 13 e 18).

Os ruminantes são naturalmente animais diurnos, sendo que quando mantidos em pastejo proferem ingestão preferencialmente ao amanhecer e o entardecer (dois picos de ingestão) e segundo os autores Cozzi e Gottardo (2005) os animais tentam conservar este instinto quando mantidos em sistemas intensivos de produção. Porém, provavelmente devido ao efeito físico de enchimento, este padrão de comportamento não foi observado em nenhum dos dois períodos deste experimento, pois houve declínio de ingestão ao longo das horas após o fornecimento das dietas. Em ambos os períodos de alimentação os animais apresentaram maior atividade de ruminação no período noturno (Figuras 10 e 20). Os ruminantes normalmente iniciam a ruminação aproximadamente 2,5 horas após a alimentação (GORDON e McALLISTER, 1970). Este comportamento foi observado apenas no período bagaço, sendo que no período feno a presença de atividade de ruminação foi quase que ininterrupta. Isso provavelmente pode ter ocorrido pelo maior consumo de FDN deste período.

Segundo Gordon e McAllister (1970) os momentos de ruminação ocorrem mais frequentemente nas primeiras horas da manhã (entre meia noite e nove horas da manhã) podendo ser alterados caso o horário habitual de alimentação seja modificado. Porém o ritmo circadiano não é determinado somente pelo momento da alimentação, mas sim da combinação deste com luminosidade e, em segundo plano, temperatura ambiental. Apesar das avançadas técnicas de alimentação em confinamento, os ruminantes ainda são sensíveis a sinais externos do ambiente como fotoperíodo, qualidade do alimento e momento da alimentação (NIKKHAH, 2013).

Não foi encontrada correlação entre comportamento ingestivo e taxa fracional de degradação em ambos os períodos experimentais para todos os substratos. Isso ocorreu provavelmente devido à baixa qualidade das dietas experimentais que limitaram consumo de energia, e por sua vez, a renovação de substrato no rúmen, prejudicando o crescimento microbiano, pois segundo Rodríguez et al. (2008), a fermentação ruminal está em paralelo com o crescimento e atividade microbiana. Nikkhah (2013) comenta que a fermentabilidade da dieta e a taxa de ingestão são os principais fatores que influenciam o ritmo de extensão e taxa de fermentação no rúmen, assim como a digestão pós-rúmen. Vanzant et al. (1998) sugerem que em trabalhos cujo objetivo seja avaliar parâmetros de degradação *in situ*, o consumo de matéria seca deve variar entre a manutenção e *ad libitum*. Porém, Zanton e Heinrichs (2008) citam trabalho em que não houve alteração dos parâmetros de MS ou FDN quando foi ofertado aproximadamente 1% do peso vivo ou *ad libitum*, todavia as dietas utilizadas foram de boa qualidade. Zanton e Heinrichs (2008) trabalharam com novilhas holandesas e não encontraram correlação entre parâmetros de degradação *in situ* (MS, FDN e PB) com nível de ingestão, onde os mesmos testaram oferta de 1,25%, 1,50%, 1,75% e 2,00% do peso vivo de dieta com alta inclusão de forragem. Rodríguez et al. (2008) realizaram *in situ* (ingredientes concentrados e volumosos) com carneiros submetidos a dois níveis de ingestão de matéria seca em dieta com alto concentrado. A fração C dos alimentos foi similar nos dois níveis de ingestão, demonstrando que o fracionamento entre digestível e não digestível é intrínseco do alimento, independente da ingestão. Neste experimento o aumento do consumo diminuiu o kd de FDN e FDA dos dois volumosos incubados sem afetar a extensão de digestão destas frações. Bhatti et al. (2007) também não encontraram interferência do nível de consumo sobre o kd de MS e FDN, nem para a fração não degradável (C) do feno de gramínea utilizado. Porém, quando acrescentaram feno de alfafa à dieta (50% da MS), observaram aumento de 35% do kd da MS e 16% do kd de FDN. Ou seja, acréscimo do teor de nitrogênio na dieta, diretamente aumenta consumo de nitrogênio e energia pelos animais, melhorando o ambiente ruminal (ABRÃO et al., 2014). Provavelmente a falta de interferência do consumo de MS sobre os parâmetros *in situ* desses trabalhos seja pelo fato das referidas dietas experimentais serem de boa qualidade. Conduzindo a conclusão que o consumo de MS *per se* não é suficiente para responder as indagações sobre o comportamento

do ambiente ruminal, mas deve ser considerado conjuntamente com o consumo de energia.

Outra questão que poderia influenciar a correlação entre k_d e comportamento, seria a metodologia utilizada para as observações, que foi de 10 minutos. Segundo Carvalho et al. (2011) 5 minutos seria mais adequado para estimar tempo de ingestão, ruminação e ócio, pois segundo os autores, intervalos acima disso resultam em menor número de períodos por atividade e consequentemente maior tempo gasto em cada período, influenciando a distribuição das atividades ao longo do dia. O viés em utilizar observações de 10 minutos pode ser constatado quando observamos o tempo estimado para consumo de água considerado pequeno durante os dois períodos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A variabilidade existente nesta população permite o desdobramento dos animais em basicamente três níveis de taxas fracionais de degradação para cada substrato. Portanto, após investigação da variabilidade populacional, seria possível substituir os trinta animais por apenas três ou quatro que estivessem no mesmo nível de degradação para cada substrato. Porém, as correlações entre e dentro de substratos e o nível de degradação apresentado pelos animais são influenciados pela dieta basal, o que implica na probabilidade de utilização de animais distintos entre incubações *in situ*, mesmo se tratando de ingredientes semelhantes. Ou seja, o número de animais utilizados em ensaios *in situ* é dependente do perfil do substrato estudado, independente da dieta ofertada. Porém os indivíduos que compõe este número pode ser alterado pela natureza da dieta.

Esta possibilidade de utilizar-se apenas três ou quatro animais intensifica a importância de estabelecer correlações entre parâmetros *in situ* e mensurações passíveis de serem conduzidas anteriormente a fase cirúrgica, para que desta forma, seja possível obter amostra populacional o mais representativa possível, com abrangência de diferentes perfis de desempenho animal. Para estudos futuros seria interessante avaliar existência de correlação entre parâmetros *in situ* com, por exemplo, ganho de peso, consumo total de matéria seca e consumo alimentar residual sob oferta de dietas de composição nutricional distintas.

O coeficiente de variação não sugere precisão em experimentos desta natureza, tampouco indica número adequado de animais a serem utilizados, sendo mais apropriada a utilização do índice de variação. Por meio deste parâmetro, para obter-se valores entre 5% a 10% de IV, sugere-se utilizar entre três a nove animais, para ambas as dietas. Por conseguinte, o IV reforça que o número de animais a ser utilizado é dependente do substrato a ser incubado.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, F.O.; DUARTE, E.R.; FREITAS, C.E.S.; VIEIRA, E.A.; GERASEEV, L.C.; SILVA-HUGHES, A.F.; ROSA, C.A.; RODRIGUES, N.M. characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. **Current Microbiology**, New York, v. 69, p. 649-659, 2014.

ALI, M.; WEISBJERG, M.R.; CONE, J.W.; DUINKERKEN, G. VAN; BLOK, M.C.; BRUINENBERG, M.; HENDRIKS, W.H. Postruminal degradation of crude protein, neutral detergent fibre and starch of maize and grass silages in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 177, p. 172-197, 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis. **Association of Official Agricultural Chemists**. 12^a ed. Washington, 1975. 51 p.

ARROYO, J.M.; GONZÁLEZ, J. Effects of microbial colonization in the rumen on concentration and degradability estimates of fibre fractions. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 153, p. 101-107, 2013.

BANZATO, D.A.; KRONKA, S.N. Experimentação agrícola. 4 ed. Jaboticabal: Funep, 2006. 237p.

BEEVER, D.E.; MOULD, F.L. Forage evaluation for efficient ruminant livestock production. In: GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD R.F.E.; OMED, H.M. **Forage evaluation in ruminant nutrition**. London: CABI Publishing, Section 1 - The importance of forage evaluation for humans and animals, 2000. p. 15-42.

BERCHIELLI, T.T.; VEGA-GARCIA, A.; OLIVEIRA, S.G. Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudo de nutrição. In: BERCHIELLI, T.T.; VAZ PIRES, A.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2011. Cap. 14, p. 415-438.

BHATTI, S.A.; BOWMAN, J.G.P.; FIRKINS, J.L.; GROVE, A.V.; HUNT, C.W. Digestion and particle passage in beef cattle effect of intake level and alfalfa substitution for grass hay on ruminal kinetics of fiber. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 134-145, 2007.

BOSSSEN, D.; MERTENS, D.R.; WEISBJERG, M.R. Influence of fermentation methods on neutral detergent fiber degradation parameters. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 91, p. 1464-1476, 2008.

CAMPOS, F.P.; NUSSIO, C.M.B.; NUSSIO, L.G. **Métodos de análises de alimentos**. Piracicaba: FEALQ, 2004. 135p.

CAMPOS, P.R.S.S.; VALADARES FILHO, S.C.; CECON, P.R.; DETMANN, E.; LEÃO, M.I.; SOUZA, S.M.; LUCCHI, B.B.; VALADARES, R.F.D. Estudo comparativo da cinética de degradação ruminal de forragens tropicais em bovinos e ovinos.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 58, n. 6, p. 1181-1191, 2006.

CARVALHO, G.G.P.; GARCIA, R.; PIRES, A.J.V.; SILVA, R.R.; DETMANN, E.; RIBEIRO, L.S.O. Evaluation of intervals between observations on estimation of eating behavior of cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 11, p. 2502-2509, 2011.

COZZI, G.; GOTTARDO, F.; Feeding behaviour and diet selection of finishing Limousin bulls under intensive rearing system. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 91, p. 181-192, 2005.

DURSO, L.M.; HARHAY, G.P.; SMITH, T.P.L.; BONO, J.L.; DeSANTIS, T.Z.; HARHAY, D.M.; ANDERSEN, G.L.; KEEN, J.E.; LAEGREID, W.W.; CLAWSON, M.L. Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 76, n. 14, p. 4858-4862, Jul. 2010.

DADO, R.G.; ALLEN, M.S. Intake limitations, feeding behavior and rumen function of cows challenged with rumen fill from dietary fiber or inert bulk. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 78, p. 118-133, 1995.

ELIMAM, M. E.; ORSKOV, E.R. Factors affecting the outflow of protein supplements from the rumen. 2. The composition and particle size of the basal diet. **Animal Production**, v. 39, p. 201-206, 1984.

FREITAS, A.W.P.; ROCHA, F.C.; ZONTA, A.; FAGUNDES, J.L.; FONSECA, R.; ZONTA, M.C.M. Desempenho de novilhos recebendo dietas à base de cana-de-açúcar in natura ou hidrolisada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 11, p. 2532-2537, 2011.

FORBES, J.M. Integration of regulatory signals controlling forage intake in ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, p. 3029-3035, 1996.

GARCIA, C.H. **Tabelas para classificação do coeficiente de variação**. Piracicaba: IPEF: ESALQ, Departamento de Ciências Florestais, 1989. 10 p. Circular Técnica nº 171.

GILBERY, T.C.; LARDY, G.P.; SOTO-NAVARRO, S.A.; BAUER, M.L.; CATON, J.S. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 1468-1480, 2006.

GILL, M.; ROMNEY, D.; The relationship between the control of meal size and the control of daily intake in ruminants. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 39, p. 13-18, 1993.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications)**. Washington: USDA, 1970. (Agricultural Handbook, 379).

GORDON, J.G.; McALLISTER, I.K. The circadian rhythm of rumination. **The Journal of Agricultural Science**, London, v. 74, p. 291-297, 1970.

GRUNINGER, R.J.; SENSEN, C.W.; McALLISTER, T.A.; FORSTER, R.J. Diversity of Rumen Bacteria in Canadian Cervids. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 2, p.1-9, Feb. 2014.

GUEVARA-GONZÁLEZ, J.A.; MOUHBI, R.; ARROYO, J.M.; ALVIR, M.R.; GONZÁLEZ, J. Effects of correcting for microbial contamination and the use of sodium sulphite in neutral detergent fibre analyses on the ruminal fibre degradability of several feeds. **Journal of Agricultural Science**, London, p. 1-10, 2014.

GUZMAN, G.A.B.; NASCIMENTO JUNIOR, D.; REGAZZI, A.J.; OBEID, J.A.; QUEIROZ, A.C. Estudo do tamanho e forma ideal da unidade amostral na avaliação da disponibilidade de matéria seca em pastagens. I. Método da máxima curvatura do coeficiente de variação. **Revista Brasileira de zootecnia**, Viçosa, v. 21, p. 396-405. 1992

HACKMANN, T.J.; SAMPSON, J.D.; SPAIN, J.N. Variability in *in situ* ruminal degradation parameters causes imprecision in estimated ruminal digestibility. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 93, p. 1074-1085, 2010.

HATFIELD, R.D. Cell wall polysaccharide interactions and degradability. In: JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D.; RALPH, J. **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society of Agronomy, Inc; Crop Science Society of America, Inc; Soil Science Society of America, Inc 1993. Chap. 12, p. 285-314.

HOLDEN, L.A. Comparison of methods of *in vitro* dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 8, p.1791-1794, 1999.

HUNTINGTON, J.A.; GIVENS, D.I. Studies on *in situ* degradation of feeds in the men: 2. The effect of bag numbers incubated and post-incubation processing of residues. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 68, p. 115-129, 1997.

HVELPLUND, T.; WEISBJERG, M.R. *In situ* techniques for the estimation of protein degradability and postrumen availability. In: GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD R.F.E.; OMED, H.M. **Forage evaluation in ruminant nutrition**. London: CAB International, 2000. Section 3 – Estimating the protein value of forages, p. 215-231.

ILLIUS, A.W.; JESSOP, N.S. Metabolic constraints on voluntary intake in ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, p. 3052-3062, 1996.

JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. Applied multivariate statistical analysis. 5 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 767p.

JUNG, H.G.; ALLEN, M.S. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 3, p. 2774-2790, 1995.

KEIM, J.P.; VALDEMARRA, X.; ALOMAR, D.; LÓPEZ, I.F. In situ rumen degradation kinetics as affected by type of pasture and date of harvest. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, n. 6, p. 405-514, Nov./Dec. 2013.

KEARL, L. C. **Nutrient requirements of ruminants in developing countries**. Utah: International feed stuffs institute, Utah Agriculture Experimental Station, Utah State University, 1982. 381p.

KIM, M.; KIM, J.; KUEHN, L.A.; BONO, J.L.; BERRY, E.D.; KALCHAYANAND, N.; FREETLY, H.C.; BENSON, A.K.; WELLS, J.E. Investigation of bacterial diversity in the feces of cattle fed different diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, p. 683-694, 2014.

KOIKE, S.; PAN, J.; KOBAYASHI, Y.; TANAKA, K. Kinetics of in sacco fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 86, p. 1429-1435, 2003.

KONG, Y.; TEATHER, R.; FORSTER, R. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 74, p. 612-622, 2010.

KRÄMER, M.; NØRGAARD, P.; LUND, P.; WEISBJERG, M.R. Particle size alterations of feedstuffs during *in situ* neutral detergent fiber incubation. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 96, p. 4601-4614, 2013.

KRIZSAN, S.J.; HUHTANEN, P. Effect of diet composition and incubation time on feed indigestible neutral detergent fiber concentration in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 96, p. 1715-1726, 2013.

LÓPEZ, S.; DIJKSTRA, J.; FRANCE, J. Prediction of energy supply in ruminants, with emphasis on forages. In: GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD R.F.E.; OMED, H.M. **Forage evaluation in ruminant nutrition**. London: CABI Publishing, 2000. Section 2 – Estimating the energy value of forages, p. 63-94.

MANLY, B. J. F. Métodos estatísticos multivariados: uma introdução. 3 ed. Porto Alegre: Bookman, 2008. 229p.

MEIER, V.D.; LESSMAN, K.J. Estimation of optimum field plot shape and size for testing yield in *Crambe abyssinica* Hochst. **Crop Science**, Madison, v. 11, p. 648-650, Sep./Oct. 1971.

MENDONÇA, S.S.; CAMPOS, J.M.S.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D.; SOARES, C.A.; LANA, R.P.; QUEIROZ, A.C.; ASSIS, A.J.; PEREIRA, M.L.A. Comportamento ingestivo de vacas leiteiras com dietas à base de cana-de-açúcar ou silagem de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 3, p. 723-728, 2004.

MOHALLEM, D.F.; TAVARES, M.; SILVA, P.L.; GUIMARÃES, E.C.; FREITAS, R.F. Avaliação do coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos com frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 449-453, 2008.

MOHAMED, R.; CHAUDHRY, A.S. Methods to study degradation of ruminant feeds. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 21, p. 68-81, 2008.

MOHAMMED, R.; STEVENSON, D.M.; WEIMER, P.J.; PENNER, G.B.; BEAUCHEMIN, K.A. Individual animal variability in ruminal bacterial communities and ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 95, p. 6716-6730, 2012.

MOULD, E.D; ROBBINS, C.T. Evaluation of different analysis in estimating nutritional value of browse. **The Journal of Wildlife Management**, Malden, v. 45, n. 4, p. 937-947, Oct 1981.

NIKKHAH, A. Chronophysiology of ruminant feeding behavior and metabolism: an evolutionary review. **Biological Rhythm Research**, Londres, v. 44, n. 2, p. 197-218, April 2013.

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

OGDEN, R.K.; COBLENTZ, W.K.; COFFEY, K.P.; TURNER, J.E.; SCARBROUGH, D.A.; JENNINGS, J.A.; RICHARDSON, M.D. Ruminal in situ disappearance kinetics of dry matter and fiber in growing steers for common crabgrass forages sampled on seven dates in northern Arkansas. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 1142-1152, 2005.

OLAISEN, V.; MEJDELL, T.; VOLDEN, H.; NESSE, N. Simplified *in situ* method for estimating ruminal dry matter and protein degradability of concentrates. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, p. 520-528, 2003.

OMONIYI, L.A.; JEWELL, K.A.; ISAH, O.A.; NEUMANN, A.P.; ONWUKA, C.F.I.; ONAGBESAN, O.M.; SUEN, G. An analysis of the ruminal bacterial microbiota in west african dwarf sheep fed grass and tree based diets. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 116, p. 1094-1105, 2014.

ORSKOV, E.R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal Agricultural Science**, Cambridge, v. 92, p. 499-503, 1979.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14 ed. Piracicaba: FEALQ, 2000. 477 p.

PITTA, D.W.; PINCHAK, W.E.; DOWD, S.E.; OSTERSTOCK, J.; GONTCHAROVA, V.; YOUN, E.; DORTON, K.; YOON, I.; MIN, B.R.; FULFORD, J.D.; WICKERSHAM, T.A.; MALINOWSKI, D.P. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. **Microbial Ecology**, New York, v. 59, p. 511-522, 2010.

REZENDE, C.A.; LIMA, M.A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E.R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 4, n. 54, p. 1-18, Nov. 2011.

RODRÍGUEZ, C.A.; GONZÁLEZ, J.; ALVIR, M.R.; CABALLERO, R. Effects of feed intake on in situ rumen microbial contamination and degradation of feeds. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 116, p. 108-117, 2008.

ROMNEY, D.L.; GIL, M. Intake of forages. In: GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD R.F.E.; OMED, H.M. **Forage evaluation in ruminant nutrition**. London: CABI Publishing, 2000. Section 1, p. 43-62.

SUZUKI, T.; KAMIYA, Y.; TANAKA, M.; HATTORI, I.; SAKAIGAICHI, T.; TAKAYOSHI TERAUCHI, T.; NONAKA, I.; TERADA, F. Effect of fiber content of roughage on energy cost of eating and rumination in Holstein cows. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 196, p. 42-49, 2014.

TELLER, E.; VANBELLE, M.; KAMATALI, P.; Chewing behaviour and voluntary grass silage intake by cattle. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 33, p. 215-227, 1993.

TRUJILLO, A.I.; MARICHAL, M. J.; CARRIQUIRY, M. Comparison of dry matter and neutral detergent fibre degradation of fibrous feedstuffs as determined with in situ and in vitro gravimetric procedures. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 161, p. 49-57, 2010.

TURNER, A.S.; MCILWRAIGHT, W.C. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. 1ª ed. São Paulo: Livraria Roca, 2002. 354p.

VALADARES, R.F.D.; GONÇALVES, L.C.; SAMPAIO, I.B.; RODRIGUEZ, N.M.; VALADARES FILHO, S.C. Níveis de proteína em dietas de bovinos. 3. pH, amônia e eficiência microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 26, n. 6, p. 1264-1269, 1997.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p.3583-3597, 1991.

VANZANT, E.S.; COCHRAN, R.C.; TITGEMEYER, E.C. Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuff evaluation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, p. 2717-2719, 1998.

VIEIRA, R.A.M.; CAMPOS, P.R.S.S.; SILVA, J.F.C.; TEDESCHI, L.O.; TAMY, W.P. Heterogeneity of the digestible insoluble fiber of selected forages in situ. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 171, p. 154-166, 2012.

WECKERLY, F.W.; Conspecific body weight, food intake, and rumination time affect food processing and forage behavior. **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v. 94, n. 1, p. 120-126, 2013.

WELCH, J.G. Rumination particle size and passage from the rumen. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 54, p. 885-894, 1984.

ZANTON, G.I.; HEINRICHS, A.J. Rumen digestion and nutritional efficiency of dairy heifers limit-fed a high forage ration to four levels of dry matter intake. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.91, p. 3579-3588, 2008.