

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DA FIBRA COMO  
MARCADORES INTERNOS E DE ALCANOS PARA  
ESTIMAR O FLUXO DE DIGESTA NO DUODENO DE  
BOVINOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Francisco Rondon Mesquita**

**Santa Maria, RS – Brasil**

**2012**

**AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DA FIBRA COMO  
MARCADORES INTERNOS E DE ALCANOS PARA  
ESTIMAR O FLUXO DE DIGESTA NO DUODENO DE  
BOVINOS**

**Francisco Rondon Mesquita**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em  
Produção Animal/Nutrição de Ruminantes, da Universidade federal de Santa  
Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Zootecnia**

**Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rondon Mesquita, Francisco  
Avaliação de componentes da fibra como marcadores  
internos e de alcanos para estimar o fluxo de digesta no  
duodeno de bovinos / Francisco Rondon Mesquita.-2012.  
79 p.; 30cm

Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski  
Coorientador: Fernando Luiz Ferreira de Quadros  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia, RS, 2012

1. Nutrição de Ruminantes 2. Marcadores internos e  
externos 3. fluxo de digesta no duodeno 4. alcanos 5.  
fibra I. Kozloski, Gilberto Vilmar II. Ferreira de  
Quadros, Fernando Luiz III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DA FIBRA COMO MARCADORES  
INTERNOS E DE ALCANOS PARA ESTIMAR O FLUXO DE DIGESTA  
NO DUODENO DE BOVINOS**

elaborada por  
**Francisco Rondon Mesquita**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Zootecnia**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Gilberto Vilmar Kozloski, Dr. (UFSM)**  
Presidente/Orientador

**José Luis Repetto, Dr. (UdelaR, Uruguay)**

**Henrique Mendonça Nunes Ribeiro Filho, Dr. (UDESC, Santa Catarina)**

Santa Maria, 01 de Março de 2012

*“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos um oceano.”*  
**Isaac Newton**

**Aos meus pais,  
Francisco Jesulei Gonçalves Mesquita e Rosani Rondon Mesquita  
pelo amor, pelo apoio incondicional e pelo incentivo em sempre buscar mais.**

**Aos meus irmãos  
Ana Paula Heck Mesquita, Rafael Rondon Mesquita e Valéria Rondon Mesquita  
Pelo companheirismo, pela torcida e apoio em todos os momentos.**

**A minha esposa Vera  
pelo amor, pela paciência e apoio em todos os momentos da minha vida**

**A vocês dedico...**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, a Deus, por me dar força, serenidade me guiando na minha caminhada.

Aos meus pais, por me possibilitarem que eu buscasse meus sonhos.

A minha família, pelo apoio em todos os momentos.

A minha mulher por estar sempre comigo, me apoiando me amando, me dando forças para a busca de meus objetivos.

Ao meu Orientador Gilberto Vilmar Kozloski, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pelo exemplo de profissional.

A pesquisadora da EMBRAPA Teresa Cristina Moraes Genro, por viabilizar a utilização de alcanos no estudo, por ampliar meus horizontes na pesquisa, pelo incentivo, e pela pessoa íntegra e profissional que é.

Aos meus colegas de pós-graduação Tiago Pansard Alves, Fernanda Hentz, Roberta Farenzena, Diego Zeni, Tiago Orlandi e Suélen Capa d'Avila, pelo companheirismo, apoio e amizade.

Aos estagiários que são o lastro das atividades de pesquisa conduzidas, Eder Minski (Cesnors-UFSC), Gabriela Guzatti (CAV-UFSC) Cristiano Stefanello, Simone Stefanello, Mariana Mezzomo, Tais Regina Longo, Marcelo Gindri, Vinicius Graf, Felipi Zanferari, por viabilizarem a realização de todos os procedimentos experimentais.

Ao Laboratório de Nutrição da EMBRAPA-CPPSUL pela parceria nas análises cromatográficas, em especial aos laboratoristas Camila Luzardo e Fabiano Solari, pelo auxílio desmedido.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AValiação de Componentes da Fibra como Marcadores Internos e de Alcanos para Estimar o Fluxo de Digesta no Duodeno de Bovinos**

AUTOR: FRANCISCO RONDON MESQUITA

ORIENTADOR: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI

Local e Data da defesa: Santa Maria, 01 de Março de 2012.

Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o potencial do uso de componentes da fibra como marcadores internos e alcanos na estimativa do fluxo duodenal em bovinos. Para tanto foi avaliada a degradabilidade intestinal das frações fibrosas de diferentes alimentos. Foram utilizados quatro bovinos da raça holandesa dotados de cânula tipo “T” simples no duodeno e um bovino dotado de fistula ruminal, com dieta a base de Aveia Preta e concentrados (60:40). Foram conduzidos ensaios com sete diferentes alimentos, estes sendo submetidos a diferentes tempos de incubação ruminal, (12, 24, 36 e 48 horas). Por meio da técnica dos saquinhos móveis, foi avaliada a degradação intestinal dos alimentos. As médias das frações fibrosas obtidas pós-ruminalmente e recuperadas nas fezes diferiram significativamente de FDN, FDA e LDA ( $P < 0,05$ ). O desaparecimento em percentual da MS foi de 6,44, 2,07 e 0,90%, para FDN, FDA e LDA, respectivamente. No entanto a análise de regressão linear indicou altos coeficientes de determinação para todos os tempos de incubação. O desaparecimento em proporção de FDA e LDA foram estatisticamente iguais em todos os tempos de incubação ( $P > 0,05$ ), indicando perda de partículas pelos poros dos saquinhos. A correção dos teores de FDA, pela perda de LDA não afetou os coeficientes de determinação que permaneceram elevados. A estimativa do fluxo de duodenal de MS com a FDA e a LDA foram similares, 2,025 e 2,135 kgMS/dia, respectivamente. Os n-alcanos apresentaram baixa recuperação fecal (C31= 63,3%; C32=46,7% e C33=75,6%), o que pode ter contribuído para alta variabilidade dos resultados. O C32 superestimou os valores de fluxo duodenal de MS, sendo que fluxo médio obtido pelo C32, corrigido pela excreção fecal do alcano, foi de 3,855 kgMS/dia, enquanto o observado com o FDA foi de 2,065kgMS/dia e 2,135 kgMS/dia com base no LDA. O FDA foi eficiente para medir o fluxo duodenal de MS, , diferentemente do n-alcano dosado, o C32, que superestimou este parâmetro e, como C31 e C33, apresentou resultados com alta variabilidade.

**Palavras-chaves:** Degradação Intestinal da Fibra. FDA. n-alcanos. Marcadores Internos e Externos.

## **ABSTRACT**

Master of Science Thesis  
Programa de Pós-graduação em Zootecnia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **EVALUATION OF FIBER COMPONENTS AS INTERNAL MARKERS AND ALKANES FOR DUODENAL DIGESTA FLOW ESTIMATION IN CATTLE**

AUTHOR: FRANCISCO RONDON MESQUITA  
ADVISER: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI  
Defense's Place and date: Santa Maria, March, 01, 2012.

The use of ADF as internal Marker of duodenal digesta flow was evaluated, for this the intestinal degradability of fiber was studied. Four Holstein calves ( $156 \pm 33$  kg), fitted with duodenal cannula "T" simple, and one calve fitted on the rumen, fed diet base with black oat and supplement, was used. Seven feeds were weighted on the polyester bags (7x5,5cm; 25 $\mu$ m) and treated at different ruminal incubation times (12, 24, 36 and 48 hours). After the respective incubations times, the bags were introduced in the duodenum of animals, recovered on the faeces and analyzed. The means of fiber fraction obtained posruminally and on the samples recovered on the faeces, were significantly different ( $P < 0,05$ ). The percent difference was 6,44, 2,07 e 0,90% on DM basis, for NDF, ADF and ADL, respectively. The disappearance of ADL indicated loss of particles through the pores of the bags, thereby the means were corrected for the loss of ADL, improving the regression coefficients and intercept of the regression equations, demonstrating the potential of using the ADF as an internal marker of digesta flow in ruminants. Additionally, was evaluated the duodenal digesta flow on cattle, with different markers. The means obtained from the ADF and ADL were similar, 2,025 and 2,135 kgDM/day, respectively. The n-alkanes presented low fecal recovery (C31=63,3%; C32=46,7% e C33=75,6%), this may have contributed to the high variability of the results obtained from the n-alkanes. The n-alkane C32 overestimated the duodenal flow of DM, 3,855 kgDM/day. The ADF was useful for to measure the duodenal digesta flow, even small loss was detected, this did not prejudice the assessment. The ADF was efficient for measure digesta flow of DM, differently of the n-alkanes that overestimated (C32) and presented high variability (C31, C32 and C33).

**Key words:** Fiber Intestinal Degradability. Duodenal Digesta Flow. ADF. Alkanes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cãnula reentrante projetada para ovinos e bovinos .....	16
Figura 2 - Cãnula “T” fechada, (a) com a válvula aberta permite a coleta total da digesta (b) com a válvula que permite a sub amostragem e devolução da digesta.....	17
Figura 3 - Cãnula “T” Simples, modelo semelhante ao usado em ovinos e bovinos.....	18
Figura 4 - Teor de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina em detergente ácido (LDA) de amostras de alimentos incubados no rúmen de um bovino durante diferentes tempos.....	32
Figura 5 - Relação entre os teores de fibra em detergente neutro (FDN) de amostras de alimentos após incubação no rumem por 12, 24, 36 ou 48 horas com aqueles obtidos após passagem do material residual pelos intestinos em saquinhos móveis e recuperados nas fezes.....	33
Figura 6 - Relação entre os teores de fibra em detergente ácido (FDA) de amostras de alimentos após incubação no rumem por 12, 24, 36 ou 48 horas com aqueles obtidos após passagem do material residual pelos intestinos em saquinhos móveis e recuperados nas fezes.....	34
Figura 7 - Relação entre os teores de lignina em detergente ácido (LDA) de amostras de alimentos após incubação no rumem por 12, 24, 36 ou 48 horas com aqueles obtidos após passagem do material residual pelos intestinos em saquinhos móveis e recuperados nas fezes.....	35
Figura 8 - Desaparecimento intestinal (%) de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina em detergente ácido (LDA) de amostras incubadas no rúmen durante diferentes tempos, inseridas no duodeno e coletadas nas fezes.....	36
Figura 9 - Relação entre o fluxo duodenal de digesta (g de MS/dia) estimado utilizando lignina em detergente ácido (LDA) ou fibra em detergente ácido (FDA) como marcador.....	37
Figura 10 - Fluxo duodenal de MS em g/dia de bovinos alimentados com dieta a base de Aveia preta ( <i>Avena strigosa</i> Schreb) e concentrados com ou sem a inclusão de 2, 4, 6% de extrato tanífero, estimado utilizando lignina em detergente ácido (LDA) ou fibra em detergente ácido (FDA) como marcador. ....	37
Figura 11 - Relação entre o fluxo duodenal de digesta (g de MS/dia) estimado utilizando fibra em detergente ácido (FDA) ou alcanos como marcador.....	39
Figura 12 - Fluxo de matéria seca (MS) em g/dia, obtido através de marcadores internos: fibra em detergente ácido (FDA) e alcanos ímpares (C31, C33, C35); e como marcador externo o alcano C32 .....	40

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Caracterização bromatológica dos alimentos testados.....	27
Tabela 2 – Média geral do consumo, concentração duodenal e fecal de n-alcenos.....	38

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO 1:</b> Análise estatística dos teores de FDN após 12, 24, 36 e 48 horas de incubação no rúmen e após a passagem pelos intestinos de bovinos.....	59
<b>ANEXO 2:</b> Análise estatística dos teores de FDA após 12, 24, 36 e 48 horas de incubação ruminal e após a passagem pelos intestinos de bovinos Dados não corrigidos e corrigidos pelo desaparecimento intestinal de LDA.....	61
<b>ANEXO 3:</b> Análise estatística dos teores de LDA após 12, 24, 36 e 48 horas de incubação ruminal e após a passagem pelos intestinos dos bovinos.....	65
<b>ANEXO 4:</b> Análise estatística do desaparecimento da LDA e FDA nos diferentes tempos de incubação.....	67
<b>ANEXO 5:</b> Análise estatística do fluxo de matéria seca (MS) em g/dia, obtido através de marcadores internos: fibra em detergente ácido (FDA) e alcanos ímpares (C31, C33, C35); e como marcador externo o alcano C32.....	70
<b>ANEXO 6:</b> Exemplo de Cromatograma que ilustrado a concentração de <i>n</i> -alcanos em amostra de forragem.....	75

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 HIPÓTESE.....</b>	<b>14</b>
<b>3 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Fluxo de Digesta.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Metodologias para determinação do fluxo de digesta.....</b>	<b>16</b>
<b>3.3 Marcadores.....</b>	<b>18</b>
3.3.1 Marcadores Internos.....	19
3.3.2 Marcadores Externos.....	20
<b>3.4 Alcanos.....</b>	<b>23</b>
3.4.1 Aplicação dos Alcanos em estudo de nutrição.....	24
<b>3.5 Determinação da digestibilidade intestinal da fibra técnica dos saquinhos móveis.....</b>	<b>24</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Local e época.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Estudo do desaparecimento ruminal e intestinal das frações .....</b>	<b>27</b>
4.2.1 Material experimental.....	27
4.2.2 Preparação, pesagem e incubação <i>in situ</i> das amostras.....	28
4.2.3 Medida da digestibilidade intestinal da fibra.....	28
<b>4.3 Avaliação do uso de Alcanos, FDA e LDA como marcadores do fluxo duodenal de digesta em bovinos .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4 Análises laboratoriais .....</b>	<b>29</b>
<b>4.5 Cálculos.....</b>	<b>31</b>
<b>4.4 Análises Estatísticas.....</b>	<b>31</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
<b>5.1 Desaparecimento ruminal e intestinal das frações fibrosas.....</b>	<b>32</b>
<b>5.2 Fluxo duodenal de digesta em bovinos estimado com FDA ou LDA como marcador interno.....</b>	<b>36</b>
<b>5.3 Recuperação fecal de alcanos e estimativa do fluxo de digesta duodenal em bovinos utilizando alcanos ou FDA como marcadores.....</b>	<b>38</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>6.1 Desaparecimento ruminal e intestinal das frações fibrosas.....</b>	<b>41</b>
<b>6.2 Fluxo duodenal de digesta em bovinos estimado com FDA ou LDA como marcador interno.....</b>	<b>42</b>
<b>6.3 Recuperação fecal de alcanos e estimativa do fluxo de digesta duodenal em bovinos utilizando alcanos ou FDA como marcadores.....</b>	<b>43</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>58</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A intensificação da produção de alimentos cada vez mais se torna indispensável em um mundo que o número de habitantes ultrapassa os 7 bilhões. No entanto essa intensificação deve ser acompanhada de uma racionalização na utilização de insumos, assim como na diminuição da emissão de resíduos à natureza. Buscando atender a essas demandas, têm sido desenvolvidos sistemas nutricionais para ruminantes baseados em energia e proteína metabolizável (AFRC, 1993 e NRC, 2001). A proteína metabolizável representa a soma dos aminoácidos de origem microbiana e de origem alimentar que chegam com a digesta no duodeno e estão disponíveis para absorção no intestino delgado.

O fluxo de digesta no duodeno pode ser medido com uso de cânulas reentrantes (PORTER & SINGLETON, 1971a). Contudo, em função da complexidade e necessidade de equipamento não convencional para efetuar tal medida, usualmente o fluxo de digesta duodenal é estimado pelo uso de marcadores externos ou internos. Medidas de fluxo duodenal de digesta obtidas com marcadores externos são frequentemente sujeitas a alta variabilidade associada a fatores que incluem grau de mistura do marcador com a digesta, procedimentos de dosagem e coleta de amostras, exatidão e precisão analítica, grau de recuperação, entre outros (OWENS & HANSON, 1992). Várias destas deficiências seriam superadas com uso de marcadores internos, os quais seriam constituintes naturais do alimento, mas indigestíveis no compartimento gastrointestinal em estudo.

Frações indigestíveis do alimento ou da fibra são frequentemente utilizadas como marcadores internos para medir excreção fecal e/ou digestibilidade total (LIPPKE et al., 2000; LANDAU et al., 2005; SILVA et al., 2007). Nesse caso, o marcador corresponde ao resíduo remanescente após incubação *in situ* ou *in vitro*, durante pelo menos cinco dias, de amostras de alimento e fezes. De outro modo, em estudos de digestibilidade que utilizam animais canulados no duodeno e mantidos em gaiolas de metabolismo, onde a excreção fecal total é mensurada, o fluxo duodenal de digesta poderia ser estimado com um marcador interno que seja indigestível nos intestinos, independentemente do seu grau de desaparecimento no rúmen. Nesta perspectiva, PORTER & SINGLETON (1971a) observaram que não houve digestão intestinal da lignina em detergente ácido (LDA) no intestino de ovinos. A LDA apresenta a vantagem ser obtida por um método rotineiro em laboratórios de análise de alimentos (BERCHIELLI, 2005). Entretanto problemas relacionados ao método analítico e a repetibilidade dos resultados obtidos na determinação da LDA, têm sido um empecilho na utilização desta fração como indicador. Em um estudo subsequente a este (PORTER &

SINGLETON, 1971b), foi observado que 95 a 100% da celulose digestível desaparece no rúmen e não nos intestinos. Estes resultados indicam o potencial uso de FDA como alternativa ao LDA como marcador do fluxo de digesta no duodeno. Em função de sua maior concentração nas amostras, a análise de FDA usualmente tem maior precisão analítica e eventuais variabilidades analíticas resultariam em menor variabilidade nas estimativas de fluxo de digesta comparado à LDA. Contudo, o uso de FDA como marcador para estimar o fluxo duodenal de digesta necessita ainda ser consistentemente avaliado.

O objetivo deste trabalho foi avaliar se, e em que grau, os componentes da fibra dos alimentos desaparecem no intestino delgado e, desta forma, seu potencial de uso como marcadores internos de fluxo de digesta duodenal em ensaios de digestibilidade. Além disso, foi avaliado também o uso de alcanos como marcadores interno e externo do fluxo de digesta duodenal.

## **2 HIPÓTESE**

Componentes da fibra dos alimentos que escapam da fermentação ruminal não são digeridas no trato digestivo inferior e podem ser utilizados como marcadores do fluxo de digesta duodenal.

O fluxo de digesta duodenal estimado com componentes da fibra indigestíveis nos intestinos é similar ao estimado com o uso de alcanos.

## 3 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

### 3.1 Fluxo de Digesta

O ruminante desenvolveu um complexo e eficiente, mecanismo digestivo para degradação e absorção dos nutrientes da parede celular das plantas (MERTENS, 1993). Os aspectos dinâmicos da digestão em ruminantes incluem o fluxo e concentração da ingesta no trato digestivo. Esse processo envolve a taxa de passagem de material indigestível e “turnover”, que por sua vez envolve a taxa de digestão e captação líquida de nutrientes (Digestibilidade) (VAN SOEST, 1994). “Turnover” é o efeito de mistura que ocorre quando há fluxo de entrada em um compartimento que tem uma ou mais saídas para balancear a entrada. (VAN SOEST, 1994).

A digesta no trato gastrointestinal é constituída de material particulado e água, em que é dissolvida uma série de solutos orgânicos e inorgânicos da dieta ou mesmo de material de origem endógena. A proporção relativa desses componentes na digesta é variável de acordo com a secção do trato (FAICHNEY, 1975). De acordo com France & Siddons (1986), a digesta apresenta uma fase líquida (líquido e pequenas partículas) e outra sólida (médias e grandes partículas). Outro importante constituinte da digesta que flui a partir do rúmen são os microrganismos ruminais bactérias em sua maioria, que são responsáveis por grande parte do aporte de proteína que será disponibilizada ao animal (VAN SOEST, 1994).

O fluxo de digesta pode ser considerado em termos de velocidade, taxa de fluxo ou taxa de passagem (WARNER, 1981). Velocidade que tem unidade de distância por unidade de tempo, é aplicada somente para segmentos tubulares do trato gastrointestinal (TGI), onde fornecem um índice de motilidade intestinal. Taxa de fluxo refere-se ao volume ou massa de digesta que passa um ponto do TGI por unidade de tempo e é medida em associação com outras análises e permite fazer estimativas da partição da digestão, ou seja, a extensão da digestão, absorção e/ou secreção ocorrendo em segmentos definidos do trato. Já a taxa de passagem, mede o tempo em que uma porção da digesta é exposta ao processo de mistura digestão e absorção no TGI, ou em um segmento específico deste (FAICHNEY, 2005). A determinação do fluxo de digesta pode ser realizada por meio de inúmeras técnicas. Ainda que na determinação do fluxo de digesta no trato como um todo, seja possível determinar por meio da recuperação fecal de um marcador, quando se deseja saber o fluxo em um determinado seguimento do trato digestivo, isso requer o uso de animais com algum grau de preparação cirúrgica (GROVUM, 1986).

A preparação dos animais pode ser feita com cânulas simples ou reentrantes.

### 3.2 Metodologias para determinação do fluxo de digesta

Existem inúmeras metodologias desenvolvidas para avaliação do fluxo de digesta ao longo do trato digestivo em ruminantes. No entanto, é consenso a utilização de animais cirurgicamente preparados em estudos dessa natureza. Nesse sentido diferentes aparatos com esse intuito têm sido desenvolvidos, cada um com suas limitações e potencialidades.

A cânula reentrante desenvolvida por Croker & Markowitz, 1936, foi utilizada pela primeira vez por Philipson, 1952, em ovinos em seus primeiros estudos sobre fisiologia digestiva. Por meio de uma cânula era desviado o fluxo para fora do corpo do animal e assim era realizada a medida direta por coleta total da digesta (WENHAM, 1979). Esse procedimento de desvio, amostragem e retorno da digesta para o intestino do animal, interfere sobre o fluxo de digesta (SAMANIEGO, 1996).

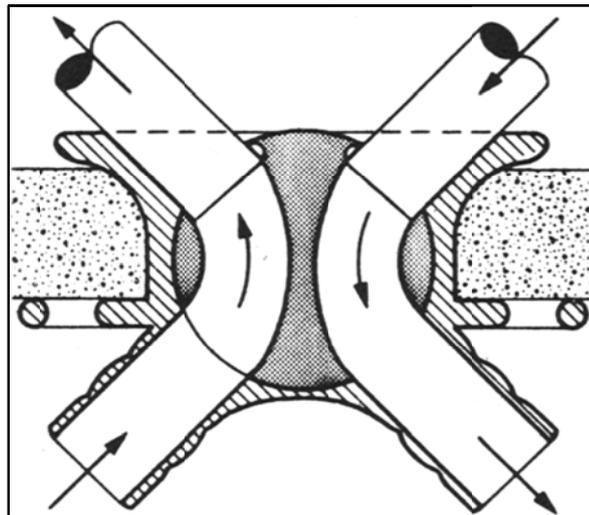


Figura 1 - Cânula reentrante projetada para ovinos e bovinos (Ivan & Johnston, 1981)

O principal problema associado ao uso da cânula reentrante é associado ao o bloqueio da cânula e perda de digesta quando a cânula inadvertidamente torna-se “separada”, além da possibilidade de um tempo de recuperação pós-cirúrgico bastante longo e comprometimentos pós cirúrgicos podendo levar o animal à óbito (HARMON & RICHARDS, 1997). Procedimentos similares, no duodeno e íleo de ovinos (BROWN, 1968) em bovinos (COONER et al. 1957) e (HORNEY et al. 1972) indicam tempos de patencia de 6 à 8 meses (HARMON & RICHARDS, 1997). A maior vantagem da cânula reentrante é que o fluxo de

digesta pode ser medido diretamente ao mesmo tempo em que é possível fazer sub-amostras (PHILLIPSON, 1969).

A cânula tipo “T” desenvolvida por Ivan, 1974 para ensaios com suínos, e mais tarde sendo aplicada em ensaios com ovinos (IVAN, 1977; IVAN & JOHNSTON, 1979), permite também a coleta total da digesta. Quando fechada toda a digesta flui pelo lúmen da cânula, quando em coleta a válvula é girada e então direciona toda a digesta para o exterior e por meio de um acessório é possível fazer a digesta retornar para o intestino, como na figura abaixo.

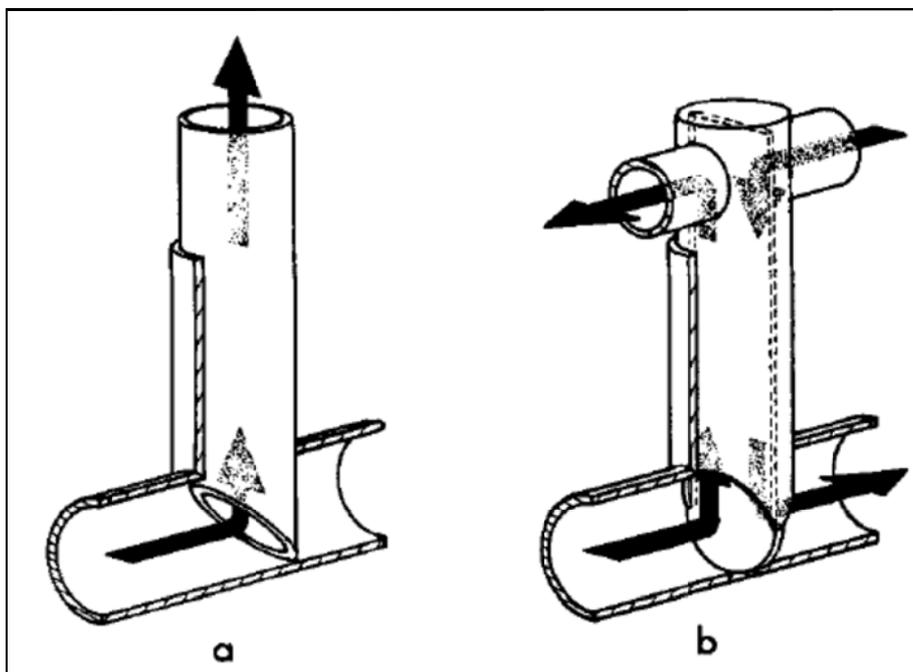


Figura 2 - Cânula “T” fechada, (a) com a válvula aberta permite a coleta total da digesta (b) com a válvula que permite a sub-amostragem e devolução da digesta. (Komarek, 1981).

Em 1953 Macdonald, descreveu a preparação de uma cânula duodenal simples em forma de “T”. Este tipo da cânula necessita de um procedimento bem menos evasivo, sendo que o tempo de patência pode ser de até 2 anos, é mais leve, de menor custo e de fácil fabricação (HARMON & RICHARDS, 1997).

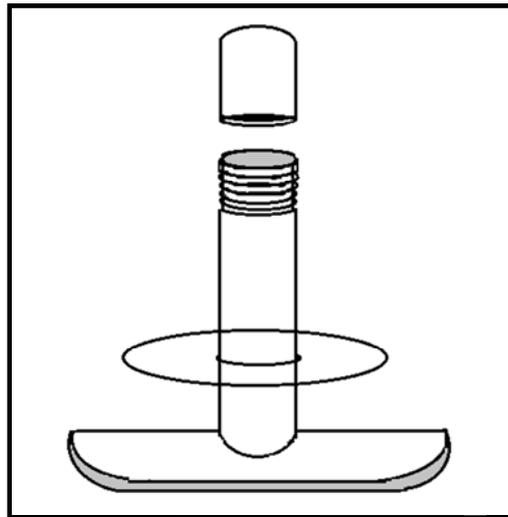


Figura 3 - Cânula “T” Simples, modelo semelhante ao usado em ovinos e bovinos. (Stein et al. 1997).

Embora mais utilizada no meio científico, a cânula simples “T”, apresenta alguns inconvenientes, os dois principais aspectos que podem causar problemas nas estimativas estão associados a heterogeneidade da digesta e marcadores. O primeiro fator pode causar maior interferência nos resultados principalmente em estudos com cânula no duodeno do que no íleo dos animais que caracteristicamente é mais homogêneo. Já os marcadores são responsáveis por grande parte dos erros em estudos de digestão em ruminantes, isso muito em função da completa homogeneização do marcador a digesta (HARMON & RICHARDS, 1997).

Um aspecto importante que deve ser considerado, independente do tipo de cânula utilizada, é no que diz respeito a interferência da colocação da cânula no fluxo da digesta e na motilidade do intestino, para que dessa forma os resultados possam ser os mais fidedignos possíveis. Em estudos radiológicos com o intuito de estabelecer as possíveis interferências da utilização das cânulas, Wenham, 1979 e Wenham & Wyburn, 1980, observaram que a cânula reentrante, adaptada por Ash em 1962 apresentou maior impacto no fluxo de digesta e na motilidade intestinal, e a cânula “T” simples foi a que apresentou menor influencia sobre o fluxo.

### 3.3 Marcadores

Quando empregada a cânula simples “T” se faz necessária a utilização de marcadores uma vez que apenas parte da digesta que foi pelo trato esta sendo amostrada (Hogan, 1964).

Um marcador é um composto de referência utilizado para monitorar aspectos químicos (hidrólise e síntese) ou físicos (fluxo) da digestão. Os marcadores são rotineiramente

utilizados para estimar o fluxo de digesta e a excreção fecal em ruminantes (OWENS & HANSON, 1992). Indicadores são substâncias indigestíveis, normalmente de fácil determinação, podendo ser administradas com o alimento ou diretamente em algum segmento do aparelho digestório, sendo posteriormente identificados e quantificados nas fezes ou ao final do segmento em estudo (WARNER, 1981).

Owens & Hanson, 1992 e Faichney, 1975 sugerem que um marcador ideal tenha as seguintes características: 1) não deve ser absorvido; 2) não deve afetar ou ser afetado pelo trato gastrointestinal ou pela população microbiana; 3) devem fluir paralelamente ou ser fisicamente semelhantes ou intimamente associada com o material a ser marcado, e; 4) deve ter um método específico e sensível de estimação.

Uma vez que a digesta pode ser dividida em duas fases é recomendável que sejam utilizados um marcador para cada fase, pois as fases não possuem a mesma proporção na digesta duodenal (WALLER et al. 1980), fluídos passam do rúmen mais rapidamente do que partículas pequenas, e pequenas partículas densas passam do rúmen mais rapidamente do que partículas grandes. Nenhum marcador único preenche todos estes critérios (MERCHEN, 1993), mas o grau tolerável de erro difere com a variável que está sendo medida (OWENS & HANSON, 1992).

### **3.3.1 Marcadores Internos**

Esses marcadores são comumente empregados nos estudos de digestão, por apresentarem uma série de vantagens frente aos marcadores externos. Estes marcadores são aplicados principalmente em experimentos com animais em pastejo onde é dificultada a dosagem individual dos animais, marcadores internos apresentam a vantagem de serem componentes indigestíveis presentes no alimento, não havendo, portanto, a necessidade de prévio preparo (BERCHIELLI et al. 2005). Entretanto o seu uso ainda tem restrições em função de erros provocados em função da modificação do marcador no alimento e nas fezes, ou seja, o marcador pode ser quimicamente modificado pela ação da digestão (MARAIS, 2000).

Proposta inicialmente por Lippke et al. 1986, os componentes indigestíveis da parede celular, como fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) têm sido usados (ÍTAVO et al., 2002a; ZEOULA et al., 2002), podendo ser obtidos pela incubação ruminal em sacos de náilon ou incubação *in vitro* em líquido ruminal (FREITAS et al., 2002). Segundo Cochran et al. (1986), a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e a fibra em

detergente ácido indigestível (FDAi) são indicadores com potencial de utilização para estimativa da digestibilidade. Entretanto, problemas com relação a variações nos resultados, possivelmente em função do método de análise com esses marcadores são relatados (DETMANN et al. 2001). As frações indigestíveis da fibra apresentam ainda problemas relacionados com a recuperação fecal, que dificultam a adoção de metodologias baseadas nessas frações. (KOZLOSKI, et al. 2009)

Outro componente da fibra que pode ser utilizado como marcador, LDA tem sua utilização limitada em função de problemas relacionados a variabilidade dos resultados obtidos nas análises. Mesmo com uma vasta quantidade de pesquisas, a composição da lignina permanece obscura e, conseqüentemente, a determinação quantitativa da lignina é basicamente empírica (FAHEY et. al. 1983).

A complexa e variável estrutura da lignina torna difícil a adoção de metodologias específicas que determinem, com alta confiabilidade, sua real concentração (BERCHIELLI et al. 2005). Existem evidências que apontam para uma modificação na composição química da lignina do alimento com relação à lignina recuperada nas fezes (ELAN & DAVIS, 1961). Embora rotineiramente analisada nos laboratórios, a lignina parece ser limitada para medir fluxo de digesta principalmente em dietas com teores elevados de concentrados (THONEY et al., 1979).

### 3.3.2 Marcadores Externos

Os marcadores externos são extensamente utilizados em nutrição de ruminantes, sejam na medida de fluxo, excreção fecal ou nas estimativas de digestibilidade de dietas. Entre eles podemos citar os compostos de metais trivalentes, tais como, o Cromo (Cr), Titânio (Ti), Cobalto (Co) e o Rutênio (Ru). Óxidos e sais de metais trivalente e tetravalente têm características de marcadores inerte e tem sido usado como tal, com diferentes graus de o sucesso (MARAIS, 2000).

O Cobalto é utilizado na forma de Co-EDTA com um ânion monovalente, geralmente é utilizado o Lítio, formando um sal (Li-Co-EDTA). Outro metal de transição, é o Rutênio que é utilizado como marcador de partículas na forma de fenantrolina de Rutênio (Ru-Phe), tem alta recuperação, segundo Marais, 2000, variando de 93 à 102%.

O marcador externo que ainda é o mais utilizado em ensaios com ruminantes é o cromo em suas diversas formas de apresentação (CARVALHO et al. 2007). Apesar de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$

de ser conhecido por se comportar de forma independente de ambas as fases líquida e partículas de digesta no trato gastrointestinal (FAICHNEY, 1975), considera-se como um marcador de referência em nutrição para a estimativa da produção de MS fecal (KOTB & LUCKEY, 1972; LE DU & PENNING, 1982) Este marcador pode ser administrado oralmente, com cápsulas de gelatina, misturado à ração ou ainda, por meio de dispositivos de liberação controlada. O uso do  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  tem algumas restrições como recuperações incompletas (MIR et al. 1989; SOARES et al. 2004), segundo Kozloski et al. 2006, outro inconveniente são flutuações nas concentrações fecais de Cromo ao longo do dia.

O cromo é sempre dado aos animais no estado trivalente, que não é tóxico para humanos e animais. No entanto, análises laboratoriais requerem cromo hexavalente para a determinação colorimétrica da concentração de cromo em solução, e cromo hexavalente é altamente tóxico e cancerígeno (COSTA, 1997; SEDMAN et al., 2006).

O Cromo pode ser também utilizado com marcador da fase líquida na forma de Cr-EDTA, assim como o cobalto também é combinado com um sal de Lítio, para que ocorra o processo de cristalização (UDÉN et al. 1980). Quando o cromo é radio-marcado ( $^{51}\text{Cr}$ ), este utiliza o Cr-EDTA como veículo (MARAIS, 2000).

De outra forma, o cromo pode ser utilizado como cromo mordente, ou seja, marcando a fibra, uma vez que estes compostos ligam-se firmemente aos componentes da parede celular das plantas. A recuperação da fibra marcada com cromo nas fezes, é influenciada pela digestibilidade do material da planta marcado. Assim menores recuperações fecais estão associadas à material com alta digestibilidade. Além disso, o tamanho das partículas exerce forte influencia sobre as taxas de passagens determinadas (BRUINING & BOSCH, 1992).

Uma importante alternativa que vem sendo testada e utilizada com êxito é o Óxido de Titânio ( $\text{TiO}_2$ ), por ter uma elevada recuperação fecal, em torno de 98% (MARAIS, 2000) e se dosado entre 2 e 3 gramas/dia, não traz nenhum malefício ao animal além de não ter propriedades carcinogênicas como o Cromo (MYERS, et al. 2004). Mulebach et al. 1970, observaram que o óxido de titânio em contato com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ocorre uma reação que produz uma intensa coloração laranja, característica essa que vem sendo explorada na determinação da concentração de óxido de titânio (NJAA et al. 1961).

Os metais de transição utilizados como marcadores podem ser determinados, de maneira geral, por espectrometria de absorção atômica.

Além dos metais de transição, os lantanídeos, ou terras raras, vem sendo utilizados em estudos de cinética digestiva. Esses elementos são indigestíveis e não são absorvidos no trato gastrointestinal de mamíferos e vem sendo testados como marcadores de fase sólida em

estudos de fluxo, assim como, em estimativas de consumo de forragem e vacas de leite (RIBEIRO FILHO, et al. 2009) Vários destes metais tais como: lantânio, cério, neodímio, samário, európio, disprósio, itérbio e érbio, têm sido impregnados ao material vegetal e usados como marcadores (MARAIS, 2000). A Adsorção de marcadores por partículas permite a medição direta do comportamento de partículas, assumindo que o marcador não influencia digestão e passagem. Elementos de terras raras têm sido usados para marcar partículas diretamente porque eles possuem propriedades de adsorção (KYKER, 1962). Isótopos radioativos de cério (ELLIS & HUSTON, 1968), disprósio (ELLIS, 1968) e itérbio (ELLIS et al., 1979) são absorvidos por partículas e têm sido empregados como marcadores de partículas (TEETER et al. 1984).

Quiroz et al. 1988 e Moore et al. 1990, observaram que os lantanídeos podem marcar diferentes partículas, e até mesmo diferentes ingredientes em um único experimento.

No entanto esta técnica exige uma preparação prévia do material marcado. O procedimento de marcação da fibra pode ser feito impregnando o material pulverizando uma solução contendo o lantanídeo, ou ainda por imersão em solução contendo o marcador (COMBS et al. 1992). Embora o segundo processo seja mais eficiente para marcar a fibra, este procedimento pode remover a maior parte do OM solúvel do alimento e, assim, alterar a sua digestibilidade e dinâmica do fluxo (ALLEN, 1992).

Também é reportado na literatura a presença de matérias no rúmen com afinidade com os elementos lantanídeos, essa migração é por alguns pesquisadores considerada insignificante, no ponto de vista analítico (HARTNELL et al. 1979) e por outros um sério problema que inviabilizaria sua utilização (MADER et al. 1984; TEETER et al. 1984). Além disso, CROOKER et al. 1982, relatou possível solubilização do itérbio no abomaso, sob condições ácidas. Quanto a sua análise na maioria dos casos é empregada a espectrofotometria de absorção atômica (BERCHIELLI, et al. 2005)

Mesmo com todos os inconvenientes relatados é possíveis fontes de problemas já descritas, muitos pesquisadores ainda utilizam os lantanídeos, e principalmente o cloreto de itérbio como marcador do fluxo de partículas tendo resultados bastante satisfatórios (PRIGGE et al. 1981; BERCHIELLI et al. 1998).

Nos estudos que objetivam avaliar o fluxo de nitrogênio de origem microbiana, da mesma forma podem ser utilizados marcadores externos, tais como os isótopos de nitrogênio ( $^{15}\text{N}$ ), de enxofre ( $^{35}\text{S}$ ) e do Fósforo ( $^{32}\text{P}$ ).

Estes isótopos são em geral utilizados para determinação do fluxo de proteína microbiana no duodeno. O  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  é um isótopo radiativo de meia vida curta, o composto

no rúmen é reduzido a sulfito, e incorporado as bactérias uma vez que as bactérias passam a sintetizar aminoácidos sulfurados, o procedimento de análise é descrito por Elliot & Armstrong, 1982. O método é baseado na espectrometria de cintilação líquida. O uso do  $^{35}\text{S}$ , ainda encontra restrições, mesmo que sua meia vida seja relativamente curta, cerca de 87 dias, este elemento possui um potencial risco a saúde e pode acumular-se na carne e no leite (MARAIS, 2000).

Semelhante problema é atribuído a  $^{32}\text{P}$ , que embora seja um marcador eficiente, agindo à nível de fosfolipídios da parede celular bacteriana (BUCHOLTZ & BERGUEN, 1973), seu uso se torna difícil em função do seu manuseio que requer muitos cuidados.

Dos isótopos, o mais amplamente utilizado é o  $^{15}\text{N}$ , na forma de  $[\text{}^{15}\text{N}](\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Isto se deve, por algumas características: ser um isótopo estável; não apresentar riscos a saúde; não ser encontrado naturalmente nos alimentos; e não marca o nitrogênio de origem endógena, dessa forma todo o  $^{15}\text{N}$  encontrado será de origem microbiana (BRODERICK & MERCHEN, 1992). Este método propicia uma ótima precisão, no entanto a sua análise além de laboriosa tem o custo um pouco elevado, uma vez que utiliza um espectrômetro de massas (I.A.E.A, 1985). Embora não seja possível a incorporação direta do  $^{15}\text{N}$  pelos protozoários, esse processo se dá de forma indireta uma vez que os protozoários em geral predam as bactérias ruminais (MARAIS, 2000).

### 3.4 Alcanos

Praticamente todas as plantas superiores têm uma camada epicuticular de cera em sua superfície externa, que normalmente é uma mistura complexa de compostos lipídicos alifáticos sintetizada pela planta (DOVE & MAYES, 2006). A composição dessa cera difere muito entre diferentes espécies de plantas e, até certo ponto, em diferentes partes da mesma planta. Folhas e partes florais tendem a ter as maiores concentrações e raízes têm níveis muito baixos (DOVE & MAYES, 1996). Outro aspecto importante é que essa variação no perfil dos componentes das ceras das plantas permite fazer inferências sobre a proporção de diferentes plantas na dieta consumida pelo animal. Uma vez que padrão desses componentes nas fezes surge a partir uma combinação específica de padrões de vegetais na dieta.

Dentre as várias substâncias que compõem a cera das plantas, surgiram diversas com potencial de utilização como indicadores, tais como os ácidos graxos de cadeia longa (GRACE & BODY, 1981) e, especialmente, os hidrocarbonetos alifáticos saturados (n-alcanos) (MAYES & LAMB, 1984). Os n-alcanos são compostos orgânicos de cadeia aberta

formados por carbono e hidrogênio, onde a diferença entre dois membros sucessivos da série é constante (são homólogos). Os alcanos que possuem de 1 a 4 carbonos em sua cadeia, são gases, os que possuem de 5 a 17 são líquidos, aqueles que possuem mais de 18 carbonos em sua cadeia são sólidos (OLIVEIRA & PRATES, 2000). Também são conhecidos como parafinas aqueles que possuem 20 ou mais carbonos em sua cadeia (MORRISON & BOYD, 1972).

Nas plantas encontram-se alcanos com comprimentos da cadeia de carbono variando de  $C_{18}$  a  $C_{37}$ , havendo predominância dos de cadeia ímpar sobre os pares (CHIBNALL et al., 1934; HAMILTON & POWER, 1969; TULLOCH, 1981; e OLIVEIRA et al., 1997).

### **3.4.1 Aplicação dos Alcanos em estudos de Nutrição de Ruminantes**

Com a necessidade do conhecimento de aspectos chaves para o aumento da acurácia dos estudos em nutrição de ruminantes, tais como: A medida exata da quantidade consumida de forragem por animais em pastejo; identificação da composição de espécies (incluindo também o consumo de diferentes partes da mesma planta) pastejadas pelo animal; e a medida dos nutrientes disponíveis para absorção no trato digestivo do animal, após a digestão ruminal (DOVE & MAYES, 1991). Os componentes encontrados nas ceras das plantas, em especial os alcanos, têm um grande potencial de suprir estas demandas.

Evidências sugerem que n-alcanos exógenos poderiam não ser marcadores satisfatórios para estudos de fracionamento de partícula, tempo retenção ou fluxo de digesta, uma vez que parece não haver afinidade tanto para a fase particulada quanto para a fase líquida da digesta (MAYES et al. 1988). Entretanto, os n-alcanos de cadeia ímpar possuem uma forte associação com as partículas sólidas parecem ser apropriados como marcadores para estudos de cinética da fase sólida da digesta (DOVE & MAYES, 1991).

O potencial dos n-alcanos naturais como marcadores do fluxo de digesta tem sido mencionado em alguns trabalhos (MAYES et al. 1988, KAFILZADEH & PARKER, 1990) entretanto ainda não foram publicados relatos do uso dessa técnica.

### **3.5 Determinação da digestibilidade intestinal pela técnica dos sacos móveis**

Inicialmente proposta por Sauer et al. 1983, para determinar a digestibilidade da proteína em suínos, a técnica foi adaptada por Kirkpatrick & Kennelly, 1984 para determinação da fração proteica dos alimentos em ruminantes. A técnica consiste em uma

pré-incubação ruminal dos alimentos a serem testados, e posterior inserção dos mesmos no intestino dos animais (TRINÁCTÝ et al. 2003). Também pode-se incluir nos procedimentos antes da inserção dos sacos no intestino dos animais uma incubação em solução ácida e pepsina, procedimento utilizado por Hvelplund, 1985; Kendall et al., 1991; Hvelplund et al., 1992, ou omitida como nos trabalhos de Rooke, 1985; de Boer et al., 1987; Deacon et al., 1988; Varvikko & Vanhatalo, 1990. Segundo Vanhatalo et al. 1995, o processo o tratamento das amostras em solução de pepsina em meio ácido, se torna dispensável na análise da digestibilidade intestinal da proteína bruta, uma vez que as amostras sejam pré-incubadas no rúmen. O procedimento se completa com a coleta dos sacos junto as fezes e processados em laboratório de maneira semelhante ao procedimento realizados nos ensaios *in situ* convencionais (FRYDRYCH, 1992).

O uso da técnica exige a observação de alguns aspectos que são relevantes para a acurácia dos resultados obtidos com essa técnica, tais como: a porosidade do material saco, relação amostra e superfície de contato com o inóculo, efeitos da dieta do animal experimental, local de recuperação de saco e contaminação microbiana (HVELPLUND, 1985; ROOKE, 1985;. VOIGT et al, 1985).

A literatura cita dimensões de saquinhos bastante variados: 3x5cm, 3,5x5,5cm, 3x10cm, 6x6cm, 7x11cm (HERNÁNDEZ, 1995), Ramos et al. 2004, utilizaram saquinhos de 4x3cm, Vanhatalo et al. 1995, utilizaram sacos com dimensões de 6x12 cm. Segundo Teixeira et al. 1989, saquinhos com dimensões maiores tendem a ter maior passagem pelos intestinos.

A porosidade do material utilizado para confecção dos saquinho é bastante variável, variando desde 9µm (HVELPLUND, 1985) até 80µm (TODOROV & GIRGINOV, 1991). Entretanto segundo Teixeira et al. 1989, a maioria dos autores utilizam material com porosidade média de 50µm.

A proporção de amostra por cm<sup>2</sup> mais comum é de 20mg/cm<sup>2</sup> (VALADARES FILHO, 1994). Tempo médio de retenção desses saquinhos é bastante variável sendo a alimentação do animal irá influenciar no transito intestinal. No entanto, pouca ou nenhuma influencia este fator tem sobre a digestibilidade intestinal (GRAHAM et al., 1985; HVELPLUND, 1985; VOIGHT et al.,1985; VAN STRAALLEN et al., 1993).

No caso do uso de forrageiras, algumas pesquisas tem mostrado certa influencia da técnica sobre a digestibilidade no intestino, levando a uma diminuição da digestibilidade intestinal, principalmente da MS, quando o tempo de passagem for inferior a 15 horas. Para tempos superiores a este não há prejuízo na digestibilidade da MS (HERNÁNDEZ, 1995).

A pesar das potenciais fontes de variação que foram observados, vários estudos têm mostrado que a técnica dos sacos móveis pode ser útil na predição da digestibilidade intestinal de proteína (STERN et al. 1997).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local e época

O projeto foi desenvolvido nas instalações do Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes do Departamento de Zootecnia, pertencente ao Centro de Ciências Rurais, da Universidade Federal de Santa Maria. As análises de alcanos foram procedidas nas instalações do laboratório de Nutrição animal da EMBRAPA, Centro de Pesquisa Pecuária Campos do Sul (CPPSUL), Bagé-RS. O projeto foi desenvolvido ao longo dos anos de 2010 e 2011.

### 4.2 Estudo do desaparecimento ruminal e intestinal das frações fibrosas

#### 4.2.1 Material experimental

Foram utilizados seis alimentos diferentes (Aveia Preta (*Avena strigosa* Schreb), capim elefante (*Penisetum purpureum* Schumach), feno de alfafa (*Medicago sativa* L.), resíduo da extração de óleo de girassol (*Helianthus annuus*) e milho moído (*Zea mayz*), feno de Tifton (*Cynodon dactylon* cv. Tifton 85)), os quais foram secos em estufa com circulação de ar forçado a 55°C e moídos em moinho Willey com peneira de 2 mm. A caracterização bromatológica dos alimentos é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização bromatológica dos alimentos testados.

Alimento	MS (%)	% na MS				
		MO	MM	FDN	FDA	LDA
Aveia Preta	93,02	91,79	8,21	49,78	24,41	1,06
Capim Elefante Anão	89,47	89,79	10,21	73,04	38,08	6,06
Feno de Alfafa	86,79	92,65	7,35	55,21	38,08	9,33
Feno de Tifton 85	88,80	89,36	10,64	63,51	32,24	8,86
Grão Milho	85,21	98,37	1,63	10,56	6,38	3,20
Resíduo de Girassol	79,85	92,35	7,65	54,83	32,42	11,77

#### 4.2.2 Preparação, pesagem e incubação ruminal das amostras

Foram pesadas aproximadamente 1,75g da amostra parcialmente seca de cada um dos alimentos em saquinhos de poliéster com dimensões de 7cm × 5,5cm, selados em seladora elétrica e colocados um saco de poliéster maior e levados ao rúmen. Foi utilizado um bovino com peso médio de 300 kg de PV dotado de cânula ruminal, mantido sob pastejo com suplementação a base de farelo de trigo, possuindo acesso a água e sal mineral à vontade. Os tratamentos foram diferenciados pelo tempo de incubação *in situ*, sendo 12, 24, 36 e 48 horas, com o intuito de avaliar se a degradabilidade intestinal das frações sofreriam influencia do tempo de retenção no rúmen. Como âncora, foram utilizados chumbos pesando em média 300 gramas. Foram incubadas no rumem 10 replicatas de cada amostra em um bovino dotado de cânula ruminal, por diferentes tempos 12, 24, 36 e 48 horas sendo as mesmas inseridas sequencialmente: iniciando com a introdução dos saquinhos correspondentes ao tratamento 48 horas, após o tratamento 36 horas, seguido do tratamento 24 horas e finalizando com a incubação dos saquinhos pertencentes ao tratamento com 12 horas de permanência no rúmen, totalizando 280 saquinhos por período.

#### 4.2.3 Medida da digestibilidade intestinal

O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos ao acaso, sendo o bloco representado por cada par de saquinhos contendo cada amostra, em cada tempo de incubação ruminal. Foram utilizados quatro bovinos da raça holandesa, machos, castrados com peso médio de 153 kg de PV. Os animais possuíam de Cânulas tipo “T” no duodeno e fístula no rumem para coleta de líquido ruminal. Os animais foram alocados em baias individuais de contenção com piso ripado dotadas de cochos de madeira e bebedouros automáticos. Foram utilizados aparatos para coleta total de fezes e arreios para coleta total de urina. A dieta foi à base de Aveia preta (*Avena strigosa* Schreb), fornecida a 2 % de MS/kgP.V. e suplementados com uma ração contendo milho, farelo de arroz desengordurado e farelo de soja 60:40 (volumoso:concentrado). A alimentação foi realizada duas vezes ao dia pela manhã as 8:00 hs, e a tarde as 17:00 hs.

Com base na técnica dos sacos móveis adaptada para ruminantes por Kirkpetrick & Kennelly (1985), duas replicatas, de cada alimento em cada tratamento (12, 24, 36 e 48 horas de incubação ruminal) foram retiradas do rumem, lavadas com água quente e introduzidas no

duodeno por meio da cânula duodenal em cada um dos quatro animais. Os mesmos foram recuperados nas fezes, limpos com água quente, e congelados para posterior análise. As duas replicatas restantes de cada alimento em cada tempo de incubação, ao serem retiradas do rumem, foram limpas com água quente e congeladas para posterior determinação do FDA.

### **4.3 Avaliação do uso de alcanos, FDA e LDA para estimar o fluxo duodenal de digesta**

Paralelamente ao ensaio com saquinhos móveis, foi testado o uso de C32 como marcador externo, dos alcanos C31, C33, FDA e LDA como marcadores internos de fluxo de digesta duodenal. Foram utilizados quatro bovinos da raça holandesa ( $156 \pm 33$  kg), dotados de cânulas no duodeno em um quadrado latino  $4 \times 4$ . A dieta era composta de aveia preta (*Avena strigosa* Schreb) e concentrados a base de farelo de milho, farelo de soja e farelo de arroz desengordurado com ou sem a inclusão de 2, 4, ou 6% da MS do concentrado de extrato tanífero. A proporção da dieta foi de 60:40 (volumoso:concentrado) e o nível de consumo foi de 2% do peso vivo dos animais. Para dosagem do C32 foram utilizados péletes de celulose impregnados com 125 mg de n-dotriacontano ( $C_{32}H_{66}$ ). O fornecimento do marcador externo (C32), foi realizada do 5º ao 15º dia de cada período experimental, pela manhã e a tarde, sempre antes do fornecimento do alimento. Amostras de conteúdo duodenal, assim como amostras das fezes direto do reto, foram coletadas no 11º, 12º, 13º e 14º dia de cada período experimental. Foram coletados 200 ml de conteúdo duodenal em intervalos de 8hs, adiantando duas horas a cada dia. Este cronograma foi desenvolvido para obter 12 amostras de digesta em intervalos de 2 horas. As amostras retais de fezes foram coletadas diariamente do 11º ao 15º dia às 09:00h e 17:00h. Todas as amostras foram compostas por animal em cada período e mantidas congeladas a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente foram secas em estufa de ar forçado a  $55^{\circ}\text{C}$  e moídas em moinho tipo Willey com peneira de 2mm para posterior análise.

### **4.4 Análises laboratoriais**

O teor de matéria seca (MS) das amostras foi determinado por secagem à estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  durante pelo menos 16 h. O conteúdo de cinzas foi determinado por combustão a  $600^{\circ}\text{C}$  durante 3 h. A análise da FDN foi baseada nos procedimentos descritos por Mertens (2002) com uso de  $\alpha$ -amilase termoestável, sem sulfito de sódio, exceto que as amostras foram pesadas em saquinhos de poliéster (KOMAREK, 1993) e tratadas com detergente neutro em autoclave à  $110^{\circ}\text{C}$  durante 40 min. (SENGER et al., 2008). As concentrações de

fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas nas amostras em saquinhos de poliéster (KOMAREK, 1993), os teores de lignina (LDA) foram determinados de acordo com a AOAC (1997, método 973.18). A determinação foi realizada de forma sequencial, ou seja, após a digestão em detergente neutro, os saquinhos foram secos e submetidos a digestão ácida, conforme (ROBERTSON e VAN SOEST, 1981).

A extração e a determinação do conteúdo de n-alcanos na forragem e fezes foram determinadas segundo o protocolo proposto por Dove & Mayes, 2006.

As amostras da forragem, conteúdo duodenal e fezes, secas a 55°C e previamente moídas, foram pesadas em tubos sendo as quantidades de aproximadamente 200mg de amostras de forragem e 100mg de amostras de conteúdo duodenal e fezes. Em cada tubo foi adicionada uma solução padrão contendo 3mg de C22 e 3mg de C34, diluídos em 13,7mL de duodecano. Para o processo de saponificação foram adicionados 1,5mL de KOH (1M) nas amostras de fezes e conteúdo duodenal e 2,0mL nas amostras de forragem. As amostras permaneceram em bloco de aquecimento, a uma temperatura de 90°C, por 16horas. Após o parcial resfriamento, foi adicionado às mesmas, 1,5mL nas amostras de fezes e 2mL de heptano nas amostras de conteúdo duodenal. Em seguida, foram adicionados 4mL de água destilada nas amostras de fezes e conteúdo duodenal e 0,6mL nas amostras de forragem. As amostras foram então agitadas, afim de se obter fases líquidas diferentes e, com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur*, foram transferidos a fase superior (não-aquosa) para outro tubo. Novamente foram adicionados 1,5 e 2,0mL de heptano nos tubos, agitados vigorosamente e em seguida, transferiu-se o sobrenadante da amostra. Com o auxílio de um evaporador com ar comprimido, a amostras foram evaporadas em “banho-maria”. A camada removida foi reconstituída com 0,3mL de heptano e passado em uma coluna de sílica-gel com 1mL de volume. Foi adicionado ao tubo com o extrato evaporado 0,1mL de heptano, passado na coluna de sílica-gel, afim de que possam ser retirados compostos que não são de interesse nesta análise e outros interferentes. A coluna, por fim, é novamente “lavada” com 2,4mL de heptano e os tubos contendo o eluato são colocados novamente em aquecimento para evaporação do heptano. Os extratos foram redissolvidos em 0,25mL de dodecano, colocados em *vials* para leitura cromatográfica.

A identificação e quantificação dos *n*-alcanos foi feita em um cromatógrafo SHIMADZU GC-2010, equipado com um detector de ionização de chama (FID), um carretel *autosampler* AOC-20S e um auto injetor AOC-20i. A coluna utilizada foi uma RTX®1 (30m×0,25mmID×0,25µm fase estacionária (film), absorvente composto de 5% de difenil e 95% dimetil polisiloxano). O gás de arraste foi o N<sub>2</sub> em fluxo constante de 4mL/minuto. A

razão do Split foi de 1:2, e a injeção da amostra 1µL. O fluxo de gases para o detector foram 350, 30 e 35mL/minuto, para o Argônio, Nitrogênio e o hidrogênio, respectivamente. A temperatura do injetor, foi constante em 280°C. A coluna teve o seguinte gradiente de temperatura: 200°C - 3 minutos, 30°C/minuto 230°C - 1 minuto e 6°C/minuto – 300°C – 4minutos, a temperatura do detector, foi de 340°C.

#### 4.5 Cálculos

O fluxo de digesta duodenal (FDD) foi calculado da seguinte forma quando utilizado o alcano C32 como marcador externo:

$$\text{FDD (g MS/dia)} = \text{Dosagem (g/dia)} / \text{Concentração na digesta duodenal (g/g MS)}$$

O fluxo de digesta duodenal (FDD) foi calculado da seguinte forma quando utilizado fibra em detergente ácido, lignina ou alcanos como marcadores internos:

$$\text{FDD (g MS/dia)} = (\text{Excreção fecal (g MS/dia)} \times \text{Concentração nas fezes (g/g MS)}) / \text{Concentração na digesta duodenal (g/g MS)}$$

#### 4.6 Análise estatística

No ensaio com saquinhos móveis a concentração de cada um dos componentes da fibra após a incubação ruminal, de cada alimento e em cada tempo de incubação, foram relacionados através de regressão linear com a concentração dos mesmos nas fezes. Da mesma forma, o fluxo de digesta estimado com o uso de componentes da fibra foi comparado com o estimado com alcanos. Em cada comparação foi gerado um R<sup>2</sup> que indicou o grau de precisão da relação entre as duas medidas. Foi testado se a intercepta era diferente de zero e se o coeficiente de regressão era diferente de 1 utilizando o teste “t”. O fluxo duodenal de matéria seca avaliado com diferentes marcadores foram submetidos ao procedimento GLM do pacote estatístico SAS, 2000, onde foram comparados os fluxos obtidos incluindo os efeitos de tratamento, período e animal.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Desaparecimento ruminal e intestinal das frações fibrosas

Os teores de FDN, FDA e LDA de todas as amostras diminuíram ( $P < 0,05$ ) com o aumento do tempo de incubação ruminal (Figura 4). A variabilidade no número de repetições das diferentes amostras nos diferentes tempos de incubação se deve à perda de saquinhos durante o procedimento experimental ou mesmo durante as análises laboratoriais.

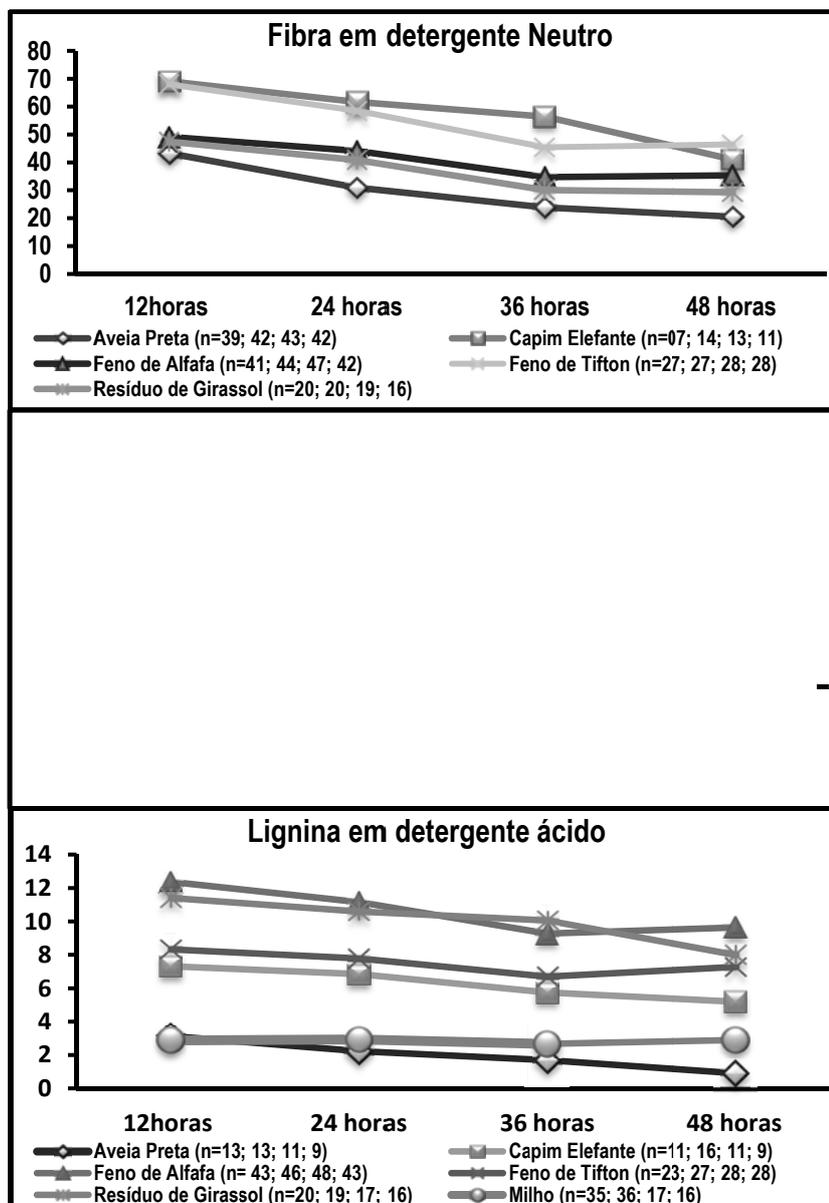


Figura 4 - Teor de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina em detergente ácido (LDA) de amostras de alimentos incubados no rúmen de um bovino durante diferentes tempos. Os valores entre parênteses representam respectivamente o número de repetições em cada tempo de incubação. Efeito de tempo de incubação:  $P < 0,05$ .

Foi observada alta e significativa ( $P < 0,05$ ) relação entre os teores de FDN das amostras de alimentos após incubação no rumem por 12, 24, 36 ou 48 horas com aqueles obtidos após passagem do material residual pelos intestinos em saquinhos móveis e recuperados nas fezes (Figura 5).

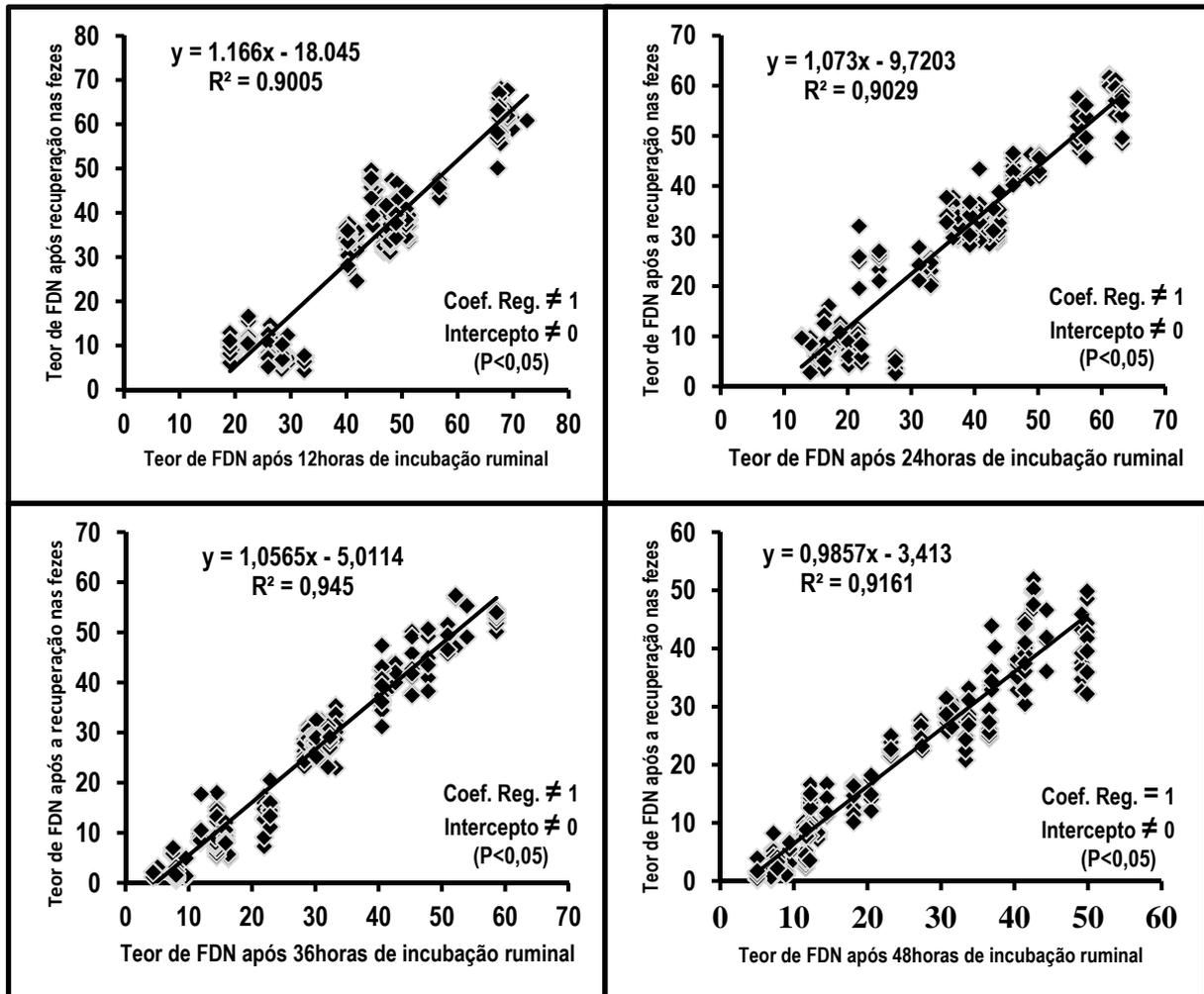
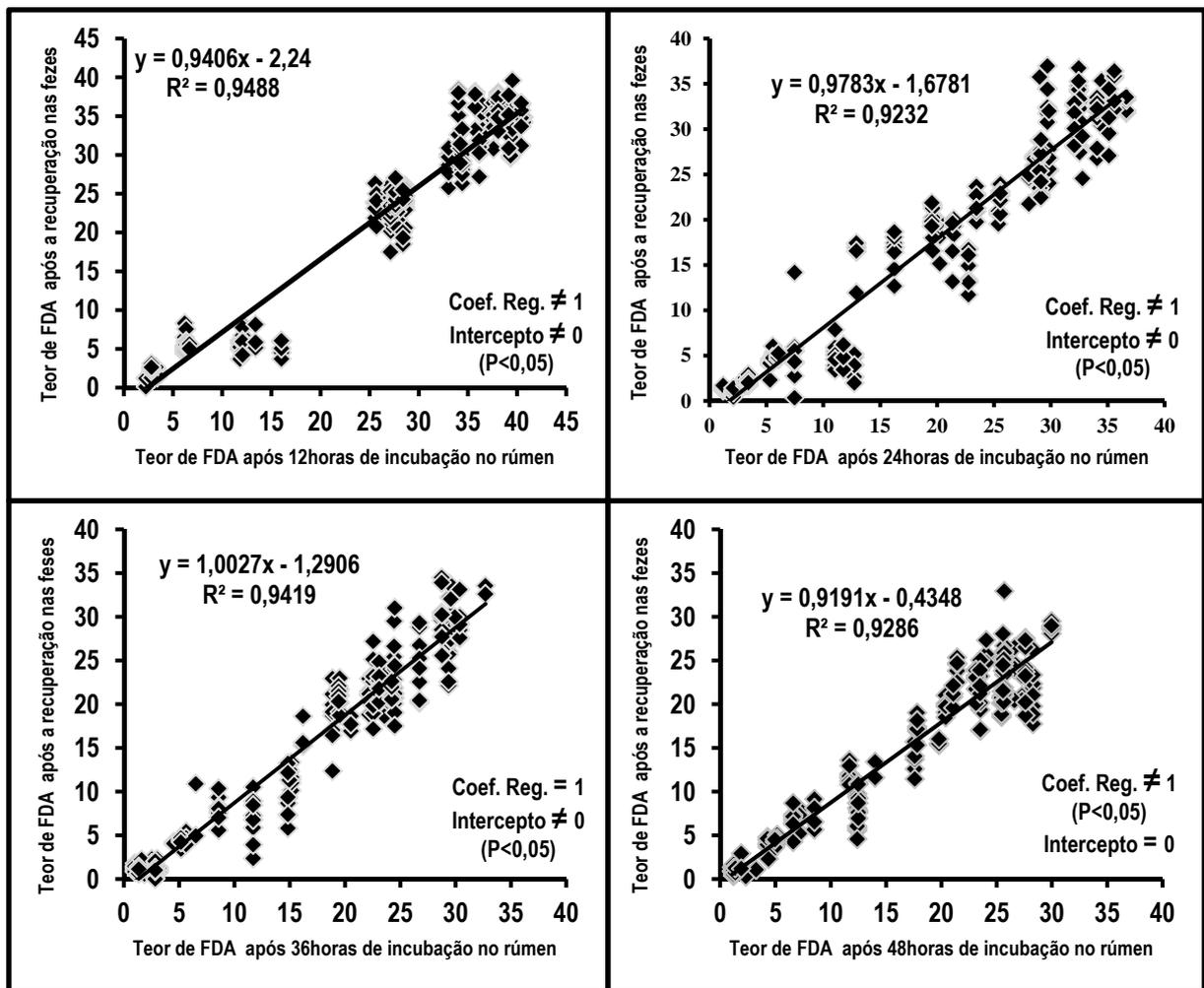


Figura 5 - Relação entre os teores de fibra em detergente neutro (FDN) de amostras de alimentos após incubação no rumem por 12, 24, 36 ou 48 horas com aqueles obtidos após passagem do material residual pelos intestinos em saquinhos móveis e recuperados nas fezes.

Embora os coeficientes de determinação tenham sido elevados em todos os tempos de incubação ( $R^2 > 0,90$ ), somente o coeficiente de regressão da equação no tempo de 48 horas foi estatisticamente igual a 1. Contudo, mesmo neste tempo de incubação a intercepta foi diferente de zero ( $P < 0,05$ ) e em todas as demais equações os coeficientes de regressão e interceptos diferiram de 1 e zero, respectivamente ( $P < 0,05$ ). Os teores de FDN do material residual após a passagem pelos intestinos foi em média 11,1, 7,3, 3,6 e 3,8% menor que os

teores iniciais presentes nas amostras após a incubação no rúmen por 12, 24, 36 ou 48 horas, respectivamente.

Foi observada alta e significativa ( $P < 0,05$ ) relação entre os teores de FDA das amostras de alimentos após incubação no rumem por 12, 24, 36 ou 48 horas com aqueles obtidos após passagem do material residual pelos intestinos em saquinhos móveis e recuperados nas fezes (Figura 6).



**Figura 6** - Relação entre os teores de fibra em detergente ácido (FDA) de amostras de alimentos após incubação no rumem por 12, 24, 36 ou 48 horas com aqueles obtidos após passagem do material residual pelos intestinos em saquinhos móveis e recuperados nas fezes.

No tempo de 36 horas o coeficiente de regressão foi igual a 1 e no tempo de 48 horas o intercepto foi igual a zero. Nas demais situações tanto o coeficiente de regressão foi diferente de 1 quanto o intercepto foi diferente de zero ( $P < 0,05$ ).

Os desaparecimentos médios observados foram de 3,4, 1,6, 1,5 e 1,7%, nos tempos de 12, 24, 36 e 48 horas, respectivamente.

A análise de regressão dos teores de LDA nas amostras após a incubação ruminal, nos diferentes tempos, e dos valores obtidos após a recuperação dos saquinhos nas fezes (Figura 7) apresentou, assim como observado para FDN e FDA, altos coeficientes de determinação ( $P < 0,05$ ).

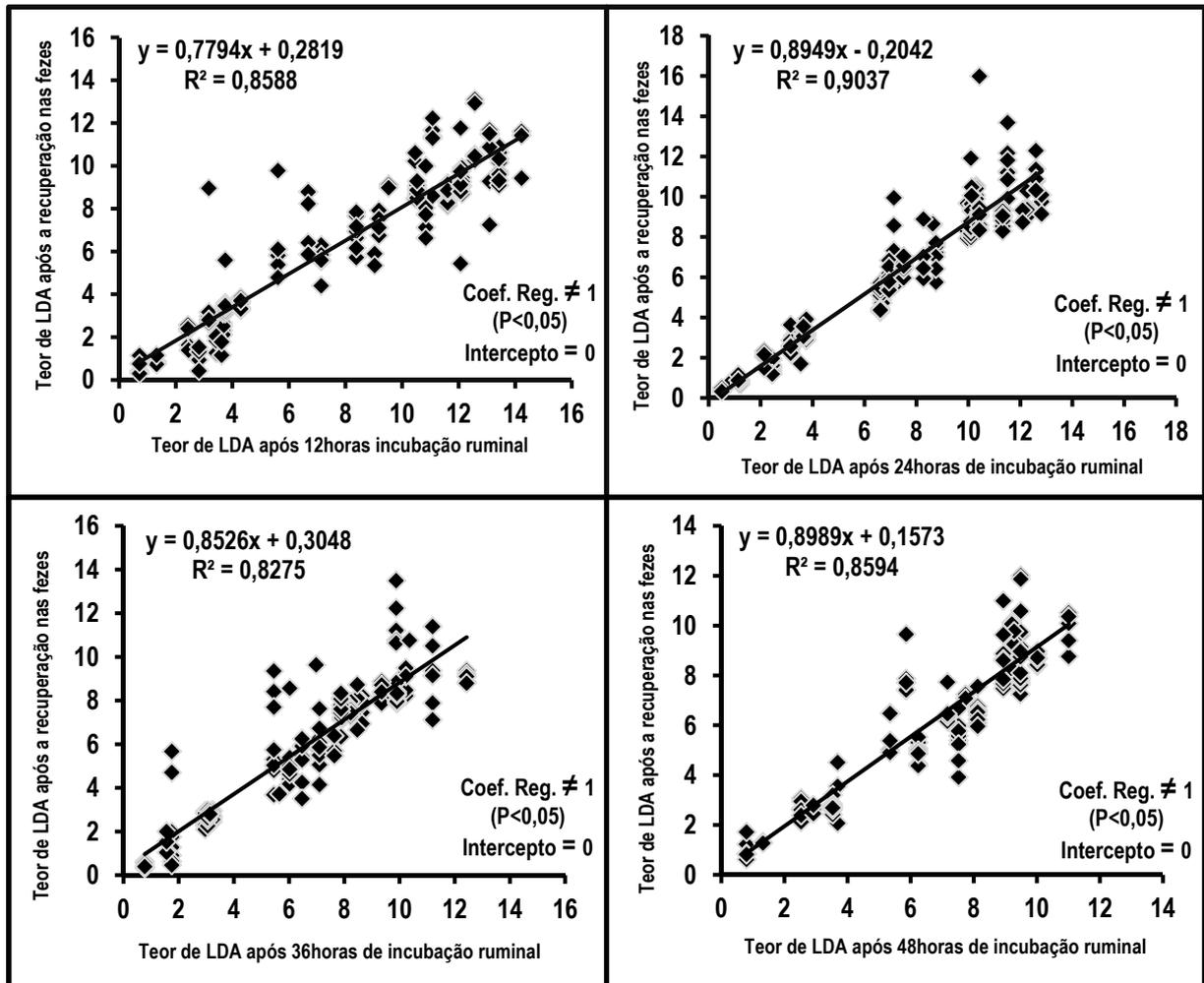


Figura 7 - Relação entre os teores de lignina em detergente ácido (LDA) de amostras de alimentos após incubação no rumem por 12, 24, 36 ou 48 horas com aqueles obtidos após passagem do material residual pelos intestinos em saquinhos móveis e recuperados nas fezes.

Em todos os tempos de incubação as equações, geraram coeficientes de regressão diferente de 1 ( $P < 0,05$ ) e interceptos iguais a zero. Os percentuais de desaparecimento observado nos tempos de 12, 24, 36 e 48 horas de incubação ruminal foram de 1,45, 0,98, 0,66 e 0,54%, respectivamente.

A proporção de FDN que desapareceu nos intestinos foi mais alta ( $P < 0,05$ ) que de FDA ou LDA em todos os tempos de incubação (Figura 8).

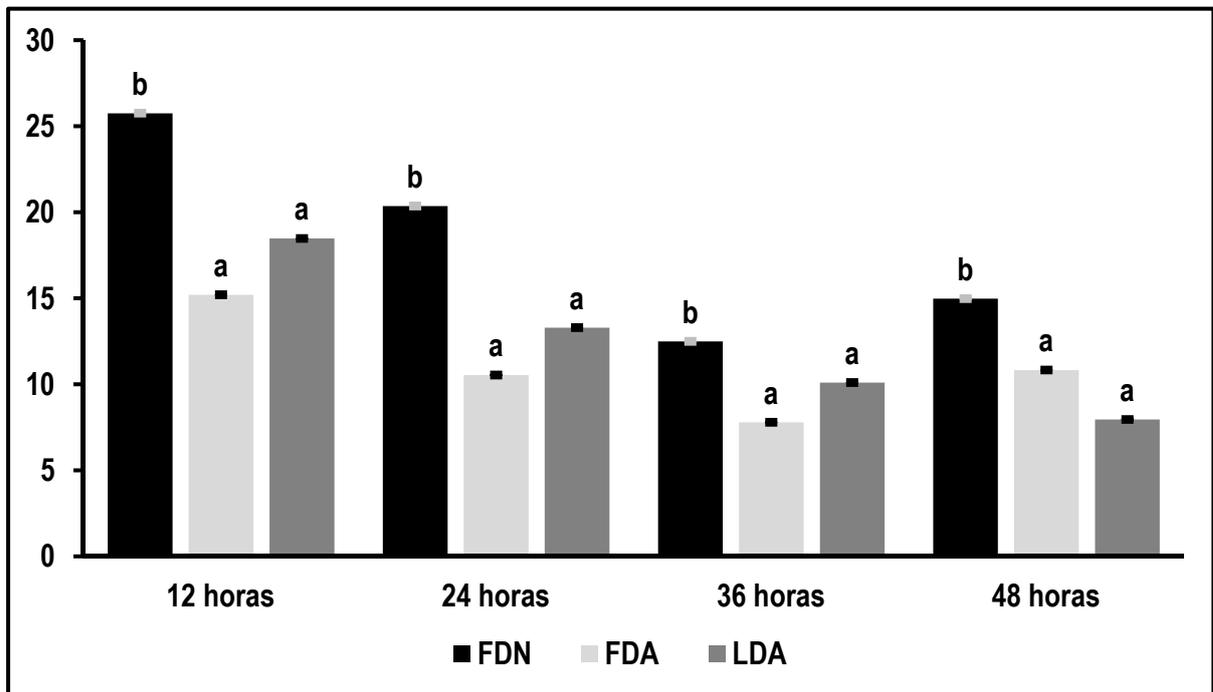


Figura 8 - Desaparecimento intestinal (%) de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina em detergente ácido (LDA) de amostras incubadas no rúmen durante diferentes tempos, inseridas no duodeno e coletadas nas fezes. As linhas nas colunas indicam o desvio padrão da média. Médias com letras diferentes acima das colunas em cada tempo de incubação são diferentes entre si ( $P < 0,05$ ).

Contudo o grau de desaparecimento intestinal foi similar entre FDA e LDA, independentemente do tempo que as amostras permaneceram incubadas no rúmen. Em média, o desaparecimento intestinal de FDN, FDA e LDA foram de 18,4, 11,1 e 12,5%, respectivamente.

## 5.2 Fluxo duodenal de digesta em bovinos estimado com FDA ou LDA como marcador interno

O fluxo de digesta duodenal nos bovinos calculado utilizando LDA foi altamente relacionado ( $R^2=0,89$ ) com as estimativas utilizando FDA como marcador interno (Figura 9).

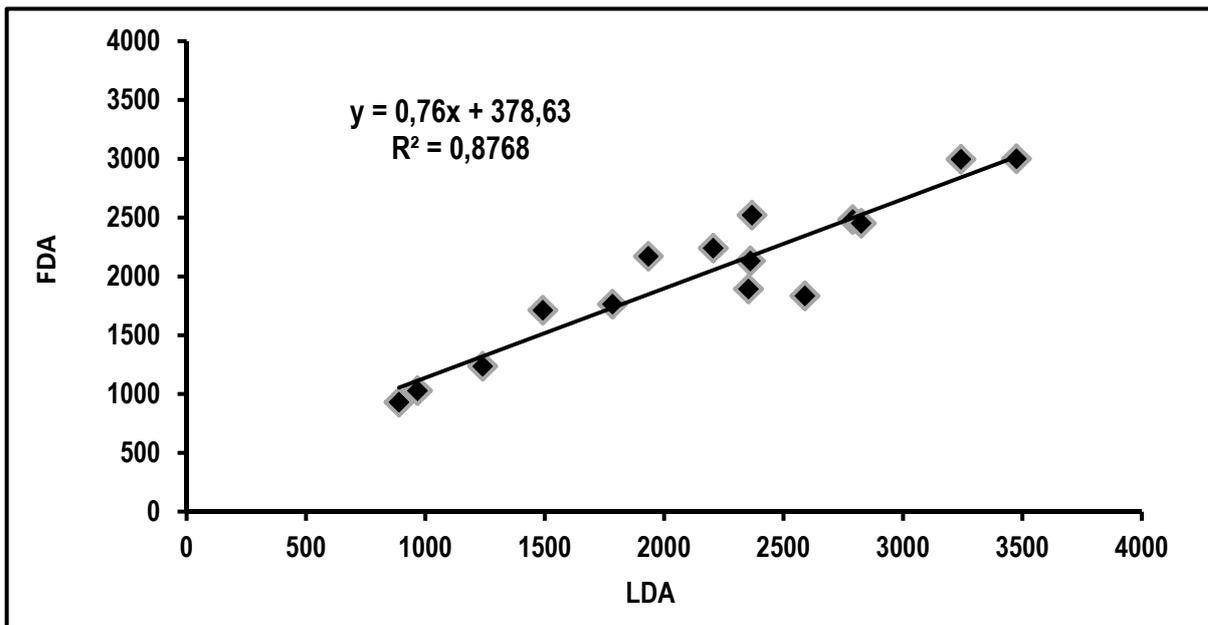


Figura 9 - Relação entre o fluxo duodenal de digesta (g de MS/dia) estimado utilizando lignina em detergente ácido (LDA) ou fibra em detergente ácido (FDA) como marcador.

O fluxo duodenal de MS de bovinos alimentados com dieta à base de volumoso e concentrados (60:40) com ou sem a inclusão de 2, 4, 6% de extrato tanífero estimado com a LDA apresentou maior erro padrão que quando utilizado a FDA em todos os tratamentos (Figura 10).

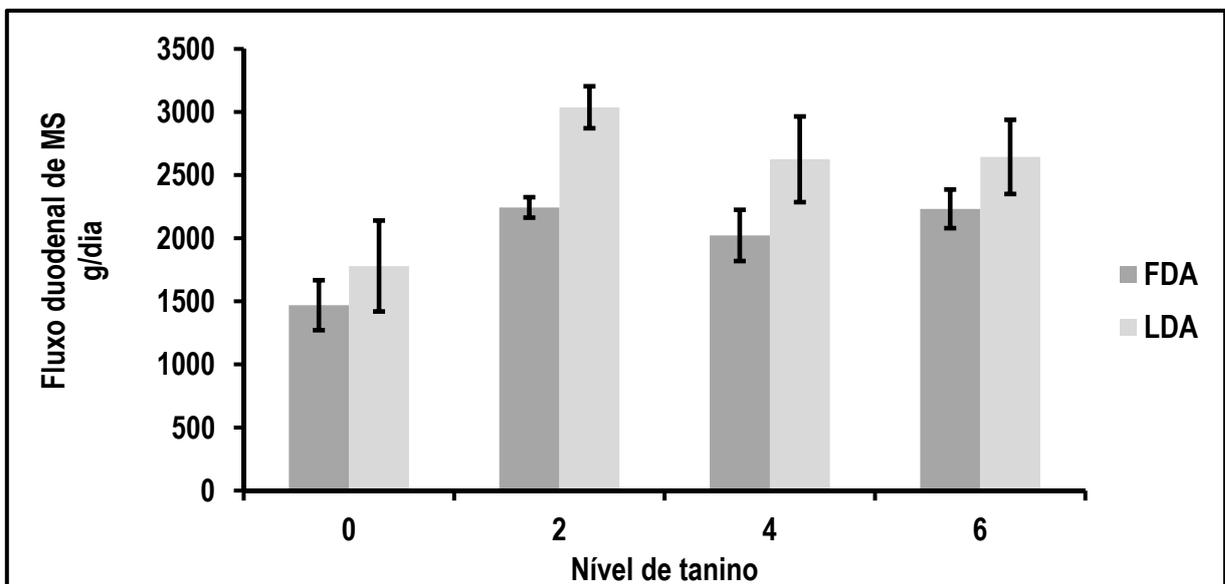


Figura 10 - Fluxo duodenal de MS em g/dia de bovinos alimentados com dieta a base de Aveia preta (*Avena strigosa* Schreb) e concentrados com ou sem a inclusão de 2, 4, 6% de extrato tanífero, estimado utilizando lignina em detergente ácido (LDA) ou fibra em detergente ácido (FDA) como marcador. As linhas nas colunas indicam erro padrão da média.

O erro padrão médio observado com o uso do FDA como marcador foi de 317 g de MS/dia, enquanto que o erro padrão associado à utilização do LDA como marcador foi 580 g de MS/dia.

### 5.3 Recuperação fecal de alcanos e estimativa do fluxo de digesta duodenal em bovinos utilizando alcanos ou FDA como marcadores

Os principais alcanos presentes na dieta dos bovinos foram o C31, C33 e C35 (Figura 12). A coleta total de fezes propiciou menor recuperação fecal que a obtida através da amostragem parcial, feita duas vezes ao dia.

**Tabela 2** - Consumo, excreção fecal e grau de recuperação fecal de n-alcanos em bovinos alimentados com dieta a base de aveia preta (*Avena strigosa* Schreb) e concentrado (60:40) e recebendo oralmente e diariamente cápsulas contendo 260 mg do alcano C32.

n-Alcano	Consumo (mg/dia)	Excreção fecal CP <sup>1</sup> (mg/dia)	Grau de recuperação fecal	CV (%)	Excreção fecal CT (mg/dia) <sup>2</sup>	Grau de recuperação fecal	CV (%)
C25	19,1	8,2	0,45	30,0	6,7	0,37	27,8
C26	0,7	0,8	1,38	66,3	0,8	1,35	59,4
C27	10,0	5,6	0,59	34,6	4,4	0,45	28,1
C28	1,5	6,1	1,28	93,5	2,0	1,72	102,4
C29	20,1	15,4	0,80	32,3	10,8	0,56	27,0
C30	1,8	6,2	0,80	79,4	1,2	0,74	63,9
C31	55,1	47,2	0,89	29,4	34,4	0,64	25,9
C32	260,1	137	0,53	17,7	117,0	0,47	14,5
C33	118,3	112	0,98	30,0	89,1	0,78	25,9
C35	50,45	51,4	1,07	31,1	42,7	0,88	26,7

<sup>1</sup>Analisado em amostras provenientes de coleta total de fezes;

<sup>2</sup>Analisado em amostras pontuais de fezes coletadas diretamente do reto dos animais duas vezes por dia.

A recuperação fecal do C32 foi muito inferior aos de mais alcanos de número de carbonos na cadeia semelhantes, independentemente do método de amostragem, (CT = 0,47 e CP = 0,53). É possível perceber a alta variabilidade no grau de recuperação fecal dos alcanos C31 ao C35, o coeficiente de variação em média de 25%.

O fluxo duodenal de digesta em bovinos estimado com FDA apresentou baixa relação com os valores estimados com alcanos, independentemente se comparado com os alcanos internos (C31, C33 ou C35) ou com o alcano externo C32 (Figura 11).

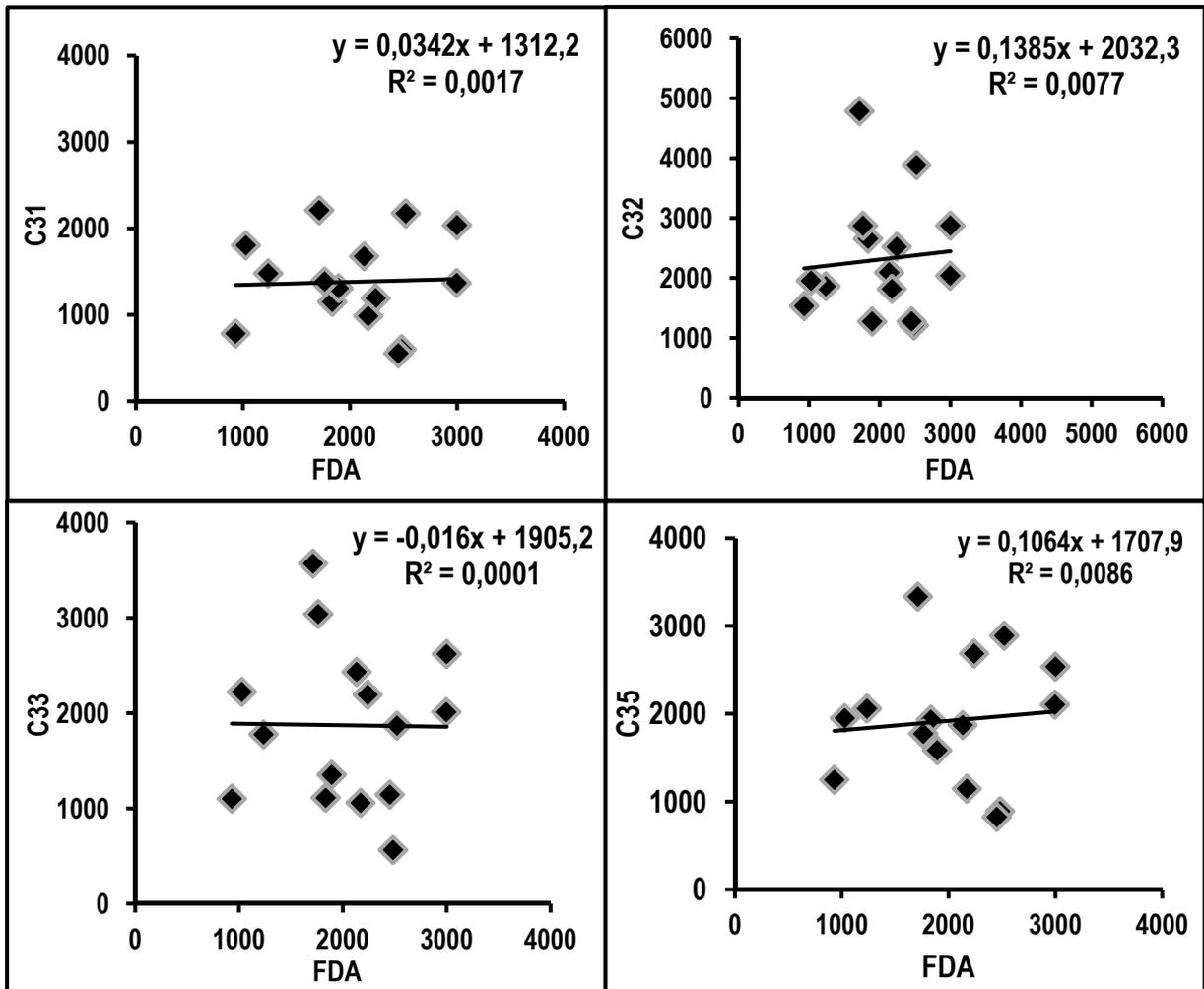


Figura 11 - Relação entre o fluxo duodenal de digesta (g de MS/dia) estimado utilizando fibra em detergente ácido (FDA) ou alcanos como marcador.

Os fluxos de digesta duodenal, calculado com base nos alcanos C31, C32, C33 E C35 foi de 1,382 e 1,873 kgMS/dia, com base no alcano par (externo) o C32, o FDD foi de 2,310 kgMS/dia. Os fluxos de digesta obtidos por diferentes marcadores (Figura 12), foram comparados considerando os efeitos de tratamento (0, 2, 4 e 6% de inclusão de tanino), animal e período (1 a 4).

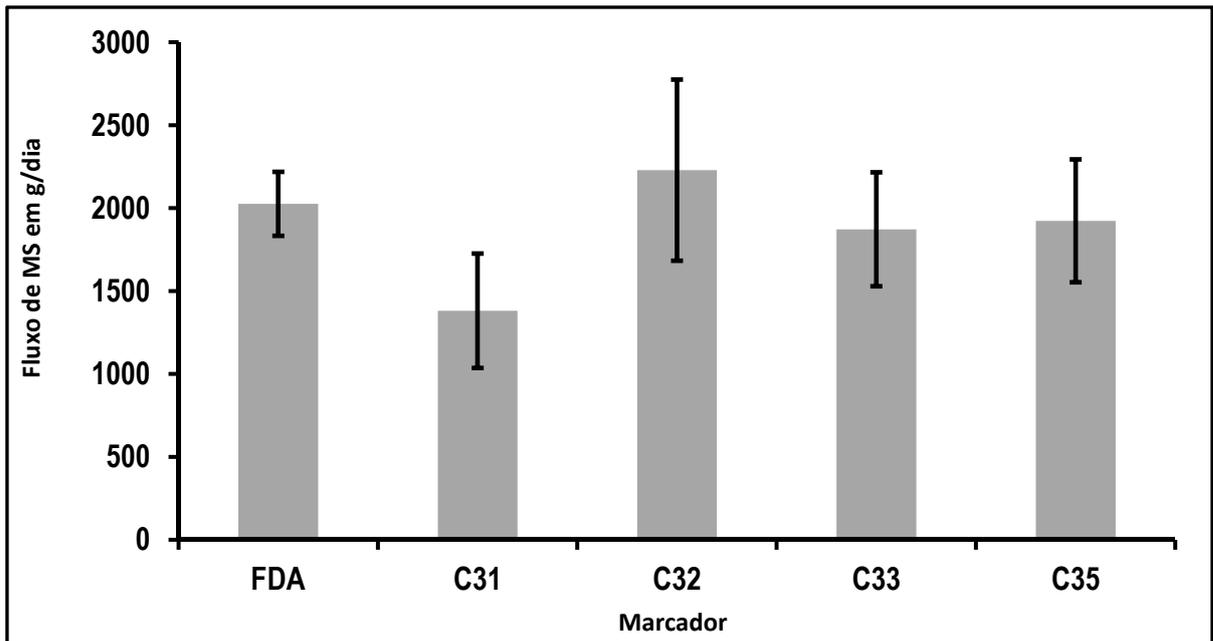


Figura 12 - Fluxo de matéria seca (MS) em g/dia, obtido através de marcadores internos: fibra em detergente ácido (FDA) e alcanos ímpares (C31, C33, C35); e como marcador externo o alcano C32. A análise estatística incluiu os efeitos de animal  $\times$  tratamento  $\times$  período, as linhas nas colunas indicam o desvio padrão médio observado.

Os desvios padrão observados nas médias de fluxos obtidas com base nos alcanos foram superiores aos obtidos nas medidas obtidas com a FDA. O desvio padrão observado com o FDA foi de 386 g, enquanto que os desvios observados com os alcanos foram de 690, 1093, 687 e 741 g, para os alcanos C31, C32, C33 e C35, respectivamente.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Desaparecimento ruminal e intestinal das frações fibrosas

O efeito do aumento do tempo de incubação ruminal levou aumento da degradação ruminal do FDN, FDA e LDA. Segundo WEISS 1994, a digestibilidade da fibra depende, dentre outros fatores, do tempo de duração da fermentação ruminal. Embora alguns trabalhos relatem que a indegradabilidade da lignina (CRAMPTON and MAYNARD, 1938; ELLIS et al., 1946; FORBES et al., 1946) há vários estudos que contrapõe este fato. HALE et al. 1940, observaram digestibilidade ruminal variando de 5,1% a 23,7% da lignina dietética. Neste estudo, foi observado degradabilidade ruminal média da LDA de 21% da lignina dietética.

O desaparecimento de FDN observado com a passagem das amostras nos intestinos esta em concordância com outros estudos. Segundo Van Soest, 1994, após a degradação ácida no abomaso, a hemicelulose se tornaria mais susceptível à degradação no cécum/colón dos ruminantes. Beever et al. 1972, em um estudo com ovinos com dieta restrita à base de forragem, observaram até 14% de desaparecimento da hemicelulose digestível no intestino grosso. Thonson, et al. 1972 observaram percentuais de até 41% da hemicelulose digestível sendo degradada nos intestinos de ovinos alimentados com alfafa peletizada. Segundo PORTER & SINGLETON, 1971b, em um estudo com ovinos dotados de cânulas reentrantes, cerca de 1 a 4% da hemicelulose digestível é absorvida no trato digestível inferior, corroborando com os resultados obtidos neste estudo.

A análise de regressão linear indicou ainda que tanto a LDA quanto a FDA apresentaram um pequeno desaparecimento intestinal das amostras independentemente do tempo de incubação. Segundo Porter & Singleton, 1971, a lignina é indegradável no trato inferior de ruminantes.

A hipótese mais coerente para este fato, é que esse desaparecimento tenha ocorrido em função de perda de partículas através dos poros dos saquinhos. A alteração no tamanho de partículas das amostras ao longo do trato digestivo explicaria este fato. Penning & Johnson, 1983 determinaram a concentração de resíduos indigestíveis em amostras moídas em peneiras com porosidade de 0,8 mm e reportaram que a incubação dessas amostras em sacos com porosidade de 43 µm resultou em perdas de material pelos poros.

Segundo LINDBERG & KNUTSSON, 1981, em um estudo testando materiais de diferentes porosidades em ensaios *in situ* encontraram um desaparecimento de 11% em sacos

de 36  $\mu\text{m}$  e de 5% em sacos 5  $\mu\text{m}$ . Araújo et al., 2000 utilizando a técnica dos sacos móveis constataram desaparecimento da fração fibrosa do alimento em função da perda de partículas pelos poros, variando de 8 a 10%. Segundo o mesmo estudo, esse desaparecimento poderia ocorrer mecanicamente tanto durante o trânsito ao longo do trato digestivo, quanto durante o processo de limpeza dos saquinhos ao serem recuperados junto às fezes.

Segundo Porter & Singleton, 1971a uma fração muito pequena da celulose digestível chega ao intestino, cerca de 95 à 100% da celulose digestível é degradada no rumem de ovinos. Beever, et al. 1972 em ovinos dotados de cânula reentrante, encontraram apenas 5% de desaparecimento pós ruminal da celulose digestível. Segundo MacRae & Armstrong 1969, 91% da celulose digestível é fermentada no rumem de ovinos alimentados exclusivamente com feno, em bovinos a proporção é a mesma (WALDO, 1970).

Estes estudos, além do fato do desaparecimento intestinal de lignina ter sido similar a porção que desapareceu de FDA, indica que a perda de LDA levou a perda de FDA uma vez que essas frações são estritamente ligadas.

## **6.2 Fluxo duodenal de digesta em bovinos estimado com FDA ou LDA como marcador interno**

Os fluxos de digesta duodenal, obtidos com base na concentração de LDA e FDA foram similares, estes resultados estão em concordância com Porter & Singleton, 1971a, que indicaram o uso do LDA como marcador por não haver degradação intestinal dessa fração. Em um trabalho subsequente, publicado no mesmo ano (PORTER & SINGLETON, 1971b), apontavam pra possibilidade de outras frações, e principalmente o FDA por apresentar degradação intestinal muito pequena, como possíveis marcadores.

Os erros-padrão observados nas determinações baseadas na FDA foram inferiores aos observados com a LDA, o que reforça o potencial dessa fração ser utilizada como marcador do fluxo de digesta em bovinos.

A análise de FDA é de baixo custo, rápida e com boa reprodutibilidade. A complexa e variável estrutura da lignina torna difícil a adoção de metodologias específicas que determinem, com alta confiabilidade, sua real concentração. A situação é agravada ao considerar evidências de que a lignina dietética difere da lignina fecal em seus constituintes químicos (ELAN e DAVIS, 1961).

### **6.3 Recuperação fecal de alcanos e estimativa do fluxo de digesta duodenal em bovinos utilizando alcanos ou FDA como marcadores.**

A análise do perfil de n-alcanos nas amostras do alimento fornecido, indicou recuperações incompletas de n-alcanos. Recuperações incompletas são frequentemente relatadas na literatura (KOLATTUKUDY & HANKIN, 1966; TULLIEZ & BORIES, 1977), isso seria explicado pela transformação de alcanos em ácidos graxos a nível de epitélio ruminal (OHAJURUKA & PALMQUIST, 1991).

Segundo Oliveira e Prates, 2000, essa variação na recuperação duodenal e fecal estaria principalmente associada a perdas no intestino delgado e, em alguns casos, uma ligeira síntese de n-alcanos neste mesmo sítio. Outra hipótese para essas recuperações incompletas seria o baixo consumo de MS neste estudo. Oliván & Osoro, 1995, em um experimento com vacas em gaiolas metabólicas, consumindo feno de alfafa em um nível de 1,5% P.V, atribuíram a baixa recuperação fecal de n-alcanos ao baixo consumo e, conseqüentemente, maior tempo de retenção de partículas no trato digestivo, possibilitando maior absorção ao longo do trato.

Os resultados de fluxo de digesta duodenal, indicam uma ineficiência do n-alcano de cadeia par como marcador deste parâmetro, principalmente em função da variabilidade dos resultados. A baixa relação entre os resultados obtidos com a FDA em comparação aos obtidos com os n-alcanos, indicada pela análise de regressão reforça a ineficiência do C32, Resultado em concordância com Mayes et al. 1988, que sugere a baixa afinidade do n-alcano exógeno tanto com a fase líquida, quanto a fase sólida. Entretanto o potencial dos n-alcanos de cadeia ímpar, que apresenta alta afinidade com a fase sólida da digesta (DOVE & MAYES, 1991) não se confirmou, pois assim como observado nos resultados obtidos a partir do C32, os fluxos obtidos com base nos n-alcanos ímpares, com mais de 30 carbonos, tiveram baixa relação com os fluxos obtidos com o FDA.

## **7 CONCLUSÃO**

A fibra em detergente neutro apresentou um desaparecimento que inviabiliza a utilização dessa fração como marcador do fluxo de digesta duodenal em bovinos. Tanto a lignina, quanto a fibra em detergente ácido, foram praticamente indegradáveis nos intestinos dos bovinos, sendo viável a utilização destas frações. Considerando aspectos relacionados a alta variabilidade nas análises de lignina, a FDA é uma opção confiável para determinar o fluxo de digesta em bovinos.

Foi observada uma alta variabilidade nos resultados fluxo de digesta obtidos com base nos n-alcanos com relação ao obtido com base no FDA, independentemente do n-alcano utilizado como referência, sendo inviável sua utilização para obtenção deste parâmetro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL - AFRC. **Technical committee on responses to nutrients: energy and protein requirements of ruminants**. Wallingford: Commonwealth Agricultural Bureaux International, 1993. 159p.

ALLEN, M. S. **Investigation into use of rare hearth elements as gastrointestinal markers**. M. S. Thesis, Cornell Universit, Ithaca, NY, 1982.

ASH, R. W. Gastro-intestinal re-entrant cannulae for studies of digestion in sheep. **Animal Production** 4:309–311, 1962.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 16 th , 3. ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD. 1997.

BAKER, E.A. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In '**The Plant Cuticle**.' (Ed. D.F. Cutler, Alvin K.L. and Price C.E. .Academic Press: London.) pp. 139-65. 1980.

BEEVER, D. E. COELHO DA SILVA, J. F., PRESCOTT, J. H. D. and ARMSTRONG, D. G. The effect in sheep of physical form and stage of growth on the sites of digestion of a dried grass 1. Sites of digestion of organic matter, energy and carbohydrate. **British Journal of Nutrition**, 28, 347, 1972.

BERCHIELLI, T. T.; OLIVEIRA, S.G. and GARCIA, A.V. Aplicação de técnicas para estudos de ingestão, composição da dieta e digestibilidade. *Archives of Veterinary Science* v. 10, n.2, p.29-40, 2005.

BERCHIELLI, T. T.; RODRIGUES, M. N.; OSÓRIO, N. E. Comparação de indicadores de fase sólida para medir fluxo de matéria seca e matéria orgânica no duodeno. **Arquivo Brasileiro de medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n.2, p. 147-152, 1998.

BERCHIELLI, T.T.; OLIVEIRA, S.G.; CARRILHO, E.N.V.M.; et al. Comparação de marcadores para estimativas de produção fecal e de fluxo de digesta em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.987-996, 2005.

BERGERO, D.; et al. Apparent of digestibility mediterranean forages determined by total collection of faeces and acid-insoluble ash as internal marker. **Livestock Production Science**, v. 85, n. 2-3, p. 235-238, 2004.

BRODERICK, G. and MERCHEN, N. R. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. **Journal of Dairy Science**, 75:2618-2632, 1992.

BROWN, G. F., ARMSTRONG, D. G. and MACRAE, J. C. The establishment in one operation of a cannula into the rumen and re-entrant cannulae into the duodenum and ileum of the sheep. **British Veterinary Journal**, 124:78–81, 1968.

BRUINING, M. and BOSCH, M.W. Ruminal passage rate as affected by CrNDF particle size. **Animal Feed Science and Technology** 37, 193–200, 1992.

BUCHOLTZ, H.F. and BERGEN, W.G. Microbial phospholipid synthesis as a marker for microbial protein synthesis in the rumen. **Applied Microbiology** 25, 504–513, 1973.

BUNTINX, S.E.; POND, K.R.; FISHER, D.S. and BURNS, J.C. Evaluation of the Captec chrome controlled-release device for the estimation of fecal output by grazing sheep. **Journal of Animal Science**, Cambridge 70, 2243–2249, 1992.

CARVALHO, P.F.; KOZLOSKI, G.; NUNES RIVEIRO FILHO, H. et al. Avanços metodológicos na determinação do consumo de ruminantes em pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.151-170, 2007 (supl. especial).

CHACON, E.A.; STOBBS, T.H. and SANDLAND, R.L. Estimation of herbage consumption by grazing cattle using measurements of eating behavior. **Journal of the British Grassland Society**. 31, 81-7, 1976.

CHEN, W.; SCOTT, J.M.; BLAIR, G.J.; et al. Using plant cuticular alkanes to study plant-animal interaction on pastures. **Canadian Journal of Animal Science**, v.79, n.4, p.553-556, 1999.

CHIBNALL, A.C.; PIPER, S.H.; POLLARD A.; et al. The constitution of the primary alcohols, fatty acids and paraffins present in plant and insect waxes. **Biochemistry Journal**, 28:2189-2208, 1934.

COCHRAN, R.C., ADAMS, D.C., WALLACE, J.D. and GALYEAN, M.L. Predicting digestibility of different diets with internal markers: evaluation of four potential markers. **Journal of Animal Science**, 63, 1476–1483, 1986.

COMBS, D. K.; SHAVER, R.D. and SATTER, L.D. Retention of rare earths by hay particles following incubation in fresh or autoclave rumen fluid. **Journal of Dairy Science** 75: 132-139. 1992.

CONNER, H. G., MCGILLIARD, A. D. and HUFFMAN C. F. Bovine re-entrant duodenal fistula studies. 1. Establishment of re-entrant duodenal fistula. **Journal of Animal Science**. 16:692-697, 1957

CÔRTEZ, C. et al. Potencial discriminatório dos N-alcenos em plantas forrageiras tropicais por análises multivariadas. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 1079-1087, 2005.

COSTA, M. Toxicity and carcinogenicity of Cr (VI) in animal models and humans. **Critical Reviews in Toxicology**. 27, 431–442, 1997.

CRAMPTON, E. W. and MAYNARD. L. A. 1938. The relation of cellulose and lignin content to the nutritive value of animal feeds. **Journal of Nutrition**. 15:383.

CROCKER, B. F., and MARKOWITZ, J. A technique for the complete fistulation of the gut at any level of the gastrointestinal tract. **American Journal of Physiology**, 116:33, 1936.

CROOKER, B. A.; CLARK, J. H. and SHANKS R. D. Rare earth elements as markers for rate of passage measurements of individual feedstuffs through the digestive tract of ruminants. **Journal of Nutrition**. 112:1353–1361, 1982.

DE BOER, G.; MURPHY, J.J. and KENNELLY, J.J. Mobile nylon bag for estimating intestinal availability of rumen undegradable protein. **Journal of Dairy Science**, 70: 977-982,1987.

DEACON, M.A.; DE BOER, G. and KENNELLY, J.J. Influence of Jet-Sploding® and extrusion on ruminal and intestinal disappearance of canola and soybeans. **Journal of Dairy Science**, 71: 745-753, 1988.

DELCURTO, T.; COCHRAN, R. C.; NAGARAJA, T. G.; CORAH, L. R.; BEHARKA, A. A. and VANZANTE, S. Comparison of soybean d s o r g h u m grain, alfalfa hay and dehydrated alfalfa pellets as supplemental protein for beef cattle consuming dormant tall grass prairie forage. **Journal of Animal Science**, 68:2901,1990.

DELAGARDE R., PÉREZ-RAMÍREZ E. and PEYRAUD J.L. Ytterbium oxide has the same accuracy as chromic oxide for estimating variations of faecal dry matter output in dairy cows fed a total mixed ration at two feeding levels. **Animal Feed Science and Technology**, 161 121–131, 2010.

DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F. et al. Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1600-1609, 2001.

DILLON, P. and STAKELUM, G. Herbage and dosed alkanes as a grass measurement technique for dairy cows. **Irish journal of agricultural research**, 28, 104 (Abstract).1989.

DILLON, P. and STAKELUM, G. **The use of n-alkanes and chromic oxide as markers for determining feed intake, faecal output and digestibility in dairy cows.** Proc. 12th Gen Meeting Eur. Grasslands Fed. (Dublin, Ireland) July 1988, pp. 154-8,1988.

DOVE, H. Using the n-alkanes of plant cuticular wax to estimate the species composition of herbage mixture. **Australian Journal of agricultural Research**, v. 43, p, 1711-1724, 1992.

DOVE, H.; FOOT, J.Z., and FREER, M. **Estimation of pasture intake in grazing ewes, using the alkanes of plant cuticular waxes.** Proc. XVI Int. Grasslands Cong. (Nice, France) pp. 1091-2.1989.

Dove, H. and R. W. Mayes. 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**. 1:1680-1697, 2006.

DOVE, H. and 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**, v. 42, p. 913-952, 1991

DOVE, H., MAYES, R.W. and FREER, M. Using cuticular wax alkanes to estimate herbage intake in animals fed supplements. **Annales de Zootechnie** 44, 237, 1995.

DOVE, H.; MAYES, R.W. and FREER, M. Effects of species, plant part, and plant age on the n-alkane concentrations in the cuticular wax of pasture plants. **Australian Journal Agricultural Research** 47, 1333–1347, 1996.

DUNCAN, A.J.; MAYES, R.W.; LAMB, C.S. et al. The use of naturally occurring and artificially applied n-alkanes as markers for estimation of short-term diet composition and intake in sheep. **Journal Agriculture Science**, v.132, p.233-246, 1999.

DYSON, W.G. and HERBIN, G.A. Studies on plant cuticular waxes - IV. Leaf wax alkanes as a taxonomic discriminant for cypresses grown in Kenya. **Phytochemistry** 7, 1339-44, 1968.

ELAM, C. J. and DAVIS, R. E. Lignin Excretion by Cattle Fed a Mixed Ration. **Journal of Animal Science**, 20:484-486, 1961

ELLIOTT, R. and ARMSTRONG, D.G. The effect of urea and urea plus sodium sulphate on microbial protein production in the rumens of sheep given diets high in alkali-treated barley straw. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge 99, 51–60, 1982.

ELLIS W. C.; MATIS J. H. and LASCANO C. Quantitating ruminal turnover. **Federation proceedings**, 38:2702, 1979.

ELLIS, G. H., MATRONE G. and MAYNARD. L. A. A 72% sulfuric acid method for the determination of lignin and its use in animal studies. **Journal of Animal Science**, 5:285, 1946.

ELLIS, W. C. and J. E. HUSTON.  $^{144}\text{Ce}$ - $^{144}\text{Pr}$  as a particulate digesta flow rate marker in ruminants. **Journal of Nutrition**. 95:67, 1968.

ELLIS, W. C. Dysprosium as an indigestible marker and its determination by radioactivation analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 16:220, 1968.

FAHEY, Jr. G. C., and JUNG, H. G. Lignin as a Marker in Digestion Studies: a Review. **Journal of Animal Science**, 57:220-225, 1983.

FAICHNEY, G. J.. The use of markers to partition digestion within the gastrointestinal tract of ruminants. In: **Digestion and Metabolism in the Ruminant**. I. W. McDonald and A.C.I. Warner, ed. Univ. New England Publ. Unit, Armidale, New South Wales, Australian, 1975.

FLOWER, W. H. Lectures on the comparative anatomy of the organs of digestion of the mammalia. Lecture IX. **Medical Times and Gazette** 2:319-322, 1872.

FORBES, E. B., ELLIOT, R. F. SWIFT, R. W. JAMES W. H. and SMITH V. F. Variation in determination of digestive capacity of sheep. **Journal of Animal Science**. 5:298, 1946.

FORBES, T.D.A. and HODGSON, J. Comparative studies of the influence of sward conditions on the ingestive behaviour of cows and sheep. **Grass and Forage Science**. 40, 69-77, 1985.

FRANCE, J. and SIDDON, R.C. Determination of digesta flow by continuous marker infusion. **Journal of Theoretical Biology**, v.121, n.2, p.105-119, 1986.

FREITAS, D.; BERCHIELLI, T.T.; SILVEIRA, R.N. Produção fecal e fluxo duodenal de matéria seca e matéria orgânica estimados por meio de marcadores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1521-1530, 2002 (suplemento).

FRYDRYCH, Z. Intestinal digestibility of rumen undegraded protein of various feeds as estimated by the mobile bag technique. **Animal Feed Science and Technology** 37, 161–172. 1992.

FUKUMOTO, N. M.; DAMASCENO, J.C.; CORTES, C.; ROEHSING, L.; REGO, F.C.A.; CECATO, U. and BRANCO, A.F. Uso de n-alcanos na estimativa da composição botânica da dieta em ovinos alimentados com diferentes proporções de *Brachiaria decumbens* Stapf e *Arachis pintoi* Kopylov e Gregory. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.36, n.4, Suplemento, p.1147-1154, 2007.

GRACE, N.D. and BODY, D.R. The possible use of long chain (C<sub>19</sub>-C<sub>32</sub>) fatty acids in herbage as an indigestible fecal marker. **Journal of Agricultural Science**, v.97, p.743-745, 198.

GRAHAM, H.; AMAN, P; NEWMAN, R. K. and NEWMAN, C. W. Use of nylon bag technique for pig feed digestibility studies. **British Journal of Nutrition**. 54:719–726, 1985.

GROVUM, W. L. A new look at what is controlling food intake. Feed Intake Symposium, Oklahoma city, 1986.

HALE, E. B., DUNCAN C. W. and HUFFMAN C. F. Rumen digestion in the bovine with some observations on the digestibility of alfalfa hay. **Journal of Dairy Science**, 23:953, 1940.

HAMILTON, B. A. and HALL, D.G. Estimation of the botanical composition of oesophageal extrusa samples. **Journal British of Grassland Society**. 30, 229-35, 1975.

HAMILTON, R. J. and POWER, D.M.. The chemical composition of the surface wax of *Lolium perenne*. **Phytochemistry**, 8(9):1771-1775, 1969.

HARKER, K.W.; TORRELL, D.T. and VAN DYNE, G.M. Botanical examination of forage from esophageal fistulas in cattle. **Journal of Animal Science** 23, 465-9, 1964.

HARMON, D. L. and RICHARDS, C. J. Considerations for gastrointestinal cannulations in ruminants. **Journal of Animal Science** 75:2248-2255, 1997.

HARTNELL, G. F. and SATTER L. D. Extent of particulate marker (samarium, lanthanum and cerium) movement from one digesta particle to another. **Journal of Animal Science**. 48:375. 1979

HARTNELL, G. F. and SATTER, L. D. Extent of particulate marker (samarium, lanthanum and cerium) movement from one digesta particle to another. **Journal Animal Science** 48:375. 1979.

- HERNÁNDEZ, F. I. L. **Avaliação da técnica do saco de náilon móvel para determinação do desaparecimento ruminal e intestinal da matéria seca e proteína bruta.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 1995.
- HOGAN, J. P. The digestion of food by the grazing sheep. The rate of flow of digesta. **Australian Journal Agricultural Research.** 15: 384, 1964.
- HORNEY, F. D., LEADBEATER, P. A. and NEUDOERFFER, T. S. Reentrant cannulation and postoperative therapy in cattle. **American Journal of Veterinary Research.** 33:1385–1389, 1972.
- HUSTON, J. E. and ELLIS, W. C. 1968. Evaluation of certain properties of radio cerium as an indigestible marker. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 16:225.
- HVELPLUND, T. Digestibility of rumen microbial protein and undegraded dietary protein estimated in the small intestine of sheep and by *in sacco* procedure. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Supplement 25:132–144, 1985.
- HVELPLUND, T.; WEISBJERG, M. and ANDERSEN, L. Estimation of the true digestibility of rumen undegraded dietary protein in the small intestine of ruminants by the mobile bag technique. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Section A, Animal Science 42, 34-39. 1992.
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Laboratory Training Manual on the Use of Nuclear Techniques in Animal Nutrition.** International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, 1985.
- ÍTAVO, L.C.V.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, F.F. et al. Comparação de marcadores e metodologia de coleta para estimativas de produção fecal e fluxo de digesta em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.4, p.1833-1839, 2002a.
- IVAN, M. A new type of re-entrant cannula designed for use in the small intestine of the pig. **Australian Veterinary Journal** 50:547–552, 1974.
- IVAN, M. A new method for re-entrant cannulation of the duodenum in sheep. **Canadian Journal of Animal Science** 57:225–227, 1977.
- IVAN, M. and JOHNSTON, D. W. Reentrant Cannulation of the Small Intestine in Sheep: Cannula and Surgical Method. **Journal of Animal Science**, 52:849-856, 1981.
- IVAN, M. and JOHNSTON D. W. A method for re-entrant cannulation in sheep. **Annales de recherches vétérinaires**, 10:288–289, 1979.
- KAFILZADEH, F. and PARKER, D.S. The use of n-alkanes as indigestible markers in studies on intestinal digestion in sheep. **Animal Production.** 50, 578-9 (Abstract), 1990.
- KENDALL, E.M.; INGALLS, R.J. and BOILA, R.J. Variability in the rumen degradability and post-ruminal digestion of the dry matter, nitrogen and amino acids of canola meal. **Canadian Journal of Animal Science**, 71: 739-754, 1991.

- KIRKPATRICK, B. K. and KENNELLY, J. J. 1984. Prediction of digestibility in cattle using a modified nylon bag technique. **Canadian Journal of Animal Science** 64:1104 (Abstr.).
- KOLATTUKUDY, P. E. and HANKIN, L. Metabolism of a plant wax paraffin (n-nonacosane) in the rat. **Journal of Nutrition** 90, 167, 1966.
- KOMAREK, R. J. A filter bag procedure for improved efficiency of fiber analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 76: p. 250, Supplement 1. 1993.
- KOMAREK, R. J. Externalizing Digesta Flow Cannula Designed for Total Digesta collection Without Intestinal Cannulation of Cattle and Sheep with a T-Shaped. **Journal of Animal Science** 53:796-802, 1981.
- KOTB, A.R. and LUCKEY, T.D. Markers in nutrition. **Nutritional Abstracts Reviews**. 42, 813–845, 1972.
- KOZLOSKI, G.V. et al. Uso do óxido de cromo como indicador da excreção fecal de bovinos em pastejo: variação das estimativas em função do horário de amostragem. **Ciência Rural**, v.36, p.599-603, 2006.
- KOZLOSKI, G. V.; MESQUITA, F. R.; ALVES, T. P.; CASTAGNINO, D. de S.; STEFANELLO, C. M.; BONNECARRÈRE SANCHEZ, L. M. Avaliação do uso de frações indigestíveis do alimento como indicadores internos de digestibilidade em ovinos. **Revista brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 1819-1823, 2009.
- KYKER, G. C. Rare earths. In: **Mineral Metabolism**. COMARC. L. and BONNETF. (Ed.)Chap. 36, Vol. 2, part B. Academic Press, New York,1962.
- LANDAU, S.; KABABYA, D.; SILANIKOVE, N. et al. The ratio between dietary rumen degradable organic matter and crude protein may affect milk yield and composition in dairy sheep. **Small Ruminant Research**, v.58, p.115-122, 2005.
- LE DU, Y.L.P. and PENNING, P.D. Animal based techniques for estimating herbage intake. In: **Herbage Intake Handbook**. Leaver, J.D. (Ed.), British Grassland Society, Reading, UK, pp. 37–75.1982.
- LINDBERG, J. E. and KNUTSSON, P. G. Effect of bag pore size on the loss of particulate matter and on the degradation of cell wall fibre. **Agriculture and Environment**6:171,1981.
- LIPPKE, H.; FORBES, T.D.A.; ELLIS, W.C. Effect of supplements on growth and forage intake by stocker steers grazing wheat pasture. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1625-1635, 2000.
- LIPPKE, H.; ELLIS, W.C.; JACOBS, B.F. Recovery of indigestible fiber from feces of sheep and cattle on forage diets. **Journal of Animal Science**, v.69, n.2, p.403-413, 1986.
- MACRAE J. C. and ARMSTRONG D. G. Studies on intestinal digestion in the sheep 2. Digestion of some carbohydrate constituents in hay, cereal and hay-cereal rations. **British Journal of Nutrition**, 23, 377, 1969.

MADER, T.L.; TEETER, R. G. and HORN, G.W. Comparison of forage labeling techniques for conducting rate of passages studies. **Journal of Animal Science**, 52:208, 1984.

MARAIS, J.P. Use of Markers. in: **Farm Animal Metabolism and Nutrition**. CAB International ed. J.P.F. D'Mello, 2000.

MAYES, R. W.; LAMB, C. S. and COLGROVE, P. M. The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge 107:161, 1986.

MAYES, R.W. and DOVE, H. Satellite meeting: wild and domestic herbivore diet characterization. In: **Manual of methods accompanying: Wild and Domestic Herbivore Diet Characterization**. Satellite meeting to the 4th International Symposium on the Nutrition of Herbivores, Merida, Mexico, October 2003. Nottingham University Press, Nottingham, UK.2004.

MAYES, R.W. and LAMB, C.S. The possible use of n-alkanes in herbage as indigestible fecal markers. **Proceedings of Nutrition Society**, v.43, n.1/3, p.39, 1984.

MAYES, R.W.; BERESFORD, N.A.; LAMB, C.S. et al. Novel approaches to the estimation of intake and bioavailability of radiocaesium in ruminants grazing forested areas. **Science of the Total Environment**, v.157, p.289-300, 1994.

MAYES, R.W.; LAMB C.S. and COLGROVE, P.M. The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge. 107, 161-70, 1986a.

MAYES, R.W.; LAMB, C.S. and COLGROVE, P.M. Determination of herbage intake of sucking lambs using long-chain n-alkanes as markers. **Animal Production** 42, 457 (Abstract). 1986b.

MAYES, R.W.; LAMB, C.S. and COLGROVE, P.M. **Digestion and metabolism of dosed even-chain and herbage odd-chain n-alkanes in sheep**. Proc. 12th Gen. Meeting Eur. Grasslds Fed. pp. 159-63, 1988.

MCALLAN, A. B. The degradation of nucleic acid in, and the removal of breakdown products from the small intestine of steers. **British Journal of Nutrition** 44:99–112, 1980.

MCALLAN, A. B., and SMITH, R. H. Degradation of nucleic acid derivatives by rumen bacteria in vitro. **British Journal of Nutrition**. 29:467–474, 1973.

MCDONALD, I. W. Experimental duodenal fistula in the sheep. **Veterinary Record** 19:290–291, 1953.

MCSWEENEY, C.S.; DULIEU, A.; KATAYAMA, Y. and LOWRY, J.B. Solubilization of lignin by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix patriciarum*. **Applied And Environmental Microbiology**, 60, 2985-2989, 1994.

MERCHEN, N.R. Digestion, absorption and excretion in ruminants. In: **The ruminant animal digestive physiology and nutrition**. Church, D.C. (Ed.) 4<sup>th</sup> ed. O&B Books. pp. 172-201, 1993.

MIR P. S., KALNIN C. M. and GARVEY S. A., Recovery of faecal chromium used as a digestibility marker in cattle. **Journal of Dairy Science** 72:2549–2553, 1989.

MOORE, J.A.; POOR, M.H. and SWINGLE, R.S. Influence of roughage source on kinetics of digestion and passage, and on calculated extents of ruminal digestion in beef steers fed 65% concentrate diets. **Journal of Animal Science** 68, 3412–3420, 1990.

MORRISON, R. and BOYD, R.N. Alcanos. In: **Química orgânica**. 6. ed. Boston: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972. cap. 4: p.110-172.

MUHLEBACH J.; MULLER K. and SCHWARZENBACHG. The peroxocomplexes of titanium. **Inorganic. Chemistry**. 11:2381–2390,1970.

MYERS W. D.; LUDDEN P. A.; NAYIGHUGU V. and HESS B. W. Technical Note: A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. **Journal of Animal Science**. 82:179–183,2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy of Science, 2001. 254p.

NJAA, L. R. Determination of protein digestibility with titanium dioxide as indicator substance. **Acta Agriculturae Scandinavica**. 11:227–241,1961.

OHAJURAKA, O. A. and PALMQUIST, D.L. Evaluation of n-alkanes as digesta Markers in dairy cows. **Journal of Animal Science**, 69:1726-1732, 1991.

OLIVÁN, M.; OSORO, K. The effect of drying treatment on the n-alkane analysis. **Annales Zootechnie**, v.44, p.238 - suppl., 1995

OLIVEIRA, D. E. de; PRATES, E. R. Utilização dos componentes das ceras epicuticulares das plantas, em especial os n-alcanos, em estudos de nutrição de ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.3,p.549-557, 2000.

OLIVEIRA, D.E. and PRATES E. R.. Utilização dos componentes da cera das plantas, em especial os n-alcanos, em estudos de nutrição de ruminantes. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 30, n. 3, p. 549-557, 2000.

OLIVEIRA, D.E.; PRATES, E.R. and PERALBA, M.C.R. Identificação e quantificação de n-alcanos presentes nas ceras de plantas forrageiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 26(5):881-886, 1997.

OWENS, F.N.; HANSON, C.F. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.9, p.2605-2617, 1992.

PENNING, P.D. and HOOPER, G.E. An evaluation of the use of short-term weight changes in grazing sheep for estimating herbage intake. **Grass and Forage Science** 40, 79-84.1985.

PENNING, P. D.; JOHNSON, R. H. The use of internal markers to estimate herbage digestibility and intake. **Journal of Agricultural Science**, v.100, p.127-131, 1983.

PHILLIPSON, A. T. Flow of digesta in the intestine of the ruminant. **Proceedures Nutrition Society** 28:110–114, 1969.

PHILLIPSON, A. T. The passage of digesta from the abomasum of sheep. **Journal of Physiology** (London), 116, 84-97, 1952.

PORTER, P. and SINGLETON, A. G. The degradation of lignin and quantitative aspects of ruminant digestion. **British Journal of Nutrition**, n. 25, 3, 1971a

PORTER, P. and SINGLETON, A. G. Digestion of carbohydrates of hay in small ruminants. **British Journal of Nutrition**, n. 26, 75, 1971b.

PRIGGE, E. C.; VARGA, G. A.; VICINI, J. L. and REID, R. L. Comparison of ytterbium chloride and chromium sesquioxide as fecal indicators. **Journal of Animal Science**, 53:1629, 1981.

QUIROZ, R. A.; POND, K. R.; TOLLEY, E. A and JOHNSON. W. L. Selection among nonlinear models for rate of passage studies in ruminants. **Journal of Animal Science**, 66:2977. 1988.

RAMOS, B.M.O; CHAMPION, M; PONCET, C.; MIZUBUTI, I.Y.; NOZIÈRE, P. Effects of vitreousness and particle size of maize grain on ruminal and intestinal *in sacco* degradation of dry matter, starch and nitrogen. **Animal Feed Science and Technology** 148 253–266, 2009.

RIBEIRO FILHO, H.M.N., DELAGARDE, R., PEYRAUD, J.L. Herbage intake and milk yield of dairy cows grazing perennial ryegrass swards or white clover/perennial ryegrass swards at low- and medium-herbage allowances. **Animal Feed Science and Technology**, 119, 13–27, 2005.

ROBERTSON, J. B. AND VAN SOEST, P. J. The detergent system of analyses and its application to human foods. In: **The analysis of dietary fiber in food**. W.P.T. James and O. Theander, ed. Marcel Dekker, Inc., New York, NY. Pages 123-156, 1981.

ROOKE, J.A. The nutritive values of feed protein residues resistant to degradation by rumen micro-organisms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 36: 6299637,1985.

SAMANIEGO, M. A. P. Master's Thesis: **Comparison of methods for the measurement of digesta flow and protein supply in sheep**. University of Aberdeen, Aberdeen, UK, 1996.

SAUER, W. C.; JORGENSEN,H. and BERZINS,R. A modified nylon bag technique for determining apparent digestibilities of protein in feedstuffs for pigs. **Canadian Journal of Animal Science** 63:233–237,1983.

SEDMAN, R.M.; BEAUMONT, J.; MCDONALD, T.A.; REYNOLDS, S.; KROWECH, G. and HOWD, R., 2006. Review of the evidence regarding the carcinogenicity of hexavalent

chromium in drinking water. **Journal of Environmental Science and Health, Part C - Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**. 24, 155–182.

SEIN, T. and TODD J. R. Investigation into the use of indicator methods of estimating the digestibilities of feeds by ruminant animals. **Journal of Agricultural Science**. v. 110, n. 2, p. 315-320, 1988.

SENGER, C. et al. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 146, n. 1–2, p. 169, Sept, 2008.

SILVA, E.A.; BERCHIELLI, T.T.; REIS, R.A. et al Teores de proteína bruta para bovinos alimentados com feno de tifton 85: consumo e digestibilidades total e parcial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.237-245, 2007.

SHERROD, L. B.; et al. ADF Insoluble ash, HCl Insoluble ash, and lignin as indicator for determining ruminant digestibility. **Proceedings Western Section American Society of Animal Science**, v. 29, n. 5, p. 236-242, 1978.

STAKELUM, G. and DILLON, P. **Dosed and herbage alkanes as feed intake predictors with dairy cows: the effect of feeding level and frequency of perennial ryegrass**. Proc. VII Eur. Grazing Workshop (Wageningen, The Netherlands) October 1990.

STERN, M. D.; BACH A. and CALSAMIGLIA S. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. **Journal of Animal Science**, 75:2256-2276,1997.

TAMMINGA, S. and CHEN, X.B. Animal-based Techniques for the Estimation of Protein Value of Forages In: **Forage Evaluation in Ruminant Nutrition**. CAB International(eds. D.I. Givens, E. Owen, R.F.E. Axford and H.M. Omed), 2000.

TEETER, R. G.; OWENS, F. N. and MADER, T. L. Ytterbium Chloride as a Marker for Particulate Matter in the rumen, **Journal of Animal Science**, 58:465-473, 1984.

TEIXEIRA, J. C.; HUBER, J.T.; WANDERLEY, C. R. **Uso da técnica de saco móvel para estimar a digestibilidade pós-ruminal em vacas leiteiras**. Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia, v. 18, n. 4, p.285-294, 1989.

THOMSON D. J.; BEEVER, D. E.; COELHO DA SILVA J. F. and ARMSTRONG D. G. The effect in sheep of physical form on the sites of digestion of a dried lucerne diet 1. Sites of organic matter, energy and carbohydrate digestion. **British Journal of Nutrition**, 28, 31, 1972.

THOMSON, D.J. The nitrogen supplied by and the supplementation of fresh or grazed forage. In **'Forage Protein in Ruminant Animal Production'**. (Eds D.J. Thomson, D.E. Beever and R.G. Gunn. - Occasional Publication no. 6, BSAP: Thames Ditton).pp. 53-66, 1982.

THONEY, M. L.; et al. Acid insoluble ash and permanganate lignin as indicators to determine digestibility of cattle rations. **Journal of Animal Science**. v. 49, n. 4, p. 1112-1116, 1979.

TODOROV, N. A. and GIRGINOV, D. G. Comparison of the infusion method, mobile bag technique and in vitro method for determination of the protein digestibility in small intestine of cattle. In: **Protein Metabolism and Nutrition**. B. O. Eggum, S. Boisen, C. Børsting, A. Danafær, and T. Hvelplund (Ed.) Procedures. 6<sup>th</sup> Int. Symp. Protein Metabolism and Nutrition. National Institute of Animal Science, Research Centre Foulum, Tjele, Denmark. EAAP Publ. n.59, v. 2. pp 80–82, 1991.

TŘINÁCTÝ, J.; HOMOLKA, P.; ZEMAN, L. and RICHTER, M. Whole tract and post ruminal digestibility determined by in situ ruminal, intestinal mobile nylon bag and whole tract nylon capsule methods. **Animal Feed Science and Technology** 106 (2003) 59–67, 2004.

TULLIEZ, J. and BORIES, G. Metabolism of aliphatic and cycloparaffins in higher animals. Retention of straight-chain aliphatic, cyclo and branched-chain paraffins by rats. **Nutritional Abstracts Reviews**, 47:62 (Abstract), 1977.

TULLOCH, A.P. Composition of epicuticular waxes from 28 genera of Graminae: Differences between subfamilies. **Canadian Journal of Botany**, 59(7):1213-1221, 1981.

TULLOCH, A.P. Composition of leaf surface waxes of Triticum species: variation with age and tissue. **Phytochemistry** 12, 2225-32. 1973.

UDÉN, P., COLUCCI, P.E. and VAN SOEST, P.J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 31, 625–632, 1980.

VALADARES FILHO, C.S. Utilização da técnica in situ para avaliação dos alimentos. In: **Anais do Simpósio Internacional de Produção de ruminantes**. 31, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil, p. 95-118, 1994.

VAN KEULEN, J. and YOUNG, B. A. Evaluation of acid insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. **Journal of Animal Science**, 44 (2): 282-287, 1977.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**, 2nd ed. Ithaca, NY: Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, 1994.

VAN STRAALLEN, W. M.; DOOPER, F.M.H.; ANTONIEWICZ, A. M.; KOSMALA, I. and VAN VUUREN, A. M. Intestinal digestibility in dairy cows of protein from grass and clover measured with mobile bag and other methods. **Journal of Dairy Science**. 76:2970–2981, 1993.

VANHATALO, A. and KETOJA, E. The role of the large intestine in post-ruminal digestion of feeds as measured by the mobile-bag method in cattle. **British Journal of Nutrition** 73, 491–505, 1995.

VARVIKKO, T. and VANHATALO, A., The effect of differing types of cloth and of contamination by non-feed nitrogen on intestinal digestion estimates using porous synthetic-fibre bags in a cow. **British Journal of Nutrition**, 63:221-229. 1990.

VOIGT, J.; PIATKOWSKI, B.; ENGLEMAN, H. and RUDOLPH, E. Measurement of the post-ruminal digestibility of crude protein by the bag technique in cows. *Archiv für Tierernährung*. 8:555–562, 1985.

WALDO, D.R.; SMITH, I.W. and COW, L.L. Model of cellulose disappearance from the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.55, n.1, p.125-129, 1972.

WALLER, J.; MERCHEN, N.; HANSON T. and KLOPFENSTEIN T. Flow Determinations effect of sampling intervals and digesta markers on abomasal. **Journal of Animal Science**, 50:1122-1126, 1980.

WALTERS, R.J.K. and EVANS, E.M. Evaluation of a sward sampling technique for estimating herbage intake by grazing sheep. **Journal British Grassland Society** 34, 37-44.1979

WARNER, A. C. I. Rate of passage of digesta through the gut of mammals and birds. **Nutritional Abstracts Reviews**. v. 51, p. 789-820, 1981.

WEISS, P.E. Estimation of digestibility of forages by laboratory methods. In: **Forage Quality, Evaluation, and Utilization**. Fahey Jr., G.C. (Ed.), American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA, pp. 644-681, 1994.

WENHAM, G. and WYBURN, S.. A radiological investigation of the effects of cannulation on intestinal motility and digesta flow in sheep. **The Journal of Agricultural Science**, 95 , p.p 539-546, 1980

WENHAM, G. Effects of cannulation on intestinal motility. **Annales Recherches Vétérinaires**. 10:157-159, 1979.

ZEOULA, L. M. et al. Uso de indicadores na determinação da digestibilidade parcial e total em bovinos. **Acta Scientiarum**, v. 22, n.3, p. 771-777, 2000.

ZEOULA, L. M.; BRANCO, A. F.; SALINA, L. J. Avaliação de indicadores em estudo de digestibilidade de alimentos para ruminantes. **Revista Unimar**, v. 22, n. 3, p.165-174, 1994.

ZEOULA, L.M.; PRADO, I.N.; DIAN, P.H.M; et al. Recuperação fecal de marcadores internos avaliados em ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.4, p.1865-1874, 2002.

ZINN, R A; BULL, L. S.; HEMKEN, R. W.; BUTTON, F. S.; ENLOW, C. and TUCKER, R. W. Apparatus for measuring and subsampling digesta in ruminants equipped with reentrant intestinal cannulas. **Journal of Animal Science**. 51:193.1980.

## **ANEXOS**

# ANEXO 1: Análise de regressão dos teores de FDN após 12, 24, 36 e 48 horas de incubação no rúmen e após a passagem pelos intestinos de bovinos.

## FDN 12 horas de incubação ruminal

\*\*\*\*\*

The SAS System 17:36 Friday, March 26, 2012 25

The REG Procedure  
Model: MODEL1  
Dependent Variable: FDNF

Number of Observations Read 206  
Number of Observations Used 206

### Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	66683	66683	1845.73	<.0001
Error	204	7370.14319	36.12815		
Corrected Total	205	74053			

Root MSE 6.01067 R-Square 0.9005  
Dependent Mean 31.63466 Adj R-Sq 0.9000  
Coeff Var 19.00027

### Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	-18.04360	1.22983	-14.67	<.0001
FDNR	1	1.16596	0.02714	42.96	<.0001

## FDN 24 HORAS DE INCUBAÇÃO RUMINAL

\*\*\*\*\*

The SAS System 17:36 Friday, March 26, 2012 37

The REG Procedure  
Model: MODEL1  
Dependent Variable: FDNF

Number of Observations Read 226  
Number of Observations Used 226

### Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	64321	64321	2082.42	<.0001
Error	224	6918.79308	30.88747		
Corrected Total	225	71240			

Root MSE 5.55765 R-Square 0.9029  
Dependent Mean 27.98743 Adj R-Sq 0.9024  
Coeff Var 19.85766

### Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	-9.72113	0.90526	-10.74	<.0001
FDNR	1	1.07301	0.02351	45.63	<.0001

FDN 36 HORAS DE INCUBAÇÃO RUMINAL

\*\*\*\*\*

The SAS System 17:36 Friday, March 26, 2012 49

The REG Procedure  
Model: MODEL1  
Dependent Variable: FDNF

Number of Observations Read 217  
Number of Observations Used 217

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	50508	50508	3694.53	<.0001
Error	215	2939.29660	13.67115		
Corrected Total	216	53448			

Root MSE	3.69745	R-Square	0.9450
Dependent Mean	24.16811	Adj R-Sq	0.9448
Coeff Var	15.29888		

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	-5.01125	0.54172	-9.25	<.0001
FDNR	1	1.05649	0.01738	60.78	<.0001

\*\*\*\*\*

FDN 48 HORAS DE INCUBAÇÃO RUMINAL

\*\*\*\*\*

The SAS System 17:21 Friday, March 26, 2012 1

The REG Procedure  
Model: MODEL1  
Dependent Variable: FDNF

Number of Observations Read 208  
Number of Observations Used 208

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	39980	39980	2249.76	<.0001
Error	206	3660.76624	17.77071		
Corrected Total	207	43641			

Root MSE	4.21553	R-Square	0.9161
Dependent Mean	21.42216	Adj R-Sq	0.9157
Coeff Var	19.67837		

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	-3.41287	0.59966	-5.69	<.0001
FDNR	1	0.98568	0.02078	47.43	<.0001

**ANEXO 2:** Análise de regressão linear dos teores de FDA após 12, 24, 36 e 48 horas de incubação ruminal e após a passagem pelos intestinos de bovinos Dados não corrigidos e corrigidos pelo desaparecimento intestinal de LDA.

The SAS System FDA 12HORAS DE INCUBAÇÃO RUMINAL  
16:35 Friday, March 26, 2012 1

The REG Procedure  
Model: MODEL1  
Dependent Variable: FDAF

Number of Observations Read 225  
Number of Observations Used 225

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	33119	33119	4129.31	<.0001
Error	223	1788.59007	8.02058		
Corrected Total	224	34908			

Root MSE 2.83206 R-Square 0.9488  
Dependent Mean 20.48707 Adj R-Sq 0.9485  
Coeff Var 13.82366

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	-2.23970	0.40091	-5.59	<.0001
FDAR	1	0.94065	0.01464	64.26	<.0001

FDA 12 HORAS DE INCUBAÇÃO RUMINAL CORRIGIDO

The SAS System 16:35 Friday, March 26, 2012 2

The REG Procedure  
Model: MODEL1  
Dependent Variable: FDAFC

Number of Observations Read 225  
Number of Observations Used 225

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	46113	46113	4129.34	<.0001
Error	223	2490.29167	11.16723		
Corrected Total	224	48604			

Root MSE 3.34174 R-Square 0.9488  
Dependent Mean 24.17471 Adj R-Sq 0.9485  
Coeff Var 13.82329

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	-2.64221	0.47306	-5.59	<.0001
FDARR	1	1.10994	0.01727	64.26	<.0001

FDA 24 horas de incubação ruminal

\*\*\*\*\*

The SAS System 16:35 Friday, March 26, 2012 18

The REG Procedure  
Model: MODEL1  
Dependent Variable: FDAF

Number of Observations Read 241  
Number of Observations Used 241

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	30493	30493	2872.33	<.0001
Error	239	2537.28641	10.61626		
Corrected Total	240	33031			

Root MSE 3.25826 R-Square 0.9232  
Dependent Mean 17.96979 Adj R-Sq 0.9229  
Coeff Var 18.13188

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	-1.67788	0.42243	-3.97	<.0001
FDAR	1	0.97829	0.01825	53.59	<.0001

FDA 24 HORAS DE INCUBAÇÃO RUMINAL CORRIGIDO

The SAS System 16:35 Friday, March 26, 2012 19

The REG Procedure  
Model: MODEL1  
Dependent Variable: FDAFC

Number of Observations Read 241  
Number of Observations Used 241

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	38940	38940	2872.24	<.0001
Error	239	3240.17392	13.55721		
Corrected Total	240	42180			

Root MSE 3.68201 R-Square 0.9232  
Dependent Mean 20.30639 Adj R-Sq 0.9229  
Coeff Var 18.13228

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	-1.89618	0.47737	-3.97	<.0001
FDARR	1	1.10550	0.02063	53.59	<.0001

FDA 36 horas de incubação ruminal

The SAS System 17:36 Friday, March 26, 2012 1

The REG Procedure

Model: MODEL1  
Dependent Variable: FDAF

Number of Observations Read 228  
Number of Observations Used 228

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	23777	23777	3661.83	<.0001
Error	226	1467.47133	6.49324		
Corrected Total	227	25245			

Root MSE 2.54818 R-Square 0.9419  
Dependent Mean 14.75829 Adj R-Sq 0.9416  
Coeff Var 17.26611

## Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	-1.29054	0.31435	-4.11	<.0001
FDAR	1	1.00270	0.01657	60.51	<.0001

-----  
The SAS System 17:36 Friday, March 26, 2012 2  
FDA 36 HORAS DE INCUBAÇÃO RUMINAL CORRIGIDO

The REG Procedure  
Model: MODEL1  
Dependent Variable: FDAFC

Number of Observations Read 228  
Number of Observations Used 228

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	28770	28770	3661.70	<.0001
Error	226	1775.68293	7.85700		
Corrected Total	227	30546			

Root MSE 2.80303 R-Square 0.9419  
Dependent Mean 16.23373 Adj R-Sq 0.9416  
Coeff Var 17.26673

## Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	-1.41989	0.34579	-4.11	<.0001
FDARR	1	1.10297	0.01823	60.51	<.0001

-----  
The SAS System 17:36 Friday, March 26, 2012 13  
FDA 48 HORAS DE INCUBAÇÃO RUMINAL  
\*\*\*\*\*

The REG Procedure  
Model: MODEL1  
Dependent Variable: FDAF

Number of Observations Read 207  
Number of Observations Used 207

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	16844	16844	2664.03	<.0001
Error	205	1296.12669	6.32257		
Corrected Total	206	18140			

Root MSE	2.51447	R-Square	0.9285
Dependent Mean	14.16594	Adj R-Sq	0.9282
Coeff Var	17.75012		

## Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	-0.43536	0.33252	-1.31	0.1919
FDAR	1	0.91911	0.01781	51.61	<.0001

The SAS System

FDA 48 HORAS DE INCUBAÇÃO RUMINAL CORRIGIDO  
17:36 Friday, March 26, 2012 14

The REG Procedure  
Model: MODEL1  
Dependent Variable: FDAFC

Number of Observations Read	207
Number of Observations Used	207

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	19646	19646	2664.08	<.0001
Error	205	1511.72508	7.37427		
Corrected Total	206	21157			

Root MSE	2.71556	R-Square	0.9285
Dependent Mean	15.29923	Adj R-Sq	0.9282
Coeff Var	17.74966		

## Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	-0.46993	0.35912	-1.31	0.1921
FDARR	1	0.99262	0.01923	51.61	<.0001

**ANEXO 3:** Análise de regressão dos teores de LDA após 12, 24, 36 e 48 horas de incubação ruminal e após a passagem pelos intestinos dos bovinos.

LDA 12 HORAS DE INCUBAÇÃO RUMINAL

\*\*\*\*\*  
 The SAS System 17:36 Friday, March 26, 2012 73

The REG Procedure  
 Model: MODEL1  
 Dependent Variable: LDAF

Number of Observations Read 152  
 Number of Observations Used 152

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	1624.81907	1624.81907	911.99	<.0001
Error	150	267.24419	1.78163		
Corrected Total	151	1892.06325			

Root MSE 1.33478 R-Square 0.8588  
 Dependent Mean 6.41401 Adj R-Sq 0.8578  
 Coeff Var 20.81032

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	0.28169	0.23012	1.22	0.2228
LDAR	1	0.77943	0.02581	30.20	<.0001

LDA 24HORAS DE INCUBAÇÃO RUMINAL

\*\*\*\*\*  
 The SAS System 17:36 Friday, March 26, 2012 81

The REG Procedure  
 Model: MODEL1  
 Dependent Variable: LDAF

Number of Observations Read 160  
 Number of Observations Used 160

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	1712.88627	1712.88627	1482.83	<.0001
Error	158	182.51337	1.15515		
Corrected Total	159	1895.39964			

Root MSE 1.07478 R-Square 0.9037  
 Dependent Mean 6.35650 Adj R-Sq 0.9031  
 Coeff Var 16.90833

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	-0.20542	0.19042	-1.08	0.2823
LDAR	1	0.89508	0.02324	38.51	<.0001

LDA 36 HORAS DE INCUBAÇÃO RUMINAL

\*\*\*\*\*

The SAS System 17:36 Friday, March 26, 2012 89

The REG Procedure  
 Model: MODEL1  
 Dependent Variable: LDAF

Number of Observations Read 148  
 Number of Observations Used 148

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	1074.36258	1074.36258	700.24	<.0001
Error	146	224.00396	1.53427		
Corrected Total	147	1298.36653			

Root MSE 1.23866 R-Square 0.8275  
 Dependent Mean 5.91068 Adj R-Sq 0.8263  
 Coeff Var 20.95628

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	0.30483	0.23504	1.30	0.1967
LDAR	1	0.85261	0.03222	26.46	<.0001

48 HORAS DE INCUBAÇÃO RUMINAL

\*\*\*\*\*

The SAS System 17:36 Friday, March 26, 2012 105

The REG Procedure  
 Model: MODEL1  
 Dependent Variable: LDAF

Number of Observations Read 129  
 Number of Observations Used 129

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	937.06468	937.06468	762.53	<.0001
Error	127	156.06980	1.22890		
Corrected Total	128	1093.13448			

Root MSE 1.10856 R-Square 0.8572  
 Dependent Mean 6.21039 Adj R-Sq 0.8561  
 Coeff Var 17.85003

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	1	0.16480	0.23970	0.69	0.4930
LDAR	1	0.89600	0.03245	27.61	<.0001

**ANEXO 4:** Análise de médias do desaparecimento da LDA e FDA nos diferentes tempos de incubação.

```

*****
DESAPARECIMENTO DE FIBRA
----- TEMPO DE INCUBAÇÃO=12 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: DIF DIFERENÇA

Source          DF          Sum of
Model           1          Squares
Error          375          Mean Square
Corrected Total 376          F Value
                                   Pr > F
                                   0.0954

                                   R-Square
0.007398

                                   Coeff Var
84.05096

                                   Root MSE
0.188345

                                   DIF Mean
0.224085

Source          DF          Type I SS          Mean Square          F Value          Pr > F
FR              1          0.09915089          0.09915089          2.80          0.0954

Source          DF          Type III SS          Mean Square          F Value          Pr > F
FR              1          0.09915089          0.09915089          2.80          0.0954

```

```

*****
DESAPARECIMENTO DE FIBRA
----- TEMPO DE INCUBAÇÃO=12 -----

The GLM Procedure

Level of
FR          N          Mean          Std Dev
DFDA       225          0.21075556          0.17372458
DLDA       152          0.24381579          0.20815154

```

```

*****
DESAPARECIMENTO DE FIBRA
----- TEMPO DE INCUBAÇÃO=24 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

Class          Levels          Values
FR              2          DFDA DLDA

Number of Observations Read          401
Number of Observations Used          401

```

```

*****
DESAPARECIMENTO DE FIBRA
----- TEMPO DE INCUBAÇÃO=24 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: DIF DIFERENÇA

Source          DF          Sum of
Model           1          Squares
Error          375          Mean Square
Corrected Total 376          F Value
                                   Pr > F
                                   0.0931

```

Error	399	11.80710352	0.02959174
Corrected Total	400	11.89096160	

R-Square	Coeff Var	Root MSE	DIF Mean
0.007052	87.85153	0.172022	0.195810

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FR	1	0.08385807	0.08385807	2.83	0.0931

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FR	1	0.08385807	0.08385807	2.83	0.0931

\*\*\*\*\*

DESAPARECIMENTO DE FIBRA

----- TEMPO DE INCUBAÇÃO=24 -----

The GLM Procedure

Level of		-----DIF-----	
FR	N	Mean	Std Dev
DFDA	241	0.20759336	0.20129378
DLDA	160	0.17806250	0.11444422

\*\*\*\*\*

DESAPARECIMENTO DE FIBRA

----- TEMPO DE INCUBAÇÃO=36 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
FR	2	DFDA DLDA

Number of Observations Read	376
Number of Observations Used	376

\*\*\*\*\*

DESAPARECIMENTO DE FIBRA

----- TEMPO DE INCUBAÇÃO=36 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: DIF DIFERENÇA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.00000197	0.00000197	0.00	0.9950
Error	374	19.08996585	0.05104269		
Corrected Total	375	19.08996782			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	DIF Mean
0.000000	110.0509	0.225926	0.205293

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FR	1	1.9704055E-6	1.9704055E-6	0.00	0.9950

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FR	1	1.9704055E-6	1.9704055E-6	0.00	0.9950

\*\*\*\*\*  
 DESAPARECIMENTO DE FIBRA  
 ----- TEMPO DE INCUBAÇÃO=36 -----  
 The GLM Procedure  

Level of FR	N	-----DIF----- Mean	Std Dev
DFDA	228	0.20535088	0.20576570
DLDA	148	0.20520270	0.25393360

 \*\*\*\*\*

DESAPARECIMENTO DE FIBRA  
 09:50 Friday, February 27, 2012 39  
 ----- TEMPO DE INCUBAÇÃO=48 -----  
 The GLM Procedure  
 Class Level Information  

Class	Levels	Values
FR	2	DFDA DLDA

Number of Observations Read	336
Number of Observations Used	336

 \*\*\*\*\*

DESAPARECIMENTO DE FIBRA  
 ----- TEMPO DE INCUBAÇÃO=48 -----  
 The GLM Procedure  
 Dependent Variable: DIF DIFERENÇA  

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.09266568	0.09266568	3.38	0.0668
Error	334	9.15027599	0.02739604		
Corrected Total	335	9.24294167			

R-Square	0.010026	Coeff Var	93.46869	Root MSE	0.165517	DIF Mean	0.177083
----------	----------	-----------	----------	----------	----------	----------	----------

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FR	1	0.09266568	0.09266568	3.38	0.0668

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
FR	1	0.09266568	0.09266568	3.38	0.0668

 \*\*\*\*\*

DESAPARECIMENTO DE FIBRA  
 ----- TEMPO DE INCUBAÇÃO=48 -----  
 The GLM Procedure  

Level of FR	N	-----DIF----- Mean	Std Dev
DFDA	207	0.19019324	0.17809118
DLDA	129	0.15604651	0.14297847

**ANEXO 5:** Análise estatística do fluxo de matéria seca (MS) em g/dia, obtido através de marcadores internos: fibra em detergente ácido (FDA) e alcanos ímpares (C31, C33, C35); e como marcador externo o alcano C32.

\*\*\*\*\*

The SAS System 15:24 Tuesday, March 30, 2012 6

The SAS System 15:24 Tuesday, March 30, 2012 8

----- M=C31 -----  
The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
A	4	3 4 5 6
P	4	1 2 3 4
T	4	0 2 4 6

Number of Observations Read 15  
Number of Observations Used 15

\*\*\*\*\*

The SAS System 15:24 Tuesday, March 30, 2012 9

----- M=C31 -----  
The GLM Procedure

Dependent Variable: FD

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	2066797.974	229644.219	0.62	0.7513
Error	5	1862613.035	372522.607		
Corrected Total	14	3929411.009			

R-Square 0.525982  
Coeff Var 44.18018  
Root MSE 610.3463  
FD Mean 1381.493

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	368730.605	122910.202	0.33	0.8048
P	3	382847.222	127615.741	0.34	0.7965
T	3	1315220.147	438406.716	1.18	0.4063

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	514155.805	171385.268	0.46	0.7222
P	3	459441.155	153147.052	0.41	0.7525
T	3	1315220.147	438406.716	1.18	0.4063

\*\*\*\*\*

----- M=C31 -----  
The GLM Procedure

Level of T	N	-----FD----- Mean	Std Dev
0	3	1081.00000	269.428803

2	4	1110.02500	629.321695
4	4	1736.87500	531.849699
6	4	1522.95000	445.946234

\*\*\*\*\*

The SAS System 15:24 Tuesday, March 30, 2012

----- M=C32 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
A	4	3 4 5 6
P	4	1 2 3 4
T	4	0 2 4 6

Number of Observations Read 15  
 Number of Observations Used 15

\*\*\*\*\*

The SAS System 15:24 Tuesday, March 30, 2012 12

----- M=C32 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: FD

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	9745494.25	1082832.69	0.91	0.5783
Error	5	5976038.38	1195207.68		
Corrected Total	14	15721532.63			

R-Square 0.619882  
 Coeff Var 49.03385  
 Root MSE 1093.256  
 FD Mean 2229.593

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	473537.220	157845.740	0.13	0.9369
P	3	2232232.424	744077.475	0.62	0.6304
T	3	7039724.602	2346574.867	1.96	0.2379

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	474026.369	158008.790	0.13	0.9368
P	3	1573192.102	524397.367	0.44	0.7353
T	3	7039724.602	2346574.867	1.96	0.2379

\*\*\*\*\*

----- M=C32 -----

The GLM Procedure

Level of T	N	Mean	Std Dev
0	3	1756.90000	780.87945

2	4	1478.35000	337.43209
4	4	3310.37500	1258.45785
6	4	2254.57500	776.02018

\*\*\*\*\*

----- M=C33 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
A	4	3 4 5 6
P	4	1 2 3 4
T	4	0 2 4 6

Number of Observations Read 15  
 Number of Observations Used 15

\*\*\*\*\*

----- M=C33 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: FD

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	7351002.452	816778.050	1.73	0.2841
Error	5	2365880.988	473176.198		
Corrected Total	14	9716883.440			

R-Square 0.756519  
 Coeff Var 36.72993  
 Root MSE 687.8780  
 FD Mean 1872.800

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	304742.776	101580.925	0.21	0.8823
P	3	3749426.962	1249808.987	2.64	0.1611
T	3	3296832.714	1098944.238	2.32	0.1922

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	302593.917	100864.639	0.21	0.8833
P	3	2774813.989	924937.996	1.95	0.2392
T	3	3296832.714	1098944.238	2.32	0.1922

\*\*\*\*\*

----- M=C33 -----

The GLM Procedure

Level of T	N	Mean	Std Dev
0	3	1190.10000	142.805077
2	4	1428.72500	725.749247
4	4	2412.52500	783.911527
6	4	2289.17500	857.647159

\*\*\*\*\*

----- M=C35 -----

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
A	4	3 4 5 6
P	4	1 2 3 4
T	4	0 2 4 6

Number of Observations Read 15  
 Number of Observations Used 15

\*\*\*\*\*

----- M=C35 -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: FD

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	4644274.781	516030.531	0.94	0.5616
Error	5	2750985.208	550197.042		
Corrected Total	14	7395259.989			

R-Square 0.628007  
 Coeff Var 38.56252  
 Root MSE 741.7527  
 FD Mean 1923.507

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	362249.405	120749.802	0.22	0.8791
P	3	265784.660	88594.887	0.16	0.9181
T	3	4016240.716	1338746.905	2.43	0.1805

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	314599.672	104866.557	0.19	0.8985
P	3	238463.861	79487.954	0.14	0.9289
T	3	4016240.716	1338746.905	2.43	0.1805

\*\*\*\*\*

----- M=C35 -----

The GLM Procedure

Level of T	N	Mean	Std Dev
0	3	1589.83333	342.362912
2	4	1433.25000	663.731881
4	4	2754.37500	510.097509
6	4	1833.15000	568.380943

\*\*\*\*\*

----- M=FDA -----

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
A	4	3 4 5 6
P	4	1 2 3 4
T	4	0 2 4 6

Number of Observations Read 15  
 Number of Observations Used 15

\*\*\*\*\*

----- M=FDA -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: FD

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	4900360.459	544484.495	3.65	0.0837
Error	5	744962.918	148992.584		
Corrected Total	14	5645323.377			

R-Square 0.868039  
 Coeff Var 19.04972  
 Root MSE 385.9956  
 FD Mean 2026.253

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	2729865.268	909955.089	6.11	0.0399
P	3	1011033.549	337011.183	2.26	0.1990
T	3	1159461.642	386487.214	2.59	0.1652

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	3	2231094.247	743698.082	4.99	0.0578
P	3	983786.407	327928.802	2.20	0.2062
T	3	1159461.642	386487.214	2.59	0.1652

\*\*\*\*\*

----- M=FDA -----

The GLM Procedure

Level of T	N	Mean	Std Dev
0	3	1552.70000	539.296570
2	4	1799.82500	775.966891
4	4	2367.45000	536.831286
6	4	2266.65000	522.189024

**ANEXO 6:** Exemplo de Cromatograma ilustrando a concentração de n-alcenos em amostra de forragem.

