UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

VAGNER OVANI DA SILVA

Uso de traçadores para a determinação de consumo, seleção e digestibilidade de dietas de ovinos compostas por gramíneas e leguminosas

Piracicaba
2019

VAGNER OVANI DA SILVA

Uso de traçadores para a determinação de consumo, seleção e digestibilidade de dietas de ovinos compostas por gramíneas e leguminosas

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla

Piracicaba
2019

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Silva, Vagner Ovani
Uso de traçadores para a determinação de consumo, seleção e digestibilidade de dietas de ovinos compostas por gramíneas e leguminosas / Vagner Ovani da Silva; orientador Adibe Luiz Abdalla. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.
87 p. : il.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2019.

1. Consumo alimentar para animal 2. Digestibilidade 3. Leguminosas forrageiras 4. Macrotiloma 5. Marcadores internos. 6. Marcadores isotópicos 7. Mucuna 8. Nutrição animal 9. Pastagem consorciada 10. Ruminantes I. Título.

CDU (636.085.2 + 633.2.033) : 621.039.85

Elaborada por:
Marilia Ribeiro Garcia Henyei
CRB-8/3631
Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Dedico este trabalho aos meus pais, José Milton Teixeira da Silva e Maria José Ovani da Silva, e aos meus irmãos, Fabrícia Ovani da Silva, Fábio Ovani da Silva e Flávio Ovani da Silva, pelos ensinamentos, apoio e incentivo ao longo de toda minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais, José Milton Teixeira da Silva e Maria José Ovani da Silva, por todos os ensinamentos e valores transmitidos, além de todo investimento na minha educação, sempre me incentivando e acreditando nas minhas decisões.

Aos meus amigos, Felipe Franco de Oliveira, Vanessa Takeshita, Alessandro Sabino da Silva, Simón Perez, Marizane Pietroski, Pablo Gotardo, Fabiano Matos, Ivan Peterson e Ewerton Lucas, por participarem da minha trajetória acadêmica, contribuindo para a superação dos desafios enfrentados nessa etapa e pelos inúmeros momentos de alegria e de descontração.

Ao Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla, por ter aceitado ser meu orientador e por toda atenção, ensinamentos e confiança concedida, oferecendo o suporte necessário para a condução deste trabalho e para o meu desenvolvimento acadêmico.

Ao Prof. Dr. Helder Louvandini, pela amizade, apoio e aprendizado concedido durante o mestrado.

A todos os amigos do laboratório de Nutrição Animal, dentre eles, os pós-graduandos, Ana Maria, Adibe Filho, Beatriz Bizzuti, Camila Chaves, Carolina Jimenez, Efrain Artega, Egon Hion, Felipe Ortiz, Fernando Vivas, Gabriel Sakita, Murilo Fernandes, Paulo Tavares, Thiago Bompadre e Wilian dos Santos; e os estagiários, Arthur, Felipe da Silva, Frederico da Silva, Gabriela de Jesus, Gabriela Assalim, Isabela Escaranaro, Jhonatan Valeriano, Luan, Mayara Ikeda, Monique Mendonça, Nicolas Diehl, Rafael Cesar, Rafaela Torresan, Renan Cunha, Victor Massaki, Virgilio Esteves, Vitor Burjato, Weidy Alves e Yasmin, por toda ajuda, pela convivência, por momentos de descontração e pela amizade construída durante essa etapa.

Aos funcionários do laboratório de Nutrição Animal, Lécio Aparecido Castilho, Maria Regina Peçanha, Karinna Scotton e Francisco Adelino da Silva, por toda assistência durante o desenvolvimento das atividades deste trabalho.

Aos funcionários da pós-graduação, por todo apoio e atenção durante o mestrado.

Agradeço a equipe do Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN). Especialmente, ao Prof. Dr. Hudson Carvalho, ao Dr. Eduardo de Almeida e a aluna de mestrado Bianca de Almeida, por disponibilizarem o espaço e os equipamentos, além de toda atenção e assistência durante a realização das análises de EDXRF.

Agradeço a equipe do Laboratório de Ecologia Isotópica (LEI), pela realização das análises de razão isotópica de carbono. Em especial, aos Prof. Dr. Luiz Martinelli e Dr. Marcelo Zacharias, por toda ajuda e atenção para realização dessas análises.

Agradeço ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo (USP), pela oportunidade de realização do curso de mestrado e por todas as oportunidades de desenvolvimento acadêmico, através da convivência com professores e alunos de excelência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo: 133252/2019-1.

Muito obrigado!

“O universo de cada um se resume no tamanho do seu saber”

Albert Einstein

RESUMO

SILVA, V. O. **Uso de traçadores para a determinação de consumo, seleção e digestibilidade de dietas de ovinos compostas por gramíneas e leguminosas**. 2019. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

Maior eficiência alimentar e a otimização do desempenho animal são alternativas para alcançar a sustentabilidade econômica, social e ambiental dos sistemas de produção de ruminantes. Para o uso eficiente das pastagens, a estimativa de consumo de nutrientes deve auxiliar na avaliação de desempenho e na definição das exigências nutricionais dos animais nos diferentes sistemas de produção. O objetivo da proposta foi de avaliar marcadores internos obtidos pela técnica de espectrometria de fluorescência de raios-X por dispersão de energia (EDXRF), a matéria seca indigestível (MSi) e a fibra em detergente neutro indigerível (FDNi), conjuntamente com a razão isotópica do ^{13}C, para estimar a digestibilidade, o consumo e a seleção de forragens consumidas por ovinos alimentados por dietas constituídas de gramíneas e leguminosas. Foram utilizados diferentes marcadores internos para estimar a digestibilidade, consumo de nutrientes e proporção de consumo de C_3 e C_4 por 21 ovinos da raça Santa Inês, alimentados com dietas contendo 100% gramínea (tratamento CTRL), com inclusão de 25% de leguminosa (tratamento MAC) e com inclusão de 50% de leguminosa (tratamento MUC). Os animais passaram por um período de adaptação de 10 dias em baias coletivas e 07 dias de avaliação em gaiolas individuais para estudo de metabolismo, onde foram realizadas coletas de ofertado, sobras e fezes. As frações de MSi e FDNi foram determinadas após 240 horas de incubação *in situ*. A concentração de titânio de ocorrência natural (Ti) foi de determinada pelo método de parâmetros fundamentais da técnica de EDXRF. Foi determinada a abundancia natural de ^{13}C por espectrômetro de massas nas amostras de fezes, nas forragens e no resíduo do FDNi. Não houve diferença estatística entre a digestibilidade das dietas CTRL, MAC e MUC, quando estimada por coleta total (CT), MSi e FDNi. Os marcadores FDNi e MSi subestimaram a digestibilidade em comparação com o método de CT. O marcador Ti apresentou resultados de digestibilidade semelhantes aos de CT para a dieta MUC. As equações com base no nitrogênio fecal apresentaram valores de digestibilidade e consumo de matéria seca similares aos valores determinados pelo método de CT. O consumo de nutrientes estimado com Ti foi semelhante ao resultado obtido pelo método de CT. A proporção de consumo (%) estimada pelo ^{13}C apresentou resultados semelhantes aos valores reais de consumo de plantas de ciclo C_3 e C_4 observados pelo método de CT. A utilização do Ti como marcador interno em parceria com valores de $\delta^{13}C$ nas fezes apresentaram valores similares aos encontrados por CT na estimativa da proporção de consumo de C_3 e C_4 (g dia^{-1}). Recomenda-se o uso do Ti como marcador interno em conjunto com valores de $\delta^{13}C$ nas fezes, para estimar a digestibilidade e o consumo individual de C_3 e C_4 em dietas de ovinos compostas por gramíneas e leguminosas.

Palavras-chave: Marcadores internos. Titânio. $\delta^{13}C$. *Macrotyloma axillare*. *Stizolobium aterrimum.*

.

ABSTRACT

SILVA, V. O. **Use of markers for determination of intake, selection and digestibility in diets of sheep composed by grasses and legumes**. 2019. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

Increased food efficiency and optimization of animal performance are alternatives to achieve the economic, social and environmental sustainability of ruminant production systems. For the efficient use of pastures, the estimate of nutrient consumption should help in the evaluation of performance and in the definition of nutritional requirements of animals in different production systems. The objective of the proposal was to evaluate internal markers obtained by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDXRF), indigestible dry matter (MSi) and indigestible neutral detergent fiber (NDFi), jointly with the ^{13}C isotopic ratio to estimate digestibility, nutrient intake and selection of forage consumed by sheep fed diets consisting of grasses and legumes. Different internal markers were used to estimate digestibility, dry matter intake of C_3 and C_4 plants by 21 Santa Inês sheep, fed with 100% grass diet (CTRL treatment), diet with inclusion of 25% legume (MAC treatment) and with 50% inclusion of legume (MUC treatment). The animals underwent an adaptation period of 10 days in collective pens and 07 days of evaluation in individual cages for metabolism study, where collections of offerings, leftovers and faeces were performed. The MSi and NDFi fractions were determined after 240 hours of *in situ* incubation. The naturally occurring titanium (Ti) concentration was determined by the EDXRF fundamental parameter method in the offered and feacal samples. The natural abundance of ^{13}C was determined by mass spectrometer in the offered and feacal samples as well as in the NDFi residue. There was no difference between the digestibility for the CTRL, MAC and MUC diets when determined by total collection, or estimated by the MSi and NDFi tracers. The markers NDFi and MSi underestimate digestibility compared to the total collection (TC) method. The Ti marker showed digestibility results similar to CT for the MUC diet. Fecal nitrogen-based equations showed digestibility and dry matter intake values similar to the values determined by the TC method. The estimated nutrient intake with Ti was similar to the result obtained by the TC method. The estimated consumption ratio (%) using ^{13}C, presented results similar to the actual consumption values of cycle plants C_3 and C_4 observed by the TC method. The use of Ti as an internal marker associated with $\delta^{13}C$ values in the faeces presented values similar to those found by the TC method for estimating the proportion of C_3 and C_4 plants (g day^{-1}) intake for MAC and MUC diets. The use of Ti as an internal marker together with feacal $\delta^{13}C$ values is recommended for estimating the digestibility and individual intake of C_3 and C_4 in diets of sheep composed of grass and legumes.

Keywords: Internal markers. Titanium. $\delta^{13}C$. *Macrotyloma axillare*. *Stizolobium aterrimum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Possíveis vias de fermentação de celulose e amido via glicose, para acetato, propionato, butirato e H_2 30

Figura 2 - Curva de calibração entre os valores de referência (Spike) e os valores recuperados por EDXRF, em intensidade (A) e em concentração de Ti (B), pelo método de parâmetros fundamentais 55

Figura 3 - Relação entre a porcentagem de leguminosa nas dietas e os valores de $\delta^{13}C$ (‰) nas fezes de ovinos 62

Figura 4 - Proporção de consumo observada por coleta total e estimada com equações com base no $\delta^{13}C$ das fezes. A – Consumo de C_3 (%) pela equação 6. B – Consumo de C_3 (%) pela equação 7. C – Consumo de C_3 (%) pela equação 8 63

Figura 5 - Relação entre o consumo de MS de planta C_3 (g dia^{-1}) observado por coleta total e estimado por marcadores internos. **A** – Consumo de C_3 por Ti. **B** – Consumo de C_3 por FDNi. **C** – Consumo de C_3 por FDNi+$\delta^{13}C$. **D** – Consumo de C_3 por MSi 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição químico-bromatológica dos fenos que compõem as dietas experimentais 42

Tabela 2 - Equações para a estimativa da digestibilidade aparente da MS, desenvolvidas através de ensaios em gaiolas para estudos de metabolismo, com base na concentração de N fecal 49

Tabela 3 - Comparação entre valores certificados e valores determinados por EDXRF 54

Tabela 4 - Concentração média de marcadores internos na matéria seca das plantas compõem cada dieta e nas fezes dos animais alimentados com as dietas CTRL, MAC e MUC 56

Tabela 5 - Digestibilidade aparente dos nutrientes determinada pelo método de coleta total e estimada por marcadores internos, para dietas com diferentes proporções de gramíneas e leguminosas 57

Tabela 6 - Digestibilidade aparente da matéria seca determinada por coleta total e estimada pelo método de N fecal, para dietas com diferentes proporções de gramíneas e leguminosas 59

Tabela 7 - Consumo de nutrientes determinado pelo método de coleta total e estimado por marcadores internos, para ovinos alimentados por dietas com diferentes concentrações de gramíneas e leguminosas 60

Tabela 8 - Consumo de matéria seca determinado por coleta total e estimado pelo método de N fecal, para ovinos alimentados por dietas com diferentes concentrações de gramíneas e leguminosas 61

Tabela 9 - Proporção de consumo médio de MS (%) para os tratamentos MAC e MUC, através de valores observados por coleta total e estimados por equações usando valores de $\delta^{13}C$ nas plantas e nas fezes 64

Tabela 10 - Proporção de consumo de C_3 e C_4 (g dia^{-1}) determinada pelo método de coleta total e estimada por marcadores internos, para ovinos alimentados por dietas com diferentes concentrações de gramíneas e leguminosas 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

‰	Partes por mil
^{12}C	Carbono de maior abundância na natureza
^{13}C	Isótopo estável natural do carbono
ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação Oficial de Químicos Analíticos
C.P.S.	Counts Per Second
Ca	Cálcio
CENA	Centro de Energia Nuclear na Agricultura
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CH4	Metano
CIA	Cinza Insolúvel em Ácido
CMS	Consumo de Matéria Seca
CPI	Celulose Potencialmente Indigestível
CT	Método de Coleta Total
CTRL	Tratamento controle composto por 100% de gramínea
$\delta^{13}C$	Unidade de medida da proporção de isótopo estável de carbono
DMS	Digestibilidade aparente da Matéria Seca
EDXRF	Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia
EE	Extrato Etéreo
FDA	Fibra em Detergente Ácido

FDAf	Fibra em Detergente Ácido fecal
FDAi	Fibra em Detergente Ácido indigestível
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FDNf	Fibra em Detergente Neutro fecal
FDNi	Fibra em Detergente Neutro indigerível
Fe	Ferro
GEE	Gases de Efeito Estufa
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
H_3BO_3	Ácido bórico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
K	Potássio
LANA	Laboratório de Nutrição Animal
LDA	Lignina em Detergente Ácido
LEI	Laboratório de Ecologia Isotópica
LIN	Laboratório de Instrumentação Nuclear
LIPE®	Lignina Purificada e Enriquecida
LOD	Limite de Detecção
MAC	Tratamento teste composto por 25% de leguminosa e 75% de gramínea
MM	Material Mineral
Mn	Manganês
MS	Matéria Seca
MSi	Matéria Seca indigestível

MUC	Tratamento teste composto por 50% de leguminosa e 50% de gramínea
N_2	Nitrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
Nf	Nitrogênio fecal
NIST	Instituto Nacional de Normalização e Tecnologia
$N\text{-}NH_3$	Nitrogênio amoniacal
NRC	National Research Council
NT	Nitrogênio Total
PB	Proteína Bruta
PBf	Proteína Bruta fecal
PF	Parâmetros Fundamentais
PIB	Produto Interno Bruto total Brasileiro
R^2	Coeficientes de determinação
S	Enxofre
Se	Selênio
Ti	Titânio
UA	Unidade de Animal
USP	Universidade de São Paulo
VPDB	Vienna PeeDee Belemnite
WDXRF	Fluorescência Dispersiva de Raios X por Comprimento de Onda
XRF	Fluorescência de Raios-X.
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 23
2 REVISÃO DA LITERATURA 27
2.1 Panorama da produção de ruminantes em pastagem no Brasil 27
2.2 Benefícios do uso de gramíneas consorciadas com leguminosas 29
2.2.1 *Megathyrsus maximus* cv. Aruana 31
2.2.2 Macrotiloma (*Macrotyloma axillare*) 31
2.2.3 Mucuna preta (*Stizolobium aterrimum*) 32
2.3 Estimativa de consumo de nutrientes por ruminantes em pastagem 33
2.3.1 Métodos para determinar ou estimar a excreção fecal 34
2.3.2 Métodos para estimar a digestibilidade 35
2.4 Uso de espectrometria de fluorescência de raios-X como ferramenta para determinação de marcadores internos 37
2.5 Uso de $\delta^{13}C$ para a estimativa da proporção de consumo de gramíneas e leguminosas 39
3 MATERIAL E MÉTODOS 41
3.1 Local 41
3.2 Dietas e delineamento experimental 41
3.3 Ensaio *in vivo* 42
3.4 Análises bromatológicas 43
3.5 Determinação *in situ* de MSi e FDNi 44
3.6 Análise elementar por fluorescência de raios-X 45
3.7 Análise isotópica do carbono ($^{13}C/^{12}C$) 47
3.8 Estimativa da digestibilidade aparente 47
3.9 Estimativa da proporção de ingestão de gramínea e leguminosa 49
3.10 Estimativa de consumo de matéria seca (CMS) 50
3.11 Análise estatística 53

4 RESULTADOS 54
5 DISCUSSÃO 67
6 CONCLUSÃO 76
REFERÊNCIAS 77

1 INTRODUÇÃO

Dentro do contexto das mudanças climáticas, da conscientização para a preservação do meio ambiente e da crescente demanda por alimento devido ao aumento da população mundial, a maior eficiência alimentar e a otimização do desempenho animal surgem como alternativas para alcançar a sustentabilidade econômica, social e ambiental dos sistemas de produção de ruminantes (EISLER et al., 2014; KENNY et al., 2018).

Dentre as estratégias para a obtenção de melhores resultados de desempenho animal destaca-se as práticas para o uso eficiente das pastagens (DELEVATTI et al., 2019), que também pode contribuir para o aumento do sequestro de carbono, a recuperação de terras degradadas (MAKKAR, 2018) e redução do uso de alimentos potencialmente comestíveis para os seres humanos na produção animal (WILKINSON; LEE, 2018).

Avaliar o consumo de alimentos pelos animais é uma ferramenta valiosa para o gerenciamento do rebanho e da pastagem (SOUSA et al., 2019). O desempenho de ruminantes em pasto, dentro dos limites de sua capacidade genética, é amplamente determinado pela ingestão de nutrientes digestíveis, que por sua vez, é determinado pela quantidade e qualidade da forragem consumida (GARCIA et al., 2011; LIPPKE, 2002). A estimativa de consumo de nutrientes em pastagem, pode auxiliar na avaliação de desempenho e na definição das exigências nutricionais dos animais em diferentes sistemas de produção, facilitando a formulação de dietas equilibradas e auxiliando na tomada de decisão para a implantação e manejo de sistemas de produção de ruminantes em pastagem.

No entanto, diferente de sistemas de produção bem controlados como nos confinamentos, o consumo de nutrientes pelos animais em pastagens é difícil de ser determinado diretamente, sendo ainda um grande desafio. Animais criados em pastagens encontram um dossel heterogêneo e ingerem a forragem de maneira seletiva (KOZLOSKI et al., 2018), a diferença de seletividade tende a ser maior entre as espécies de ruminantes, ovelhas e cabras consomem uma dieta que difere em termos de espécies de plantas, partes de plantas e concentração de nutrientes, em relação à média de biomassa vegetal disponível na pastagem (DOVE; MAYES, 2005).

Em sistemas de pastagem heterogênea, como em consórcio de gramíneas e leguminosas, essas dificuldades são mais evidentes. Assim, uma estimativa precisa do consumo de nutrientes

requer não só a estimativa do consumo total, mas também a estimativa da composição botânica. No entanto, essas mensurações são difíceis de serem feitas em condições de campo devido a deficiências nos métodos de amostragem e de estimativas (DOVE; MAYES, 2005).

Foram propostos alguns métodos para estimativa de consumo de nutrientes em pastagens, como métodos diretos com base na pesagem dos animais e mensurações de altura e massa de forragem, antes e após o pastejo (NOWAKOWSKI; CZYZ; IWASZKIEWICZ, 2017). Também foi proposto estimativas pelo comportamento alimentar dos animais, através das mensurações do tempo gasto em pastejo, da taxa de bocado e da massa de forragem consumida pelo tamanho do bocado (HODGSON, 1985). No entanto, estes métodos tendem a ser trabalhosos, com alto custo de execução e com baixa acurácia e aceitação.

Devido à dificuldade de medir diretamente, métodos indiretos têm sido empregados para estimar o consumo em pastejo. Uma das técnicas indiretas que tem sido amplamente avaliada e frequentemente utilizada, baseia-se na relação entre a ingestão, a digestibilidade e a excreção fecal. Este método tem como princípio que a excreção fecal de um animal é inversamente proporcional à digestibilidade, mas diretamente relacionada à quantidade de alimento ingerido, deste modo, o consumo pode ser estimado a partir da obtenção das variáveis “produção fecal” e “digestibilidade” (CARVALHO et al., 2007). Marcadores internos tem sido utilizados para estimar a digestibilidade e marcadores externos para estimar a produção fecal, a combinação dessas duas variáveis são utilizadas para estimar o consumo em pastagem (DOVE; MAYES, 2006).

Quando os valores de consumo são obtidos a partir de estimativas separadas da excreção fecal e da digestibilidade, existem erros na estimativa de ambas, no entanto, a variabilidade das estimativas de excreção fecal é menos impactante do que a variabilidade das estimativas de digestibilidade, que tende a ser mais expressivas e preocupantes (COTTLE, 2013; DOVE; MAYES, 2005; KOZLOSKI et al., 2014), motivando a realização de vários trabalhos em busca do aperfeiçoamento na estimativa desta variável.

Os marcadores internos mais estudados para a estimativa da digestibilidade têm sido os componentes indigestíveis da parede celular, como a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), a fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), a matéria seca indigestível (MSi), a lignina em detergente ácido (LDA), as cinzas insolúveis em ácido (CIA) e os n-alcanos, além do nitrogênio fecal (Nf) (BERCHIELLI; ANDRADE; FURLAN, 2000; CASALI et al., 2008; DOVE; MAYES, 2006; VAN SOEST, 1994).

Com a aquisição e acessibilidade a novas técnicas analíticas, surge a possibilidade da obtenção de novos marcadores, além do avanço na aplicabilidade e aperfeiçoamento dos marcadores já existentes. Dentro dessa convicção destaca-se o uso da espectrometria fluorescência de raios-X por energia dispersiva (EDXRF), uma técnica promissora que já tem sido usada para análises de elementos em tecido vegetal. A EDXRF é uma técnica não destrutiva capaz de analisar simultaneamente elementos com número atômico acima de 11 (KNUDSEN et al., 1981).

Esta técnica apresenta características de preparo simples das amostras, multi-elementar e em uma grande faixa de concentração, tornando a análise rápida e barata (NEČEMER et al., 2008). Alguns dos elementos detectados pela EDXRF apresentam caraterísticas desejáveis para a utilização como marcadores internos e já são frequentemente utilizados como marcadores externos em ensaios para estimativa de consumo, dentre eles, o cromo (Cr), o titânio (Ti) e o itérbio (Yb) (COTTLE, 2013). A ocorrência natural desses elementos em tecido vegetal, mesmo em baixa concentração, pode ser detectada pela técnica de EDXRF, permitindo o uso destes elementos como marcadores internos.

O uso do isótopo estável de carbono (^{13}C) para a distinção de plantas de via fotossintética C_3 e C_4 em dietas de ruminantes é uma técnica bem estabelecida, e que apresenta novas alternativas de utilização (COATES, 1999; HELLWING et al., 2015; JONES et al., 1979; SMITH; EPSTEIN, 1971). O ^{13}C representa aproximadamente 1,11% dos átomos do carbono da terra, com 98,88% sendo de ^{12}C, mas devido a discriminação isotópica durante processos biológicos, físicos e químicos, essa proporção difere no tecido vegetal entre as plantas. Dentre esses processos, destaca-se a discriminação pela fotossíntese, principal responsável pela diferença na relação $^{13}C/^{12}C$ no tecido vegetal de plantas de via fotossintética C_3 (ciclo de Calvin) e de via C_4 (Hatch-Slack) (BERNOUX et al., 1998).

O contraste existente na relação isotópica de $^{13}C/^{12}C$ no tecido das plantas de ciclo C_3 e C_4, tem permitindo obter quantitativamente suas concentrações em diferentes amostras (DUCATTI et al., 2011). A diferença isotópica de $^{13}C/^{12}C$ também persiste em cadeias de carbono da fração de tecidos vegetais indigestíveis utilizados como marcadores internos. Assim, o uso da razão isotópica de ^{13}C em conjunto com marcadores internos, fornece a possibilidade de estimar não só o consumo total de dietas, mas também a concentração consumida para as plantas de ciclo C_3 e C_4, obtendo estimativas de consumo mais precisas para sistemas de pastagem consorciada.

A capacidade de estimar com precisão e simplicidade o consumo e a seleção de forragem em dietas de animais em pastagem, fornece uma ferramenta para projetar sistemas de pastagem com combinações apropriadas de forragens, para aumentar a eficiência alimentar e alcançar objetivos de sustentabilidade (NORMAN et al., 2009). Desta forma, os objetivos dessa proposta foram de avaliar a precisão de marcadores internos obtidos pela técnica de EDXRF, além da matéria seca indigestível (MSi) e a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), em parceria com a razão isotópica de ^{13}C, para a estimativa da digestibilidade, do consumo e da seleção de forragens consumidas por ovinos alimentados por dietas constituídas de gramíneas e leguminosas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Panorama da produção de ruminantes em pastagem no Brasil

As previsões de aumento da população mundial para em torno de 9 bilhões de pessoas nas próximas décadas e os efeitos de mudanças climáticas, são dois dos principais desafios a serem enfrentados atualmente (UN, 2019; SOUZA et al., 2019). Diante disso surge a necessidade de obtenção de medidas que promovam maior eficiência dos setores de produção de alimentos, vinculado com a necessidade de redução dos impactos ambientais provindos dos mesmos.

Dentre os setores de produção de alimentos no Brasil, a pecuária assume posição de destaque. De acordo com a ABIEC (2018) em 2017 o agronegócio contribuiu com 22% do Produto Interno Bruto total Brasileiro (PIB), com a pecuária correspondendo com 31% do PIB do agronegócio, fornecendo 14,4% da produção mundial de carne.

Estes valores são derivados principalmente da produção de ruminantes, com um rebanho bovino de 221,81 milhões de cabeças, além de 17,97 milhões de ovinos, 9,59 milhões de caprinos e 1,38 milhões de bubalinos (ABIEC, 2018; IBGE, 2017). Estes animais são produzidos através do uso de pastagens como principal base alimentar, distribuídos em uma área total de 174 milhões de hectares de pastagem (LOBATO et al., 2014).

Este cenário de produção de ruminantes predominantemente em pastejo no Brasil apoia-se em alguns atributos positivos, dentre eles o econômico, sendo considerado a fonte de alimento mais acessível entre os sistemas de produção, pela capacidade dos ruminantes converterem o material fibroso com valor nutricional relativamente baixo, não consumíveis pelos seres humanos, em alimentos proteicos de alta qualidade (EISLER et al., 2014; LIMA et al., 2018a). Schneider et al. (2011) também destacam que aumento do interesse da produção de ruminantes a base de pastagem apoia-se na boa relação custo-benefício, devido aos custos crescentes dos concentrados que compõem as dietas, principalmente quando os mesmos são de interesse para alimentação humana. As pastagens também oferecem a oportunidade de produzir alimentos com um nicho de alta qualidade, com maior valor de mercado comparado com o produto similar derivado da pecuária industrial (BOVAL; DIXON, 2012).

No entanto, a produção de ruminantes em pastagem no Brasil, ainda está longe de atingir seu potencial em fatores produtivos e ambientais. Dias-Filho (2011) comenta que cerca de

50 a 70% das pastagens estão degradadas ou apresentam algum grau de degradação. Isso promove baixa capacidade de suporte e reduz a taxa média de lotação das pastagens do Brasil para menos de 1 unidade animal (UA, 450 kg) por hectare (MAZZETTO et al., 2015). Strassburg et al. (2014) destacam que a estimativa de capacidade de suporte das pastagens cultivadas no Brasil está em torno de 32 a 34% de seu potencial.

A falta de reposição de nutrientes no solo, práticas culturais inadequadas, assim como o manejo do pastejo inadequado, associado ao surgimento de pragas e doenças, são as principais causas deste cenário de baixa produtividade e degradação das pastagens, além da oscilação significativa da capacidade de resiliência e qualidade da forragem entre as estações de chuva e seca ao longo do ano (EUCLIDES et al., 2014; SOUZA et al., 2019).

Os impactos oriundos deste cenário são expressivos, contribuindo para a redução do desempenho animal e para o aumento danos ao meio ambiente. De acordo com Dias-Filho (2011) a redução prematura de produtividade dos pastos, levando a sua baixa longevidade produtiva, tende a incentivar o desmatamento, para a formação de novas áreas de pastagem. Bueno et al. (2015) ressaltam que a produção animal baseada principalmente em sistemas de pastagem, com caracteristicas de baixo teor de proteína bruta e alto teor de fibras, como comumente ocorrente nas pastagens brasileiras, resultam em emissões elevadas de metano (CH_4) provenientes da fermentação microbiana ruminal, contribuindo para as emissões totais de gases de efeito estufa (GEE). De acordo com Gerber et al. (2015) e Huysveld et al. (2015) entre 8 e 12% da energia do alimento é perdida nessas emissões de CH_4.

Assim, os desafios da pecuaria atual ainda permanecem em reverter as perdas econômicas e ambientais da degradação das pastagens (OLIVEIRA SILVA et al., 2017), sendo evidente a necessidade de definição e transferência de princípios adequados de manejo, capazes de melhorar a produtividade de maneira persistente (EUCLIDES et al., 2014). Além da necessidade de mitigação dos GEE derivados da pecuária, tendo em vista que o Brasil é o terceiro maior emissor no ranking mundial para as emissões totais da agricultura, com aproximadamente 459.159,74 gigagramas de $C0_2$ equivalente, sendo 58% proveniente da fermentação entérica (FAO, 2017).

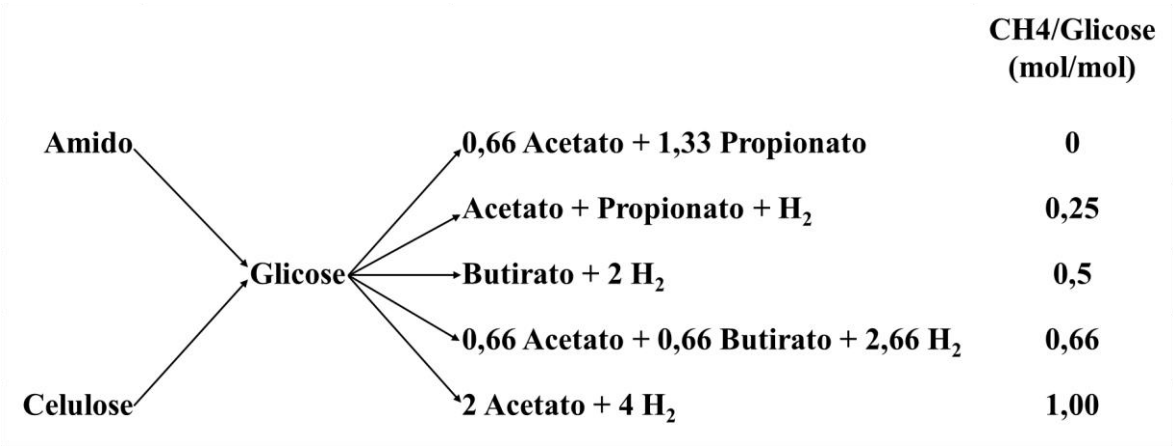
2.2 Benefícios do uso de gramíneas consorciadas com leguminosas

A adoção do consórcio de leguminosas com gramíneas forrageiras é uma alternativa promissora para atender os atuais desafios da pecuária Brasileira, com grande potencial para a reincorporação de áreas improdutivas em sistemas produtivos (MENEZES et al., 2019). A presença de leguminosas pode reduzir o uso de insumos inorgânicos de nitrogênio com a fixação simbiótica de N_2, aumentando o rendimento e o valor nutritivo da forragem, com maior eficiência na conversão de forragem em proteína animal, além da redução na produção de GEE e maior resiliência a variações de temperatura e aos períodos de estresse hídrico (LÜSCHER et al., 2014), podendo diminuir a variação sazonal de produção de massa seca da forragem (SANDERSON et al., 2005).

As leguminosas normalmente apresentam menor teor de fibra e maior teor de proteína bruta em comparação com às gramíneas, que por sua vez, apresentam alta proporção de fibra indigestível e baixos níveis de proteína (HAMMOND et al., 2011; TIEMANN et al., 2009). Assim, a presença de leguminosas tende a aumentar o valor nutricional da dieta e pode promover a redução da produção de CH_4 (PIÑEIRO-VÁZQUEZ et al., 2015). Dietas com grande proporção de forragem, dispondo de muito material vegetal fibroso, produz mais CH_4 por unidade de alimento digerido, já dietas a base de forragem com menor teor de fibra ou maior teor de carboidratos não fibrosos, como ocorre nas forrageiras leguminosas, resultam em menor produção de CH_4 (JANSSEN, 2010).

A proporção do tipo de carboidrato (estrutural ou não estrutural) presente na dieta exerce influência direta na população microbiana do rúmen e, por sua vez, no perfil de ácidos graxos voláteis. A formação de acetato e butirato de modo geral é resultado da fermentação de carboidratos estruturais, resultando maior liberação de hidrogênio e consequentemente, maior produção de CH_4 pelas archaeas metanogênicas. Por outro lado, o propionato é comumente produzido pela fermentação de carboidratos solúveis, sendo uma via competitiva para o uso de hidrogênio, reduzindo a produção total de CH_4 (Figura 1) (ELLIS et al., 2008; KRAUSE et al., 2014).

Figura 1 – Possíveis vias de fermentação de celulose e amido via glicose, para acetato, propionato, butirato e H_2



Obs.: Por simplicidade, CO_2, H+ e H_2O não são mostrados.
Fonte: Adaptado de Janssen (2010).

Além da redução da produção de CH_4 através de mudanças do perfil dos produtos da fermentação microbiana, as leguminosas também exercem efeito direto na abundancia da população dos microrganismos, devido à presença de taninos (CHELLAPANDI et al., 2018; KNAPP et al., 2014). De acordo com McDonald et al. (2011) muitas leguminosas, especialmente as espécies mais pesquisadas para a nutrição animal, contêm concentrações apreciáveis de taninos condensados, modificando a produção de gás no rúmen e possivelmente reduzindo a produção de CH_4.

Os efeitos inibitórios dos taninos sobre a metanogênese ruminal tem sido atribuídos a efeitos diretos sobre as archaeas metanogênicas e protozoários (PATRA; SAXENA, 2011). A presença de taninos condensados também fornece um meio prático de proteger a proteína dietética da forrageira da degradação ruminal, aumentando assim a captação de proteína vegetal no intestino delgado e aumentando o desempenho animal. Os taninos também afetam a população de nematoides no trato gastrointestinal dos ruminantes (PILUZZA et al., 2013).

2.2.1 *Megathyrsus maximus* cv. Aruana

O *Megathyrsus maximus* (Jacq.) BK Simon e SWL Jacobs cv. Aruana foi lançado em 1989 pelo Instituto de Zootecnia da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, como opção para formação de pastagens (COLOZZA et al., 2000; GERDES et al., 2005). É uma forragem de origem Africana de porte baixo, pequenos internódios, folhas estreitas, pequenas e tenras, em relação as demais cultivares de *M. maximus* (GHISI; ALMEIDA; ALCÂNTARA, 1989). Tem hábito de crescimento variável entre cespitoso e decumbente (POMPEU et al., 2010), com boa tendência para gramar, demonstrando maior viabilidade de exploração e aceitação por ovinos (BIANCHINI et al., 1999). Recomenda-se o manejo com altura de entrada de 30 cm e pastejo até 15 cm de altura pós-pastejo, por promover maior taxa de acúmulo de massa seca e melhor controle do alongamento de caule (ZANINI et al., 2012).

Apresenta grande capacidade e rapidez de perfilhamento, com bom número de gemas basais e níveis elevados de produção de biomassa, na ordem de 18 a 21 toneladas de MS/ha/ano, além de elevada digestibilidade *in vitro* e teor de proteína bruta de 10 a 12% (SANTOS; CUNHA; BUENO, 2007). Lima et al. (2018b) obtiveram valores de composição bromatológica em relação a matéria seca de 9,11% de proteína bruta, 2,42% de extrato etéreo, 73,11% de fibra em detergente neutro, 45,61% de fibra em detergente ácido e 6,18% de fração de cinzas, para feno de *M. maximus* cv. Aruana.

2.2.2 Macrotiloma (*Macrotyloma axillare*)

A *Macrotyloma axillare* E. Mey. é um membro da família *Fabaceae*, nativa no continente africano (BLUMENTHAL; STAPLES, 1993) que apresenta grande potencial de uso em sistemas agrícolas e pecuários tropicais e subtropicais (BATISTA et al., 2019).

É uma planta perene de comportamento rasteiro, tem raízes fortes sem tendência de desenvolver raízes adventícias, possui hastes cilíndricas e folhas trifolioladas, com folíolos ovado-lanceolados ligeiramente brilhantes na face adaxial e pálidas na face abaxial. A inflorescência é um racemo axilar de 2 a 4 flores papilionadas esbranquiçadas a amarelo-esverdeadas, a vagem possui formato linear oblonga, pouco estipulada e lateralmente achatada (COOK et al., 2005a).

Lima et al. (2018b) apresentaram valores de composição bromatológica para feno de *M. axillare* em relação a matéria seca, de 15,4% de proteína bruta, 3,02% de extrato etéreo, 62,66% de fibra em detergente neutro, 44,64% de fibra em detergente ácido e 7,77% de fração de cinzas, além de 2,32% de total de taninos e 0,21% de taninos condensados.

2.2.3 Mucuna preta (*Stizolobium aterrimum*)

A mucuna preta (*Stizolobium aterrimum* Piper e Tracy) é uma *Fabaceae* nativa no leste da índia e no sul da china. É uma planta anual vigorosa que se estende até 18 metros de comprimento, com grandes folhas trifolioladas, folíolos laterais assimétricos e folíolo terminal simétrico. A inflorescência é um racimo axilar, com até 32 centímetros de comprimento, com muitas flores de coloração roxa ou branca. Apresenta vagens de formato oblongo, com 4 a 13 centímetros de comprimento e 1 a 2 centímetros de largura, geralmente possuem formato de "S" e contêm até 7 sementes em formato oblongo-elipsoides (COOK et al., 2005b).

É comumente utilizada para adubação verde e cobertura vegetal, pela grande produção de matéria orgânica e sua ampla adaptabilidade. Vem sendo usada como forrageira na suplementação proteica de bovinos, ovinos e caprinos, tanto verde como em silagem e feno. É uma planta de fácil cultivo e boa aceitação pelos animais, sem impactos negativos na saúde e no desempenho animal, além de excelente composição química (COOK et al., 2005b; JORGE et al., 2007; SENO; GOMES; CORTELAZZO, 1996). Apresenta alto teor de proteína bruta, minerais e fibras, além de alta variedade de compostos secundários, como flavonoides, ácidos fenólicos, saponinas e alcaloides (RODRÍGUEZ et al., 2018).

Moreira (2017) avaliou a inclusão de mucuna preta na dieta de ovinos e observou mudanças nos parâmetros fermentativos, com maior ingestão de proteína bruta digestível pelos animais, além de maiores teores de nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$), maior concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) total, de propionato e redução da relação acetato:propionato, em relação aos animais que receberam exclusivamente feno da gramínea. Katsande et al. (2016) encontraram valores de 14,79% de proteína bruta, 25,26% de fibra bruta, 39% de fibra em detergente ácido, 12,13% de cinzas e 0,44% de taninos condensados, na matéria seca de feno de mucuna preta. Longo et al. (2012) apresentam valores de 24,1% de proteína bruta, 63,7% de fibra em detergente neutro, 41,2% de fibra em detergente ácido, 3,8% de taninos totais e 2,0% de taninos condensados, para a matéria seca da mucuna preta.

2.3 Estimativa de consumo de nutrientes por ruminantes em pastagem

Tendo em vista que o desempenho animal, dentro dos limites do potencial genético, é amplamente determinado pela ingestão de nutrientes digestíveis (LIPPKE, 2002), o desempenho de ruminantes em pastagem passa a ser determinado pela quantidade e qualidade da forragem consumida (GARCIA et al., 2011). Assim o consumo de forragem é o principal fator determinante do desempenho de animais em pastejo, sendo influenciado por vários fatores associados ao animal, ao pasto, ao ambiente e às suas interações (CARVALHO et al., 2007).

O conhecimento do consumo de forragem é um fator determinante para a obtenção de melhores resultados no desempenho animal exclusivamente em pastagem, ou para a formulação de dietas balanceadas em sistemas semiextensivos. Informações de consumo de forragem em comparação com resultados de produção, também podem ser usadas para avaliar a eficiência energética e nutricional do animal em pastejo, permitindo a seleção de cada animal, de acordo com seu potencial genético (ROMBACH et al., 2019).

No entanto, a estimativa de consumo de matéria seca de forragem e a eficiência de seu uso para ganho de peso vivo, sempre foi difícil de medir em condições de campo (COTTLE, 2013). Mesmo com a evolução dos procedimentos experimentais e analíticos ao longo do tempo, as estimativas do consumo em pastejo ainda continuam sendo deficientes em acurácia e confiabilidade (CARVALHO et al., 2007).

Os primeiros ensaios experimentais visando a estimava de consumo de forragem em campo, foram baseados nas diferenças entre os rendimentos estimados da forragem antes e depois do pastejo, através da realização de amostragem em pré e pós-pastejo (WALTERS; EVANS, 1979), e através da pesagem dos animais antes e depois do pastejo, assumindo a diferença entre as duas pesagens como o consumido (ERIZIAN, 1932; PENNING; HOOPER, 1985). Também foi proposto a estimativa de consumo de forragem através de medidas do comportamento alimentar do animal, realizando mensurações do tempo gasto com a alimentação, determinando o número de bocado por unidade de tempo e o tamanho médio de cada bocado (CHACON; STOBBS; SANDLAND, 1976).

No entanto, estes métodos possuem algumas limitações práticas, como o crescimento constante da forragem, perdas de massa por pisoteio, além de dificuldade de mensuração de perdas energéticas, de produção de fezes e de urina pelo animal. Sendo aplicáveis apenas para medições de curto prazo de tempo, com altas exigências de capital e mão-de-obra,

sendo mais voltadas para estudos comportamentais (CARVALHO et al., 2007; DOVE; MAYES, 1991; WALTERS; EVANS, 1979).

Buscando reduzir as limitações das técnicas anteriores, nos últimos anos as pesquisas direcionaram para a avaliação de técnicas indiretas de estimativa de consumo, baseadas na determinação ou estimativa da produção fecal e da digestibilidade da dieta (CORDOVA; WALLACE; PIEPER, 1978; COTTLE, 2013; LIPPKE, 2002). Este método é baseado no princípio de que a excreção fecal é inversamente proporcional a digestibilidade, mas diretamente proporcional a quantidade de alimento ingerido (PENNING; JOHNSON, 1983).

Atualmente, têm sido utilizados marcadores para a estimar a excreção fecal e a digestibilidade. Funcionalmente, os marcadores são classificados como sendo internos, aqueles que ocorre naturalmente nos alimentos, ou externos, aqueles adicionados ao alimento ou dosados separadamente ao animal (LIPPKE, 2002). Os marcadores externos têm sido usados para estimar a produção fecal e marcadores internos para estimar a digestibilidade da matéria seca (VELÁSQUEZ et al., 2018).

Um marcador para ser ideal deve apresentar características essenciais como, não ser absorvido pelo animal, recuperação completa após a ingestão, não ter efeito sobre o animal, não afetando e nem sendo afetado pelo trato gastrintestinal, ter características físicas (em termos de tamanho de partícula e densidade) semelhantes ao conteúdo do trato digestivo, estando intimamente associado ao material marcado, com taxa de passagem semelhante ao alimento e medição quantitativa precisa, com método de estimativa simples e específico (DOVE; MAYES, 2006; VELÁSQUEZ et al., 2018).

2.3.1 Métodos para determinar ou estimar a excreção fecal

A excreção fecal por animais em pastejo pode ser medida diretamente, com uso de sacolas presas aos animais, que permitem a coleta total das fezes, ou estimada indiretamente, com uso de marcadores externos (CARVALHO et al., 2007).

O procedimento de mensuração da excreção fecal através de coleta total apresenta algumas limitações e desvantagens, como a alta exigência de mão-de-obra, não apenas para a coleta real, mas também para o treinamento, manutenção e adaptação dos animais a gaiolas ou

bolsas de coleta, causando desconforto e mudanças de comportamento na alimentação e perdas de amostras no período de mensuração (CABRAL et al., 2017; LIPPKE, 2002).

Alternativamente, métodos indiretos como o uso de marcadores externos foram desenvolvidos para estimar a produção fecal e tem sido frequentemente utilizados e aprimorados, com vantagens sobre a coleta total de fezes por sua simplicidade e praticidade (CABRAL et al., 2017; CARVALHO et al., 2007).

Os marcadores externos comumente utilizados para calcular a excreção fecal são o óxido de cromo, o dióxido de titânio, o óxido de itérbio e os n-alcanos sintéticos, todos administrados via oral (COTTLE, 2013). O óxido de cromo já foi o marcador externo mais utilizado para estimar a excreção fecal, no entanto, a sua recuperação varia muito entre os animais e suas propriedades carcinogênicas são uma preocupação; o dióxido de titânio passou a ser uma alternativa, sem apresentar propriedades negativas a saúde animal (SOUZA et al., 2015). O óxido de itérbio também tem sido frequentemente utilizado e tem apresentado maior associação às partículas da digesta, sendo mais palatável do que o óxido de cromo, entretanto, é um produto importado e oneroso (CARVALHO et al., 2007).

O LIPE® também vem sendo uma alternativa dentre os marcadores externos para estimativa da produção fecal, é um produto desenvolvido por pesquisadores do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária e de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG (LANZETTA et al., 2009). O LIPE® é um polímero hidroxi-fenil-propano modificado (uma lignina purificada de Eucalipto) e tem como características benéficas o baixo período de adaptação para que sua excreção alcance o equilíbrio, que aparenta ser menor do que para o óxido de cromo (CARVALHO et al., 2007).

2.3.2 Métodos para estimar a digestibilidade

A digestibilidade da dieta pode ser definida como a proporção de dieta consumida que não é excretada nas fezes (DOVE; MAYES, 2006). Os maiores desafios na determinação da digestibilidade estão relacionados a inexistência de métodos para a sua medição direta, além da grande dificuldade de obtenção de uma amostra representativa da dieta efetivamente consumida pelo animal em pastejo (DOVE; MAYES, 2005).

Os animais pastam seletivamente, preferindo as plantas jovens em vez de velhas e folhas em vez de caule, uma amostra do pasto colhido à mão ou cortada com um cortador de grama, não representa a seletividade daquela consumida pelo animal (McDONALD et al., 2011). Animais fistulados no esôfago tem sido usados para obter amostras representativas (DOVE; MAYES, 2005). Mas existem críticas relacionadas à mudança no comportamento ingestivo dos animais e a restrições éticas e legais ao seu uso, predominando a pratica de coleta manual de forragem (CARVALHO et al., 2007).

Uma vez coletadas as amostras de forragem, a digestibilidade pode ser estimada em ensaio *in vitro* (TILLEY; TERRY, 1963), e mais recentemente, pela técnica *in vitro* de produção de gases (ABDALLA et al., 2012; CAMPOS et al., 2019; SANTOS et al., 2017; SOLTAN et al., 2012). Também é comum a estimativa da digestibilidade por ensaio *in vivo* em pequenos animais confinados em gaiolas de metabolismo, com o oferecimento do alimento em quantidades conhecidas, separando as fezes e urina por um arranjo de peneiras (McDONALD et al., 2011), no entanto, este método requer controle rigoroso da ingestão e excreção dos animais, o que o torna trabalhoso e oneroso (BERCHIELLI; ANDRADE; FURLAN, 2000).

A estimativa de digestibilidade pode ser realizada por meio de amostras de fezes, através da determinação da concentração de nitrogênio fecal. O uso de nitrogênio fecal como marcador segue duas suposições, a primeira considera que a excreção endógena de nitrogênio fecal é constante e independente da excreção fecal de matéria seca, assim a excreção fecal de nitrogênio é diretamente proporcional à digestibilidade da dieta. Desta forma, quando a digestibilidade da matéria seca na dieta diminui, a concentração de nitrogênio endógeno fecal na matéria seca é diluída pela quantidade crescente de matéria seca fecal, sendo portanto, um indicador de digestibilidade (LUKAS et al., 2005; PERIPOLLI et al., 2011). A segunda considera que a excreção fecal de nitrogênio está diretamente relacionada com a excreção fecal de matéria seca, que por sua vez, está diretamente relacionada com a ingestão da dieta oferecida (PERIPOLLI et al., 2011).

O uso da concentração fecal de nitrogênio para estimar a digestibilidade da matéria seca é uma técnica viável quando dietas complexas e alimentação seletiva impedem a amostragem representativa do ofertado, pois esse método não requer amostras de alimentos e não impõe qualquer restrição aos animais (LUKAS et al., 2005). O uso do método de nitrogênio fecal depende apenas de equipamentos e técnicas comumente disponíveis na maioria dos laboratórios que realizam testes de qualidade de forragem (AZEVEDO et al., 2014).

Atualmente, a técnica mais utilizada para a estimativa da digestibilidade tem sido o uso de concentrações relativas de marcadores internos indigestíveis na dieta e nas fezes (DOVE; MAYES, 2006). Essa técnica considera que nos processos de digestão e absorção, é removido quase que a totalidade dos compostos solúveis e dos insolúveis potencialmente digestíveis, desta forma, a passagem do alimento pelo trato gastrointestinal, promove o aumento progressivo da concentração do indicador indigestível (DETMANN et al., 2001). O aumento da concentração de marcadores nas fezes em relação a dieta fornece uma estimativa da indigestibilidade da dieta, ou seja, a proporção de dieta consumida que é excretada nas fezes, calculada como "concentração de marcador na dieta" dividida pela "concentração de marcador nas fezes", desta forma, a digestibilidade pode ser calculada como "1 – indigestibilidade" (DOVE; MAYES, 2005; LIPPKE, 2002).

Os marcadores internos mais utilizados em ensaios de digestibilidade são a lignina em detergente ácido (LDA), a fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), a matéria seca indigestível (MSi), a celulose potencialmente indigestível (CPI), as cinzas insolúveis em ácido (CIA), os ácidos graxos de cadeia longa e os n-alcanos de cadeia longa (FERREIRA et al., 2009; MAYES; DOVE, 2000; SAMPAIO et al., 2011). Os indicadores internos apresentam a vantagem de já estarem presentes no alimento e, de modo geral, permanecerem uniformemente distribuídos na digesta durante o processo de digestão e excreção (PIAGGIO et al., 1991; WATANABE et al., 2010).

2.4 Uso de espectrometria de fluorescência de raios-X como ferramenta para determinação de marcadores internos

Independentemente da essencialidade, a maioria dos elementos da tabela periódica pode ser encontrada em folhas de plantas superiores, os elementos originalmente derivados do solo, são absorvidos pelas plantas através do sistema radicular e acumulados na parte aérea (TAKADA et al., 1997). Alguns destes elementos apresentam caraterísticas desejáveis para a utilização como marcadores internos.

A espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF) é um método instrumental não destrutivo de análise qualitativa e quantitativa para elementos químicos, baseada na medição de intensidade das linhas espectrais de raios-X, emitidas por excitação secundária, seguindo o

princípio de que cada elemento emite o seu próprio espectro característico de raios-X (LAWRENCE, 1998; CHEREMISINOFF, 1996). A técnica utiliza radiação de excitação (geralmente um feixe de raios-X), produzindo a ionização das camadas internas dos átomos que compõem cada amostra, devido à absorção fotoelétrica. A energia ou comprimento de onda dos raios-X emitidos, são então usados para identificar cada elemento presente na amostra (MARGUÍ; ZAWISZA; SITKO, 2014).

Quando um feixe de raios-X colide com um elemento alvo, os elétrons orbitais podem ser ejetados. Feixes de raios-X e raios gama podem ser energéticos o suficiente para expelir elétrons firmemente retidos nos orbitais internos de um átomo. A remoção de um elétron em uma camada interna torna a estrutura eletrônica do átomo instável, desta forma, a vaga deixada tende a ser preenchida por outro elétron de uma camada mais externa. Durante este processo, libera-se energia na forma de um fóton (raios-X secundários conhecidos como fluorescência). A energia do fóton do raio-X emitido depende da distribuição dos elétrons no átomo excitado, como cada elemento possui uma distribuição eletrônica exclusiva, cada elemento produz um espectro secundário exclusivo de raios-X, cuja intensidade é proporcional à concentração do elemento na amostra (CHEREMISINOFF, 1996; NASROLLAHZADEH et al., 2019).

A instrumentação de fluorescência de raios-X é dividida em dois tipos, espectrômetro dispersivo de comprimento de onda (WDXRF) e de dispersão de energia (EDXRF). Em um espectrômetro de dispersão de energia (tipo utilizado neste trabalho), a radiação de raios-X emitida pela amostra colide diretamente com um detector de silício derivado de lítio no estado sólido. Este detector é capaz de coletar e analisar uma gama de energias de raios-X de maneira simultânea (CHEREMISINOFF, 1996).

A técnica de espectrometria de fluorescência de raios-X por dispersão de energia (EDXRF) permite a realização de análises qualitativas e quantitativas para quase todos os elementos da tabela periódica (elementos com número atômico maior ou igual a 11), em diferentes matrizes (minerais e orgânicas), com o mínimo de preparo das amostras, podendo ser analisadas diretamente ou simplesmente moídas. Apresenta alta frequência analítica (quase 96 amostras em um turno de 8 horas) e a maioria dos equipamentos conta com uma plataforma automática de inserção das amostras (ALMEIDA et al., 2019; NAVAS; ASUERO; JIMÉNEZ, 2016).

A técnica de EDXRF apresenta um limite de detecção (LOD) de dezenas de miligramas do elemento por quilograma de tecido vegetal, para análise direta de tecido moído (ALMEIDA et al., 2019). Bachiega et al. (2019) avaliando concentração de Selênio (Se) em plântulas de brócolis com um EDXRF de bancada, encontraram um LOD de 0,9 mg kg^{-1}. Sendo assim, uma ferramenta com grande potencial para a utilização na determinação de elementos utilizados como marcadores internos.

2.5 Uso de $\delta^{13}C$ para a estimativa da proporção de consumo de gramíneas e leguminosas

Plantas de ciclo fotossintético C_3 são aquelas em que o primeiro produto da fotossíntese é uma molécula de 3 carbonos; enquanto que as plantas de ciclo C_4, o produto fotossintético inicial é uma molécula de 4 carbonos. As plantas do ciclo C_3 fixam o CO_2 atmosférico através da enzima Rubisco, enquanto que as plantas do ciclo C_4 fixam CO_2 através da enzima PEP carboxilase (EHLERINGER; CERLING, 2002). A PEP carboxilase apresenta maior afinidade pelo CO_2 em relação à Rubisco (MAGALHÃES, 1985). Devido a menor afinidade pelo CO_2, a Rubisco promove maior discriminação do isótopo pesado de carbono (^{13}C) em relação ao isótopo leve (^{12}C); desta forma, as plantas de ciclo C_3 incorporam menos ^{13}C em relação ao ^{12}C. Isto leva a diferentes razões isotópicas na biomassa da planta e promove variações nas razões isotópicas ao longo da cadeia alimentar, tornando as plantas de ciclo C_3 em média 14,4‰ mais leves do que plantas de ciclo C_4 (DUCATTI et al., 2011; NORMAN et al., 2009).

O dióxido de carbono atmosférico contém cerca de 1,1% do isótopo de ^{13}C e 98,9% do isótopo ^{12}C (O'LEARY, 1981). As moléculas isotópicas $^{12}CO_2$ e $^{13}CO_2$ não são diferenciadas pelas membranas biológicas de origem vegetal ou animal, ou seja, este nêutron a mais no núcleo de carbono não é detectado. No entanto, devido a diferenças de anatomia, fisiologia, bioquímica e de ecologia, as plantas discriminam e apresentam diferenças nas razões isotópicas do ^{13}C, tornando-o um excelente traçador em nível de variação natural (DUCATTI et al., 2011; O'LEARY, 1981; SMITH; EPSTEIN, 1971).

Os desvios nas razões de isótopos de carbono são expressos como $\delta^{13}C$ e medidos como desvios em partes por mil (‰), a partir da razão isotópica de um carbonato padrão. A biomassa das plantas C_3 tem valores de $\delta^{13}C$ que variam de –22 a –34‰, e as plantas C_4 possuem valores que variam entre –9 a –16‰ (DUCATTI et al., 2011; JONES et al., 1979; NORMAN et al., 2009).

As deficiências na estimativa consumo em pastejo são mais evidentes em pastagens consorciadas, devido a presença de diferentes forrageiras com diferenças morfológicas e de valor nutricional. O contraste existente na relação isotópica de $^{13}C/^{12}C$ das plantas de ciclo fotossintético C_3 e C_4 tem possibilitado estudos na área de nutrição e metabolismo animal, utilizando como traçador o ^{13}C e sua concentração natural nos alimentos (DUCATTI et al., 2011; MAYES; DOVE, 2000). Essa diferença isotópica de ^{13}C pode ser explorada como uma ferramenta para estimar a proporção de consumo de forragem em pastagem consorciada.

O $\delta^{13}C$ de uma dieta composta por gramíneas e leguminosas (C_3 e C_4) é diretamente relacionada a suas proporções, assim, conhecendo razão isotópica do ^{13}C na leguminosa e na gramínea, a proporção ingerida pelo animal para cada planta pode ser calculada a partir dos valores de $\delta^{13}C$ das fezes (JONES et al., 1979). Segundo De Smet et al. (2004) os resultados de $\delta^{13}C$ das fezes podem fornecer informações sobre a dieta imediata do animal ou de um período de tempo, permitindo a investigação de flutuações da dieta em um tempo determinado. Sponheimer et al. (2003) ressaltam a facilidade de obtenção das amostras de fezes dos animais em situação de campo, além capacidade de refletir o carbono indigestível à medida que o material digerível foi absorvido, com a capacidade de estimar com precisão e simplicidade a seleção da dieta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Os ensaios *in vivo* e *in situ* foram desenvolvidos no Laboratório de Nutrição Animal (LANA), as determinações elementares por fluorescência de raios X foram conduzidas no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) e as determinações da razão isotópica do carbono foram realizadas no Laboratório de Ecologia Isotópica (LEI), todos localizados no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo (USP), no município de Piracicaba, SP. Todos os procedimentos com uso de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-CENA/USP (Protocolos №. 005061, №. 003/2016 e №. 006-2018).

3.2 Dietas e delineamento experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com arranjo experimental constituído por diferentes marcadores internos para a estimativa da digestibilidade e do consumo de matéria seca, e por três tratamentos representados por dietas com diferentes proporções de leguminosa:

- Tratamento CTRL - 100% gramínea (feno de *Megathyrsus maximus* cv. Aruana);
- Tratamento MAC - Inclusão de 25% de leguminosa (75% feno de *Megathyrsus maximus* cv. Aruana e 25% feno de *Macrotyloma axillare*);
- Tratamento MUC - Inclusão de 50% de leguminosa (50% feno de *Megathyrsus maximus* cv. Aruana e 50% feno de *Stizolobium aterrimum*).

A composição químico-bromatológica das forragens que compõem cada dieta, com base na matéria seca, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição químico-bromatológica dos fenos que compõem as dietas experimentais

Variáveis analisadas	Aruana	Macrotiloma	Mucuna preta
---------- g Kg^{-1} da MS ----------			
Matéria seca (MS)[1,2]	953,85	873,87	924,85
Proteína bruta (PB)	91,10	154,02	153,76
Extrato etéreo (EE)	24,15	30,18	39,40
Fibra em detergente neutro (FDN)	731,06	626,58	729,75
Fibra em detergente ácido (FDA)	456,10	446,36	559,25
Matéria mineral (MM)	61,75	77,65	46,65
---------- % da MS ----------			
Coeficiente de Digestibilidade[3]	60,44	58,89	56,54
---------- mg Kg^{-1} de MS ----------			
Ca[4]	5272,74	8365,57	7870,78
P	733,75	1639,27	2364,20
S	1603,25	1579,73	2004,88
K	16564,45	8829,73	15375,93
Fe	611,18	548,12	554,38
Mn	217,43	103,61	134,44
Zn	16,79	21,53	21,68
---------- g ácido tânico Kg^{-1} da MS ----------			
Fenóis totais[1,5]	-	29,64	24,68
Taninos totais	-	23,23	15,31
---------- g leucocianidina Kg^{-1} da MS ----------			
Taninos condensados[1,4]	-	2,14	5,67
---------- ‰ ----------			
$\delta^{13}C$ [6]	-14,62	-26,98	-27,45

[1]Resultados apresentados por Lima (2016) e Moreira (2017); [2]Análises realizadas de acordo com AOAC (2011). [3]Valores determinados de acordo com McDonald et al. (2011). [4]Valores elementares determinados por EDXRF. [5]Análises realizadas de acordo com Makkar (2000). [6]Expresso como a proporção de $^{13}C/^{12}C$ nas amostras em relação a proporção de $^{13}C/^{12}C$ no padrão internacional Vienna PeeDee Belemnite - VPDB.

3.3 Ensaio *in vivo*

Foram utilizados 21 ovinos da raça Santa Inês, com peso corporal médio de 25 ± 1,8 kg, divididos em 3 grupos alimentados pelos tratamentos CTRL, MAC e MUC (7 animais em cada tratamento). O período experimental foi de 17 dias, dividido em um período de adaptação de 10 dias nas respectivas dietas em baias coletivas e 7 dias de avaliação com os animais alocados em gaiolas individuais para estudo de metabolismo, providas de comedouro, bebedouro, cocho para suplementação mineral e estrutura para separação e coleta de vezes e urina. O período de avaliação foi dividido em 2 dias de adaptação nas gaiolas individuais para

estudo de metabolismos e 5 dias para as mensurações e coletas de sobras, fezes e urina. Em ambos os períodos (baias coletivas e gaiolas individuais) foram fornecidos água e sal mineral *ad libitum*.

As dietas foram ofertadas duas vezes ao dia (período da manhã e período da tarde), considerando o consumo médio de matéria seca de 3% em relação ao peso corporal de cada animal. O oferecido de cada dieta foi ajustado visando garantir 10% de sobras durante todo período experimental. A dieta dos tratamentos MAC e MUC foi fornecida buscando manter a relação gramínea e leguminosa de 75:25 e 50:50, respectivamente. Desta forma, a quantidade de feno de gramínea ofertado no período da tarde, dependia do consumo de feno de leguminosa ofertado no período da manhã.

Durante os 5 dias de coletas, as sobras e as fezes foram recolhidas e pesadas diariamente. As sobras do tratamento MAC e tratamento MUC foram fracionadas para a determinação da proporção de consumo de gramínea e leguminosa. Após as coletas e mensurações das sobras e fezes, foi amostrado em torno de 10% para cada amostra, para a formação de uma amostra composta por animal. As amostras compostas foram armazenadas em câmara fria a –20ºC até a realização das análises seguintes.

3.4 Análises bromatológicas

As amostras de ofertado, sobras e fezes foram descongeladas e acondicionadas em estufa de circulação forçada de ar a 60ºC (Modelo MA 037 – Marconi, Piracicaba – SP, Brasil), até atingir peso constante e foram moídas a 1 mm com auxílio de um moinho de facas tipo Willey (Marconi, Piracicaba – SP, Brasil). Em seguida, foram analisados os teores de MS, MM e PB, seguindo o protocolo da Associação Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, 2011).

Para a determinação da MS, foram pesadas 1 g de cada amostra com auxílio de uma balança analítica (modelo SA210, Scientech, Brasil), em cadinhos de porcelana e secas em estufa (modelo EL – 1.6, Odontobrás, Brasil) por 24 horas a 105ºC. Em seguida, os cadinhos foram alocados em dessecador por 2 horas e pesados novamente em balança analítica para a determinação da MS. O MM foi determinado após a queima em forno mufla (JUNG – Blumenau – SC, Brasil) a 500ºC por 4 horas.

O teor de PB foi determinado pelo método de Kjeldahl, através da decomposição da matéria orgânica por digestão, seguido de destilação e titulação. A digestão foi realizada a quente, com 0,1 g de amostra em solução digestora a base de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). A destilação foi realizada por arraste a vapor (TE – 036/1, Tecnal, Piracicaba – SP, Brasil) com solução concentrada de hidróxido de sódio (NaOH), a solução de ácido bórico (H_3BO_3) foi utilizada como solução coletora do N volatilizado. A titulação foi realizada com solução padrão de ácido sulfúrico diluído de título conhecido (H_2SO_4 0,05N), determinando a concentração de nitrogênio total (NT) de cada amostra. Multiplicou-se o valor de NT por 6,25 para a obtenção da concentração de PB.

As análises das frações de FDN e FDA seguiram a metodologia sugerida por Van Soest, Robertson e Lewis (1991) e adaptada por Mertens et al. (2002). Foram adicionados 0,5 g de cada amostra em saquinhos tipo Ankon© para determinação de fibra (modelo F57 – Ankon Technology Corp., USA), os saquinhos foram selados e inseridos no determinador de fibra (TE-149 Tecnal, Piracicaba – SP, Brasil). Para a análise de FDN as amostras foram lavadas a 90ºC por 1 hora, com solução detergente neutro, α-amilase e sulfito de sódio, seguido de 2 lavagens de 5 minutos com água destilada e α-amilase. Para a análise de FDA as amostras foram lavadas com solução detergente ácido a 90ºC por 1 hora, seguido de 4 lavagens de 5 minutos com água destilada. Em seguida, as amostras foram imersas em acetona por 5 minutos, acondicionadas em pirex e deixadas em repouso em capela para total evaporação da acetona. As amostras foram secas em estufa a 102ºC por 4 horas, colocadas em dessecador por 2 horas e pesadas em balança analítica. Posteriormente, as amostras foram colocadas em cadinhos de porcelana e queimadas em forno mufla a 525ºC por 3 horas, para a determinação das cinzas e do teor de FDN e FDA na matéria orgânica.

3.5 Determinação *in situ* de MSi e FDNi

As amostras de ofertado e de fezes foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 60ºC, moídas para passar em peneira de 1 mm em moinho de facas tipo Willey e pesadas (0,5 g) dentro de saquinhos Ankon F57 (BENDER; COOK; COMBS, 2016). Estes foram acondicionados em sacos de nylon (até 04 saquinhos por saco de nylon) e incubados no rúmen de carneiros canulados por um período de 240 horas (CASALI et al., 2008).

Foram utilizados 7 carneiros machos da raça Santa Inês, com peso corporal médio de 63 kg ± 7,6 Kg com cânulas no rúmen. Durante o período de incubação os animais permaneceram em baias coletivas, com acesso à água e sal mineral à vontade. Foram alimentados com dieta composta por 60% de volumoso (feno de Tifton 85) e 40% concentrado (milho e soja). A dieta foi ofertada no período da manhã e no período da tarde, considerando o consumo médio de MS de 3% do peso vivo de cada animal.

Após a incubação as amostras foram lavadas com água de torneira em máquina de lavar em dois ciclos de 45 minutos e levadas para estufa com circulação de ar a 60ºC por 72 horas. Para a determinação da matéria seca indigestível (MSi g Kg^{-1} de MS), as amostras foram secas em estufa não ventilada (102ºC por 24 horas), colocadas em dessecador por 2 horas e pesadas em balança analítica (CASALI et al., 2008). Em seguida, realizou-se a determinação da fração de fibra em detergente neutro indigerível (FDNi g Kg^{-1} de MS), seguindo a metodologia de determinação de FDN sugerida por de Van Soest, Robertson e Lewis (1991) e adaptada por Mertens (2002).

Após a determinação da fração de FDNi, os saquinhos Ankon foram abertos e em torno de 20% do resíduo de cada amostra foi coletado para a determinação da abundância natural do isótopo de carbono ($^{13}C/^{12}C$), o restante da amostra foi colocada em cadinhos e queimada em forno mufla a 525ºC por 3 horas, para a determinação das cinzas (MM).

3.6 Análise elementar por fluorescência de raios-X

Para a determinação elementar por fluorescência de raios-X nas fezes e no ofertado foram utilizadas amostras secas, moídas a 0,25 mm em moinho de facas tipo Willey e peneiradas em peneira de aço inoxidável de 0,15 mm. Foram utilizados 100 mg de cada amostra acondicionados em cubetas de plástico com a abertura inferior (lado de análise por FRX) selada por um filme de polipropileno de 6 μm (P/N: FPP25-R3, LGC Standards, Manchester-NH, USA). As amostras foram compactadas com auxílio de bastão de vidro e a abertura superior foi coberta com filme PVC comercial com um furo central realizado com uma agulha hipodérmica. Em seguida, as cubetas foram levadas para o espectrômetro de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) de bancada (EDX720, Shimadzu, Japão). As análises foram realizadas a vácuo e as concentrações de cada elemento foram determinadas pelo método de

parâmetros fundamentais (PF) fornecido pelo software Shimadzu, considerando a matriz de celulose. Para avaliação da veracidade da análise dos elementos Ca, P, S, K, Fe, Mn e Zn, foi utilizada a amostra de referência padrão de folhas de maçã (NIST 1515), certificada pelo Instituto Nacional de Normalização e Tecnologia (NIST).

Foi utilizada uma solução comercial (1 mg ml^{-1} de Ti, Acros Organics) para desenvolver um padrão interno para o titânio (Ti), visando aferir a capacidade de recuperação para esse elemento usando a técnica de EDXRF. Para isso, foram preparados 0,5 g das amostras de fezes e de forragem com uma quantidade conhecida de Ti (Spike), sendo adicionado em cada matriz (fezes e forragem) 100 mg kg^{-1} de Ti da solução comercial. As amostras foram secas por 2 horas em estufa não ventilada a 60ºC, homogeneizadas em almofariz por 10 minutos e pesados 100 mg em cubetas para análise em EDXRF. A recuperação (%) para cada elemento na amostra de referência (NIST 1515) e no Spike, foram determinadas de acordo com a equação 1:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Valor EDXRF (mg Kg}^{-1}\text{)}}{\text{Valor certificado (mg Kg}^{-1}\text{)}} * 100 \qquad (1)$$

Onde, Valor EDXRF (mg Kg^{-1}) é o valor obtido na amostra certificada e no Spike, pela técnica de EDXRF; e o Valor certificado (mg Kg^{-1}) é o valor conhecido da amostra certificada pelo NIST e no Spike.

Valores de recuperação acima de 80% foram considerados satisfatórios (Tabela 3). Devido à baixa recuperação para as amostras de fezes, foram preparadas 6 amostras com diferentes concentrações de Ti para a obtenção de uma curva de calibração para essa matriz (0, 200, 400, 600, 800 e 1000, mg kg^{-1} de Ti). Para isso, utilizou-se 6 amostras de 500 mg de fezes, pesadas em placas de Pétri, para o preparo de cada concentração. As concentrações foram obtidas adicionando 100 mg kg^{-1} de Ti (solução padrão em fase liquida de 1 mg ml^{-1} de Ti, Acros Organics) em intervalos de 2 horas, até atingir as concentrações desejadas em cada amostra, durante este período as amostras foram mantidas em estufa não ventilada a 60ºC. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em almofariz por 10 minutos e foram transferidos 100 mg em cubetas para análise em EDXRF.

3.7 Análise isotópica do carbono ($^{13}C/^{12}C$)

A abundancia natural de $^{13}C/^{12}C$ nas fezes, no ofertado e no resíduo do FDNi, foi determinada nas amostras secas a 60ºC em estufa de circulação forçada de ar, moídas a 0,25 mm em moinho de facas tipo Willey e pesadas (entre 2,4 a 2,7 mg) dentro de cápsulas de estanho, com auxílio de balança analítica. Em seguida, foram analisadas por combustão e sob fluxo contínuo de hélio, usando um analisador elementar (Carlo Erba, modelo CH-1110, Milão, Itália), acoplado a um espectrômetro de massas Thermo Scientific (Delta Plus, Bremen, Alemanha) para a realização da leitura do valor isotópico.

As razão isotópica (R) de carbono (C) foi expressa como valores de $\delta^{13}C$, em partes por 1000 (‰), em relação ao padrão internacional Vienna PeeDee Belemnite - VPDB, de acordo com a equação 2 descrita por Smet et al. (2004):

$$\delta\ ^{13}\text{C da amostra (‰)} = \left(\frac{\text{R amostra} - \text{R padrão}}{\text{R padrão}}\right) \times 1000 \qquad (2)$$

Onde, R amostra é a razão isotópica do carbono da amostra; e R padrão é a razão isotópica do carbono no padrão internacional (VPDB).

3.8 Estimativa da digestibilidade aparente

A digestibilidade aparente dos nutrientes de cada dieta foi determinada pelo método de coleta total (CT) de sobras e fezes em gaiolas para ensaios de metabolismo, de acordo com a equação 3 descrita por McDonald et al. (2011). O resultado obtido com este método foi usado como padrão, em comparação com outros métodos de estimativa da digestibilidade aparente avaliados neste estudo.

$$\text{Digestibilidade (\%)} = \frac{\text{Nutriente consumido} - \text{Nutriente nas fezes}}{\text{Nutriente consumido}} \text{x } 100 \qquad (3)$$

Onde, Nutriente consumido (g kg^{-1} da MS) é o valor ofertado de cada nutriente subtraído pelo valor de nutrientes nas sobras; Nutriente nas fezes (g kg^{-1} de MS) é a concentração de cada nutriente nas fezes; e os Nutrientes são as variáveis da análise bromatológica (MS, MO, FDN, FDA e PB).

A digestibilidade aparente da matéria seca (DMS) das dietas foi estimada pelo método de marcadores internos e por equações utilizando nitrogênio fecal. Para a estimativa da digestibilidade aparente dos nutrientes pelo método de marcadores internos, utilizou-se a equação 4 descrita por Church (1988). A matéria seca indigestível (MSi), a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e o titânio de ocorrência natural (Ti), foram os marcadores internos avaliados.

$$\text{D (\%)} = 100 - \left(100 \times \frac{\text{Marcador no alimento (g Kg}^{-1})}{\text{Marcador nas fezes (g Kg}^{-1})} \times \frac{\text{Nutriente nas fezes (g Kg}^{-1})}{\text{Nutriente no alimento (g Kg}^{-1})}\right) \qquad (4)$$

Onde, D (%) é a digestibilidade aparente de cada nutriente nas dietas; Marcador no alimento (g Kg^{-1}) é a concentração de cada marcador na dieta; Marcador nas fezes (g Kg^{-1}) é a concentração de cada marcador nas fezes; e os Nutrientes são as variáveis da análise bromatológica (MS, MO, FDN, FDA e PB).

Para a estimativa da DMS pela técnica de N fecal foram utilizadas 12 equações adquiridas na literatura, desenvolvidas a partir de ensaios de digestibilidade em gaiolas para estudos de metabolismo com ruminantes alimentados por diferentes dietas a base de forragem (Tabela 2). Para as equações baseadas no valor de PB nas fezes, utilizou-se os resultados de PB das fezes coletadas no ensaio *in vivo*, obtidos de acordo com o protocolo da AOAC, (2011). Para as equações baseadas nos valores de N nas fezes, os resultados de PB foram convertidos pela divisão por 6,25.

Tabela 2 - Equações para a estimativa da digestibilidade aparente da MS, desenvolvidas através de ensaios em gaiolas para estudos de metabolismo, com base na concentração de N fecal

	Dietas	Equações	Elaboradores
EqN. 1	Forragem conservada	D=0,9−(5,13/Nf)	Schmidt e Jentsch (1994)
EqN. 2	Forragem fresca	D=0,8955−(4,6/Nf)	Schmidt et al. (1999)
EqN. 3	Forragem fresca	D=0,866−26,623/PBf	Boval et al. (2003)
EqN. 4	Feno de pastagem heterogênea	D=0,899−0,644*exp(−0,5774*PBf/100)	Wang et al. (2009)
EqN. 5	Feno de diversas forragens (gramíneas e leguminosas)	D=0,7246−0,3598exp[(−0,9052*PBf)/100]	Peripolli et al. (2011)
EqN.6	Forragem fresca em 3 estágios fenológicos	D =1,01557–39,6067/PBf	Azevedo et al. (2014)
EqN. 7	Forragem fresca em 3 estágios fenológicos	D=1,1151−23,4416/PBf−0,000590151*FDAf	Azevedo et al. (2014)
EqN. 8	Forragem fresca de milheto	D=1,5313−1,1486exp(−0,154×PBf/100)	David et al. (2014)
EqN. 9	Forragem fresca de milheto	D=1,29325−98,2962/PBf−0,000239755*FDNf	David et al. (2014)
EqN. 10	Feno de forragem tropical	D=0,81−0,40/Nf	Kozloski et al. (2014)
EqN. 11	Forragem fresca temperada	D=0,95−0,55/Nf	Kozloski et al. (2014)
EqN. 12	Feno de gramínea e leguminosa tropical	D=0,35−(−0,69)/Nf	Kozloski et al. (2014)

Obs.: As equações 1 e 2 foram desenvolvidas utilizando bovinos como unidade animal, as demais equações foram desenvolvidas com ovinos. Nf = Nitrogênio fecal; PBf = Proteína bruta fecal; FDAf = Fibra em detergente ácido fecal; FDNf = Fibra em detergente neutro fecal.

3.9 Estimativa da proporção de ingestão de gramínea e leguminosa

A proporção de ingestão de gramínea e leguminosa foi determinada pelo método de coleta total, de acordo com a quantidade ofertada em cada dieta e a coleta total e fracionamento das sobras (Equação 5). O resultado desta equação foi usado como padrão em comparação com os valores estimados por equações com base nos valores de $\delta^{13}C$ nas fezes e no ofertado.

$$C4(\%) = \left(\frac{\text{C4 consumida}}{\text{C3 consumida} + \text{C4 consumida}}\right) \times 100 \qquad (5)$$

A estimativa da proporção de ingestão de MS de gramínea e leguminosa foi calculada através das equações 6, 7 e 8, adaptadas de Norman et al. (2009):

$$\mathrm{C4}(\%) = 100 - \left(100 * \left(\frac{\left(\delta\,^{13}\mathrm{C\ Fezes} - \delta\,^{13}\mathrm{C\ C4}\right)}{\left(\delta\,^{13}\mathrm{C\ C3} - \delta\,^{13}\mathrm{C\ C4}\right)}\right)\right) \quad (6)$$

$$\mathrm{C4}(\%) = 100 - \left(100 * \left(\frac{\left(\delta\,^{13}\mathrm{C\ Fezes} - \delta\,^{13}\mathrm{C\ C4} - \mathrm{F}\right)}{\left(\delta\,^{13}\mathrm{C\ C3} - \delta\,^{13}\mathrm{C\ C4}\right)}\right)\right) \quad (7)$$

$$\mathrm{C4}(\%) = 100 - \left(100 \Big/ \left(\left(\frac{\left((100 - \mathrm{DC3}) \times ((\delta^{13}\mathrm{C\ C3} + \mathrm{F}) - \delta^{13}\mathrm{C\ Fezes})\right)}{\left((100 - \mathrm{DC4}) \times \left(\delta^{13}\mathrm{C\ Fezes} - (\delta^{13}\mathrm{C\ C4} + \mathrm{F})\right)\right)}\right) + 1\right)\right) \quad (8)$$

Onde, δ^{13}C Fezes – é o valor de δ^{13}C nas fezes; δ^{13}C C_4 – é o valor de δ^{13}C de planta C_4; δ^{13}C C_3 – é o valor de δ^{13}C de planta C_3; F – é o fator de fracionamento de δ^{13}C nas fezes; DC_3 – é a digestibilidade da planta C_3; e DC_4 – é a digestibilidade da planta C_4.

A equação 6 baseia-se na suposição de que não ocorre discriminação do ^{13}C no sistema digestório dos animais e não leva em consideração as diferenças na digestibilidade entre plantas de ciclo C_3 e C_4. A equação 7 assume que o ^{13}C foi discriminado, com o fator de discriminação de δ^{13}C nas fezes sendo de –0,94 ‰ (NORMAN et al., 2009), mas não considera diferenças na digestibilidade entre plantas de ciclo C_3 e C_4. A equação 8 considera a discriminação do ^{13}C e supõe que existe diferenças na digestibilidade da plantas C_3 e C_4 (HELLWING et al., 2015; JONES et al., 1979; NORMAN et al., 2009).

3.10 Estimativa de consumo de matéria seca (CMS)

O consumo de nutrientes de cada dieta foi estimado de acordo com a equação 9 descrita por Carvalho et al. (2007). Os dados de produção fecal foram obtidos por coleta total em gaiola para estudo de metabolismo. Foram utilizados os resultados de digestibilidade aparente obtidos pelo método de coleta total, de marcadores internos e por equações com base na concentração de N fecal. O consumo estimado com a produção fecal e a digestibilidade aparente determinadas por coleta total, foi considerado como padrão em comparação com o consumo estimado através dos resultados de digestibilidade aparente pelos métodos de marcadores internos e N fecal.

$$\text{Consumo de nutrientes (g d}^{-1}\text{da MS)} = \left(\frac{\text{Produção fecal (g d}^{-1})}{(1 - \text{Digestibilidade (\%)})}\right) \quad (9)$$

Onde, Produção fecal (g d^{-1}) – é a produção fecal obtida por coleta total em gaiolas para estudos de metabolismo; e a Digestibilidade – é a digestibilidade aparente da dieta estimada por diferentes métodos.

A proporção de consumo de matéria de seca (CMS) de C_3 e C_4 foi estimada através de três abordagens. A primeira abordagem utilizou os resultados de produção fecal e da digestibilidade aparente da matéria seca (DMS) obtidos pelo método de coleta total, com a inclusão da concentração de C_3 e C_4 nas fezes estimada por $\delta^{13}C$, como descrito na equação 10, proveniente da adaptação da equação 3 (McDONALD et al., 2011) e da equação 9 (CARVALHO et al., 2007).

$$\text{DMS C3 (\%)} = \frac{\text{C3 consumida} - (\text{Produção fecal} \times \text{\%C3 por } \delta^{13}\text{C})}{\text{C3 consumida}} \text{ x } 100$$

$$+ \quad (10)$$

$$\text{CMS de C3 (g d}^{-1}) = \left(\frac{\text{Produção fecal (g d}^{-1}) \times \text{ \%C3 por } \delta^{13}\text{C}}{(1 - \text{DMS C3 (\%)})}\right)$$

Onde, DMS C_3 (%) – é a digestibilidade da planta C_3; CMS de C_3 (g d^{-1}) – é o consumo de matéria seca de planta C_3; Produção fecal (g d^{-1}) – é a produção fecal obtida por coleta total em gaiolas para estudos de metabolismo; e %C_3 por $\delta^{13}C$ – é a porcentagem de planta C_3 nas fezes estimada por $\delta^{13}C$.

A segunda abordagem estima o CMS de C_3 e C_4 através da produção fecal obtida por coleta total, com a inclusão da concentração de C_3 e C_4 nas fezes estimada por $\delta^{13}C$ e utiliza a digestibilidade de cada dieta estimada com marcadores internos, pressupondo que não existe diferença de digestibilidade entre as plantas que compõem as dietas, como descrita na equação 11 adaptada de Carvalho et al. (2007).

$$\text{CMS de C3 (g d}^{-1}) = \left(\frac{\text{Produção fecal (g d}^{-1}) \times \text{ \%C3 por } \delta^{13}\text{C}}{(1 - \text{DMS (\%)})}\right) \quad (11)$$

Onde, CMS de C_3 (g d^{-1}) – é o consumo de MS de planta C_3; Produção fecal (g d^{-1}) – é a produção fecal obtida por coleta total em gaiolas para estudos de metabolismo; %C_3 por $\delta^{13}C$ – é a porcentagem de planta C_3 nas fezes estimada por $\delta^{13}C$; e DMS (%) – é a digestibilidade das dietas, estimada por marcadores internos (equação 04).

A terceira abordagem utiliza a digestibilidade aparente da MS de cada planta (C_3 e C_4) das dietas, estimada com a equação 12 adaptada de CHURCH (1988), que considera a inclusão da fração de FDNi de planta C_3 e C_4 na dieta e a concentração de FDNi de C_3 e C_4 nas fezes (estimada por análise de $\delta^{13}C$ no resíduo da fração total de FDNi das fezes).

$$\text{DMS C3 (\%)} = 100 - \left(100 \times \left(\frac{\text{FDNi de C3 na dieta (g Kg}^{-1})}{\text{FDNi nas fezes(g Kg}^{-1}) \text{ x \%FDNi de C3 nas fezes}}\right)\right) \qquad (12)$$

Onde, DMS C_3 (%) – é a digestibilidade da planta C_3 estimada por FDNi; FDNi de C_3 na dieta (g kg^{-1}) – é fração total de FDNi de planta C_3 na dieta; FDNi nas fezes (g kg^{-1}) – é fração total de FDNi nas fezes; e %FDNi de C_3 nas fezes – é a fração de FDNi provinda de planta C_3 dentro da fração total de FDNi nas fezes, obtida a partir da análise de $\delta^{13}C$ no resíduo da fração total de FDNi das fezes.

Com isso, a proporção de CMS de planta C_3 e C_4 foi estimada com a equação 13 adaptada de Carvalho et al. (2007), considerando a produção fecal provinda de planta C_3 e C_4 estimada por $\delta^{13}C$ e a digestibilidade aparente da MS de cada planta, estimada com a equação 12.

$$\text{CMS de C3 (g d}^{-1}) = \left(\frac{\text{Produção fecal (g d}^{-1}) \times \text{ \%C3 por } \delta\ ^{13}\text{C}}{(1 - \text{DMS C3 (\%)})}\right) \qquad (13)$$

Onde, CMS de C_3 (g d^{-1}) – é o consumo de MS de planta C_3; Produção fecal (g d^{-1}) – é a produção fecal obtida por coleta total em gaiolas para estudos de metabolismo; %C_3 por $\delta^{13}C$ – é a porcentagem de planta C_3 nas fezes estimada por $\delta^{13}C$; e DMS C_3 (%) – é a digestibilidade de planta C_3, estimada por FDNi e $\delta^{13}C$ (equação 12).

3.11 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise estatística utilizando o software R (R Core Team, 2019). Os dados de digestibilidade e de consumo das dietas foram submetidos a análise de variância (ANOVA) considerando as dietas e os métodos de determinação (coleta total, marcadores internos e N fecal) como efeitos fixos. Foi realizada a comparação múltipla entre as médias pelo teste de Tukey utilizando o pacote "agricolae" (MENDIBURU, 2019) e o pacote "emmeans" (LENTH, 2019), considerando o nível de 5% de significância, conforme o seguinte modelo:

$$Yijk = \mu + Di + Mj + (D \times M)ij + Ak + eijk \quad (13)$$

Onde, Yijk – são as variáveis dependentes (digestibilidade, consumo e proporção de consumo de gramínea e leguminosa) para cada animal "k", em cada dieta "i", obtidas por diferentes métodos de determinação "j" (Coleta total, marcadores internos e N fecal); μ – é a média geral; Di – é o efeito fixo de dietas; Mj – é o efeito fixo dos métodos de determinação; (D x M) – é o efeito de interação entre dietas e métodos de determinação; Ak – é o efeito aleatório das unidades experimentais representadas pelos animais; e eijk – é o erro experimental.

Além da comparação de médias pelo teste de Tukey, foi utilizada regressão linear através do pacote "ggplot2" (WICKHAM, 2016) para avaliar a relação da proporção de consumo de gramínea e leguminosa estimada por marcadores internos em comparação com os valores reais de consumo determinados por coleta total.

4 RESULTADOS

A recuperação para cada elemento químico, com base na comparação dos valores de amostras de referência padrão certificada pelo NIST e nas amostras de padrão interno (Spike) determinadas por EDXRF estão apresentados na Tabela 3. Dos elementos presentes na amostra certificada pelo NIST, somente o Zn apresentou recuperação insatisfatória (<80%).

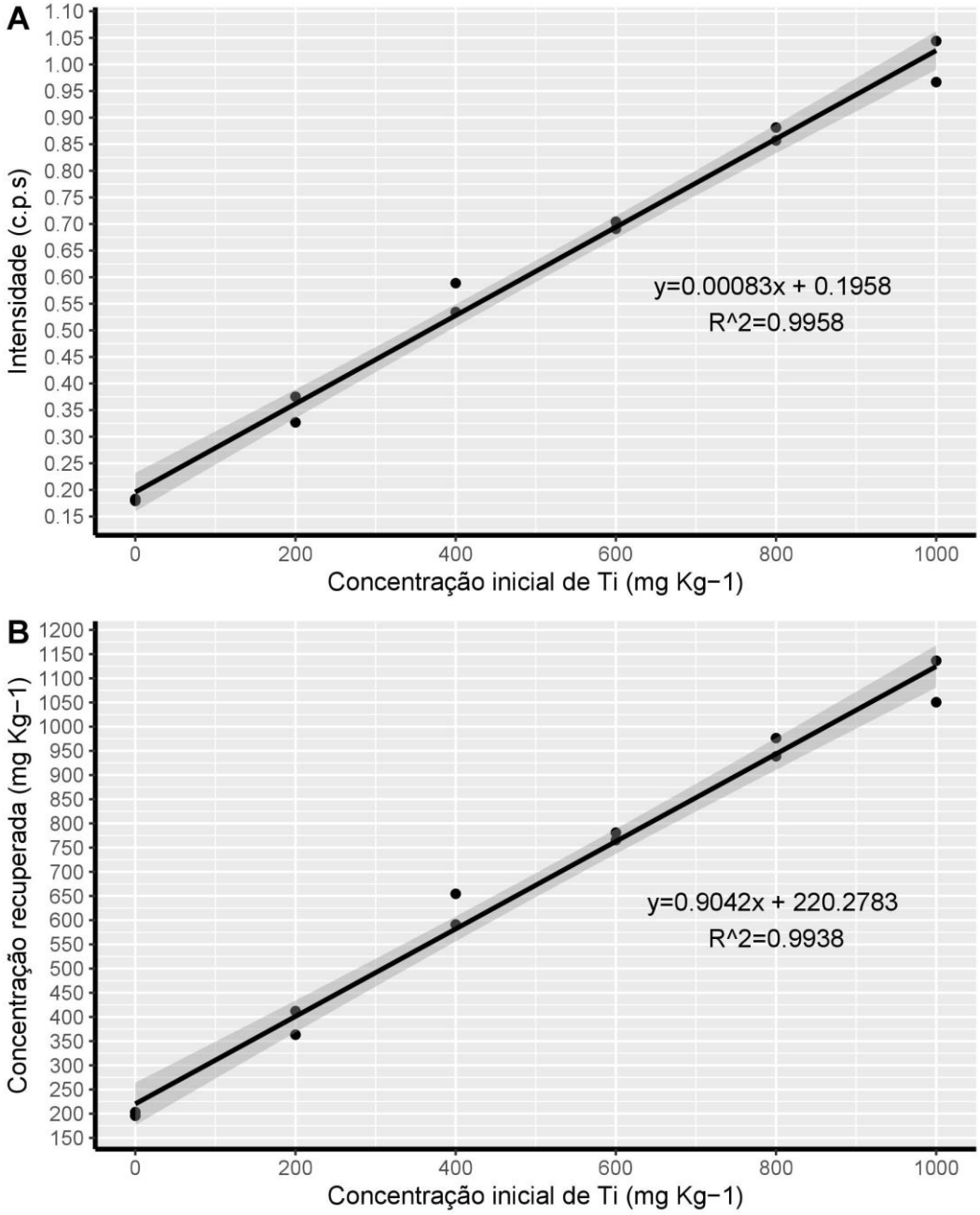
Tabela 3 – Comparação entre valores certificados e valores determinados por EDXRF

Amostras	Elementos	Valor certificado	Valor encontrado	Recuperação[2]
		----------mg Kg^{-1}----------		-----%-----
NIST 1515	Ca	15250	12280,880	80,530
NIST 1515	P	1593	1564,386	98,204
NIST 1515	S	1800	1504,039	83,558
NIST 1515	K	16080	14167,061	88,104
NIST 1515	Fe	82,700	78,380	94,776
NIST 1515	Mn	54,100	47,119	87,096
NIST 1515	Zn	12,450	7,738	62,153
Fezes[1]	Ti	100	68,333	68,333
Forragem[1]	Ti	100	93,043	93,043

NIST – National Institute of Standards e Technology. NIST1515 – Material de referência padrão de folhas de maçã usado na validação de métodos analíticos. [1]Padrão interno de Ti obtido através de solução de título conhecido (1 mg ml^{-1} de Ti, Acros Organics). [2]Recuperação (%) = (Valor encontrado por EDXRF / Valor certificado) x 100.

As amostras com quantidade conhecida de Ti (Spike) desenvolvidas para aferir capacidade de recuperação para este elemento, apresentou alta recuperação para as amostras de forragem (93,043%), no entanto, devido à baixa recuperação do Spike das amostras de fezes (<80%), foi elaborada uma curva de calibração com diferentes concentrações de Ti para essa matriz (Figura 2). A análise de regressão da recuperação de Ti por EDXRF, em intensidade (c.p.s) e em concentração de Ti (mg kg^{-1}), ajustou a linha de tendência linear crescente, com coeficientes de determinação (R^2) de 99,58% e 99,38%, respectivamente, apresentando valores adequados, com baixo erro de previsão para análises de Ti em amostras de fezes.

Figura 2 – Curva de calibração entre os valores de referência (Spike) e os valores recuperados por EDXRF, em intensidade (**A**) e em concentração de Ti (**B**), pelo método de parâmetros fundamentais



A concentração dos marcadores internos avaliados na matéria seca das fezes e nas plantas que compõem cada dieta encontra-se na Tabela 4. Para o limite de detecção da técnica de EDXRF, não foram encontradas concentrações de Cromo (Cr) e Itérbio (Yb) nas forragens estudadas.

Tabela 4 – Concentração média de marcadores internos na matéria seca das plantas compõem cada dieta e nas fezes dos animais alimentados com as dietas CTRL, MAC e MUC

Marcadores	Plantas			Fezes		
	Aruana	Macrotiloma	Mucuna	CTRL	MAC	MUC
---------- g Kg^{-1} de MS ----------						
MSi	302,3 $^{\pm 5,2}$	351,1 $^{\pm 10,8}$	424,5 $^{\pm 12,7}$	525,8 $^{\pm 12,2}$	527,7 $^{\pm 13,7}$	653,7 $^{\pm 11,1}$
FDNi	201,9 $^{\pm 8,4}$	243,9 $^{\pm 8,9}$	320,7 $^{\pm 8,6}$	389,0 $^{\pm 10,9}$	386,6 $^{\pm 15,2}$	484,3 $^{\pm 9,9}$
---------- mg Kg^{-1} de MS ----------						
Ti	91,9 $^{\pm 8,5}$	122,7 $^{\pm 12,5}$	41,46 $^{\pm 3,47}$	158,3 $^{\pm 8,8}$	209,7 $^{\pm 9,6}$	135,8 $^{\pm 2,9}$
Yb	–	–	–	–	–	–
Cr	–	–	–	–	–	–
---------- ‰ ----------						
$\delta^{13}C$	-14,6 $^{\pm 0,1}$	-26,9 $^{\pm 0,1}$	-27,5 $^{\pm 0,04}$	-15,2 $^{\pm 0,03}$	-17,4 $^{\pm 0,09}$	-21,1 $^{\pm 0,4}$

Obs.: Médias ± erro padrão; CTRL – 100% feno de *M. maximus* cv. Aruana; MAC – 75% feno de *M. maximus* cv. Aruana e 25% feno de *M. axillare*; MUC – 50% feno de *M. maximus* cv. Aruana e 50% feno de *S. aterrimum*. Ti – Titânio de ocorrência natural. FDNi – Fibra em detergente neutro indigestível. MSi – Matéria seca indigestível.

Houve interação significativa entre os métodos de determinação (marcadores internos e coleta total) e as dietas analisadas (P<0,0001) para os resultados de digestibilidade aparente (Tabela 5). Não houve diferença significativa de digestibilidade aparente entre as dietas CTRL, MAC e MUC para todas as variáveis bromatológicas, quando determinadas por coleta total (CT) ou estimadas com os marcadores FDNi e MSi. No entanto, para o marcador Ti a digestibilidade aparente da dieta MAC foi superior aos resultados estimados para as dietas CTRL e MUC.

Tabela 5 – Digestibilidade aparente dos nutrientes determinada pelo método de coleta total e estimada por marcadores internos, para dietas com diferentes proporções de gramíneas e leguminosas

Método de determinação	Dietas		
	CTRL	MAC	MUC
	Digestibilidade aparente da matéria seca (%)		
Coleta total	$60,4^{Aa\ \pm 2,00}$	$58,1^{Ab\ \pm 2,00}$	$56,2^{Aa\ \pm 2,00}$
Ti	$49,1^{Bb\ \pm 2,36}$	$69,3^{Aa\ \pm 2,00}$	$55,1^{Ba\ \pm 2,00}$
FDNi	$48,0^{Ab\ \pm 2,00}$	$44,9^{Ac\ \pm 2,00}$	$46,7^{Aab\ \pm 2,00}$
MSi	$42,3^{Ab\ \pm 2,00}$	$40,4^{Ac\ \pm 2,00}$	$45,0^{Ab\ \pm 2,00}$
Valor de P	<0,0001		
	Digestibilidade aparente da matéria orgânica (%)		
Coleta total	$62,1^{Aa\ \pm 1,81}$	$60,3^{Ab\ \pm 1,81}$	$58,3^{Aa\ \pm 1,81}$
Ti	$50,6^{Bb\ \pm 2,14}$	$70,8^{Aa\ \pm 1,81}$	$57,7^{Ba\ \pm 1,81}$
FDNi	$50,0^{Ab\ \pm 1,81}$	$47,5^{Ac\ \pm 1,81}$	$49,9^{Aab\ \pm 1,81}$
MSi	$44,5^{Ab\ \pm 1,81}$	$43,2^{Ac\ \pm 1,81}$	$48,3^{Ab\ \pm 1,81}$
Valor de P	<0,0001		
	Digestibilidade aparente da fibra em detergente neutro (%)		
Coleta total	$60,9^{Aa\ \pm 2,32}$	$57,4^{Ab\ \pm 2,32}$	$53,3^{Aa\ \pm 2,32}$
Ti	$45,4^{Bb\ \pm 2,48}$	$68,9^{Aa\ \pm 2,32}$	$52,4^{Ba\ \pm 2,32}$
FDNi	$48,5^{Ab\ \pm 2,32}$	$44,2^{Ac\ \pm 2,32}$	$43,6^{Aab\ \pm 2,32}$
MSi	$43,0^{Ab\ \pm 2,32}$	$39,6^{Ac\ \pm 2,32}$	$41,8^{Ab\ \pm 2,32}$
Valor de P	<0,0001		
	Digestibilidade aparente da fibra em detergente ácido (%)		
Coleta total	$46,3^{Aa\ \pm 2,72}$	$40,6^{Ab\ \pm 2,72}$	$43,1^{Aa\ \pm 2,72}$
Ti	$33,0^{Bab\ \pm 3,22}$	$58,1^{Aa\ \pm 2,72}$	$42,6^{Bab\ \pm 2,72}$
FDNi	$31,9^{Ab\ \pm 2,72}$	$24,9^{Ac\ \pm 2,72}$	$32,0^{Aab\ \pm 2,72}$
MSi	$24,6^{Ab\ \pm 2,72}$	$18,7^{Ac\ \pm 2,72}$	$29,9^{Ab\ \pm 2,72}$
Valor de P	<0,0001		
	Digestibilidade aparente da proteína bruta (%)		
Coleta total	$60,5^{Aa\ \pm 3,68}$	$60,1^{Aa\ \pm 3,68}$	$53,8^{Aa\ \pm 3,68}$
Ti	$38,7^{Bb\ \pm 3,68}$	$70,0^{Aa\ \pm 3,68}$	$48,1^{Bab\ \pm 3,68}$
FDNi	$45,8^{Aab\ \pm 3,68}$	$45,6^{Aab\ \pm 3,68}$	$38,3^{Ab\ \pm 3,68}$
MSi	$39,8^{Ab\ \pm 3,68}$	$41,2^{Ab\ \pm 3,68}$	$36,5^{Ab\ \pm 3,68}$
Valor de P	<0,0001		

Obs.: Médias ± erro padrão; CTRL – 100% feno de *M. maximus* cv. Aruana; MAC – 75% feno de *M. maximus* cv. Aruana e 25% feno de *M. axillare*; MUC – 50% feno de *M. maximus* cv. Aruana e 50% feno de *S. aterrimum*. Ti – Titânio de ocorrência natural. FDNi – Fibra em detergente neutro indigestível. MSi – Matéria seca indigestível. Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e da mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de significância.

Para a dieta CTRL todos os marcadores internos subestimaram a digestibilidade da MS, MO e FDN, em comparação com o método de CT, mas para a fração de FDA estimada com Ti os valores não diferiram da digestibilidade aparente determinada pelo método de CT. Não houve diferença significativa para a digestibilidade aparente da PB entre os métodos de CT e de FDNi para essa dieta.

Os resultados de digestibilidade aparente do tratamento MAC obtidos com marcadores internos diferiram dos resultados determinados pelo método de CT, para as variáveis bromatológicas MS, MO, FDN e FDA. Os marcadores FDNi e MSi subestimam a digestibilidade aparente dos nutrientes, enquanto o marcador Ti tende a superestimar estes valores, em relação a CT. Para a digestibilidade aparente da PB os marcadores Ti e FDNi apresentaram resultados semelhantes aos da CT. Na dieta MUC não houve diferença significativa entre o método de CT e o marcador Ti para a digestibilidade aparente dos nutrientes, no entanto, os resultados estimados com FDNi e MSi foram inferiores aos encontrados por CT.

Houve interação significativa ($P<0,0001$) entre as equações com base no N fecal e as dietas com diferentes proporções de leguminosas, para a digestibilidade aparente da MS estimada pelo método de N fecal (Tabela 6). Nenhuma das equações apresentaram resultados de digestibilidade aparente semelhantes ao método de CT para as três dietas. Dentre as equações analisadas, as equações 6, 5 e 7 apresentaram valores de digestibilidade aparente similares aos valores determinados pelo método de CT para as dietas CTRL, MAC e MUC, respectivamente.

Tabela 6 – Digestibilidade aparente da matéria seca determinada por coleta total e estimada pelo método de N fecal, para dietas com diferentes proporções de gramíneas e leguminosas

Método de determinação	Dietas		
	CTRL	MAC	MUC
	Digestibilidade aparente da matéria seca (%)		
Coleta total	60,4^{Ab}	58,1^{ABbcd}	56,2^{Be}
EqN. 1	56,0^{Bcdef}	57,5^{Bbcde}	66,8^{Abc}
EqN. 2	59,1^{Bbc}	60,4^{Bb}	68,7^{Ab}
EqN. 3	58,4^{Bbcd}	59,6^{Bbc}	67,3^{Ab}
EqN. 4	52,6^{Bf}	53,5^{Be}	61,0^{Ad}
EqN. 5	57,1^{Bbcde}	57,7^{Bbcd}	62,1^{Ad}
EqN. 6	59,6^{Bbc}	61,5^{Bb}	72,9^{Aa}
EqN. 7	48,1^{Bg}	46,4^{Bf}	53,3^{Ae}
EqN. 8	53,8^{Bef}	54,5^{Bde}	60,4^{Ad}
EqN. 9	05,8^{Ch}	10,4^{Bg}	38,9^{Af}
EqN. 10	54,5^{Bdef}	55,7^{Bcde}	62,9^{Acd}
EqN. 11	58,6^{Bbcd}	60,2^{Bb}	70,1^{Aab}
EqN. 12	80,7^{Aa}	78,7^{Aa}	66,2^{Bbc}
EPM		1,06	
Valor de P		<0,0001	

EPM – Erro padrão da média. CTRL – 100% feno de *M. maximus* cv. Aruana; MAC – 75% feno de *M. maximus* cv. Aruana e 25% feno de *M. axillare*; MUC – 50% feno de *M. maximus* cv. Aruana e 50% feno de *S. aterrimum*. Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e da mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de significância.

Não foram observados efeitos de interação (P>0,05) entre as dietas e os métodos de determinação (marcadores internos e CT) para a estimativa de consumo de nutrientes (Tabela 7). A dieta CTRL apresentou valores de consumo da MS, MO, FDN, FDA e PB inferiores aos encontrados com as dietas MAC e MUC. O consumo de nutrientes estimado com o marcador Ti foi semelhante aos resultados obtidos pelo método de CT, enquanto os valores estimados com a FDNi e MSi subestimaram o consumo.

Tabela 7 – Consumo de nutrientes determinado pelo método de coleta total e estimado por marcadores internos, para ovinos alimentados por dietas com diferentes concentrações de gramíneas e leguminosas

Tratamentos	Consumo (g dia^{-1})				
	MS	MO	FDN	FDA	PB
CTRL	557$^{b\ \pm 50,1}$	565$^{b\ \pm 39,5}$	500$^{b\ \pm 29,6}$	308$^{b\ \pm 31,6}$	56,9$^{b\ \pm 9,54}$
MAC	711$^{a\ \pm 51,2}$	743$^{a\ \pm 40,2}$	624$^{a\ \pm 31,0}$	405$^{a\ \pm 31,8}$	83,1$^{a\ \pm 9,54}$
MUC	674$^{ab\ \pm 50,1}$	694$^{a\ \pm 39,5}$	569$^{ab\ \pm 29,6}$	410$^{a\ \pm 31,6}$	93,0$^{a\ \pm 9,54}$
Valor de P	0,0072	0,0021	0,0149	0,0029	<0,0001
Marcadores	Consumo (g dia^{-1})				
	MS	MO	FDN	FDA	PB
Coleta total	735$^{a\ \pm 47,6}$	752$^{a\ \pm 42,6}$	640$^{a\ \pm 33,6}$	413$^{a\ \pm 29,7}$	89,9$^{a\ \pm 8,01}$
Ti	725$^{a\ \pm 49,6}$	762$^{a\ \pm 43,6}$	632$^{a\ \pm 35,7}$	430$^{a\ \pm 30,3}$	89,1$^{a\ \pm 8,01}$
FDNi	586$^{ab\ \pm 47,6}$	599$^{b\ \pm 42,6}$	512$^{ab\ \pm 33,6}$	340$^{ab\ \pm 29,7}$	68,2$^{b\ \pm 8,01}$
MSi	543$^{b\ \pm 47,6}$	556$^{b\ \pm 42,6}$	474$^{b\ \pm 33,6}$	315$^{b\ \pm 29,7}$	63,5$^{b\ \pm 8,01}$
Valor de P	0,0008	0,0004	0,0008	0,0022	<0,0001

Obs.: Médias ± erro padrão; CTRL – 100% feno de *M. maximus* cv. Aruana; MAC – 75% feno de *M. maximus* cv. Aruana e 25% feno de *M. axillare*; MUC – 50% feno de *M. maximus* cv. Aruana e 50% feno de *S. aterrimum*. Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de significância.

Houve interação significativa entre as equações com base no N fecal e as dietas com diferentes proporções de leguminosa (P<0,0001), para a estimativa do consumo de matéria seca (Tabela 8). Os resultados seguiram a tendência encontrada na estimativa de digestibilidade aparente por N fecal (Tabela 5), com as equações 6, 5 e 7 apresentando os valores de consumo de matéria seca similares aos valores determinados pelo método de CT para as dietas CTRL, MAC e MUC, respectivamente.

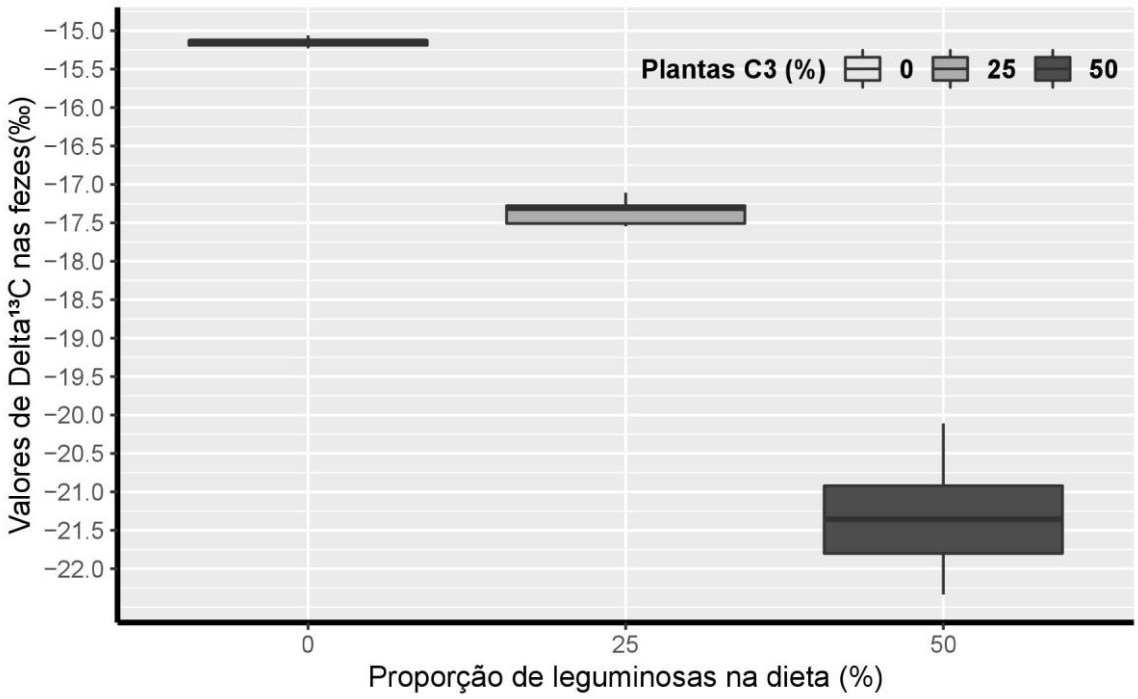
Tabela 8 – Consumo de matéria seca determinado por coleta total e estimado pelo método de N fecal, para ovinos alimentados por dietas com diferentes concentrações de gramíneas e leguminosas

Método de determinação	Tratamentos		
	CTRL	MAC	MUC
	Consumo de matéria seca (g dia^{-1})		
Coleta total	694^{Ab}	764^{Ab}	746^{Abcd}
EqN.1	627^{Bbc}	750^{ABb}	979^{Aabc}
EqN.2	674^{Bb}	805^{ABb}	1040^{Aabc}
EqN.3	663^{Bb}	789^{ABb}	995^{Aabc}
EqN.4	582^{Abc}	685^{Abc}	834^{Aabcd}
EqN.5	643^{Abc}	752^{Ab}	860^{Aabcd}
EqN.6	682^{Bb}	826^{Bb}	1198^{Aa}
EqN.7	532^{Abc}	594^{Abc}	695^{Acd}
EqN.8	598^{Abc}	700^{Abc}	823^{Abcd}
EqN.9	293^{Ac}	355^{Ac}	533^{Ad}
EqN.10	606^{Bbc}	719^{ABbc}	877^{Aabcd}
EqN.11	665^{Bb}	800^{Bb}	1087^{Aab}
EqN.12	1481^{Aa}	1508^{Aa}	991^{Babc}
EPM		77,5	
Valor de P		<0,0001	

EPM – Erro padrão da média. CTRL – 100% feno de *M. maximus* cv. Aruana; MAC – 75% feno de *M. maximus* cv. Aruana e 25% feno de *M. axillare*; MUC – 50% feno de *M. maximus* cv. Aruana e 50% feno de *S. aterrimum*. Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e da mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de significância.

Os valores de $\delta^{13}C$ nas fezes dos ovinos alimentados com as dietas CTRL, MAC e MUC, demonstraram uma tendência decrescente de acordo com a diferença na proporção de leguminosa nas três dietas (Figura 3).

Figura 3 – Relação entre a porcentagem de leguminosa nas dietas e os valores de $\delta^{13}C$ (‰) nas fezes de ovinos



As três equações (equações 6, 7 e 8) utilizadas para estimar a proporção de ingestão de gramíneas e leguminosas a partir dos valores de $\delta^{13}C$ nas fezes, apresentaram relação linear satisfatória (R^2>0,90) em relação com os valores de ingestão observados por coleta total (Figura 4). A Proporção de consumo médio de MS (%) de C_3 e C_4 observados por CT e estimados pelas equações 6, 7 e 8 são expressos na Tabela 9. A equação 6 não diferiu estatisticamente dos valores reais de consumo observados pelo método de CT, apresentando a predição mais precisa em relação as equações 7 e 8, que por sua vez, subestimaram a proporção de consumo das plantas de ciclo C_3.

Figura 4 – Proporção de consumo observada por coleta total e estimada com equações com base no $\delta^{13}C$ das fezes. **A** – Consumo de C_3 (%) pela equação 6. **B** – Consumo de C_3 (%) pela equação 7. **C** – Consumo de C_3 (%) pela equação 8

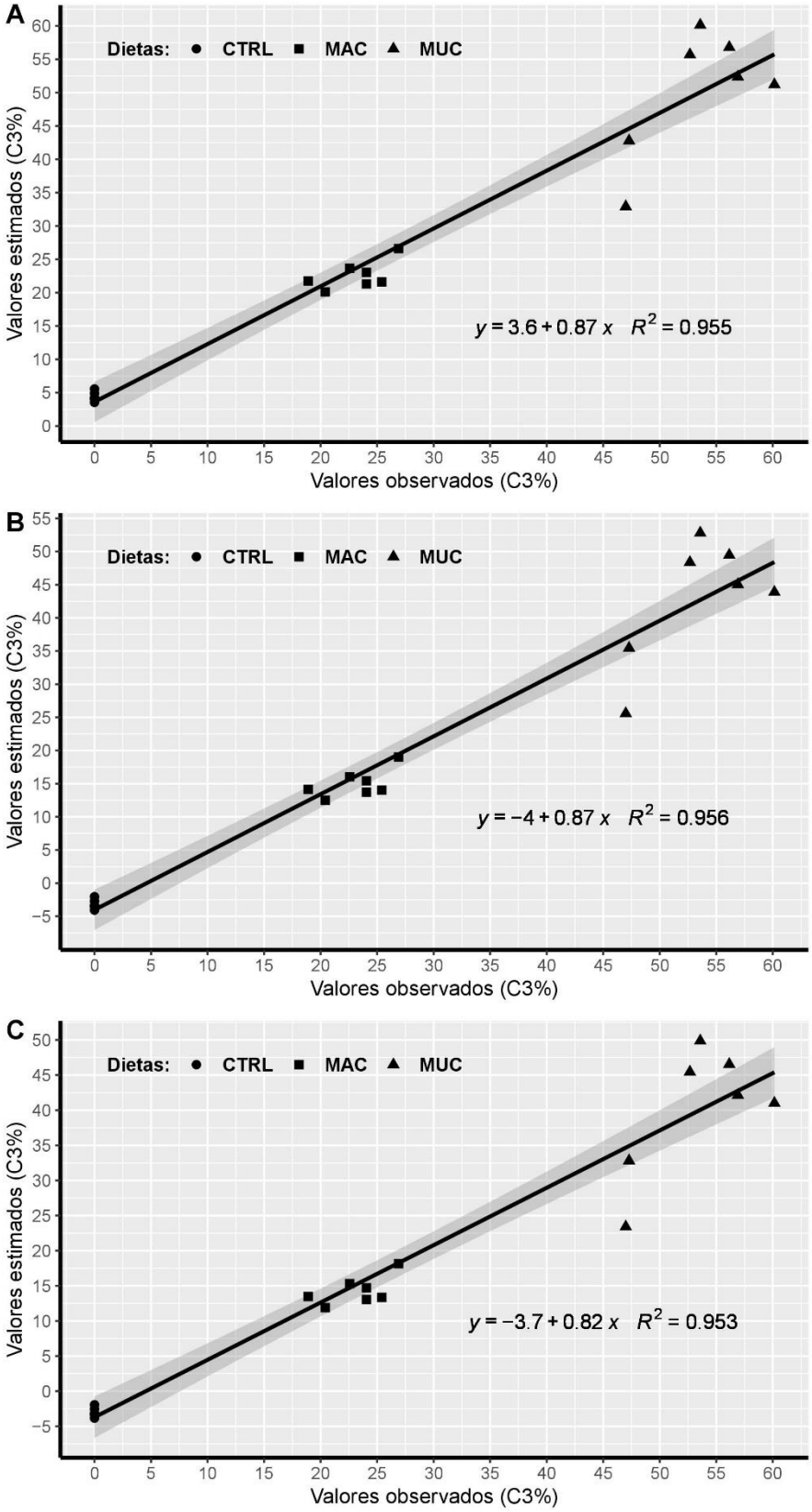


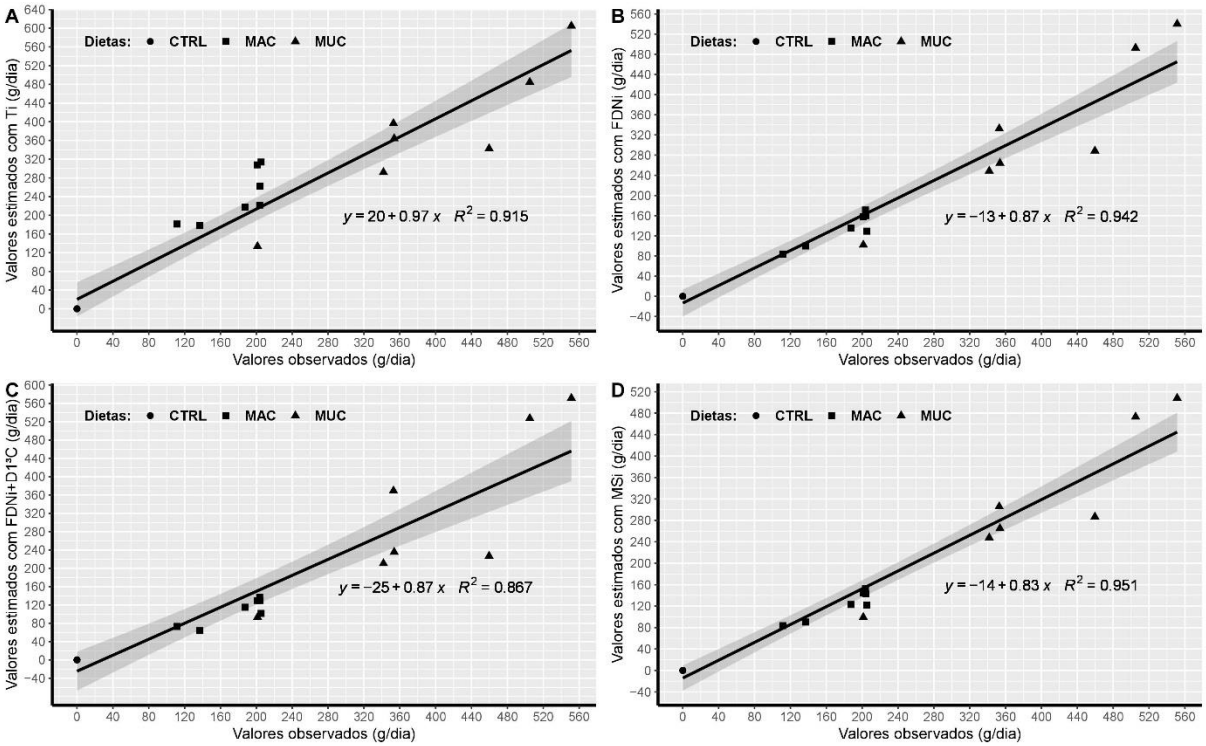
Tabela 9 – Proporção de consumo médio de MS (%) para os tratamentos MAC e MUC, através de valores observados por coleta total e estimados por equações com base nos valores de $\delta^{13}C$ das fezes

Variáveis		Proporção de consumo (%)	
		M. axillare	*M. maximus* cv. Aruana
MAC	Coleta total	$23{,}18^{a\ \pm 1{,}06}$	$76{,}82^{b\ \pm 1{,}06}$
	Equação 6	$22{,}59^{a\ \pm 0{,}80}$	$77{,}41^{b\ \pm 0{,}80}$
	Equação 7	$14{,}98^{b\ \pm 0{,}80}$	$85{,}02^{a\ \pm 0{,}80}$
	Equação 8	$14{,}28^{b\ \pm 0{,}77}$	$85{,}72^{a\ \pm 0{,}77}$
Valor de P		<0,0001	<0,0001
		S. aterrimum	*M. maximus* cv. Aruana
MUC	Coleta total	$53{,}39^{a\ \pm 1{,}85}$	$46{,}61^{b\ \pm 1{,}85}$
	Equação 6	$50{,}27^{ab\ \pm 3{,}56}$	$49{,}73^{ab\ \pm 3{,}56}$
	Equação 7	$42{,}94^{ab\ \pm 3{,}56}$	$57{,}06^{ab\ \pm 3{,}56}$
	Equação 8	$40{,}18^{b\ \pm 3{,}46}$	$59{,}82^{a\ \pm 3{,}46}$
Valor de P		0,0246	0,0246

Obs.: Médias ± erro padrão. MAC – 75% feno de *M. maximus* cv. Aruana e 25% feno de *M. axillare*. MUC – 50% feno de *M. maximus* cv. Aruana e 50% feno de *S. aterrimum*. Médias com mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados de consumo de MS de planta C_3 (g dia^{-1}) observados por CT e estimados por marcadores internos, analisados por regressão linear (Figura 5), se ajustaram a linha de tendência linear crescente, com coeficientes de determinação (R^2) de 0,91, 0,94, 0,86 e 0,95 para Ti, FDNi, FDNi+$\delta^{13}C$ e MSi, respectivamente.

Figura 5 – Relação entre o consumo de MS de planta C_3 (g dia^{-1}) observado por coleta total e estimado por marcadores internos. **A** – Consumo de C_3 por Ti. **B** – Consumo de C_3 por FDNi. **C** – Consumo de C_3 por FDNi+δ^{13}C. **D** – Consumo de C_3 por MSi



A proporção de consumo de C_3 e C_4 (g dia^{-1}) para as dietas MAC e MUC, determinada pelo método de CT e estimada por diferentes abordagens usando marcadores internos é demonstrada na Tabela 10. Não houve interação significativa entre as dietas e os métodos de determinação (P>0,05). Para o tratamento MAC, o CMS de C_3 e C_4 estimado com a equação 11, com o uso do Ti como marcador interno, foi semelhante ao obtido pelo método de coleta total. No entanto, os resultados sugerem que o CMS de C_3 e C_4 foi subestimado quando estimado pela equação 11 com os marcadores internos FDNi e MSi, e com a equação 13 com o uso do FDNi como marcador interno e a inclusão dos valores de δ^{13}C na fração de FDNi. Para o tratamento MUC o CMS de C_3 e C_4 não diferiu estatisticamente quando estimado com os marcadores internos e pelo método de CT, através das equações 10, 11 e 13.

Tabela 10 – Proporção de consumo de C_3 e C_4 (g dia^{-1}) determinada pelo método de coleta total e estimada por marcadores internos, para ovinos alimentados por dietas com diferentes concentrações de gramíneas e leguminosas

Variáveis		Proporção de consumo (g dia^{-1})	
		M. axillare	*M. maximus* cv. Aruana
MAC	[1] Coleta total	178,6$^{ab\ \pm 14,5}$	585,4$^{ab\ \pm 29,7}$
	[2] Ti	212,1$^{a\ \pm 15,3}$	675,1$^{a\ \pm 30,8}$
	[2] FDNi	133,9$^{bc\ \pm 12,3}$	458,8$^{bc\ \pm 40,4}$
	[3] FDNi + δ^{13}C	107,0$^{c\ \pm 10,9}$	498,6$^{bc\ \pm 43,8}$
	[2] MSi	122,7$^{c\ \pm 10,2}$	420,5$^{c\ \pm 33,3}$
	Valor de P	<0,0001	0,0012
		S. aterrimum	*M. maximus* cv. Aruana
MUC	Coleta total	395,1$^{a\ \pm 44,9}$	350,3$^{a\ \pm 45,1}$
	Ti	374,1$^{a\ \pm 56,0}$	349,8$^{a\ \pm 32,5}$
	FDNi	324,1$^{a\ \pm 56,7}$	299,2$^{a\ \pm 34,6}$
	FDNi + δ^{13}C	319,1$^{a\ \pm 66,9}$	312,8$^{a\ \pm 40,2}$
	MSi	312,2$^{a\ \pm 52,7}$	289,7$^{a\ \pm 33,1}$
	Valor de P	0,776	0,684

Obs.: Médias ± erro padrão. [1]Resultados obtidos através da equação 10. [2]Resultados obtidos através da equação 11. [3]Resultados obtidos através da equação 13. MAC – 75% feno de *M. maximus* cv. Aruana e 25% feno de *M. axillare*; MUC – 50% feno de *M. maximus* cv. Aruana e 50% feno de *S. aterrimum.* Médias com mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5 DISCUSSÃO

Os valores recuperados do Spike de Ti para as amostras de forragem foram concordantes com os valores reais, com recuperação de 93,04% e baixo erro de previsão para essa matriz. A regressão das amostras de fezes se ajustou a uma tendência linear, com coeficientes de correlação (R^2) de 99,58% para intensidade (c.p.s) e 99,38% para as concentrações de Ti (mg kg^{-1}). A ANVISA e o INMETRO recomendam valores de coeficiente de correlação iguais ou maiores que 0,99 e 0,90, respectivamente (RIBANI et al., 2004). Assim, estes valores demonstram a qualidade da curva obtida, com baixa dispersão dos valores encontrados, permitindo a utilização da técnica de EDXRF para a determinação de Ti em amostras de forragem e de fezes de ovinos.

Não foram encontradas concentrações de Cr e Yb nas amostras de fezes e forragem, pressupondo que os valores para estes elementos estejam abaixo do limite de detecção (LOD) apresentado pela técnica de EDXRF, que para análise direta de tecido vegetal moído, apresenta um LOD na ordem de dezenas de miligramas do analito por quilograma de tecido avaliado (ALMEIDA et al., 2019).

A inclusão de leguminosa nas dietas MAC e MUC não proporcionou impactos negativos na digestibilidade aparente dos nutrientes quando determinada por CT, FDNi e MSi, em comparação com a dieta CTRL. Mero e Udén (1998) avaliando dietas compostas por feno de *Cenchrus ciliaris* suplementado com leguminosas, não obtiveram diferenças na digestibilidade da matéria seca *in vivo* para dietas suplementadas com leguminosas em comparação com a dieta controle, e quando suplementado com Macrotiloma obtiveram valores similares (57,1%) aos obtidos em coleta total no tratamento MAC (58,1%). Moreira (2017) encontrou valores de DMS de 52,99% para dieta composta por feno de capim-aruana e mucuna preta, sendo próximos aos valores encontrados neste estudo para a dieta MUC. Lima et al. (2018b) obtiveram resultados similares de DMS entre dieta composta somente por capim-aruana (54,62%) e dieta composta por 25% de macrotiloma (55,62%). Estes resultados corroboram com a DMS individual de cada planta que compõem as dietas (Tabela 01), onde é observado uma variação menor que 4% entre as plantas.

Os resultados de digestibilidade estimados com FDNi e MSi assim como observado pelo método de CT também não apresentaram diferença significativa entre as dietas, sugerindo que a inclusão de leguminosas não interfere na estimativa da digestibilidade quando usado FDNi e

MSi, no entanto, estes marcadores subestimaram de digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas em comparação com o método de CT. Na literatura não existe um padrão nos resultados estimados com esses marcadores, Kozloski et al. (2009) apresentam resultados de digestibilidade estimada com MSi e FDNi inferiores aos obtidos por coleta total de fezes. Teixeira et al. (2018) encontraram valores similares entre a digestibilidade dos nutrientes estimada com MSi e FDNi e o métodos de coleta total. Berchielli et al. (2000) apresentaram resultados semelhantes entre a digestibilidade dos nutrientes estimada pelo FDNi e por coleta total de fezes. Magalhães et al. (2018) apresentam resultados de digestibilidade estimada por FDNi semelhantes com os de coleta total e ressaltam a baixa exatidão de estimativa de digestibilidade com MSi.

De acordo com Lippke, Ellis e Jacobs (1986) a falta de homogeneidade dos resultados de digestibilidade obtidos com indicadores internos pode ser atribuída a falta de padronização no método de determinação. Sousa et al. (2019) ressaltam que os resultados observados na literatura são conflitantes e comentam que vários fatores influenciam essas estimativas, incluindo variações nas dietas, animais e metodologias utilizadas. Ferreira et al. (2009) também ressaltam a grande variabilidade de resultados encontrados na literatura e destaca necessidade de cuidados na preparação de amostras e nas técnicas de análise.

Em sinergia com essas suposições, Berchielli et al. (2005) comentam que as prováveis razões para variações na eficácia de frações fibrosas indigestíveis como marcadores internos são em virtude de perdas durante a rotina das análises laboratoriais e decorrentes de perdas de partículas das amostras pelos poros dos sacos nylon durante a incubação ruminal. Kozloski et al. (2009) observaram recuperação incompleta e altamente variável para os marcadores MSi e FDNi nas fezes e consideraram como as prováveis causas, a possibilidade de digestão ou absorção parcial dessas frações, além de possíveis deficiências dos procedimentos analíticos. Watanabe et al. (2010) consideram que presença de componentes como a hemicelulose, pode ser o maior responsável pelas variações encontradas nos diversos experimentos com indicadores internos utilizando a FDNi.

Outra fonte de variação é a seletividade de ingestão pelos animais, que em caso de dietas disponibilizadas a vontade, os animais tendem a selecionar e ingerir uma fração menos fibrosa com qualidade nutricional mais elevada e, consequentemente, com menos marcadores indigestíveis (PEREIRA NETO et al., 2019), diferindo das amostras utilizadas para representar o ofertado, que geralmente são coletadas em uma fração da forragem de maneira aleatória.

O método de estimativa da digestibilidade aparente por marcadores internos utiliza a relação entre a concentração de marcadores na amostra do ofertado e a concentração encontrada nas fezes. Deste modo, quando a amostra que representa o ofertado subestima a qualidade nutricional e a concentração de marcadores internos realmente ingerida pelo animal, consequentemente, os valores de digestibilidade aparente também serão subestimados. Berchielli et al. (2005) relatam a possibilidade de seleção na ingestão de forragem pelos animais quando se trabalha com marcadores internos, ressaltando a importância de realizar uma correção nos dados de ingestão do marcador em relação à fibra indigestível presente nas sobras, além de sugerirem a realização de oferta limitada da dieta, na tentativa de evitar a presença de sobras e a seleção de forragem, no entanto, essa pratica só é usual em casos de ambientes experimentais controlados.

Neste trabalho as amostras foram colocadas em sacos de Ankon F57 e acondicionadas em sacos de nylon para a incubação ruminal, evitando perdas de partículas das amostras pelos poros dos sacos nylon. No entanto, os animais não tiveram restrição do ofertado, permitindo a possibilidade de seleção na ingestão, as sobras não foram incubadas para a determinação de FDNi e MSi, realizando a correção das sobras só para o método de coleta total. Desta forma, acredita-se que as diferenças de digestibilidade entre os métodos de coleta total, MSi e FDNi, estejam relacionadas com a digestão parcial desses marcadores, além de amostras de ofertado pouco representativas ao que realmente foi ingerido e os erros provenientes do próprio método analítico.

A utilização do Ti como marcador interno apresentou resultados de digestibilidade aparente dos nutrientes com alta semelhança aos encontrados por coleta total para a dieta MUC, no entanto, os resultados variaram para as demais dietas, subestimando a digestibilidade da dieta CTRL e superestimando a digestibilidade da dieta MAC. Uma possível explicação para essa variação seria a baixa concentração de Ti nas amostras das dietas e nas fezes. Velásquez et al. (2018) comentam que marcadores com baixas concentrações tornam a análise química menos confiável, devido ao aumento da dificuldade de detectar diferenças em pequenas quantidades de resíduos que são deixadas para trás após a realização dos procedimentos. Berchielli et al. (2000) comentam que a baixa concentração de marcadores internos é responsável por resultados indesejáveis, destacando possíveis contaminações como fonte de variação. Assim, é evidente a necessidade de maior critério no preparo das amostras, para a obtenção de material representativo e sem contaminações, para a redução da variação dos resultados.

Apesar da variação na dieta CTRL e MAC, o Ti demonstrou eficiência na estimava da digestibilidade aparente dos nutrientes para a dieta MUC, apresentando requisitos suficientes para ser um marcador adequado. Os atributos mais importantes de um bom marcador, são recuperação completa nas fezes, medição quantitativa precisa, serem quimicamente discretos, de modo que tenha certeza sobre se o marcador testado nas fezes é quimicamente idêntico ao testado na dieta, inércia em termos de não ter efeito sobre o animal e ser intimamente associado ao material marcado (DOVE; MAYES, 2005; 2006). Berchielli et al. (2005) relatam a importância do marcador ser uniformemente distribuído na dieta e comentam que amostras não representativas alteram a concentração do marcador em relação à sua concentração na digesta verdadeira. É esperado uma distribuição homogênea do Ti nas forragens da dieta MUC, uma vez que com esse marcador a digestibilidade não foi subestimada nessa dieta. Estudos da concentração deste marcador nas partes morfológicas das plantas forrageiras podem ajudar a reforçar o seu potencial de utilização como marcador interno, visando reduzir um dos principais problemas da estimativa de digestibilidade de forragem em pastejo, que é a dificuldade de coleta de uma amostra representativa da forragem ingerida.

Também vale ressaltar que não foram encontrados relatos de Ti, ou de outros elementos de ocorrência natural determinados por EDXRF, para o uso como marcadores internos na estimativa da digestibilidade aparente de dietas para ruminantes, desta forma, estes resultados surgem como uma nova alternativa no auxílio de linhas de pesquisas voltadas para esse setor.

Embora não tenha encontrado uma única equação com base no N fecal que fosse capaz de estimar valores de DMS e de CMS com similaridade aos valores encontrados com CT para as 3 dietas estudadas, a EqN 6, EqN 5 e EqN 7 obtiveram resultados semelhantes aos de CT para as dietas CTRL, MAC e MUC, respectivamente. A variação dos valores de DMS e CMS estimados pelo método de N fecal entre as dietas estudadas já era esperada, visto a diferença de concentração de leguminosas em suas composições. De acordo com Carvalho et al. (2007) as principais críticas ao método de N fecal são que, geralmente, há elevada variabilidade individual nos resultados, além da necessidade de se obter uma equação para cada situação de pastejo. De acordo com esses autores, isto ocorre porque a excreção fecal de N de origem endógena e, em menor proporção, o residual do alimento, são dependentes do consumo de N, que difere do assumido pelos modelos.

No entanto, são destacados vários benefícios do método de N fecal para a estimativa da DMS e CMS em dietas de ruminantes, como a facilidade de obtenção de resultados, já que o método depende apenas de equipamentos e técnicas comumente disponíveis na maioria dos laboratórios que realizam testes de rotina de qualidade forragem. As estimativas de digestibilidade podem ser feitas sem dosagem ou amostragem da forragem, evitando problemas relacionados a obtenção de amostras representativas de forragem ingerida como discutido anteriormente, sendo necessário apenas o conhecimento da concentração de N em uma amostra fecal. O método também permite estimativas individuais de animais, em uma ampla gama de condições, incluindo pastejo (AZEVEDO et al., 2014; DAVID et al., 2014; SCHNEIDER et al., 2011).

As equações com base no N fecal geralmente são divididas em duas abordagens, a primeira inclui as equações gerais, desenvolvidas com um número elevado de forrageiras, buscando alcançar uma variação suficiente para que o modelo possa representar e ser capaz de estimar a DMS de um grande número de forragens. A segunda abordagem inclui as equações desenvolvidas em ambientes específicos, essas são voltadas para a estimativa de DMS para um número reduzido de forragens, buscando estimativas mais acuradas e precisas.

A eficiência das equações EqN 6 e EqN 7 na estimativa da DMS e CMS para as dietas CTRL e MUC demonstra que equações gerais também podem obter valores estimados com alta precisão, semelhantes aos apresentados por equações desenvolvidas para situações especificas. Savian et al. (2018) ressaltam a capacidade de equações gerais estimar com precisão a digestibilidade de pastagem para ovinos, independentemente do tipo de forragem e do local para qual a equação foi desenvolvida.

As equações EqN 6 e EqN 7 foram desenvolvidas por Azevedo et al. (2014) com ovelhas alimentadas por dietas compostas por forragens em diferentes estágios fenológicos (vegetativo, pré-floração e floração) em gaiolas metabólicas, levando em consideração que as características químicas e morfológicas das plantas são alteradas devido à mudança do estágio de maturidade e que isso pode interferir na equação de predição da DMS. A EqN 7 teve a inclusão das concentrações de FDA fecal como uma variável de correção.

Os resultados semelhantes de DMS e CMS entre os valores estimados com a equação EqN 5 e os valores determinados pelo método de coleta total para a dieta MAC, são justificados pela grande diversidade de plantas utilizadas no desenvolvimento dessa equação. A equação EqN 5 foi desenvolvida por Peripolli et al. (2011) a partir de experimentos de digestibilidade

realizados com ovelhas alimentadas por 28 forrageiras (puras ou em misturas de gramíneas e leguminosas). De acordo com esses autores, a alta precisão para prever a DMS em pastagem heterogênea para esta equação, é devido à maior variabilidade nos dados de digestibilidade utilizados neste trabalho, incluindo diferentes tipos de forragem com variação suficiente de digestibilidade e de ciclo de produção.

Ainda assim vale salientar a necessidade de desenvolvimento de equações mais especificas para algumas condições, em busca de resultados mais acurados. David et al. (2014) e Boval et al. (2003) comentam que a relação N fecal e digestibilidade é mais precisa quando equações de predição são construídas especificamente para as plantas forrageiras em estudo, em vez de procurar cobrir uma ampla variedade de forragens.

Foi observado o aumento no consumo de nutrientes pelos animais nas dietas MAC e MUC em comparação com a dieta CTRL. Como a digestibilidade das dietas são similares, acredita-se que a variação de consumo venha das possíveis diferença bromatológicas entre as dietas. A baixa qualidade da forragem e alta concentração de fibras na dieta limitam o consumo de forragem, devido a diferença nas proporções de compostos como a lignina, celulose e a hemicelulose na fração fibrosa, dependendo das espécies forrageiras, das condições ambientais e da maturidade da planta. A substituição de gramíneas por leguminosas tende a diminuir a concentração de fibras na dieta, aumentando o consumo (PEREIRA NETO et al., 2019; VAN SOEST, 1994).

O aumento no consumo de nutrientes com a inclusão de leguminosas também foi observado por Bandeira et al. (2017) com a substituição de 40% do feno de capim-buffel por *Mimosa tenuiflora* na alimentação de cordeiros da raça Santa Inês. Silva et al. (2017) avaliando a substituição do feno de capim Bermuda por feno de alfafa em dieta de ovinos, também observaram um efeito linear positivo para o consumo de MS, MO e PB. Foster et al. (2009) encontraram maiores valores de consumo de MS, MO e FDN por cordeiros suplementados com feno de leguminosas perenes e anuais em relação a cordeiros alimentados por gramíneas. Lima et al. (2018b) avaliando a inserção de *M. axillare* na dieta de ovinos, observaram que o uso dessa leguminosa aumentou não apenas o consumo total, mas também o consumo de proteína bruta.

Como esperado, devido as tendências encontradas na digestibilidade dos nutrientes estimada com marcadores internos, os valores de consumo de nutrientes estimados com Ti também foram similares aos valores obtidos pelo método de coleta total, enquanto os valores

estimados com FDNi e MSi subestimaram o consumo. Estes resultados reforçam a importância da digestibilidade como principal fator de variação das estimativas de consumo, em comparação com a excreção fecal. Os valores de CMS para o método de coleta total e com Ti como marcador interno foram de 735 e 725 g dia^{-1} de MS, respectivamente, sendo similares aos valores recomendados pelo NRC (2007) para carneiros com peso corporal de 20 a 30 kg, que são de 590 a 1030 g dia^{-1} de MS consumida.

Os valores de $\delta^{13}C$ para o capim-aruana, a macrotiloma e a mucuna preta foram de –14,62, –26,98 e –27,45‰, respectivamente. Estes valores são condizentes com os encontrados na literatura para plantas de ciclo C_3 e C_4. Ducatti et al. (2011) comentam que valores de $\delta^{13}C$ em plantas C_3 variam de –22 a –34‰ e nas C_4, de –9 a –16‰. De Smet et al. (2004) relatam um valor médio de $\delta^{13}C$ para silagem de milho de ± –11,9‰ e para os demais volumosos de ciclos C_3 com valores de $\delta^{13}C$ entre –27,3‰ e –29,8‰. Coates (1999) expõem valores de $\delta^{13}C$ para leguminosa pura de –26 a –28‰ e para gramínea pura de –12 a –13‰.

As fezes também apresentaram valores esperados de $\delta^{13}C$ de acordo com o aumento de inclusão de leguminosa, com –15,2, –17,4 e –21,1‰, para as dietas CTRL (100% C_4), MAC (25% C_3) e MUC (50% C_3), respectivamente, demonstrando a viabilidade de utilização da razão isotópica do carbono como marcador para a estimativa da proporção de ingestão de gramíneas e leguminosas. Norman et al. (2009) avaliando amostras de fezes, plasma, sólidos do rúmen, licor do rúmen, urina e lã, também observaram uma relação linear positiva entre os valores de $\delta^{13}C$ da dieta e $\delta^{13}C$ das amostras de fezes, e concluíram que em termos práticos, as amostras fecais são mais fáceis de obter e menos estressantes para o animal, do que as outras avaliadas. Jones et al. (1979) também observaram a redução de $\delta^{13}C$ nas fezes de ruminantes com o aumento da proporção de leguminosas na dieta, sendo que a redução de 1 unidade no valor de $\delta^{13}C$ nas fezes foi associada ao aumento médio de 7,5% de leguminosas para bovinos e de 7,0% de leguminosas para cabras. Neste trabalho com a inclusão de 25% de leguminosa na dieta o valor de $\delta^{13}C$ nas fezes de ovinos reduziu –2,2‰ em relação a dieta com 100% C_4, e com a inclusão de 50% de leguminosa o $\delta^{13}C$ reduziu –5,9‰. Assim, a redução de 1 unidade no valor de $\delta^{13}C$ nas fezes foi associada a um aumento médio de 11,4% de leguminosa na dieta MAC e 8,5% na dieta MUC.

Apesar do ajuste linear satisfatório (R^2>0,90) para os valores de ingestão de gramíneas e leguminosas estimados pelas equações 6, 7 e 8, somente a equação 06 apresentou resultados de proporção de consumo de C_3 e C_4 similares aos valores de ingestão observados por coleta

total. O modelo proposto na equação 6 só considera os valores de $\delta^{13}C$ nas fezes e no tecido vegetal das plantas de ciclo C_3 e C_4, a equação 7 busca corrigir as variações na previsão causada pelo fracionamento isotópico durante o processo digestivo até excreção do material indigestível nas fezes, o modelo da equação 8 visa corrigir não só a variação do fracionamento, mas também busca reduzir os efeitos da digestibilidade de cada planta que compõem a dieta na previsão de consumo de C_3 e C_4 (NORMAN et al., 2009).

Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira Neto et al. (2019) em que observaram que a adição das variáveis digestibilidade e fracionamento aumentou o erro de predição e não melhorou a precisão na estimativa de proporção de consumo de C_3 e C_4 nas equações 7 e 8. No entanto, estes resultados diferem dos encontrados por Norman et al. (2009) e Hellwing et al. (2015) que incluindo os valores de digestibilidade de planta C_3 e C_4 e o fator de fracionamento isotópico, obtiveram melhor precisão na estimativa de proporção C_3 e C_4 consumida da dieta, usando amostras de fezes.

Neste trabalho não foi desenvolvido ensaios para avaliar o fracionamento isotópico por planta em cada dieta, mas foi observado a baixa variação de digestibilidade entre as plantas e entre as dietas. Assim, os resultados sugerem que as fontes variação provindas do fracionamento de $\delta^{13}C$ das fezes e das possíveis diferenças de digestibilidade entre as plantas de cada dieta, não foram suficientes para influenciar na predição da proporção de consumo de C_3 e C_4, estimando valores que diferem da proporção de consumo real observada pelo método de coleta total com as equações 7 e 8. Desta forma, para essas condições recomenda-se o uso da equação 6 para a predição da proporção de consumo de C_3 e C_4 em pastagem consorciada, visto a sua simplicidade e precisão perante os demais modelos.

Os valores de consumo de planta C_3 (g dia^{-1}) indicam efeito linear entre os resultados observados por coleta total e estimados pelos marcadores internos. Por outro lado, quando avaliado a contribuição individual de cada planta para o tratamento MAC, os valores com maior semelhança com o método de coleta total foram obtidos a partir da abordagem da equação 11, utilizando a digestibilidade da dieta estimada por Ti e a excreção fecal com a inclusão dos valores de $\delta^{13}C$. Esta abordagem estima o consumo individual de C_3 e C_4 desconsiderando possíveis diferenças de digestibilidade entre as plantas. Assim, esses resultados sugerem que em casos de baixa variação entre a digestibilidade individual de cada planta que compõem a dieta, o consumo individual de C_3 e C_4 pode ser estimado somente com a digestibilidade da dieta total e a excreção fecal com inclusão dos valores de $\delta^{13}C$.

O CMS de C_3 e C_4 foi subestimado quando utilizada a abordagem empregada na equação 13, onde é utilizado a digestibilidade individual de cada planta estimada com FDNi e os valores de $\delta^{13}C$ no resíduo da FDNi. Apesar disso, vale ressaltar a necessidade de avaliação de outros marcadores que contenham cadeias de carbono em sua composição, em parceria com valores de $\delta^{13}C$ no seu resíduo, devido ao potencial dessa abordagem como fonte de informações precisas de consumo de C_3 e C_4 para pastagens consorciadas com forragens de frações digestíveis distintas.

Outra alternativa é a realização de correções dos erros embutidos no método de determinação da fração de FDNi, visto que a baixa precisão da abordagem utilizada na equação 13 pode ter sido causada por deficiências inerentes ao método de obtenção deste marcador, como discutido anteriormente. Kozloski et al. (2009) utilizando a fração de FDNi como marcador interno, propuseram a mensuração e a consideração do valor médio de recuperação fecal dos marcadores no cálculo de digestibilidade, visto que estes marcadores podem não ser totalmente recuperados, visando corrigir a ocorrência de dados subestimados para essa variável. Estes autores comentam que para melhorar exatidão das estimativas de consumo de forragem em experimentos de pastejo utilizando marcadores internos para estimar a digestibilidade, é necessário conduzir ensaios paralelos de digestibilidade para mensurar o grau de recuperação do marcador, para a realização das correções necessárias.

Não houve diferença estatística no CMS de C_3 e C_4 entre os valores estimados com marcadores internos nas equações 11 e 13 e os valores determinados pelo método de coleta total para o tratamento MUC. Assim, é recomendado a utilização da abordagem mais simples e menos onerosa para estimava de CMS de C_3 e C_4 em dietas com proporções de gramíneas e leguminosas similares à dieta MUC. Também observa-se que existe uma alta variação entre as unidades experimentais alimentadas pela dieta MUC, como observado pelos valores de erro padrão e na dispersão dos dados no gráfico de regressão linear (Figura 5), confirmando a existência de maior variação de seletividade no consumo de C_3 e C_4 quando os animais são alimentados por dietas mais heterogêneas com maior proporção de leguminosa, como comentado por Dove e Mayes (2005) e McDonald et al. (2011).

6 CONCLUSÃO

O titânio de ocorrência natural determinado por EDXRF pode ser utilizado como marcador interno para estimar a digestibilidade e o consumo de matéria seca em dietas compostas por gramíneas e leguminosas.

Recomenda-se o uso das equações EqN. 6, EqN. 5 e EqN. 7 para a estimativa da DMS para dietas compostas por 100% de gramíneas, 25% de leguminosas e 50% leguminosas, respectivamente. No entanto, para a obtenção de resultados mais precisos, é recomendado a realização de ensaios de digestibilidade em gaiolas metabólicas para a aquisição de equações especificas para cada condição.

Para as condições observadas neste trabalho, é sugerido o uso da equação 6 para a estimava da proporção consumo (%) de plantas de ciclo C_3 e C_4 em dietas heterogêneas.

Recomenda-se estimar o consumo individual de C_3 e C_4 por meio da digestibilidade da dieta total estimada com Ti como marcador interno em conjunto com valores de $\delta^{13}C$ nas fezes, para dietas heterogêneas com baixa variação de digestibilidade individual entre as plantas. Apesar dos resultados imprecisos quando utilizado o FDNi e os valores de $\delta^{13}C$ na fração de FDNi para a estimativa da DMS, ainda são necessários novos estudos com outros marcadores internos constituídos por cadeias de carbono em parceria com valores de $\delta^{13}C$.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, A. L. et al. In vitro evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, Heidelberg, v. 44, n. 5, p. 953–964, 2012.

ALMEIDA, E. DE et al. EDXRF for elemental determination of nanoparticle - related agricultural samples. **X-Ray Spectrometry**, Chichester, v. 48, p. 151–161, 2019.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis.** 18. ed. Arlington: AOAC International, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE - ABIEC. **Perfil da Pecuária no Brasil**. São Paulo, 2018. Disponível em: <http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>. Acesso em: 09 jul. 2019.

AZEVEDO, E. B. et al. Use of faecal components as markers to estimate intake and digestibility of grazing sheep. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 165, n. 1, p. 42–50, 2014.

BACHIEGA, P. et al. Benchtop and Handheld Energy-Dispersive X-Ray Fluorescence (EDXRF) as Alternative for Selenium Concentration Measurement in Biofortified Broccoli Seedling. **Food Analytical Methods**, New York, v. 12, p. 1520–1527, 2019.

BANDEIRA, P. A. V. et al. Performance and carcass characteristics of lambs fed diets with increasing levels of Mimosa tenuiflora (Willd.) hay replacing Buffel grass hay. **Tropical Animal Health and Production**, Heidelberg, v. 49, n. 5, p. 1001–1007, jun. 2017.

BATISTA, K. et al. The influence of phosphorus and calcium application rates on the mineral composition of the perennial legume Macrotyloma axillare. **African Journal of Range & Forage Science**, Scottsville, v. 36, n. 1, p. 41–48, 2019.

BENDER, R. W.; COOK, D. E.; COMBS, D. K. Comparison of in situ versus in vitro methods of fiber digestion at 120 and 288 hours to quantify the indigestible neutral detergent fiber fraction of corn silage samples. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 7, p. 5394–5400, 2016.

BERCHIELLI, T. T. et al. Comparação de marcadores para estimativas de produção fecal e de fluxo de digesta em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 3, p. 987–996, 2005.

BERCHIELLI, T. T.; ANDRADE, P. DE; FURLAN, C. L. Avaliação de Indicadores Internos em Ensaios de Digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 830–833, 2000.

BERNOUX, M. et al. The use of stable carbon isotopes for estimating soil organic matter turnover rates. **Geoderma**, Amsterdam, v. 82, n. 1–3, p. 43–58, 1998.

BIANCHINI, D. et al. Viabilidade de doze capins tropicais para criação de ovinos. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 56, n. 2, p. 163–177, 1999.

BLUMENTHAL, M. J.; STAPLES, I. B. Origin, evaluation and use of Macrotyloma as forage - review. **Tropical Grasslands**, Melbourne, v. 27, p. 16–29, 1993.

BOVAL, M. et al. The ability of faecal nitrogen to predict digestibility for goats and sheep fed with tropical herbage. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 140, n. 4, p. 443–450, 2003.

BOVAL, M.; DIXON, R. M. The importance of grasslands for animal production and other functions: a review on management and methodological progress in the tropics. **Animal**, Cambridge, v. 6, n. 5, p. 748–762, 2012.

BUENO, I. C. S. et al. In vitro methane production and tolerance to condensed tannins in five ruminant species. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 205, p. 1–9, 2015.

CABRAL, Í. D. S. et al. Evaluation of internal markers as determinants of fecal dry matter output and digestibility in feedlot sheep. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 5, p. 3331-3340, 2017.

CAMPOS, F. C. et al. Rumen degradability and gas production as influenced by different strains of Bacillus thuringiensis. **Canadian Journal of Animal Science**, doi: 10.1139/cjas-2017-0196.

CARVALHO, P. C. DE F. et al. Avanços metodológicos na determinação do consumo de ruminantes em pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 151–170, 2007. Suplemento.

CASALI, A. O. et al. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos in situ. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 2, p. 335–342, 2008.

CHACON, E.; STOBBS, T. H.; SANDLAND, R. L. Estimation of herbage consumption by grazing cattle using measurements of eating behaviour. **Grass and Forrage Science**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 81–87, 1976.

CHELLAPANDI, P. et al. Methanobacterium formicicum as a target rumen methanogen for the development of new methane mitigation interventions: A review. **Veterinary and Animal Science**, New York, v. 6, p. 86–94, 2018.

CHEREMISINOFF, N. P. **Polymer characterization**: laboratory techniques and analysis. New York: Elsevier, 1996. p. 43–81. Chap. 4: Elemental and structural characterization tests.

CHURCH, D. C. **The ruminant animal.** Digestive physiology and nutrition. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1988.

COATES, D. B. The use of faecal $\delta^{13}C$ values values to improve the reliability of estimates of diet quality when sampling tropical pastures with oesophageal fistulated cattle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v. 39, n. 1, p. 1-7, 1999.

COLOZZA, M. T. et al. Respostas de Panicum Maximum cultivar Aruana a doses de nitrogênio. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 57, n. 1, p. 21–32, 2000.

COOK, B. et al. **Tropical Forages**: an interactive selection tool. Macrotyloma axillare. [CD-ROM]. Brisbane, Australia: CSIRO; CIAT; ILRI, 2005a. Disponível em: <http://www.tropicalforages.info/key/forages/Media/Html/entities/macrotyloma_axillare.pdf> Acesso em: 22 fev. 2019.

COOK et al. **Tropical Forages**: an interactive selection tool. Mucuna pruriens (L.) DC. var. utilis (Wall. ex Wight) Baker ex Burck. [CD-ROM]. Brisbane, Australia: CSIRO; CIAT; ILRI, 2005b. Disponível em: <http://www.tropicalforages.info/key/forages/Media/Html/entities/mucuna_pruriens.pdf>. Acesso em: 22 fev. 2019.

CORDOVA, F. J.; WALLACE, J. O. E. D.; PIEPER, R. E. X. D. Forage intake by grazing livestock : a review. **Journal of Range Management**, Lawrence, v. 31, n. 6, p. 430-438, 1978.

COTTLE, D. J. The trials and tribulations of estimating the pasture intake of grazing animals. **Animal Production Science**, Melbourne, v. 53, n. 11, p. 1209–1220, 2013.

COUNCIL, N. R. **Nutrient requirements of small ruminants**. Washington, DC: National Academies Press, 2007.

DAVID, D. B. et al. Faecal index to estimate intake and digestibility in grazing sheep. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 152, n. 4, p. 667–674, 2014.

DE SMET, S. et al. Stable carbon isotope analysis of different tissues of beef animals in relation to their diet. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 18, n. 11, p. 1227–1232, 2004.

DELEVATTI, L. M. et al. Forage management intensification and supplementation strategy: Intake and metabolic parameters on beef cattle production. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 247, p. 74–82, 2019.

DETMANN, E. et al. Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 1600–1609, 2001.

DOVE, H.; MAYES, R. W. The use of plant Wax alkanes as marker substances in studies of nutrition of herbivores: a review. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 42, p. 913–952, 1991.

DOVE, H.; MAYES, R. W. Using n-alkanes and other plant wax components to estimate intake, digestibility and diet composition of grazing/browsing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 59, n. 2–3, p. 123–139, 2005.

DOVE, H.; MAYES, R. W. Protocol for the analysis of n-alkanes and other plant-wax compounds and for their use as markers for quantifying the nutrient supply of large mammalian herbivores. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 4, p. 1680–1697, 2006.

DUCATTI, C. et al. Utilização de isótopos estáveis em ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, p. 68–75, 2011.

EHLERINGER, J. R.; CERLING, T. E. C_3 and C_4 photosynthesis. **Encyclopedia of global environmental change**, v. 2, p. 186-190, 2002.

EISLER, M. C. et al. Agriculture: Steps to sustainable livestock. **Nature**, London, v. 507, n. 7490, p. 32–34, 2014.

ELLIS, J. L. et al. Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. **The Journal of Agricultural Science**, London, v. 146, n. 2, p. 213–233, 2008.

ERIZIAN, C. Eine neue Methode zur Bestimmung der von Vieh gefressenen Weidefutters Menge. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v. 25, n. 1–3, p. 443–459, 1932.

EUCLIDES, V. P. B. et al. Manejo do pastejo de cultivares de Brachiaria brizantha (Hochst) Stapf e de Panicum maximum Jacq. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, p. 808–818, 2014. Suplemento.

FAO. **FAOSTAT**. Emissões totais da agricultura em CO_2 equivalente, Brasil. Rome, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/GT/visualize>. Acesso em: 18 set. 2019.

FERREIRA, M. D. A. et al. Avaliação de indicadores em estudos com ruminantes : digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 8, p. 1568–1573, 2009.

FOSTER, J. L. et al. Intake, digestibility, and nitrogen retention by sheep supplemented with warm-season legume hays or soybean meal. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 9, p. 2891–2898, 2009.

GARCIA, C. S. et al. Desempenho de novilhos mantidos em pastagens de capim-elefante e capim-mombaça. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 2, p. 403–410, 2011.

GERBER, P. J. et al. Environmental impacts of beef production: Review of challenges and perspectives for durability. **Meat Science**, Barking, v. 109, p. 2–12, 2015.

GERDES, L. et al. Características do Dossel Forrageiro e Acúmulo de Forragem em Pastagem Irrigada de Capim-Aruana Exclusivo ou Sobre-Semeado com uma Mistura de Espécies Forrageiras de Inverno. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 1088–1097, 2005.

GHISI, O. M. A. A.; ALMEIDA, A. R. P. DE; ALCÂNTARA, V. D. B. G. Avaliação agronômica de seis cultivares de Panicum maximum jacq. sob três níveis de adubação. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 46, n. 1, p. 1–15, 1989.

HAMMOND, K. J. et al. Effects of feeding fresh white clover (Trifolium repens) or perennial ryegrass (Lolium perenne) on enteric methane emissions from sheep. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 166–167, p. 398–404, 2011.

HELLWING, A. L. F. et al. Comparison of methods for estimating herbage intake in grazing dairy cows. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 176, p. 61–74, 2015.

HODGSON, J. The control of herbage intake in the grazing ruminant. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 44, n. 2, p. 339–346, 1985.

HUYSVELD, S. et al. Resource use assessment of an agricultural system from a life cycle perspective - a dairy farm as case study. **Agricultural Systems**, Barking, v. 135, p. 77–89, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA – IBGE. **Tabela 3939 - Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho.** Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>. Acesso em: 22 fev. 2019.

JANSSEN, P. H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 160, p. 1–22, 2010.

JONES, R. J. et al. Estimation of the proportion of C_3 and C_4 plant species in the diet of animals from the ratio of natural ^{12}C and ^{13}C isotopes in the faeces. **The Journal of Agricultural Science**, London, v. 92, n. 1, p. 91–100, 1979.

JORGE, M. A. et al. Mucuna Species : Recent Advances in Application of Biotechnology. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, Tokyo, v. 1, n. 2, p. 80–94, 2007.

KATSANDE, S. et al. Apparent digestibility and microbial protein yield of Desmodium uncinatum, Mucuna pruriens and Vigna unguiculata forage legumes in goats. **African Journal of Range & Forage Science**, Scottsville, v. 33, n. 1, p. 53–58, 2016.

KENNY, D. A. et al. Invited review: Improving feed efficiency of beef cattle – the current state of the art and future challenges. **Animal**, Cambridge, v. 12, n. 9, p. 1815–1826, 2018.

KNAPP, J. R. et al. Invited review : Enteric methane in dairy cattle production : Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 6, p. 3231–3261, 2014.

KNUDSEN, D. et al. Plant analysis of trace elements by X-Ray. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 3, n. 1–4, p. 61–75, 1981.

KOZLOSKI, G. V. et al. Avaliação do uso de frações indigestíveis do alimento como indicadores internos de digestibilidade em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 9, p. 1819–1823, set. 2009.

KOZLOSKI, G. V. et al. Faecal nitrogen excretion as an approach to estimate forage intake of wethers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 98, n. 4, p. 659–666, 2014.

KOZLOSKI, G. V. et al. Faecal N excretion as an approach for estimating organic matter intake by free-ranging sheep and cattle. **The Journal of Agricultural Science**, London, v. 156, n. 3, p. 443–449, 2018.

KRAUSE, D. O. et al. Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, n. 1, p. 331–341, 2014.

LANZETTA, V. A. S. et al. Validação do LIPE® como método para determinar a digestibilidade dos nutrientes em eqüinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 1, p. 69–74, 2009.

LAWRENCE, D. C. The constitution and specification of portland cement. In: LEA, F. M.; Hewlett, P. C. **Lea's chemistry of cement and concrete**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 131-193.

LENTH, R. **emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means.** R package version 1.4. 2019. Disponível em: < https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>. Acesso em: 12 Ago. 2019.

LIMA, D. M. et al. Morphological characteristics, nutritive quality, and methane production of tropical grasses in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 53, n. 3, p. 323–331, 2018a.

LIMA, P. M. T. et al. Nutritional evaluation of the legume Macrotyloma axillare using *in vitro* and *in vivo* bioassays in sheep. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 102, n. 2, p. e669–e676, 2018b.

LIMA, P. M. T. **Aspectos produtivos e emissão de metano em ovinos Santa Inês suplementados com a leguminosa** *Macrotyloma axillare*. 2016. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

LIPPKE, H. Estimation of forage intake by ruminants on pasture. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 3, p. 869, 2002.

LIPPKE, H.; ELLIS, W. C.; JACOBS, B. F. Recovery of Indigestible Fiber from Feces of Sheep and Cattle on Forage Diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 69, n. 2, p. 403–412, 1986.

LOBATO, J. F. P. et al. Brazilian beef produced on pastures: Sustainable and healthy. **Meat Science**, Barking, v. 98, n. 3, p. 336–345, 2014.

LONGO, C. et al. Chemical characterization and in vitro biological activity of four tropical legumes, Styzolobium aterrimum L., Styzolobium deeringianum, Leucaena leucocephala, and Mimosa caesalpiniaefolia, as compared with a tropical grass, Cynodon spp. for the us. **Czech Journal of Animal Science**, Prague, v. 57, n. 6, p. 255–264, 2012.

LUKAS, M. et al. Relationship between fecal crude protein concentration and diet organic matter digestibility in cattle1. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 6, p. 1332–1344, 2005.

LÜSCHER, A. et al. Potential of legume-based grassland-livestock systems in Europe: a review. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 69, n. 2, p. 206–228, 2014.

MAGALHÃES, A. C. N. Fotossíntese. In: FERRI, M. G. (Ed.). **Fisiologia vegetal.** 2. ed. São Paulo: EPU, 1985. p. 117-166.

MAGALHÃES, A. L. R. et al. Dietas para ovinos contendo capim elefante maduro e raspa de mandioca: estimativa de digestibilidade aparente por meio de indicadores. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 67, n. 258, p. 244–252, 2018.

MAKKAR, H. P. S. Review: Feed demand landscape and implications of food-not feed strategy for food security and climate change. **Animal**, Cambridge, v. 12, n. 8, p. 1744–1754, 2018.

MARGUÍ, E.; ZAWISZA, B.; SITKO, R. Trace and ultratrace analysis of liquid samples by X-ray fluorescence spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 53, p. 73–83, 2014.

MAYES, R. W.; DOVE, H. Measurement of dietary nutrient intake in free-ranging mammalian herbivores. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 13, p. 107–138, 2000.

MAZZETTO, A. M. et al. Improved pasture and herd management to reduce greenhouse gas emissions from a Brazilian beef production system. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 175, p. 101–112, 2015.

McDONALD, P. et al. **Animal nutrition**. 7. ed. Harlow, England: Prentice Hall/Pearson, 2011.

MENDIBURU, F. **agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research**. R package version 1.3-1. 2019. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>. Acesso em: 12 Ago. 2019.

MENEZES, K. M. S. et al. Shading and intercropping with buffelgrass pasture affect soil biological properties in the Brazilian semi-arid region. **Catena**, Amsterdam, v. 175, p. 236–250, 2019.

MERO, R. N.; UDÉN, P. Promising tropical grasses and legumes as feed resources in Central Tanzania V. Effect of supplementing Cenchrus ciliaris hay with leaves from four legumes on intake and digestibility by growing Mpwapwa bulls. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 70, n. 1–2, p. 111–122, 1998.

MERTENS, D. R. et al. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, n. 6, p. 1217–1240, 2002.

MOREIRA, G. D. **Emissão de metano *in vitro* e *in vivo* em ovinos alimentados com mucuna-preta** (*Stizolobium aterrimum*). 2017. 103 p. **Tese** (Doutorado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2017.

NASROLLAHZADEH, M. et al. Plant-mediated green synthesis of nanostructures: mechanisms, characterization, and applications. In: NASROLLAHZADEH, M. et al. (Ed.). **An Introduction to green nanotechnology**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2019. chap. 6, p. 199–322. (Interface Science and Technology, 28).

NAVAS, M. J.; ASUERO, A. G.; JIMÉNEZ, A. M. A Review of Energy Dispersive X-Ray Fluorescence (EDXRF) as an Analytical Tool in Numismatic Studies. **Applied Spectroscopy**, Thousand Oaks, v. 70, n. 1, p. 207–221, 2016.

NEČEMER, M. et al. Application of X-ray fluorescence analytical techniques in phytoremediation and plant biology studies. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 63, n. 11, p. 1240–1247, 2008.

NORMAN, H. C. et al. Stable carbon isotopes accurately predict diet selection by sheep fed mixtures of C_3 annual pastures and saltbush or C_4 perennial grasses. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 121, n. 2–3, p. 162–172, 2009.

NOWAKOWSKI, P.; CZYZ, K.; IWASZKIEWICZ, M. Estimation of pasture herbage intake by beef cattle based on n-alkanes as markers. **Acta Agrobotanica**, Warsaw, v. 70, n. 1, p. 1–8, 2017.

O'LEARY, M. H. Carbon isotope fractionation in plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 553–567, 1981.

OLIVEIRA SILVA, R. et al. Sustainable intensification of Brazilian livestock production through optimized pasture restoration. **Agricultural Systems**, Barking, v. 153, p. 201–211, 2017.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 91, p. 24–37, 2011.

PENNING, P. D.; HOOPER, G. E. An evaluation of the use of short- term weight changes in grazing sheep for estimating herbage intake. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 79–84, 1985.

PENNING, P. D.; JOHNSON, R. H. The use of internal markers to estimate herbage digestibility and intake: 1. Potentially indigestible cellulose and acid insoluble ash. **The Journal of Agricultural Science**, London, v. 100, n. 1, p. 127, 1983.

PEREIRA NETO, J. D. et al. Tracing back sheep diet composition feeding grass-legume mixtures using fecal $\delta^{13}C$. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 175, p. 7–14, 2019.

PERIPOLLI, V. et al. Fecal nitrogen to estimate intake and digestibility in grazing ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 163, n. 2–4, p. 170–176, 2011.

PIAGGIO, L. M. et al. Avaliação de cinzas insolúveis em ácidos indigestíveis e lignina em detergente ácido indigestível como indicadores internos da digestibilidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 306–312, 1991.

PILUZZA, G. et al. Grass and Forage Science Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability : a review. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 69, p. 32–48, 2013.

PIÑEIRO-VÁZQUEZ, A. T. et al. Potential of condensed tannins for the reduction of emissions of enteric methane and their effect on ruminant productivity. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Santiago, v. 47, n. 3, p. 263–272, 2015.

POMPEU, R. C. F. F. et al. Características morfofisiológicas do capim-aruana sob diferentes doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 11, n. 4, p. 1187–1210, 2010.

R Core Team. R: **A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 12 Ago. 2019.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RODRÍGUEZ, I. S. et al. Potentiality of the forage meal of Stizolobium niveum and Stizolobium aterrimum as a nutraceutical for animal feeding. **Cuban Journal of Agricultural Science**, San José de las Lajas, v. 52, n. 2, p. 1–12, 2018.

ROMBACH, M. et al. Herbage dry matter intake estimation of grazing dairy cows based on animal, behavioral, environmental, and feed variables. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 102, n. 4, p. 2985–2999, 2019.

SAMPAIO, C. B. et al. Evaluation of fecal recovering and long term bias of internal and external markers in a digestion assay with cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 1, p. 174–182, 2011.

SANDERSON, M. A. et al. Forage mixture productivity and botanical composition in pastures grazed by dairy cattle. **Agronomy Journal**, Madison, v. 97, n. 5, p. 1465-1471, 2005.

SANTOS, L. E. dos; CUNHA, E. A.; BUENO, M. S. **Sistema de produção intensiva de ovinos em pastagem de capim Aruana**. 2007. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/oviaruana/Index.htm>. Acesso em: 09 Set. 2019.

SANTOS, K. C. et al. Nutritional potential of forage species found in Brazilian Semiarid region. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 195, p. 118–124, 2017.

SAVIAN, J. V et al. Comparison of faecal crude protein and n-alkanes techniques to estimate herbage intake by grazing sheep. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 242, p. 144–149, 2018.

SCHMIDT, L., JENTSCH, W. Die Schätzung der Verdaulichkeit von Konservatfutterrationen für Rinder anhand des Stickstof- fgehaltes im Rinderkot. **FBN Schriftenreihe**, Dummerstorf, v. 7, 179–184, 1994.

SCHMIDT, L., WEISSBACH, F., HOPPE, T., KUHLA, S. Untersuchungen zur Verwendung der Kotstickstoff-Methode für die Schätzung des energetischen Futterwertes von Weidegras und zum Nachweis der selektiven Futteraufnahme auf der Weide. **Landbauforschung,** Völkenrode, v. 49, 123–135, 1999.

SCHNEIDER, S. et al. Suitability of eight techniques for estimating digestibility of herbage from continuously grazed all-day pasture. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 170, n. 1–2, p. 1–11, 2011.

SENO, M. S.; GOMES, L.; CORTELAZZO, A. L. Caracterização do material de reserva em feijão-guandu, lablabe e mucuna. **Bragantia**, Campinas, v. 55, n. 1, p. 57–65, 1996.

SILVA, J. C. DA et al. Nutritional value, performance, feeding behavior and serum biochemical profile of sheep fed with alfalfa hay replacing Bermuda grass (Cynodon dactylon (L.) Pers.) hay. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 77, n. 4, p. 340–345, 2017.

SMITH, B. N.; EPSTEIN, S. Two Categories of $^{13}C/^{12}C$ Ratios for Higher Plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 47, n. 3, p. 380–384, 1971.

SOLTAN, Y. A. et al. Comparative in vitro evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Jabłonna, v. 21, n. 4, p. 759–772, 2012.

SOUSA, S. V. et al. Internal markers for predicting dry matter intake and digestibility in Santa Inês ewes on a pasture. **Grassland Science**, Carlton South, v. 65, n. 2, p. 75–85, 2019.

SOUZA, J. et al. Evaluation of external markers to estimate fecal excretion, intake, and digestibility in dairy cows. **Tropical Animal Health and Production**, Heidelberg, v. 47, n. 1, p. 265–268, jan. 2015.

SOUZA, N. R. D. et al. Sugarcane ethanol and beef cattle integration in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 120, p. 448–457, 2019.

SPONHEIMER, M. et al. An experimental study of carbon-isotope fractionation between diet, hair, and feces of mammalian herbivores. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 81, n. 5, p. 871–876, 2003.

STRASSBURG, B. B. N. et al. When enough should be enough: Improving the use of current agricultural lands could meet production demands and spare natural habitats in Brazil. **Global Environmental Change**, Guidford, v. 28, n. 1, p. 84–97, 2014.

TAKADA, J. et al. Element content in a number of plant leaves and accumulation of some elements in typical plant species: A case of Okayama Prefecture. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Dordrecht, v. 217, n. 1, p. 65–70, 1997.

TEIXEIRA, C. S. C. et al. Evaluation of days of total collection and use of internal markers in nutritional trials with small ruminants. **Tropical Animal Health and Production**, Heidelberg, v. 50, n. 4, p. 815–823, abr. 2018.

TIEMANN, T. T. et al. Effect of season, soil type and fertilizer on the biomass production and chemical composition of five tropical shrub legumes with forage potential. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 255–265, 2009.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A TWO-STAGE TECHNIQUE FOR THE IN VITRO DIGESTION OF FORAGE CROPS. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 104–111, 1963.

UNITED NATIONS. Department of Economic and Social Affairs Population. **World Population Prospects 2019**: Highlights. New York, 2019. Disponível em: <https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_10KeyFindings.pdf>. Acesso em: 26 dez. 2019.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Comstock Pub., 1994.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583–3597, 1991.

VELÁSQUEZ, A. V. et al. Evaluating internal and external markers versus fecal sampling procedure interactions when estimating intake in dairy cows consuming a corn silage-based diet. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 101, n. 7, p. 5890–5901, 2018.

WALTERS, R. J. K.; EVANS, E. M. Evaluation of a sward sampling technique for estimating herbage intake by grazing sheep. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 37–44, 1979.

WANG, C. J. et al. Fecal crude protein content as an estimate for the digestibility of forage in grazing sheep. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 149, n. 3–4, p. 199–208, 2009.

WATANABE, P. H. et al. Indicadores internos indigestíveis para a estimativa das digestibilidades de dietas para bovinos de corte confinados. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Mayagüez, v. 17, n. 3, p. 77–82, 2010.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.** New York: Springer-Verlag, 2016. Disponível em: < https://ggplot2.tidyverse.org>. Acesso em: 12 ago. 2019.

WILKINSON, J. M.; LEE, M. R. F. Review: Use of human-edible animal feeds by ruminant livestock. **Animal**, Cambridge, v. 12, n. 8, p. 1735–1743, 2018.

ZANINI, G. D.; SANTOS, G. T.; SBRISSIA, A. F. Frequencies and intensities of defoliation in Aruana Guineagrass swards : accumulation and morphological composition of forage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, n. 4, p. 905–913, 2012.