

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

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES EXTERNOS E
INTERNOS PARA ESTIMAR EXCREÇÃO FECAL E
CONSUMO EM OVINOS ALIMENTADOS COM
PASTAGEM NATURAL OU FENO DE TIFTON 85**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thaís Regina Longo

Santa Maria, RS, Brasil.

2015

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES EXTERNOS E INTERNOS
PARA ESTIMAR EXCREÇÃO FECAL E CONSUMO EM
OVINOS ALIMENTADOS COM PASTAGEM NATURAL OU
FENO DE TIFTON 85**

Thaís Regina Longo

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.

2015

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

Longo, Thaís Regina

Avaliação de marcadores externos e internos para estimar excreção fecal e consumo em ovinos alimentados com pastagem natural ou feno de tifton 85 / Thaís Regina Longo.-2015.

49 f.; 30cm

Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, RS, 2015

1. Excreção fecal 2. Marcadores externos 3. Marcadores internos 4. Recuperação fecal I. Kozloski, Gilberto Vilmar II. Título.

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Thaís Regina Longo. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: thais@zootecnista.com.br

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

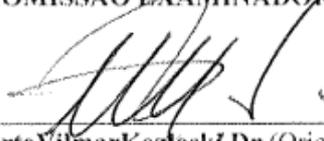
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES EXTERNOS E INTERNOS PARA
ESTIMAR EXCREÇÃO FECAL E CONSUMO EM OVINOS
ALIMENTADOS COM PASTAGEM NATURAL OU FENO DE
TIFTON 85**

elaborada por
Thaís Regina Longo

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

COMISSÃO EXAMINADORA:



Gilberto Vilmar Kozloski, Dr. (Orientador)



Fernando Luiz Ferreira de Quadros, PhD (Presidente)



Henrique Mendonça Nunes Ribeiro Filho, Dr. (CAV/UDESC)



Maria Cecilia Cajarville Sanz, Dr. (UDELAR)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo à Deus, que é de onde veio e vêm a minha força para seguir em frente sempre, independente da situação.

Aos meus pais e irmão, Hélio, Sirlei e Guto, pelo apoio e amor que sempre desempenharam, que mesmo longe, nunca deixaram de estar presentes.

À toda equipe de pós-graduação e estagiários LABRUMEN pela ajuda e esforço ao longo de toda a caminhada.

Aos técnicos de laboratório Gisele, Vitor e Clóvis pelo auxílio e atenção durante as análises.

Os amigos e amigas que Deus me deu, que são irmãos de coração e que estiveram ao meu lado desde o início, me ajudando de alguma forma: Zanfi, Marcelo, Ricardo, Andressa Guterres, Dessa Martins, Flai, Eli, Mari Rentas, Paula Severo, Ane, Si, Lis, Mari Sette, Fabi Favero, Ana Sôster.

Ao Professor Gilberto Kozloski pelo aprendizado e paciência durante o período que estive no laboratório.

À todos os professores da UFSM que de alguma maneira colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Ana Gabriela Saccol e Professor Fernando Quadros que contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Ao Laboratório de Análise de Solos da UFSM pelo auxílio e análise das minhas amostras.

Ao CNPQ pelo auxílio por meio da bolsa de estudos.

Enfim, o meu muito obrigada a todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte dessa etapa da minha vida.

*"Confia no Senhor e faze o bem,
habitarás na terra, e verdadeiramente serás alimentado.
Deleita-te também no Senhor, e te concederá os desejos do teu coração.
Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e ele tudo fará".
Salmos 37.3-5*

RESUMO

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

AVALIAÇÃO DE MARCADORES EXTERNOS E INTERNOS PARA ESTIMAR EXCREÇÃO FECAL E/CONSUMO EM OVINOS ALIMENTADOS COM PASTAGEM NATURAL OU FENO DE TIFTON 85

AUTORA: THAÍIS REGINA LONGO
ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO VILMAR KOZLOSKI
Data e local de defesa: 27 de fevereiro de 2015.

O objetivo deste estudo foi avaliar os marcadores externos óxido de cromo (Cr_2O_3), dióxido de titânio (TiO_2) para estimar recuperação fecal, excreção fecal, o tempo para tornar-se constante e desaparecer totalmente do organismo do animal e efeito de horários de amostragem ao longo do dia; e marcadores internos matéria seca (MSi), Fibra em detergente neutro (FDNi) e Nitrogênio fecal (NF) para estimar digestibilidade de nutrientes e consumo de matéria orgânica de ovinos. Foram utilizados seis cordeiros Corriedale, alimentados com dietas à base de feno de Tifton 85 (FT) ou pastagem natural (PN), em um delineamento Quadrado Latino (3 x 3). Os animais foram dosados uma vez ao dia com TiO_2 e Cr_2O_3 . Foram realizadas coletas diárias de fezes desde o primeiro dia de cada período e nos últimos 4 dias foram obtidas amostras de fezes em diferentes horários ao longo do dia. A MSi e FDNi foram avaliados pesando-se em sacos de poliéster o alimento e as fezes e incubados *in situ* por 144 h. Para o marcador TiO_2 a estabilização de excreção fecal foi de 9 dias após primeira dosagem e recuperação fecal de 72%, já para o Cr_2O_3 , este se estabilizou em 10 dias e sua recuperação fecal foi de 84%. A MSi apresentou recuperações de 100% (FT) e 91% (PN) e a FDNi 92% (FT) e 71% (PN), tendo alta e significativa relação para estimar DMO. Para o NF também foi observada alta e significativa relação entre CMO observado e NF estimado, tendo coeficientes de determinação de 75% para FT e 58% para PN. Assim, o TiO_2 e Cr_2O_3 não apresentaram recuperação total e a concentração fecal de ambos apresentaram alta variabilidade ao longo do dia e em diferentes dias, sendo necessário pelo menos 10 dias de fornecimento prévio. No entanto, a MSi é um marcador adequado para estimar a digestibilidade da forragem ingerida. Da mesma maneira, em animais que é feita coleta total de fezes, a excreção de N fecal é um indicador adequado para estimar consumo de MO.

Palavras-chave: Excreção fecal. Marcadores externos. Marcadores internos. Recuperação fecal.

ABSTRACT

Master Degree Dissertation
Post-Graduate Program in Animal Science
Federal University of Santa Maria

EVALUATION OF EXTERNAL AND INTERNAL MARKERS TO ESTIMATE FECAL EXCRETION AND INTAKE IN SHEEP FED WITH NATURAL FORAGE OR TIFTON 85 HAY

AUTHOR: THAÍS REGINA LONGO

ADVISOR: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI

Place and Date of evaluation: Santa Maria, February 27, 2015.

The objective of this study was to evaluate the external markers chromium oxide (Cr_2O_3), titanium dioxide (TiO_2) to estimate fecal recovery, fecal excretion, time to become constant and totally disappear from the animal's body and sampling time effect throughout the day; and internal markers indigestible dry matter (iDM), indigestible neutral detergent fiber (iNDF) and fecal nitrogen (FN) to estimate nutrient digestibility and intake of organic matter in sheep. Six Corriedale lambs were fed diets base of Tifton 85 hay (TH) or natural pasture (NP), in a Latin square design (3 x 3). The animals were dosed once daily with TiO_2 and Cr_2O_3 . Daily fecal samples were taken from the first day of each period and in the last four days stool samples were obtained at different times throughout the day. The iDM and iNDF were evaluated by weighing in polyester bags food and faeces and incubated *in situ* for 144 hours. For the stabilization of the TiO_2 marker fecal excretion was 9 days after the first dose and fecal recovery of 72% for longer Cr_2O_3 , this stabilized at 10 days and faecal recovery was 84%. The iDM showed recoveries of 100% (TH) and 91% (NP) and iNDF 92% (TH) and 71% (NP), having high and significant relationship to estimate OMD. For the NF was also observed high and significant relationship between observed and NF estimated OMI, with coefficients of determination of 75% for FT and 58% for PN. Thus, the TiO_2 and Cr_2O_3 not show full recovery and fecal both showed high variability throughout the day or on different days, requiring at least 10 days prior to delivery. However, iDM is a suitable marker to estimate the digestibility of forage. Similarly, in animals that is made complete collection of feces, N Faecal excretion is an appropriate indicator for estimating consumption OM.

Key-words: Fecal excretion. External markers. Internal markers. Fecal recovery.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Tempo (dias) necessário para os marcadores externos TiO_2 e Cr_2O_3 atingirem concentração fecal constante	30
Figura 2.	Concentração fecal do marcador externo TiO_2 ao longo de 10 dias após última dose	31
Figura 3.	Concentração fecal do marcador externo TiO_2 ao longo de 10 dias após última dose	32
Figura 4.	Recuperação fecal (%) do marcador externo dióxido de titânio (TiO_2) e marcadores internos matéria seca indigestível (MSi) e fibra em detergente indigestível (FDNi) e respectivos desvios padrões em ovinos ingerindo feno de tifton 85 e pastagem natural	33
Figura 5.	Recuperação fecal (%) dos marcadores externos dióxido de titânio (TiO_2) e óxido de cromo (Cr_2O_3) e marcadores internos matéria seca indigestível (MSi) e fibra em detergente indigestível (FDNi) e respectivos desvios padrões em ovinos ingerindo feno de tifton 85 e pastagem natural	34
Figura 6.	Relação entre a DMO observada e DMO estimada pela MSi como marcador interno quando incubado <i>in situ</i> o feno de tifton 85 como fonte de forragem	36
Figura 7.	Relação entre a DMO observada e DMO estimada pela MSi como marcador interno quando incubado <i>in situ</i> a pastagem natural como fonte de forragem....	37
Figura 8.	Relação entre a DMO observada e DMO estimada pela FDNi como marcador interno quando incubado <i>in situ</i> o feno de tifton 85 como fonte de forragem	37
Figura 9.	Relação entre a DMO observada e DMO estimada pela MSi como marcador interno quando incubado <i>in situ</i> a pastagem natural como fonte de forragem....	38
Figura 10.	Relação entre a CMO observada e CMO estimado pelo N fecal a partir de amostras fecais de ovinos ingerindo com feno de tifton	38
Figura 11.	Relação entre a CMO observada e CMO estimado pelo N fecal a partir de amostras fecais de ovinos ingerindo com pastagem natural	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição química do feno de tifton 85 e pastagem natural procedente do bioma pampa	24
Tabela 2.	Produção fecal estimada e observada (g MS fecal/dia) pelo dióxido de titânio em diferentes tempos de amostragens de fezes e com ou sem correção para a recuperação fecal em ovinos ingerindo feno de tifton 85	35
Tabela 3.	Produção fecal estimada e observada (g MS fecal/dia) pelo dióxido de titânio em diferentes tempos de amostragens de fezes e com ou sem correção para a recuperação fecal em ovinos ingerindo pastagem natural.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 HIPÓTESE	13
3 OBJETIVOS	14
3.1 Objetivos	14
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
4.1 Consumo e digestibilidade de ruminantes	15
4.2 Medida da excreção fecal	16
4.3 Estimativa da excreção fecal	17
4.4 Marcadores externos	18
4.4.1 Óxido de cromo (Cr ₂ O ₃).....	18
4.4.2 Dióxido de titânio (TiO ₂).....	19
4.5 Marcadores internos	20
4.5.1 Matéria seca indigestível (MSi) e Fibra em detergente neutro indigestível (FDNi)	21
4.5.2 Nitrogênio fecal	22
5 MATERIAL E MÉTODOS	23
5.1 Local e época	23
5.2 Animais, dietas e Delineamento experimental	23
5.2.1 Administração do Dióxido de Titânio no ensaio 1 (feno de tifton 85).....	24
5.2.2 Administração do Dióxido de Titânio e Óxido de Cromo no ensaio 2 (pastagem natural).....	24
5.3 Coleta de amostras	25
5.4 Análises químico-bromatológicas	25
5.5 Determinação de MSi e FDNi	26
5.6 Cálculos e análise estatística	27
6 RESULTADOS	30
6.1 Número de dias para estabilização da excreção fecal dos marcadores externos	30
6.2 Número de dias necessários para o completo desaparecimento dos marcadores externos	31
6.3 Recuperação fecal dos marcadores externos	32
6.3.1 Ensaio 1 – feno de tifton.....	32
6.3.2 Ensaio 2 – Pastagem natural	33
6.4 Relação entre excreção fecal estimada e observada em diferentes horas de amostragens de fezes	34
6.5 Matéria seca indigestível e Fibra em detergente neutro indigestível	36
6.6 Índice fecais	38
7 DISCUSSÃO	40
8 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

O valor alimentar de um alimento é determinado por dois componentes principais: digestibilidade e consumo. A mensuração do consumo é de fundamental importância para estabelecer e suprir exigências nutricionais de qualquer espécie e categoria animal de acordo com as potencialidades do alimento ofertado. No entanto, o conhecimento do consumo de forragem por animais em pastejo é ainda um desafio para os pesquisadores, uma vez que não é possível quantificar diretamente a forragem ingerida. Da mesma forma, o uso de sacolas para coleta total de fezes em animais em pastejo é viável em ovinos mas, devido ao volume e consistência das fezes, torna-se mais trabalhoso em bovinos.

Alternativamente, a maior parte dos estudos publicados que incluíram estas avaliações, utilizam marcadores externos e/ou internos para estimar excreção fecal e/ou digestibilidade e, indiretamente, consumo de forragem. Contudo, nenhuma das substâncias usadas preenchem todas as características de marcador perfeito, mas várias são suficientemente adequadas para fornecer dados relevantes (MERCHANT, 1993). Por esta razão, a procura de marcadores ideais constitui ainda um dos assuntos de grande interesse na pesquisa de técnicas de estudo em de nutrição de ruminantes.

Existem diferentes tipos de marcadores, que são classificados como externos, os quais são administrados ao animal, sendo os mais utilizados o óxido de cromo e dióxido de titânio (MYERS, 2006; TIGMEYER et al. 2001; SAMPAIO, 2011), ou internos caracterizados por estarem presentes naturalmente no alimento ofertado, incluindo matéria seca indigestível (MSi), fibra em detergente indigestível (FDNi), fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), entre outros.

Os marcadores externos são utilizados para estimar o fluxo da digesta e a excreção fecal, enquanto os marcadores internos são utilizados para estimar a digestibilidade do alimento ingerido. Adicionalmente, a concentração e/ou a excreção de N fecal também é utilizado para estimar digestibilidade (LANCASTER, 1949) ou diretamente o consumo de alimento (KOZLOSKI et al., 2014).

Há inúmeros fatores que podem afetar a acurácia da utilização do método de marcadores em animais. Dentre eles pode-se citar o protocolo de administração do marcador, método de análise, procedimento de amostragem de fezes, irregularidade na excreção dos marcadores, baixa recuperação fecal e dinâmica do marcador ao longo do dia são dos pontos

mais preocupantes quando utiliza-se marcadores em estudos para ruminantes (CARVALHO et al., 2007; SOARES et al., 2004, MORENZ et al.,2006; KOZLOSKI et al., 2006).

Na tentativa de diminuir estes problemas algumas alternativas têm sido propostas ao longo dos anos. Entre elas destaca-se o uso dos marcadores impregnado a cápsulas de gelatina ou incorporado ao concentrado. Esta última forma de administração aos animais (misturado ao concentrado) têm a vantagem de diminuir o estresse causado durante o fornecimento do marcador.

No entanto, a maioria dos estudos que avaliaram os marcadores mais comumente utilizados, foram conduzidos com animais alimentados com dietas contendo médio a altos níveis de concentrado. Não foi encontrado nenhum estudo na literatura avaliando a dinâmica do dióxido de titânio como marcador externo em animais alimentados somente com gramíneas e/ou com pastagem natural do Bioma Pampa, o que constitui importante demanda dos grupos de pesquisa que trabalham com a interface planta-animal, particularmente no sul do Brasil.

2 HIPÓTESE

O óxido de cromo e o dióxido de titânio são eficientes marcadores externos para estimar excreção fecal de ovinos alimentados somente com gramíneas forrageiras, independentemente do nível de consumo. A matéria seca indigestível, a fibra em detergente neutro indigestível são igualmente eficientes como marcadores para estimar a digestibilidade da matéria orgânica, e a excreção fecal de Nitrogênio é um eficiente índice fecal para estimar consumo da MO nestes animais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos

- a) Avaliar o tempo em dias para o dióxido de titânio e o óxido de cromo permanecerem com concentração constante nas fezes após a primeira dosagem;
- b) Avaliar o tempo em dias para o desaparecimento total do dióxido de titânio e o óxido de cromo nas fezes após a última dosagem;
- c) Avaliar a recuperação fecal dos marcadores externos e internos;
- d) Avaliar o efeito de tempos de amostragem sobre a concentração do dióxido de titânio;
- e) Avaliar a precisão e exatidão das estimativas de excreção fecal utilizando ambos marcadores externos;
- f) Avaliar a precisão e exatidão das estimativas de digestibilidade utilizando os marcadores internos matéria seca Indigestível e fibra em detergente neutro indigestível;
- g) Avaliar o nitrogênio fecal como marcador para estimar consumo.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Consumo e digestibilidade de ruminantes

Na produção animal a alimentação é de fundamental importância para alcançar um desempenho eficiente, através de um manejo alimentar adequado e conhecimento das características químicas do alimento, sendo influenciado por vários fatores associados ao animal, ao pasto, ao ambiente e às suas interações.

É imprescindível a formulação de dietas balanceadas para suprir as necessidades de manutenção e produção dos animais, explorando sua máxima capacidade digestiva e potencial genético. Para isso deve-se levar em consideração o consumo de matéria seca e a qualidade do alimento ofertado. A qualidade nutricional de uma forrageira depende da digestibilidade, da eficiência de utilização dos nutrientes digeridos e absorvidos e principalmente do consumo voluntário.

No caso de ruminantes criados em sistemas extensivos há grande dificuldade na determinação do consumo, de tal maneira que nos últimos anos vêm se estudando diferentes métodos para estimá-lo, sendo eles através da digestibilidade da dieta e excreção fecal. A excreção fecal é inversamente proporcional à digestibilidade, mas diretamente relacionada à quantidade de alimento ingerido.

Deste modo, segundo os autores Lippke, 2002; Pedreira, 2002; Rodrigues et al., 2006; Berchielli et al., (2007) o consumo pode ser estimado da seguinte forma:

$$\text{Consumo (g/dia)} = \text{Produção fecal (g/dia)} / (1 - \text{Digestibilidade})$$

Quando trata-se de digestibilidade, é visto que conceitualmente, a digestibilidade é a fração de um alimento ou nutriente que não é excretado nas fezes, e que por isso se assume que foi absorvida pelo animal. Uma forma de se avaliar a qualidade do alimento é através da determinação deste parâmetro. Esta pode ser estimada pela composição química de um alimento, em ensaios *in vivo* ou *in vitro* e por meio da excreção fecal. Além disso, conhecer a digestibilidade de um alimento é primordial para que sejam quantificados os nutrientes que o animal está absorvendo da dieta que está sendo ofertada, satisfazendo de forma eficiente às

necessidades do animal e evitando perdas de nutrientes e custos com a produção. Dessa forma, a digestibilidade pode ser estimada através da seguinte equação (POND et al., 1995):

$$\text{Digestibilidade (\%)} = \frac{\text{Ingerido} - \text{excretado nas fezes}}{\text{Ingerido}} \times 100$$

Existem vários fatores que podem influenciar a digestibilidade, como a composição e o preparo dos alimentos da dieta, além de fatores dependentes dos animais e do nível nutricional, especialmente a densidade energética da ração. Assim, é de fundamental importância o conhecimento e determinação da digestibilidade na nutrição animal, para que dessa maneira sejam formuladas dietas balanceadas que supram exigências nutricionais à produção que está sendo desenvolvida.

4.2 Medida da excreção fecal

A excreção fecal de animais mantidos em pasto pode ser medida diretamente, com uso de sacolas coletoras que tem como objetivo obter a coleta total das fezes produzidas. No entanto, esta técnica é criticada por causar um desconforto (peso das fezes principalmente em bovinos) e estresse animal, podendo prejudicar no comportamento ingestivo e o consumo de pasto e além disso, pode ocorrer também a perda dos excrementos, subestimando a excreção fecal. Aparentemente, estes problemas parecem ser mais limitantes em bovinos do que em ovinos, principalmente com animais de alto nível de consumo e mantidos em pastagens com alto teor de umidade (MÉLIX et al., 1987; McMENNIMAN, 1997; MOORE e SOLLENBERGER, 1997; LIPPKE, 2002) Por este e outros motivos, que nos últimos anos vêm se estudando alternativas à coleta total de fezes.

4.3 Estimativa da excreção fecal

Visto que a coleta da quantidade total fecal de animais criados à pasto é de grande dificuldade para ser obtida, a técnica dos marcadores que estimam a excreção fecal, por meio da concentração do marcador obtido nas fezes, foi inicialmente utilizada décadas atrás, com a finalidade de facilitar a determinação dessa produção total fecal. Esta por sua vez, não requer o manuseio de grandes quantidades de material, além de permitir estimar o consumo individual diário dos animais, pois para o cálculo de produção fecal leva-se em conta a quantidade do marcador fornecido ao animal e a sua concentração nas fezes (FERREIRA et al., 2009).

Os marcadores são substâncias químicas que devem possuir alguns requisitos básicos para serem eficientes, tais como: ser inerte e atóxico; não apresentar função fisiológica; ser totalmente indigerível e inabsorvível; não ser processado com o alimento; misturar-se bem ao alimento e permanecer uniformemente distribuído na digesta; não influenciar ou ser influenciado por secreções intestinais, absorção, motilidade e a população microbiana intestinal; possuir método específico e sensível de determinação.

Para isso, os marcadores são divididos em dois diferentes grupos, podendo ser marcadores externos, os quais são administrados via oral ou ruminal ao animal por meio de cápsulas de gel ou papel ou misturados ao concentrado. A administração de dose única de um marcador permite estimar a produção fecal, o consumo de matéria seca, a taxa de passagem da digesta, o tempo médio de retenção e o enchimento do trato gastrintestinal (POND et al., 1989; QUIROZ et al., 1988), ou então os marcadores internos que possuem a vantagem de serem substâncias presentes naturalmente no alimento. No entanto, estes marcadores não permitem estimar o consumo de períodos diferentes de 24 horas e sua concentração fecal varia amplamente ao longo do tempo, após o fornecimento, de modo que vários dias são necessários para excreção total da dosagem inicial fornecida, por isso o objetivo de realizar a dosagem desde o primeiro dia de cada período é de obter amostras fecais mais homogêneas, simulando 24 horas.

É essencial também que o marcador seja quantitativamente recuperado nas fezes e distribuído uniformemente, de modo a permitir concentração constante e quantificável na digesta, atingindo o chamado estado de equilíbrio (“steady-state”) o mais rapidamente possível.

Diversas variáveis podem provocar efeito sobre os resultados de estimativa da produção fecal em ruminantes, tais como: tipo e dose de marcadores; grupamento genético, idade e sexo do animal; plano de alimentação; extensão do período de adaptação; número de dias e horário das coletas de fezes; entre outras.

Dessa forma, a excreção fecal pode ser quantificada pela equação descrita por Smith e Reid (1955):

$$\text{Excreção fecal(g/dia)} = \frac{\text{Indicador fornecido (g/dia)}}{\text{Concentração do indicador nas fezes (g/gMS)}}$$

4.4 Marcadores externos

4.4.1 Óxido de cromo (Cr₂O₃)

O óxido de cromo apesar de não ser o melhor marcador de fluxo de digesta, tem se consolidado como um dos marcadores mais utilizados para estimar o consumo de ruminantes em pastejo, particularmente por pesquisadores no Brasil, como Cândido et al. (2005), Lopes et al. (2007), Gontijo Neto et al. (2006), Palieraqui et al.(2006), entre vários outros. É um dos mais utilizados por possuir baixo custo e a relativa simplicidade dos procedimentos analíticos (MORENZ et al., 2006). Contudo, algumas limitações associadas são a incompleta recuperação fecal (SOARES et al., 2004) e sua irregularidade na excreção ao longo dia (MORENZ et al., 2006; KOZLOSKI et al., 2006).

Dependendo da forma como é fornecido, como por exemplo o cromo em pó por via oral ou cânula, estas limitações podem ser maiores. No entanto, o fornecimento dos marcadores externos em pó, embalados em cápsulas de papel ou gel, por via oral, ainda é a forma mais utilizada. A opção da mistura no concentrado facilita o manejo e diminui o estresse causado aos animais. Entretanto, a sua utilização em animais que não são dotados de cânula ruminal exige que o concentrado seja suficientemente palatável, característica que o óxido de cromo não possui. Deste modo, a sua adição a um alimento concentrado só pode ser

realizada em pequenas quantidades, o que requer um método analítico sensível e preciso para determinar sua concentração fecal.

Com relação aos erros encontrados, estes estão associados à flutuação diária da excreção do Cr_2O_3 , podendo ser minimizados pela obtenção de várias amostras de fezes ao longo de um dia, ou durante vários dias, mas com coletas em horários alternados, de forma a obter-se uma amostra composta contendo sub-amostras a cada 3 ou 4 horas de um ciclo de 24 horas (KOZLOSKI et al., 2006).

Além disso, as dosagens diárias também são um problema, por muitas vezes necessitar de mais de uma dosagem por dia e em horários alternados, assim como a coleta de amostras. Por todas estas características citadas, estão sendo estudadas alternativas ao óxido de cromo como marcador externo.

4.4.2 Dióxido de titânio (TiO_2)

O TiO_2 é um pó branco, seco e finamente pulverizado, de constituição inorgânica, quimicamente inerte e termicamente estável, inodoro e insolúvel em água. Possui baixo custo, tem foto-estabilidade e estabilidade química em uma ampla faixa de pH. É muito utilizado na indústria de cosméticos, de alimentos e biotecnologia, mas principalmente na indústria de tintas, pois tem grande capacidade de branquear e possui alto poder de refletância.

O dióxido de titânio é um marcador externo que está sendo utilizado como alternativa ao óxido de cromo, pois segundo pesquisas recentes, não possui propriedades carcinogênicas como o óxido de cromo, possui um processo analítico rápido e acurado, melhor recuperação fecal e melhor homogeneidade à digesta (FERREIRA et al., 2009; SAMPAIO, 2011).

Existem poucos trabalhos com o dióxido de titânio, no entanto este marcador possui grande potencial para ser utilizado como marcador externo em ensaios de digestibilidade, visto que alguns autores já afirmaram que o dióxido de titânio apresentou bons resultados de recuperação fecal (MYERS et al., 2006; MARCONDES et al., 2006a; MARCONDES et al., 2006b; FERREIRA et al., 2009).

Trabalhando com o TiO_2 , Ferreira et al. (2009) encontraram valores de recuperação fecal semelhantes aos obtidos com a coleta total de fezes em novilhas mestiças alimentadas à base de cana de açúcar e concentrado. No entanto, Titgemeyer et al. (2001)

conduziram três experimentos com novilhos, avaliando a acurácia dos marcadores Cr_2O_3 e TiO_2 , e observaram que a recuperação fecal variou em função das características de cada ensaio. No primeiro experimento, os animais foram alimentados com dietas à base de feno e concentrado e nos demais com dietas baseadas em silagem de milho. Segundo os autores, somente no primeiro experimento o TiO_2 estimou valores de produção fecal semelhantes ao da coleta total. Nos demais, foi observado a subestimativa da excreção fecal.

4.5 Marcadores internos

Os marcadores internos são compostos presentes naturalmente nos alimentos, tendo como vantagem serem baratos e serem facilmente utilizados na experimentação animal com animais domésticos ou silvestres, facilitando a obtenção de respostas essenciais ao desempenho dos mesmos. Embora muitos marcadores internos pareçam promissores, poucos têm ganhado aceitação, principalmente porque podem sofrer alterações no processo.

A estimativa da digestibilidade por estes marcadores é feita através de uma relação da concentração de compostos indigestíveis presentes no alimento e nas fezes coletadas.

De acordo com Penning (2004), a técnica requer que o marcador permaneça inalterado ao longo da passagem pelo trato gastrointestinal; que pode ser quantitativamente recuperado nas fezes e que a forragem e as fezes sejam acuradamente amostradas. Este método se baseia no fato de que, à medida que o alimento transita pelo trato gastrointestinal, a concentração do marcador aumenta progressivamente pela remoção de outros componentes, por digestão e absorção (ASTIGARRAGA, 1997), estabelecendo-se assim relações de causa e efeito entre a concentração do marcador e os diferentes eventos digestivos aos quais o alimento é submetido.

Estes marcadores possuem como principais vantagens: não necessitarem do fornecimento ao animal e prévio preparo; serem de baixo custo; permanecerem uniformemente distribuídos na digesta durante o processo de digestão e excreção; apresentarem facilidade de avaliação em diversas espécies (BERCHIELLI et al., 2000).

No entanto, podem existir restrições à utilização dos marcadores internos em ensaios metabólicos, ocasionadas por alterações no processo digestivo, que podem interferir na recuperação fecal e conseqüente eficácia na resposta pretendida. Os principais problemas encontrados no emprego dos marcadores internos são: incompletas e variadas taxas de recuperação fecal; maior sensibilidade a erros nas estimativas de digestibilidade e/ou de produção fecal; interação dos marcadores com a dieta; variação na excreção do marcador ao longo do dia; baixa concentração do marcador na dieta; falta de padronização das técnicas laboratoriais para sua determinação; processamento inadequado e falta de representatividade das amostras de forragens, fezes e sobras (LOPES, 2007).

Os principais marcadores internos atualmente recomendados para estimar a excreção fecal em ruminantes são: matéria seca indigestível (MSi), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi); fibra em detergente ácido indigestível (FDAi); *n-alcanos*; entre outros (LOPES, 2007; DETMANN, 2001).

4.5.1 Matéria seca indigestível (MSi) e Fibra em detergente neutro indigestível (FDNi)

A MSi e FDNi estão entre os mais promissores marcadores internos para estimativa da produção fecal de ruminantes. Estes marcadores consistem em frações indigeríveis do alimento que podem ser utilizadas para estimar a produção fecal, por meio da relação entre sua concentração no alimento e nas fezes.

A determinação da concentração destes marcadores internos nos alimentos e fezes pode ser realizada pela sua incubação, *in vitro* ou *in situ*, no rúmen (FREITAS et al., 2002). Os cálculos são realizados a partir da diferença entre as concentrações no alimento e nas fezes de uma determinada fração indigestível, de acordo com as equações de Dyne 1968, citado por Holechek; Vavra, (1982). Em muitos estudos é utilizado período de incubação de 144 horas (RODRIGUEZ et al., 2006).

As diferenças nos resultados da literatura em relação à utilização da FDNi como marcador interno para estimativa da produção fecal podem ser parcialmente atribuídas às variações existentes na recuperação de marcadores indigestíveis, falta de padronização no método de determinação, além daquelas relacionadas aos métodos de determinação *in situ* ou *in vitro* (OLIVEIRA Jr. et al., 2004).

A MSi após incubação *in situ* em estudos já realizados, pode ser menos precisa para detectar diferenças na digestibilidade de alimentos impostas pelos tratamentos em um experimento (KOZLOSKI et al., 2006).

Em trabalhos com ovinos, Detmann et al. (2007) encontraram valores de recuperação completa da FDNi, demonstrando que tal indicador apresentou comportamento ideal para determinar a digestibilidade em ruminantes. Os autores relataram que a FDAi nesta mesma condição experimental, apresentou-se mais sensível a erros, provavelmente, como decorrência da sua menor concentração nos alimentos.

4.5.2 Nitrogênio fecal

A metodologia do Nitrogênio fecal (NF) como marcador para estimar o consumo de animais, é uma técnica baseada na proposta de que o NF oriundo do metabolismo (microrganismos indigestíveis, secreções digestivas e descamação das células epiteliais (HUTCHINSON, 1958; LUKAS et al., 2005) e o consumo de matéria orgânica (CMO) por unidade excretada é constante. Peripolli et al. (2011), com auxílio de dados coletados em ensaios de digestibilidade com ovinos, observaram que há uma alta relação (0,85) entre CMO e excreção de NF (g/dia). Estes resultados indicaram que o consumo de ruminantes criados à pasto pode ser estimado de forma direta, utilizando a concentração de NF excretado em vez de utilizar NF para estimar a digestibilidade de forragens.

Uma das vantagens da utilização do N como índice fecal para estimar digestibilidade é além de não haver a necessidade de dosagem como em marcadores externos, apenas com a condução de um experimento de digestibilidade e coleta de pequenas amostras de fezes é possível relacionar a concentração do N nas fezes e o CMO. Além disso, sua análise laboratorial de fácil e rápida determinação, dependendo apenas de equipamentos normalmente disponíveis em laboratórios de bromatologia.

Apesar do grande número de publicações aprovando os índices fecais para estimativas de consumo, (NUNEZ-HERNANDEZ et al., 1992), CARVALHO et al., 2007) ainda se faz necessário estudos para melhor esclarecer esta metodologia.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local e época

Foram conduzidos dois ensaios de digestibilidade *in vivo* com ovinos e um ensaio de digestibilidade *in situ* com bovino nas instalações do Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes (LABRUMEN), vinculado ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no período de maio de 2013 a outubro de 2014.

5.2 Animais, dietas e Delineamento experimental

Em cada ensaio de digestibilidade *in vivo* foram utilizados seis ovinos machos castrados da raça Corriedale (peso vivo médio de 25 kg), em delineamento experimental quadrado Latino replicado 3 x 3. Os ovinos foram alojados em gaiolas de metabolismo com cochos para alimento, água e sal mineral. Após um período pré-experimental de aproximadamente duas semanas, os ensaios foram conduzidos em três períodos de 17 dias.

As dietas experimentais foram constituídas de feno de Tifton 85 (ensaio 1) e pastagem natural oriundas do bioma pampa da região central do Rio Grande do Sul (ensaio 2). A pastagem natural foi coletada de uma área cedida pelo Laboratório de Ecologia de Pastagens Naturais (LEPAN) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Esta pastagem foi cortada e congelada em câmara fria até o fornecimento aos animais.

Os tratamentos incluídos em cada experimento foram três níveis de oferta de forragem (base na MS) respectivamente: 2% do peso corporal 3% do peso corporal e *ad libitum* (ensaio 1) e 1,5% do peso corporal, 2,5% do peso corporal e *ad libitum* (ensaio 2).

Nos dois ensaios o alimento foi ofertado duas vezes ao dia, aproximadamente às 8:00h e 17:00h, sendo que o feno foi picado em partículas menores para evitar a seleção dos animais, e a pastagem natural congelada foi retirada da câmara fria para descongelamento e então fornecida aos animais. As composições químicas das forragens são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química do feno de tifton 85 e pastagem natural procedente do bioma pampa.

Item ¹	Feno de Tifton 85	Pastagem Natural
MS (%)	89,71	41,89
-----Composição (% na MS) -----		
MO	90,02	91,52
PB	11,76	7,62
FDN	71,42	79,01
FDA	29,33	38,08
LDA	7,24	6,82
EE	3,55	5,06

¹MS= matéria seca; MO= matéria orgânica; PB= proteína bruta; FDN= fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; LDA= lignina em detergente ácido; EE= extrato etéreo; NIDN= nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA= nitrogênio insolúvel em detergente ácido.

5.2.1 Administração do Dióxido de Titânio no ensaio 1 (feno de tifton 85)

Foram administradas cápsulas de dióxido de titânio apenas no 1º e 3º períodos do ensaio 1, de forma que no 2º período não houvesse dosagem do marcador, com o objetivo de avaliar o tempo de eliminação do marcador no organismo do animal. Dessa forma, foram pesadas um total de 102 cápsulas em gel contendo 0,5 g de dióxido de titânio cada cápsula. Nos respectivos períodos, do 1º ao 17º dia, estas cápsulas foram administradas via oral (uma cápsula/animal/dia) às 8:00h e em seguida foi fornecido o alimento para garantir que a cápsula chegasse ao rúmen.

5.2.2 Administração do Dióxido de Titânio e Óxido de Cromo no ensaio 2 (pastagem natural)

Foram administradas cápsulas de dióxido de titânio e óxido de cromo apenas no 1º e 3º períodos do ensaio 2, de forma que no 2º período não houvesse dosagem, com o objetivo de avaliar o tempo de eliminação dos marcadores no organismo do animal. Dessa forma, foram pesadas um total de 204 cápsulas em gel, sendo 102 cápsulas contendo 0,5 g de dióxido de titânio e 102 cápsulas contendo 0,5 g de óxido de cromo. Nos respectivos períodos, do 1º ao 17º dia, estas cápsulas foram administradas via oral (uma cápsula/animal/dia) às 8:00h e em seguida foi fornecido o alimento para garantir que a cápsula chegasse ao rúmen.

5.3 Coleta de amostras

Os procedimentos experimentais referentes aos dois ensaios foram os mesmos, como descritos a seguir. O dados do consumo real para medir a eficácia dos marcadores foi anotado em uma planilha todos os dias, individualmente para cada animal, durante os dois ensaios. As fezes foram coletadas diariamente em todos os períodos experimentais, pesadas e secas em estufa com ventilação forçada a 55°C e, a seguir, moídas (peneira de 1 mm porosidade) e armazenadas para posterior análise. Nos últimos sete dias de cada período experimental também foram feitas coletas de amostras de sobras e alimentos, as quais foram secas a 55°C em estufa com ventilação forçada, moídas (peneira com porosidade de 1 mm) e armazenadas para posteriores análises.

Entre o 14° e 17° dia dos períodos 1 e 3 foram coletadas amostras pontuais de fezes diretamente do reto do animais (aproximadamente 30 g) em intervalos de seis horas adiantando duas horas a cada dia, de modo a obter subamostras a cada duas horas em um período de 24 horas. Estas amostras foram submetidas aos procedimentos de secagem e moagem descritos acima e armazenadas para posterior análise.

5.4 Análises químico-bromatológicas

O cálculo da digestibilidade da MO foi feita baseado na análise de amostras compostas de fezes dos últimos sete dias de cada período experimental. O teor de matéria seca (MS) foi obtido por secagem em estufa a 105°C durante pelo menos 8 h. A matéria mineral (MM) foi determinada pela queima em mufla a 600°C durante três horas. O nitrogênio (N) total do alimento e das fezes foram determinados por um método Kjeldahl (AOAC, 1995) modificado conforme descrito por Kozloski et al., (2003). Para determinar o teor de fibra em detergente neutro (FDN) as amostras foram pesadas em saco de poliéster (KOMARECK, 1993) e tratadas com detergente neutro em autoclave a 110°C durante 40 minutos (SENGER et al., 2008). Os teores de fibra em detergente ácido (FDA) e lignina em detergente ácido (LDA) foram determinados de acordo com AOAC (método 97318, AOAC, 1995), mas sem uso de amianto. Os teores de extrato etéreo (EE) das amostras foram obtidos por extração com éter de petróleo em um sistema de refluxo a 180°C durante 2h (Soxtherm, Gerhardt).

A concentração de dióxido de titânio foi determinada por meio do método adaptado de OHMORI (2013). Onde pesou-se 0,5g de amostra de fezes APS (por animal/período/dia) em tubos do tipo micro-Kjeldahl adicionando 5 mL de ácido sulfúrico (PA) e aproximadamente 1g de catalizador. Foi realizada a digestão em temperatura de 350°C (a cada 30 minutos aumentou-se 50°C) até a solução atingir a coloração azul clara. Após esfriar foi adicionado 10ml de água destilada, filtrada com filtro de papel e aferido para balão de 100 ml com água destilada. Coletada uma alíquota em frascos para posterior leitura adicionando-se 0,2 mL de peróxido de hidrogênio (20%) em espectrofotômetro em comprimento de onda de 408 nm.

A análise do óxido de cromo foi determinada por absorção atômica por meio da metodologia proposta por Kozloski et al. (2006), pesando-se aproximadamente 0,5g de amostra de fezes APS (por animal/período/dia) em becker de 20 ml. A amostra foi queimada em mufla a 600°C durante 3 horas. Após baixar a temperatura da mufla as amostras foram retiradas e transferidas para tubos de micro-Kjeldahl adicionando 10 ml de solução solubilizadora de cromo (5ml para lavar o becker + 5ml para lavar a parede do tubo). Foi realizada a digestão em temperatura de 350°C até a solução atingir a coloração amarelo-alaranjada. Após esfriar foi adicionado 10ml de água destilada, filtrada em filtro de papel e aferido para balão de 50 ml com água destilada. Coletada uma alíquota em frascos para posterior leitura em espectrofotometria de absorção atômica

5.5 Determinação de MSi e FDNi

Para determinar os teores de matéria seca indigestível (MSi) e fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) para as duas forragens (feno de tifton 85 e pastagem natural), foi utilizado procedimento descrito por Penning e Johnson (1983) e Cochran et al. (1986) a partir de um ensaio de digestibilidade *in situ*. Foram pesadas alíquotas de 1g das amostras de alimentos e fezes em triplicatas, em sacos de poliéster de 4 × 5 cm, com porosidade de 40 µm, previamente pesados e identificados. Os sacos foram selados a quente e incubados durante 144 horas no rúmen de um bovino adulto. Posteriormente, foram retirados, lavados até o completo clareamento da água, levados à estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas e submetidos à secagem em estufa a 105°C por 8 hora. Em seguida, foram retirados, esfriados em dessecador e pesados para determinação da concentração de MSi. Posteriormente, foram submetidos à fervura em solução detergente neutro (SENGER et al., 2008), por 40 minutos,

lavados com água quente, secos e pesados, pelo mesmo procedimento, para determinação da FDNi.

5.6 Cálculos e análise estatística

a) Avaliação do tempo para o dióxido de titânio e o óxido de cromo atingirem a concentração constante nas fezes após a primeira dosagem;

O efeito do tempo (dias) após a primeira dosagem do marcador sobre concentração do marcador nas fezes em cada animal, ensaio e período, excluindo-se o período 2 de cada ensaio, foi analisado utilizando-se regressão segmentada (*Broken Line*). O ponto de quebra (em dias) a partir do qual ocorreu estabilização da variável indicou o período mínimo de estabilização da excreção do marcador. Segundo Robbins (1986) o modelo de regressão segmentada consiste em duas partes: uma linha inclinada ascendente ou descendente seguida de uma linha horizontal, onde seus pontos de interseção vão determinar o ponto de quebra. Essa análise foi feita utilizando o procedimento NLIN do SAS, com base no modelo: $y=L + U(R-x)$, onde L representa a intercepta (ponto no eixo das ordenadas) da regressão linear ascendente ou descendente, U o coeficiente dessa regressão e R o ponto de quebra (ponto no eixo das abcissas). Os valores de R de cada animal, ensaio e período foram submetidos à análise de variância pelo PROC MIXED, utilizando um modelo que incluiu os efeitos fixos de dieta, os efeitos aleatórios de animal e período, e o nível de consumo como covariável.

b) Avaliação do tempo para o desaparecimento total do dióxido de titânio e o óxido de cromo nas fezes após a última dosagem;

O tempo, em dias, para desaparecimento do marcador das fezes após a última dosagem, foi considerado aquele cuja concentração do marcador nas fezes foi nula.

c) Avaliação da recuperação fecal dos marcadores externos e internos;

A recuperação dos marcadores (%) foi estimada através da equação: (quantidade do marcador excretado (mg/dia) / quantidade de marcador ingerido (mg/dia)) x 100, sendo que a quantidade do marcador excretado diariamente foi calculado com base na média de concentração fecal do marcador e na excreção fecal observada nos últimos 6 dias do primeiro e terceiro período experimental. Desse modo, em cada ensaio foram obtidos 12 valores

médios de recuperação de cada marcador, submetidos à análise de variância pelo PROC MIXED, utilizando um modelo que incluiu os efeitos fixos de dieta, os efeitos aleatórios de animal e período, e o nível de consumo e de excreção fecal como covariável.

d) Avaliação de intervalos de amostragem de fezes sobre a concentração do dióxido de titânio;

Os valores de concentração fecal do marcador externo nas amostras coletadas em diferentes horários do dia foram submetidos à análise de variância pelo PROC MIXED, utilizando um modelo que incluiu os efeitos fixos de dieta, os efeitos aleatórios de animal e período, e o efeito de horário de amostragem como medidas repetidas.

e) Avaliação da precisão e exatidão das estimativas de excreção fecal utilizando ambos marcadores externos

A excreção fecal de MS foi estimada com base na média de concentração fecal do marcador nas amostras de fezes coletadas da quantidade total excretada nos últimos 6 dias do primeiro e terceiro período experimental. Estes valores estimados foram comparados com os valores médios observados também nestes 6 dias, através de regressão linear simples. Foi utilizado teste t de Student para verificar se a intercepta foi diferente de zero e se o coeficiente de regressão foi diferente de 1.

Adicionalmente, foi simulado a eficácia de diferentes protocolos de amostragem sobre a estimativa da excreção fecal usando os marcadores externos. Para tal, foram feitas estimativas de excreção fecal utilizando amostras compostas a intervalos de 2 (12 sub-amostras), 4 (6 sub-amostras), 8 (3 sub-amostras) ou 12 horas (2 sub-amostras), as quais foram comparadas com os valores médios observados nos últimos 6 dias do primeiro e terceiro período experimental, utilizando o mesmo procedimento estatístico descrito acima.

f) Avaliação da precisão e exatidão das estimativas de digestibilidade utilizando os marcadores internos

A digestibilidade foi calculada com base na média de concentração do marcador no alimento e nas fezes, como média dos últimos 6 dias do primeiro e terceiro período experimental, por meio da seguinte equação: $DMO = 1 - \left(\frac{\{MSi \text{ ou } FDNi \text{ alimento (g/kg de MO)}\}}{\{MSi \text{ ou } FDNi \text{ fezes (g/kg MO)}\}} \right)$. Os valores de digestibilidade estimados e observados foram comparados por meio de regressão linear conforme descrito anteriormente.

g) Avaliação do nitrogênio fecal como marcador para estimar consumo.

Os valores individuais de consumo de MO (g/dia) e excreção fecal de N (g/dia), como médias dos últimos 6 dias do primeiro e terceiro período experimental, foram relacionados por regressão linear utilizando um modelo misto que incluiu tipo de dieta como efeito fixo.

6 RESULTADOS

6.1 Número de dias para estabilização da excreção fecal dos marcadores externos

Na Figura 1 é demonstrado os números de dias necessários para os marcadores externos dióxido de titânio (TiO_2) e óxido de cromo (Cr_2O_3) atingirem o “steady - state”, ou seja, o tempo para cada marcador atingir a concentração fecal constante. Estes resultados foram observados nos períodos 1 e 3 em que os animais receberam os marcadores por via oral. Foi observado que para o TiO_2 a eliminação fecal do mesmo tornou-se constante em 9 dias após primeira administração aos animais ($P < 0,05$). Para o Cr_2O_3 o equilíbrio de excreção fecal do marcador foi com 10 dias após primeira dosagem.

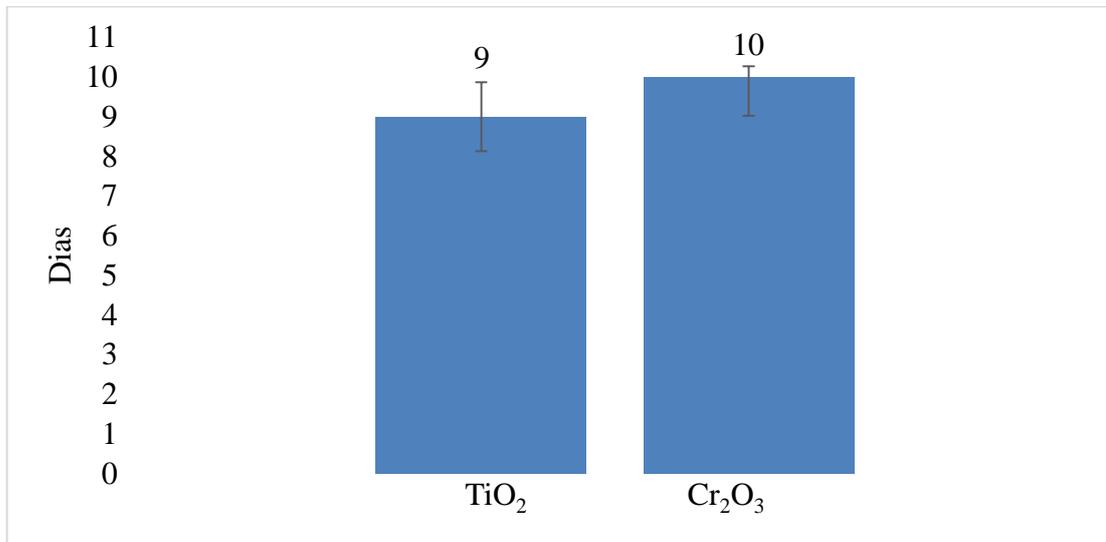


Figura 1. Tempo (dias) necessário para os marcadores externos TiO_2 e Cr_2O_3 atingirem concentração fecal constante em ovinos ingerindo feno de tifton 85 e pastagem natural.

6.2 Número de dias necessários para o completo desaparecimento dos marcadores externos

Nas Figuras 2 e 3 são demonstrados os dias de excreção fecal dos marcadores TiO_2 e Cr_2O_3 ao longo de 10 dias após a última administração. Foi observado que a excreção fecal (concentração fecal) o marcador TiO_2 é muito variável com o passar dos dias e não possui eliminação fecal total em 10 dias. Já para o Cr_2O_3 a concentração fecal do marcador decresce com o passar dos dias, tendo concentração fecal muito próximas de 0 em 10 dias sem dosificação com Cr_2O_3 .

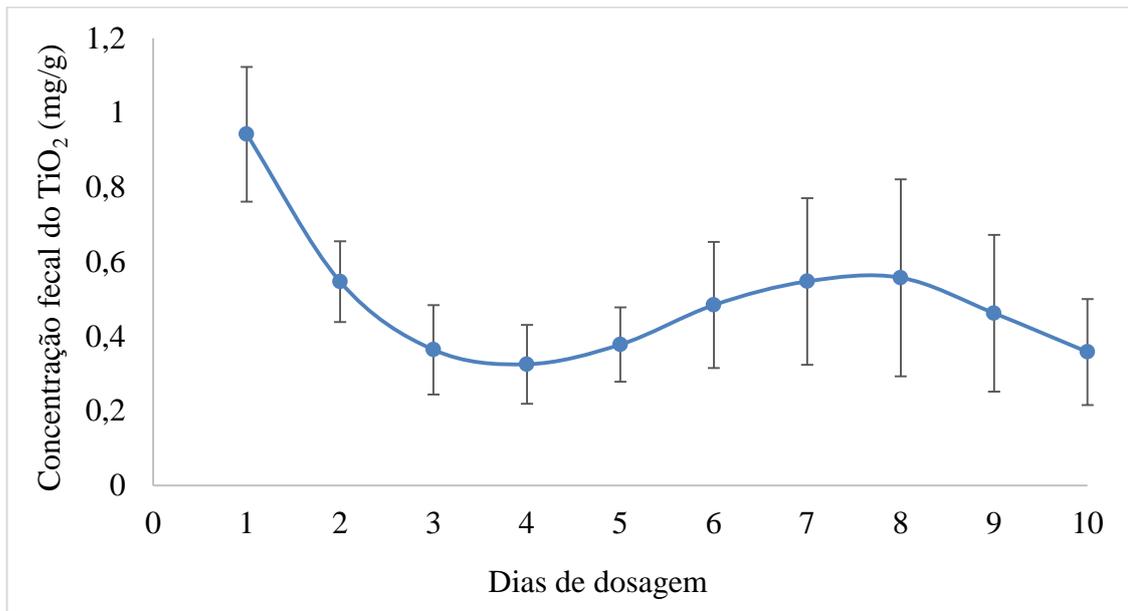


Figura 2. Concentração fecal do marcador externo TiO_2 ao longo de 10 dias após última dose em ovinos ingerindo feno de tifton 85 e pastagem natural.

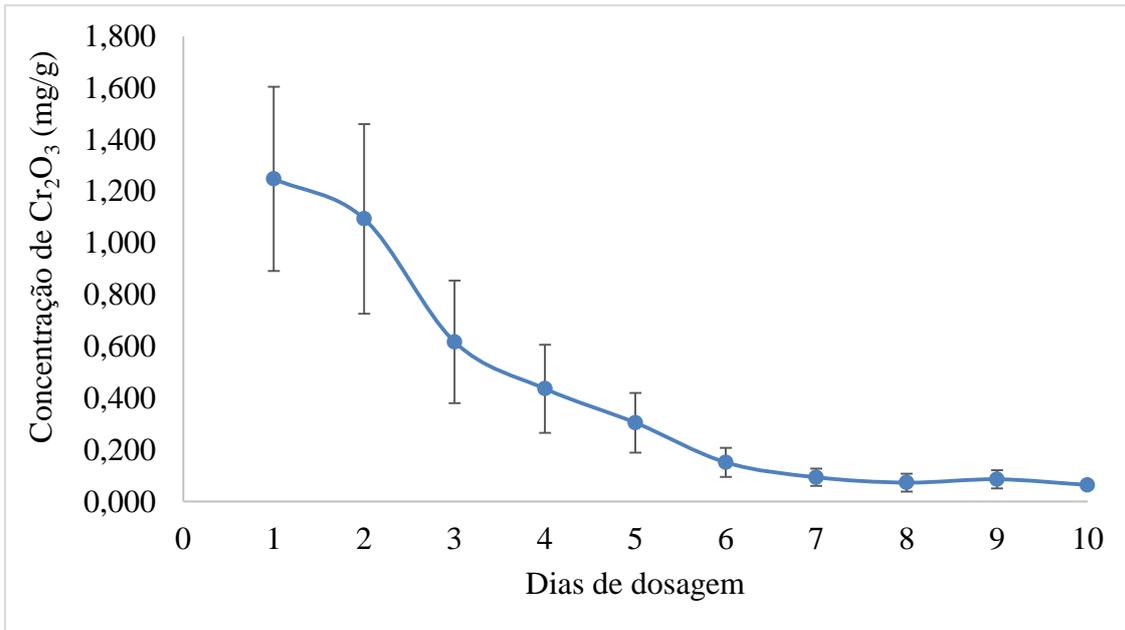


Figura 3. Concentração fecal do marcador externo Cr₂O₃ ao longo de 10 dias após última dose em ovinos ingerindo pastagem natural.

6.3 Recuperação fecal dos marcadores externos

6.3.1 Ensaio 1 – feno de tifton

Na Figura 4, é demonstrada a relação entre recuperação fecal (%) do marcador externo (TiO₂) e marcadores internos (MSi e FDNi) com respectivos desvios padrões das médias durante o primeiro ensaio conduzido com animais alimentados com feno e tifton. Foi observado que para os marcadores internos a recuperações foi maior que para o TiO₂ (58%), tendo recuperação de 100% para MSi e 91% para FDNi com desvio padrão de ±8,25; ±7,25 e ±8 respectivamente.

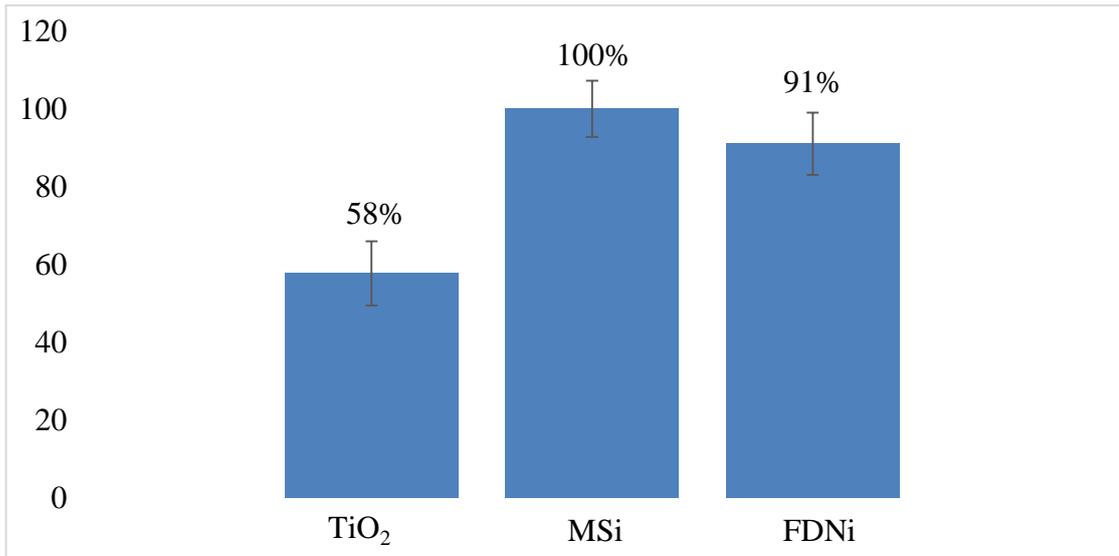


Figura 4. Recuperação fecal (%) do marcador externo dióxido de titânio (TiO₂) e marcadores internos matéria seca indigestível (MSi) e fibra em detergente indigestível (FDNi) e respectivos desvios padrões em ovinos ingerindo feno de tifton 85.

6.3.2 Ensaio 2 – Pastagem natural

Na Figura 5, também foi avaliada a recuperação fecal (%) dos marcadores, porém além do marcador externo TiO₂ foi avaliado o Cr₂O₃ durante o segundo ensaio, onde os animais foram alimentados com pastagem natural. Foram observadas recuperações de 72% para TiO₂, 84% Cr₂O₃, 92% MSi e 71% para o marcador FDNi com desvio padrão de ±11,5; ±17,5; ±14,5 e ±13,7 respectivamente.

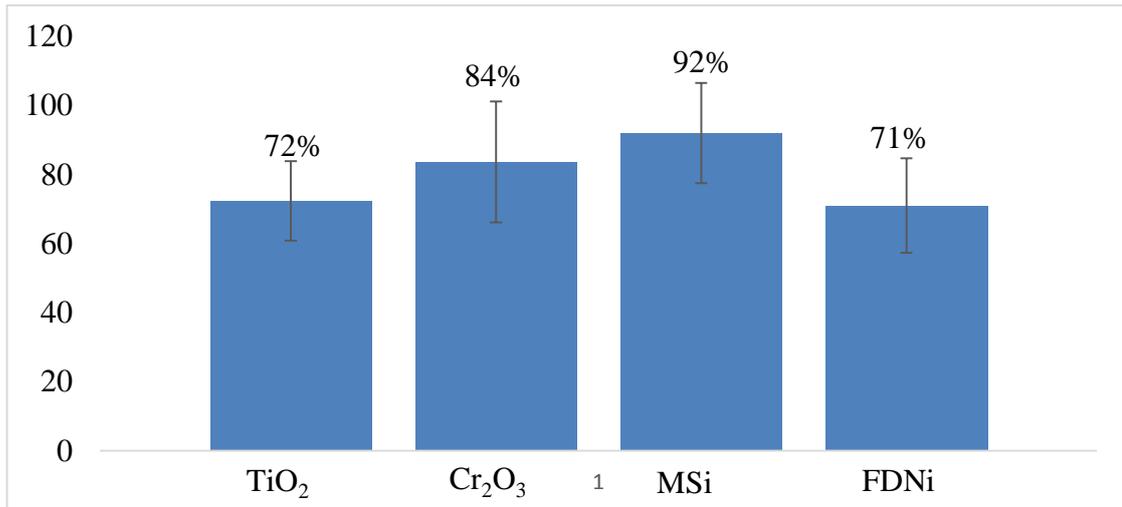


Figura 5. Recuperação fecal (%) dos marcadores externos dióxido de titânio (TiO₂) e óxido de cromo (Cr₂O₃) e marcadores internos matéria seca indigestível (MSi) e fibra em detergente indigestível (FDNi) e respectivos desvios padrões em ovinos ingerindo pastagem natural.

6.4 Relação entre excreção fecal estimada e observada em diferentes horas de amostragens de fezes

Nas Tabelas 2 e 3 são demonstrados os valores de excreção fecal estimados pelo marcador dióxido de titânio em diferentes horas de amostragens de fezes, relacionados com a excreção fecal observada por meio da coleta total de fezes em ambos os ensaios de digestibilidade *in vivo*. Além disso, para todos os horários foi feita uma correção para a recuperação fecal.

Para o marcador TiO₂ verificou-se que a produção fecal observada foi estatisticamente igual a produção fecal estimada (com correção) para todos os intervalos de amostragem ($P > 0,05$) tanto quando utilizado o feno de tifton 85 ou pastagem natural como dieta, independente do protocolo de amostragem e dos ensaios. No entanto, para as horas de amostragem sem correção para a recuperação fecal, os valores observados foram estatisticamente diferentes dos estimados pelo marcador TiO₂ ($P < 0,05$), mostrando que é de fundamental importância que seja feita esta correção quando realizado estudos com marcadores externos.

Tabela 2. Produção fecal estimada e observada (g MS fecal/dia) pelo dióxido de titânio (TiO₂) em diferentes tempos de amostragens de fezes e com ou sem correção para a recuperação fecal em ovinos ingerindo feno de tifton 85.

sem correção - TiO ₂				
Amostragem de fezes	PF observada (g MS fecal/dia) ¹	PF estimada (g MS fecal/dia) ²	EPM ³	P ⁴
2 em 2 horas	289	485	0.20	0.003
				<.000
4 em 4 horas	289	505	0.26	1
				<.000
8 em 8 horas	289	503	0.31	1
12 em 12 horas	289	429	0.50	0,019
com correção - TiO ₂				
2 em 2 horas	289	296	0.18	0,831
4 em 4 horas	289	293	0.23	0,896
8 em 8 horas	289	297	0.32	0,807
12 em 12 horas	289	262	0.38	0,412

¹Produção fecal observada (g MS fecal/dia)

²Produção fecal estimada (g MS fecal/dia)

³Erro Padrão da Média

⁴Probabilidade

Tabela 3. Produção fecal estimada e observada (g MS fecal/dia) pelo dióxido de titânio (TiO₂) em diferentes tempos de amostragens de fezes e com ou sem correção para a recuperação fecal em ovinos ingerindo pastagem natural.

sem correção - TiO ₂				
Amostragem de fezes	PF observada (g MS fecal/dia) ¹	PF estimada (g MS fecal/dia) ²	EPM ³	P ⁴
2 em 2 horas	279	406	0.19	0,01
				3
				0,02
4 em 4 horas	279	408	0.21	0
				0,03
8 em 8 horas	279	398	0.17	0
				0,02
12 em 12 horas	279	405	0.28	1
com correção - TiO ₂				
2 em 2 horas	279	303	0.22	0,46
				9
				0,32
4 em 4 horas	279	248	0.24	0
				0,72
8 em 8 horas	279	291	0.21	2
				0,63
12 em 12 horas	279	295	0.30	7

¹Produção fecal observada (g MS fecal/dia)

²Produção fecal estimada (g MS fecal/dia)

³Erro Padrão da Média

⁴Probabilidade

6.5 Matéria seca indigestível e Fibra em detergente neutro indigestível

Para o marcador interno matéria seca indigestível (MSi) no ensaio com feno de tifton foi obtido recuperação do marcador de 100%, mostrando que pode ser utilizado em ensaios para estimar digestibilidade da matéria orgânica (DMO). Nas figuras 22 e 23 foram comparadas a DMO observada e MSi estimada pelo marcador MSi nos dois ensaios, feno de tifton e pastagem natural. Foram observados coeficiente de determinação de 55% e 35% respectivamente. Já com pastagem natural a recuperação do MSi foi de 92%. Da mesma forma, quando utilizada a FDNi como marcador interno, foram obtidas recuperações de 91% para o ensaio com feno de tifton e 71% para o ensaio com pastagem natural. Nas figuras 24 e 25 foi comparada a DMO observada e FDNi estimada pelo marcador FDNi. O coeficiente de determinação para o ensaio com feno de tifton foi de 63% e quando utilizada a pastagem natural 53%. No entanto, estes resultados mostraram-se variáveis entre períodos, porém com médias de recuperações entre experimentos muito altas, o que é desejável quando trabalha-se com este tipo de avaliação.

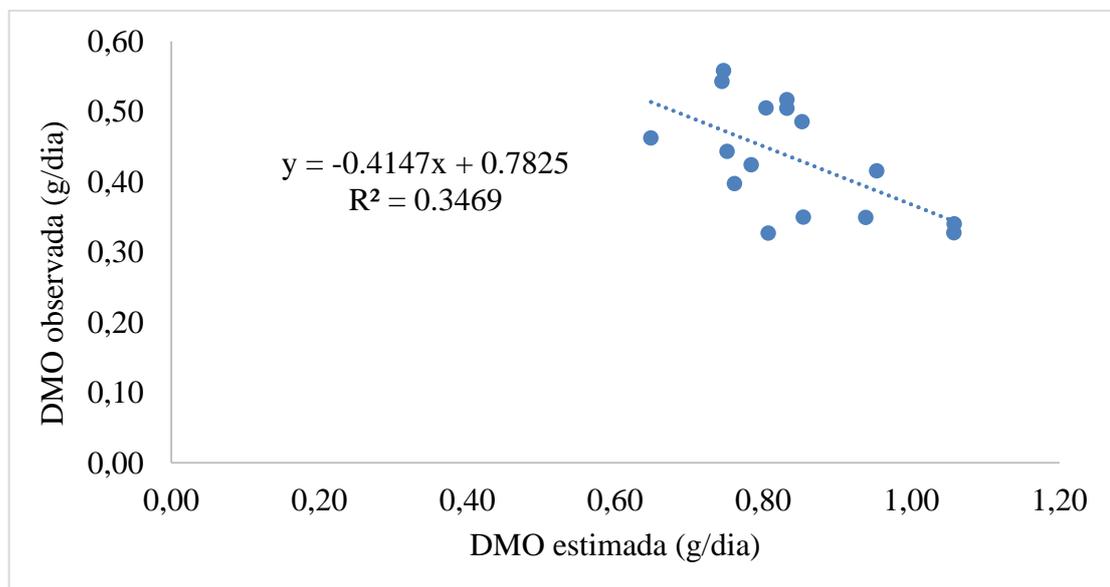


Figura 6. Relação entre a DMO observada e DMO estimada pela MSi como marcador interno quando incubado *in situ* o feno de tifton 85 como fonte de forragem.

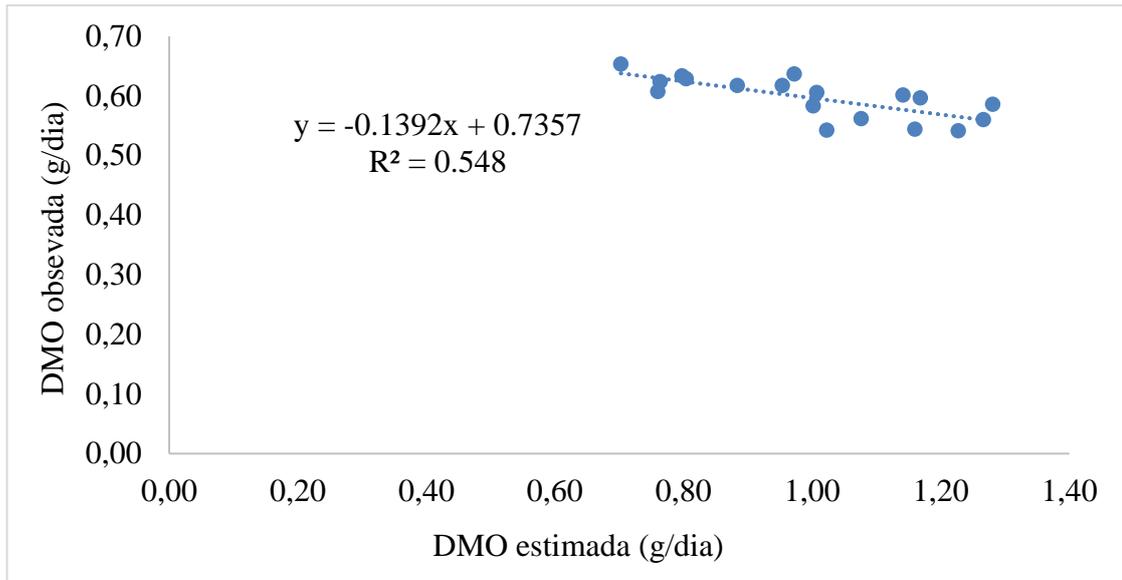


Figura 7. Relação entre a DMO observada e DMO estimada pela MSi como marcador interno quando incubado *in situ* a pastagem natural como fonte de forragem.

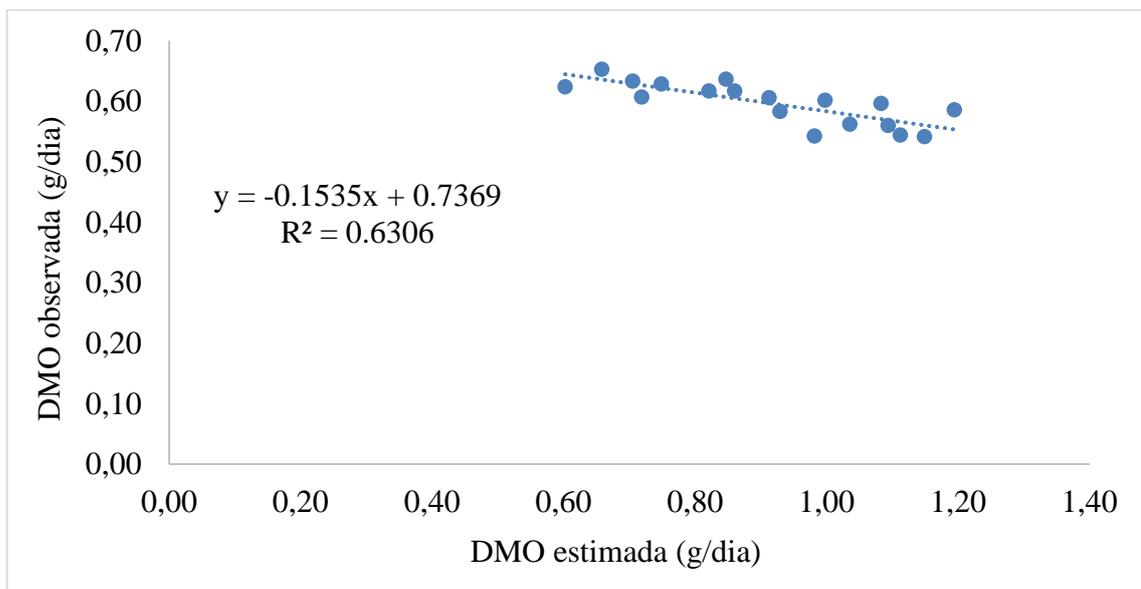


Figura 8. Relação entre a DMO observada e DMO estimada pela FDNi como marcador interno quando incubado *in situ* o feno de tifton 85 como fonte de forragem.

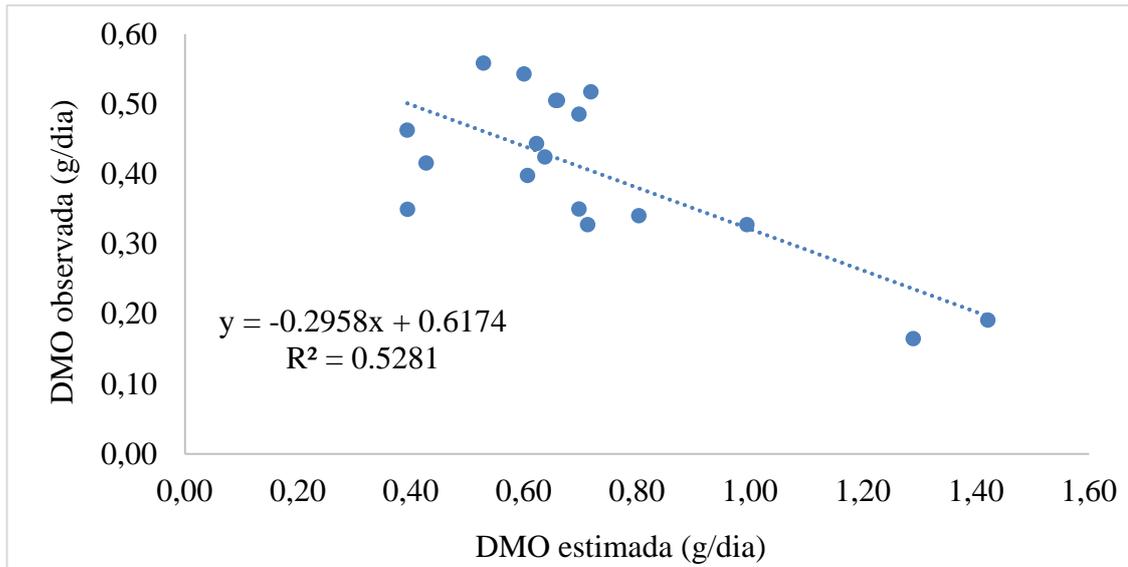


Figura 9. Relação entre a DMO observada e DMO estimada pela FDNi como marcador interno quando incubado *in situ* a pastagem natural como fonte de forragem.

6.6 Índice fecais

Na utilização do Nitrogênio Fecal (NF) como marcador quando utilizado o feno de tifton 85 foi estimado o Consumo de Matéria Orgânica (CMO) a partir do NF, onde foi observada uma relação entre CMO observado (g/dia) e NF estimado (g/dia), tendo um coeficiente de determinação de 74%

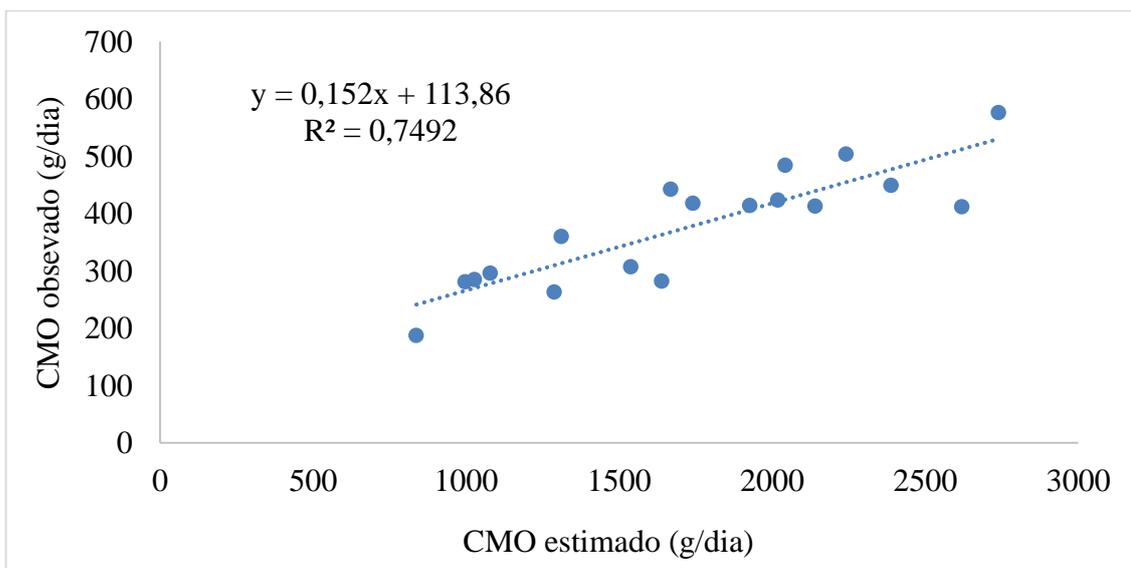


Figura 10. Relação entre a CMO observada e CMO estimado pelo N fecal a partir de amostras fecais de ovinos ingerindo com feno de tifton.

Para estimativa do CMO a partir do NF quando utilizada pastagem natural foi observada uma relação do CMO observado (g/dia) e NF estimado (g/dia), tendo como coeficiente de determinação de 57%.

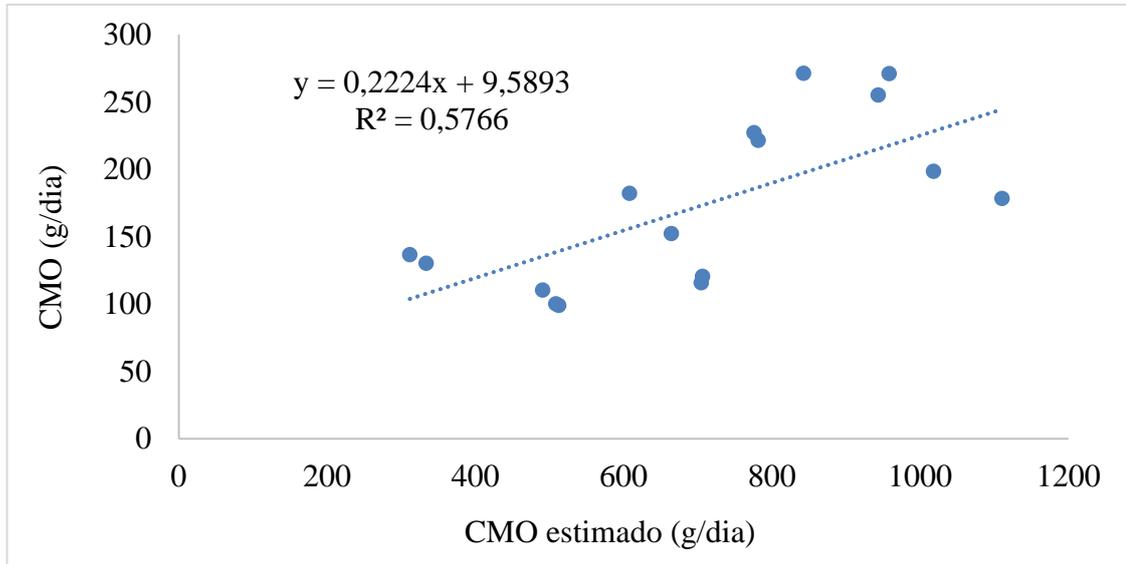


Figura 11. Relação entre a CMO observada e CMO estimado pelo N fecal a partir de amostras fecais de ovinos ingerindo com pastagem natural.

7 DISCUSSÃO

O protocolo de dosagem de marcadores externos é de grande importância e pode influenciar diretamente nos resultados esperados. Dessa forma, Penning (2004) compilou dados de literatura e concluiu que o período recomendado de dosagem dos marcadores, em geral, e do óxido de cromo em particular, é de 12 dias, compreendendo um período preliminar de 7 dias e coletas de fezes nos últimos 5 dias, num regime de dosagem de duas vezes ao dia em intervalos de aproximadamente 8 e 16 horas. Ao contrário dos resultados demonstrados por Penning (2004), neste presente estudo foram observados que para os marcadores dióxido de titânio e óxido de cromo, estes podem ser administrados 9 e 10 dias respectivamente, para que então seja iniciada a coleta de fezes após pelo menos 10 dias de prévia administração. Este resultado se deve provavelmente pela diferença de protocolo de dosagem ser apenas uma vez ao dia e apenas 0,5g de cada marcador por animal para este estudo. Pelo fornecimento de uma menor quantidade dos marcadores e menos vezes ao longo do dia (para evitar o estresse com dosagem) permite com que a estabilização da concentração fecal desses marcadores demorem mais tempo para tornarem-se constante nas fezes dos animais. No entanto, é necessário que sejam realizados mais estudos utilizando estas forragens e estes marcadores para gerar mais dados e conseqüentemente resultados relevantes que possam ser comparados.

A recuperação fecal incompleta de inúmeros marcadores utilizados para estimativas de excreção fecal, ainda é uma característica a ser estudada, como já citada por (MIR et al., 1989; SOARES et al., 2004; SAMPAIO et al., 2011). Esta incompleta recuperação fecal obtida nos trabalhos realizados ao longo dos dois ensaios experimentais, com feno de 85 e pastagem natural, pode ser explicada pela dieta fornecida aos animais. Como já mencionado por Sampaio et al. (2011) as recuperações fecais obtidas são muito próximas à 100%, percentagem esperada quando trabalhado com marcadores. No entanto este autor utilizou dietas distintas as do presente estudo sendo, silagem de capim-elefante, silagem de milho ou feno de capim-braquiária, obtendo recuperações de 99.50%, 101.95%, 99.02%, 98.87% para dióxido de titânio (TiO_2), óxido de cromo (Cr_2O_3), matéria seca indigestível (MSi) e fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), respectivamente. Já neste estudo, foi fornecido feno de tifton 85 e pastagem natural como dietas, obtendo recuperações fecais mais baixas, sendo de 58% (TiO_2), 100% (MSi) e 91% (FDNi) para o ensaio com feno de tifton; e 72% (TiO_2), 84%

(Cr₂O₃), 92% (MSi) e 71% (FDNi) para o ensaio com pastagem natural como fonte de forragem.

Estas menores recuperações fecais podem ser explicadas pelo tipo de dieta utilizada em cada experimento, podendo fazer com que a característica de cada forragem possa afetar na recuperação fecal de cada marcador. Outro fator importante para que sejam obtidas recuperações fecais esperadas, é a utilização ou não de concentrado junto à dieta ofertada. Neste presente estudo em nenhum dos ensaios foi utilizado concentrado, e se comparado a estudos que incorporam concentrado às forragens, desenvolvidos por Sampaio et al. (2011), avaliando as três forragens citadas acima com ou sem adição de 20% de concentrado, demonstraram que a recuperação fecal de todos marcadores estudados foram menores quando não adicionado o concentrado junto à forragem.

A irregularidade na concentração de marcadores ao longo do dia (MORENZ et al., 2006; KOZLOSKI et al., 2006), também é uma preocupação em obter resultados precisos com marcadores, visto que são necessárias mais de uma amostragem de fezes ao longo de um dia ou durante vários, para favorecer a diminuição dos erros associados à flutuação diária da excreção. A coleta em horários alternados, de forma a obter-se uma amostra composta contendo sub-amostras a cada 3 ou 4 horas de um ciclo de 24 horas já compilado por (KOZLOSKI et al., 2006). A partir disso, nos resultados obtidos neste estudo, é observado que quando realizadas amostragens de fezes com menor intervalo de tempo os dados são mais próximos da coleta total real. Dessa forma, é visto que o protocolo de amostragens, assim como de dosagens, é um dos principais pontos a serem pensados antes de ser iniciado ensaios com marcadores externos.

A MSi e FDNi por sua vez, têm sido mais frequentemente testados e utilizados. A precisão e exatidão das estimativas de digestibilidade da matéria orgânica utilizando estes marcadores tem sido variável assim como estudos já realizados por Berchielli et al., (2005) e Rodrigues et al., (2006). Isto ocorre porque estas frações não constituem unidades químicas uniformes e constantes em todos os alimentos, e tampouco há um método padrão definido para sua determinação (LIPPKE, 2002). No entanto, estes problemas não inviabilizam o uso destes indicadores, desde que em cada experimento individual, independentemente da técnica de determinação utilizado.

Com relação ao marcador nitrogênio fecal, houve alta correlação Stallcup et al., (1975) observaram alta correlação (R=0,93) entre excreção fecal de nitrogênio e consumo de matéria orgânica. Da mesma forma, Hutchinson (1958) observou altas correlações (0,9) entre excreção total de N e consumo de matéria seca em ovinos. Porém, salienta o fato de que a

exatidão das estimativas diminui a muito altos (45g/dia) ou muito baixos (8g/dia) consumos de N. Consumos acima de 45g/dia aumentam a proporção de N nas fezes pela baixa oportunidade de digestão ou absorção. Já quando os ovinos consomem abaixo de 8 g/dia de N, há uma diminuição no metabolismo o que faz com que diminua a secreção metabólica de N e desta forma a participação do N endógeno nas fezes.

8 CONCLUSÃO

Os marcadores externos TiO_2 e Cr_2O_3 não apresentaram recuperação total e a concentração fecal de ambos apresentaram alta variabilidade ao longo do dia e em diferentes dias. Dessa forma, a estimativa da excreção fecal em ovinos alimentados com feno de tifton 85 ou pastagem natural, utilizando esses marcadores externos, necessita pelo menos 10 dias de fornecimento prévio e faz-se necessário um protocolo de amostragem que reduza ao mínimo a variabilidade de excreção. No entanto, a MSi é um marcador adequado para estimar a digestibilidade da forragem ingerida. Da mesma maneira, em animais que é feita coleta total de fezes, a excreção de N fecal é um indicador adequado para estimar consumo de MO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDEN, W. G.; WHITTAKER, A. McD. The determinants of herbage intake by grazing sheep: The interrelationship of factors influencing herbage intake and availability. *Aust. J. Agric. Res.*, v. 21, p. 755-66. 1970.

AOAC. Official methods of analysis Washington: **Association of Official Analytical Chemists**, 1995.1094 p.

AROEIRA, L. J. M. Estimativas de consumo de gramíneas tropicais. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE DIGESTIBILIDADE EM RUMINANTES, 1997, Lavras Anais... Lavras: UFLA-FAEPE,1997. p. 127-163.

ASTIGARRAGA, L. Técnicas para la medición del consumo de rumiantes en pastoreo. In: Simpósio sobre avaliação de pastagens com animais, 1997, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 1997. p. 1-23.

BERCHIELLI, T. T.; ANDRADE, P.; FURLAN, C. L. Avaliação de indicadores internos em ensaios de digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 29, n. 3, p. 830-833, 2005.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, V. A.; OLIVEIRA, S. G. Principais Técnicas de avaliação aplicadas em estudo de nutrição. **Nutrição de Ruminantes**, Jaboticabal: Funesp, 2000. p. 397-442.

BERCHIELLI, T. T.; VEJA, A. G.; REIS, R. A. Técnicas de avaliação de consumo em ruminantes: Estado da arte. In: RENNÓ, F. P.; SILVA, L. F. P. (Eds.) **Simpósio Internacional Avanços em Técnicas de Pesquisa em Nutrição de Ruminantes**, Anais... Pirassununga, 2007. p. 305-341.

CANDIDO, M. J. D.; ALEXANDRINO, E.; GOMIDE, C. A. D. et al. Período de descanso, valor nutritivo e desempenho animal em pastagens de *Panicum maximum* cv. Mombaça sob lotação intermitente. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 5, p. 1459-1467, 2005.

CARVALHO, P. C. et al. Avanços metodológicos na determinação do consumo de ruminantes em pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 1, p. 151-170, Jan., 2007.

COCHRAN, R. C.; ADAMS, D. C.; WALLACE, J. D.; GALYEAN, M. L. Predicting digestibility of different diets with internal markers: evaluation of four potential markers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 63, n. 5, p. 1476-1483, 1986.

DETMANN, E.; SOUZA, R.; GARCIA, S. C. et al. Avaliação do vício de “tempo longo” de indicadores internos em ensaio de digestão com ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 182-188, 2007.

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

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

GONTIJO NETO, M. M.; BATISTA EUCLIDES, V. P.; DO NASCIMENTO, D. et al. Consumo e tempo de pastejo por novilhos Nelore em pastagem de capim-tanzânia sob diferentes ofertas de forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 60-66, 2006.

HOLECHEK, J. L.; VAVRA, M. Forage intake by cattle on forest and grassland ranges. **Journal of Range Management**, Denver, v. 35, n. 6, p. 737-741, 1982.

HUTCHINSON, B. J: Factors governing faecal nitrogen wastage in sheep. **Australian Journal of Agricultural Research** 9,508-520, 1958.

KOMAREK, A. R. A filter bag procedure for improved efficiency of fiber analysis. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 76, (Suppl.1) p. 250, 1993.

KOZLOSKI, G. V. et al. Potencial nutricional assessment of dwarf elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Mott) by chemical composition, digestion and net portal flux of oxygen in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v. 104, p. 29-40, 2003.

KOZLOSKI, G. V. et al. Intake and digestion by lambs of dwarf elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum, cv. Mott) hay or hay supplemented with urea and different levels of cracked corn grain. **Animal Feed Science and Technology**. Amsterdam, v. 125, n. 1, p. 111-122, Jan., 2006.

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

LANCASTER, R. J. Estimation of digestibility of grazed pasture from faeces nitrogen. **Nature**, v. 163, n. 4139, p. 330-331, Feb, 1949.

LIPPKE, H. Estimation of forage intake by ruminants on pasture. **Crop Science**, v. 42, p. 869-872, 2002.

LOPES, F. C. F. Determinação do consumo de forrageiras tropicais por vacas em lactação em condição de pastejo. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 1-116, 2007.

LUKAS, M.; S € UDEKUM, K. H.; RAVE, G.; FRIEDEL, K.; SUSENBETH, A: Relationship between faecal crude protein concentration and diet organic matter digestibility in cattle. **Journal of Animal Science** 83, 1332-1344, 2005.

MARCONDES, M. I. VALADARES FILHO et al.. NASCIMENTO, F. B et al. Estimativa do consumo de matéria seca de animais alimentados em grupo e desempenho, consumo de matéria seca e conversão alimentar de animais nelore de três classes sexuais alimentados individualmente ou em grupo. In: Congresso brasileiro de zootecnia, 2006, **Anais...** Recife: Associação Brasileira de Zootecnistas, 2006.

MARCONDES, M. I.; VALADARES FILHO, S. C.; BRITO. A. F. et al. Indicadores para estimar a produção de matéria seca fecal e avaliar o consumo individual de concentrado e volumoso em novilhas. In: **Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia**, 2006, **Anais...** João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2006.

McMENNIMAN, N. P. Methods of estimating intake of grazing animals. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34., 1997, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1997. p. 133-168.

MÉLIX, C.; PEYRAUD, J. L. Utilisation de l'oxyde de chrome chez les vaches laitières pour la prévision des quantités de fèces émises. 2. Comparaison des méthodes de prélèvement de fèces par voie rectale et par collecte globale (en stalle à digestibilité et sur le champ). **Reproduction Nutrition Development**, v. 27(1B), p. 217-218, 1987.

MERCHEN, N. R. Digestion, absorption and excretion in ruminantes In: CHURCH, D. C. (Ed.) **The ruminant animal digestive physiology and nutrition**. 4. ed. Carvallis: O&B Books. 1993. p. 172-201.

MOORE, J. E.; SOLLENBERGER, L. E. Techniques to predict pasture intake. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL EM PASTEJO, 1997, Viçosa, **Anais**. Viçosa: UFV, 1997, p. 81-96.

MORENZ, M. J. F.; DA SILVA, J. F. C.; AROEIRA, L. J. M. et al. Óxido de cromo e alcanos na estimativa do consumo de forragem de vacas em lactação em condições de pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1535-1542, 2006.

MYERS, W. D.; LUDDEN, P. A.; NAYIGIHUGU, V. et al. Excretion patterns of titanium dioxide and chromic oxide in duodenal digesta and feces of ewes. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 135-141, 2006.

NUNEZ-HERNANDEZ, G. et al. Evaluation of fecal indicators for assessing energy and nitrogen status of cattle and goats. **Journal of Range Manage**, Colorado: v. 45, n. 1, p. 143-147, Mar., 1992.

OHMORI, H. et al. An improved dry ash procedure for the detection of titanium dioxide in cattle feces. **Animal science journal**. Japan. v. 84, p. 726-731, Nov., 2013.

OLIVEIRA Jr., R. C.; PIRES, A. V.; RESENDE, J. J. et al. avaliação de indicadores para estimar a digestibilidade dos nutrientes em novilhos Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 3, p. 749-758, 2004.

OWENS, F.; HANSON, C. F. 1992. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. **J. Dairy Sci.** 75, 2605-2617.

PALIERAQUI, J. G. B.; FONTES, C. A. A.; RIBEIRO, E. G. et al. Influência da irrigação sobre a disponibilidade, a composição química, a digestibilidade e o consumo dos capins mombaça e napier. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2381-2387, 2006.

PEDREIRA, C. G. S. Avanços metodológicos na avaliação de pastagens. In: Reunião anual da sociedade de zootecnia, 39, 2002, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Zootecnia CD-ROM.

PENNING, P. D.; JONHSON, R. H. The use of internal markers to estimate herbage digestibility and intake. 2. Indigestible acid detergent fibre. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 100, n. 1, p. 133-138, 1983.

PENNING, P. D.; RUTTER, S. M. Ingestive behaviour. In: PENNING, P. D. (Ed.). Herbage Intake Handbook. 2ed. Reading: **The British Grassland Society**, 2004. p. 151-175.

PERIPOLLI, V.; PRATES, E. R.; BARCELLOS, J. O. J.; NETO, J. B. Faecal nitrogen to estimate intake and digestibility in grazing ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, 163, 170-173, 2011.

POND, K. R.; ELLIS, W. C.; MATIS, J. H.; DESWYSEN, A. G. 1989. Passage of chromium- mordanted and rare earth-labeled fiber: time dosing kinetics. **J. Anim. Sci.**, 67:1020-1028.

POND, W. G.; CHURCH, D. C.; POND, K. R. **Animal nutrition and feeding**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1995. 615 p.

QUIROZ, R. A.; POND, K. R.; TOLLEY, E. A. et al. 1988. Selection among nonlinear models for rate of passage studies in ruminants. **J. Anim. Sci.**, 66: 2977-2986.

RODRIGUEZ, N. M.; SALIBA, E. O. S.; GUIMARAES Jr., R. Uso de indicadores para estimativa de consumo a pasto e digestibilidade. In: Reunião anual da sociedade brasileira de zootenia. 2006, **Anais de Simpósios...** João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2006.

SAMPAIO, C. B.; DETMANN, E.; VALENTE, T. N. P. et al. Evaluation of fecal recovering and long term bias of internal and external markers in a digestion assay with cattle. In: **Revista brasileira de zootenia**. v. 40; p. 174-182, 2011.

SAS Statistical Analysis Systems User's Guide. Version 6. Cary, NC: **SAS institute**, 2001. 1042 p.

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.

SMITH, A. M. and REID, J. T. Use of chromic oxide as an indicator of fecal output for the purpose of determining the intake of a pasture herbage by grazing cows. **J Dairy Sci**, 38: 515-524. 1955.

SOARES, J. P. G.; BERCHIELLI, T. T.; AROEIRA, L. J. M. et al. Estimativas de consumo de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum), fornecido picado para vacas lactantes utilizando a técnica do óxido de cromo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 3, p. 811-820, 2004.

SOEST, P. J. van. Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by ruminants: voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 24, n. 3, p. 834-843, 1965.

STALLCUP, O. T.; DAVIS, G. V.; SHIELDS, L. Influence of Dry Matter and Nitrogen Intakes on Fecal Nitrogen Losses in Cattle. **Journal of Dairy Science**, Illinois, v. 58, n. 9, p. 1301-1309, Sept, 1975.

SUDEKUM, K.-H.; ZIGGERS, W.; ROOS, N.; SICK, H.; TAMMINGA, S.; STANGASSINGER, M. 1995. **Estimating the passage of digesta in steers and wethers using the ratio of ^{13}C to ^{12}C and titanium 12-(IV)-oxide.** *Isotopes Environ. Health Stud.* 31, 219-227.

TITGEMAYER, E. C.; ARMENDARIZ, C. K.; BINDEL, D. J. et al. Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 1059-1063, 2001.