

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

**AVALIAÇÃO DE INDICADORES DE ADAPTAÇÃO À
MUDANÇAS DIETÉTICAS EM RUMINANTES**

TESE DE DOUTORADO

Roberta Farenzena

Santa Maria, RS, Brasil

2013

AVALIAÇÃO DE INDICADORES DE ADAPTAÇÃO À MUDANÇAS DIETÉTICAS EM RUMINANTES

Roberta Farenzena

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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
Doutor em Zootecnia

Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski

Santa Maria, RS, Brasil

2013

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

Farenzena, Roberta
AVALIAÇÃO DE INDICADORES DE ADAPTAÇÃO À MUDANÇAS
DIETÉTICAS EM RUMINANTES / Roberta Farenzena.-2014.
77 p.; 30cm

Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, RS, 2014

1. Consumo 2. Concentrado 3. Digestibilidade 4. Feno
5. Fermentação ruminal I. Kozloski, Gilberto Vilmar II.
Título.

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Tese de Doutorado

**AVALIAÇÃO DE INDICADORES DE ADAPTAÇÃO À MUDANÇAS
DIETÉTICAS EM RUMINANTES**

elaborada por
Roberta Farenzena

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Zootecnia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Gilberto Vilmar Kozloski, Dr. (Presidente/Orientador)

Eduardo Bohrer de Azevedo, Dr. (UNIPAMPA)

Henrique Mendonça Nunes Ribeiro Filho, Dr. (UDESC)

João Pedro Velho, Dr. (UFSC/CESNORS)

Marcio Nunes Corrêa, Dr. (UFPEL)

Santa Maria, 19 de dezembro de 2013.

Dedicatória

Aos meus pais, Nelson e Carmen, que proporcionaram-me, além de extenso carinho e amor, os conhecimentos da integridade, da perseverança e de procurar sempre em Deus à força maior para o meu desenvolvimento como ser humano.

A vocês dedico essa tese!

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esta tese foi utilizar apenas uma página para agradecer a todos que fizeram parte desta minha trajetória na UFSM:

À Universidade Federal de Santa Maria, pela minha formação;

Ao meu orientador Gilberto Kozloski, por me induzir a pensar criticamente. Obrigada pelas constantes demonstrações de sabedoria e humildade;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ), pela atuação na construção do meu conhecimento;

Aos meus colegas de pós-graduação, pela convivência e troca de experiências no decorrer das aulas;

A toda equipe, colegas de pós-graduação, estagiários e funcionários, do LabRumen pela amizade e pela fundamental participação e colaboração na elaboração deste trabalho durante todo o período do curso;

Aos animais que foram utilizados para que este estudo pudesse ser desenvolvido;

Aos professores, pesquisadores e alunos da UDELAR (Universidad De La República – Uruguay), que convivi durante o período de doutorado sanduíche, pela hospitalidade e exemplo de simplicidade e perseverança, tanto no que se refere a pesquisa científica, como também nas relações pessoais;

Agradeço ainda aos meus *amigos* que me incentivaram na concretização deste trabalho quando as coisas pareciam complicadas.

Agradeço, sobretudo, a Deus por poder citar todas estas pessoas neste momento tão importante. Obrigada por colocá-las tão caprichosamente em minha vida;

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES – Brasil. Agradeço esta instituição pelo apoio financeiro e interesse neste estudo.

A todos estes, meu MUITO OBRIGADA!

“- Utopia [...] ella está en el horizonte. Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos. Camino diez pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá. Por mucho que yo camine, nunca la alcanzaré. Para que sirve la utopía? Para eso sirve: para caminar”

Eduardo Galeano

De vez en cuando hay que hacer una pausa, contemplarse a sí mismo sin la fruición cotidiana, examinar el pasado rubro por rubro, etapa por etapa, baldosa por baldosa y no llorarse las mentiras sino cantarse las verdades.

Mario Benedetti

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DE INDICADORES DE ADAPTAÇÃO À MUDANÇAS DIETÉTICAS EM RUMINANTES

AUTORA: ROBERTA FARENZENA
ORIENTADOR: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI
Santa Maria, 19 de dezembro de 2013.

Foram conduzidos dois ensaios de digestibilidade *in vivo* com ovinos para avaliar o impacto da mudança de dieta sobre variáveis nutricionais, incluindo consumo voluntário, digestibilidade e fermentação ruminal, bem como estabelecer qual o tamanho de período de alimentação necessário para se obter valores reproduzíveis destas variáveis. O Ensaio 1 foi conduzido com 10 ovinos da raça Corriedale (34 ± 5 kg de peso corporal (PC)), mantidos em gaiolas de metabolismo, ao longo de três períodos de 21 dias, em um delineamento experimental inteiramente casualizado em um esquema de dupla reversão. Os animais foram divididos em dois grupos (Grupos A e B, $n=5$ por grupo), alimentados *ad libitum* com a seguinte sequência de dietas ao longo dos períodos: Grupo A: feno – feno+concentrado – feno; Grupo B: feno+concentrado – feno – feno+concentrado. O feno utilizado foi de *Cynodon sp.* e o concentrado composto por milho, farelo de soja e farelo de trigo, o qual foi incluído na dieta numa proporção de 50% (base matéria seca). O consumo, a excreção fecal e a digestibilidade da matéria orgânica, da fibra em detergente neutro e dos compostos nitrogenados, assim como a excreção urinária de N e alantoína, foram medidos diariamente ao longo dos períodos experimentais. No Ensaio 2 foram avaliados parâmetros da fermentação ruminal (i.e. pH, degradabilidade *in situ*, aderência bacteriana e atividade enzimática bacteriana no resíduo de incubação) e foi conduzido utilizando o mesmo desenho experimental do Ensaio 1, exceto que foram utilizados somente quatro ovinos da raça Santa Inês (65 ± 5 kg de PC, $n=2$ por grupo), implantados cirurgicamente com uma cânula ruminal, e incluiu um período adicional de avaliação (i.e. total de quatro períodos de 21 dias, em um esquema de tripla reversão). A maior parte das variáveis nutricionais avaliadas nesse estudo foram impactadas pela mudança da dieta, sendo que o tempo de adaptação à nova dieta variou de 6 a 13 dias, dependendo da variável e do tipo de dieta. Os resultados do presente estudo indicam que o período mínimo de adaptação em ensaios de digestibilidade *in vivo* deveria ser de 14 dias.

Palavras-chave: Consumo. Concentrado. Digestibilidade. Feno. Fermentação ruminal. Ovinos

ABSTRACT

Doctor's Thesis
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

EVALUATION OF ADAPTATION INDICATORS TO DIET CHANGING IN RUMINANTS

AUTHOR: ROBERTA FARENZENA
ADVISOR: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI
Santa Maria, december 19, 2013.

Two *in vivo* digestibility assays with sheep were conducted to evaluate the impact of diet changing on nutritional variables, including voluntary intake, digestibility and ruminal fermentation, as well as to establish the minimum length of feeding period as to obtain reproducible values of these variables. Assay 1 was conducted with 10 Polwarth wethers (34 ± 5 kg body weight (BW)), housed in metabolism cages, throughout three 21 d experimental periods, in a completely randomized 2-way crossover design. The animals were divided in two groups (Group A e B, n=5 per group) which were fed *ad libitum* with a sequence of the following diets throughout the experimental periods: Group A: hay – hay+concentrate – hay; Group B: hay+concentrate – hay – hay+concentrate. It was used a *Cynodon sp.* hay and a concentrate composited by grain corn, soybean meal and wheat meal, which was included in a proportion of 50% of total diet dry matter. The intake, fecal excretion and digestibility of the organic matter, neutral detergent fibre and N compounds, as well as the urinary excretion of N and allantoin were daily measured throughout the experiment. The Assay 2 was conducted to evaluate some parameters of ruminal fermentation (i.e. pH, *in situ* degradation, microbial adherence and microbial enzyme activity on residue of *in situ* incubation). It was used the same experimental design of Assay 1, excepting that it was conducted with four Santa Inês sheep (65 ± 5 kg de BW, n=2 per group), fitted with ruminal cannula, and included one additional 21 d experimental period (i.e total of four 21 d periods, as a 3-way crossover design). Most nutritional variables were impacted by diet changing, and the time of adaptation varied from 6 to 13 days, depending of the variable and diet type. The results of the present study indicate that the minimum adaptation period for *in vivo* digestibility assays should be of 14 d long.

Keywords: Intake. Concentrate. Digestibility. Hay. Ruminal fermentation. Sheep

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma do processo de extração de enzimas nas amostras de resíduo ruminal.	30
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química ¹ dos alimentos no ensaio 1	26
Tabela 2 – Composição química ¹ dos alimentos no ensaio 2	27
Tabela 3 - Consumo, digestibilidade e excreção fecal de matéria orgânica (CMO, DMO e EFMO) e fibra em detergente neutro (CFDN, DFDN e EFFDN) por ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação.	36
Tabela 4 - Consumo (CN), excreção fecal (EFN), retenção (RN), excreção urinária (EUN) de Nitrogênio e excreção de alantoína por ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação.	37
Tabela 5 - Degradação ruminal in situ de feno (Deg, %), aderência bacteriana ruminal (Ader, mg P/g MS), atividade enzimática bacteriana (A. E. P., nmol de glicose/mg proteína/minuto), atividade enzimática bacteriana (A. E. MS, nmol de glicose/g MS/minuto), pH antes da alimentação (pH _i) da manhã e pH após 4 horas de alimentação (pH _a) por ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação	39
Tabela 6 - Ponto de quebra (R, dias), número de observações (N), média (X) e probabilidade (P) de efeito das dietas dos dias de adaptação (R) sobre variáveis nutricionais ¹ em ovinos alimentados com feno ou feno+concentrado (F+C)	42

ANEXOS

Anexo A - Gráfico do consumo de matéria orgânica (ensaio 1).....	53
Anexo B - Gráfico da digestibilidade da matéria orgânica (ensaio 1).....	54
Anexo C - Gráfico da excreção fecal de matéria orgânica (ensaio 1)	56
Anexo D - Gráfico do consumo de fibra em detergente neutro (ensaio 1)	57
Anexo E - Gráficos da digestibilidade da fibra em detergente neutro (ensaio 1) ..	58
Anexo F - Gráfico da excreção fecal da fibra em detergente neutro (ensaio 1)	60
Anexo G - Gráfico do consumo de Nitrogênio (ensaio 1).....	61
Anexo H - Gráfico da excreção fecal de Nitrogênio (ensaio 1)	62
Anexo I - Gráfico da retenção de Nitrogênio (ensaio 1)	63
Anexo J - Gráfico da excreção urinária de N (ensaio 1).....	64
Anexo L - Gráfico da excreção urinária de alantoína (ensaio 1)	65
Anexo M - Gráfico da degradação ruminal da matéria parcialmente seca (ensaio 2).....	66
Anexo N - Gráfico da aderência bacteriana ruminal (ensaio 2).....	67
Anexo O - Gráficos da atividade enzimática bacteriana ruminal (ensaio 2)	68
Anexo P - Gráficos do pH ruminal (ensaio 2).....	70
Anexo Q - modelo de in put do SAS para a análise de Broken Line	72
Anexo R - modelo de out put do SAS para a análise de Broken Line	73
Anexo S - modelo de gráfico do SAS para a análise de Broken Line	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO.....	14
2.1 Fatores que afetam o consumo de alimentos por ruminantes	14
2.2 Impacto da adição de concentrado sobre o consumo, fermentação ruminal e digestibilidade	16
2.2.1 Impacto sobre o consumo de volumoso e consumo total	16
2.2.2 Impacto sobre o pH e ambiente ruminal	17
2.2.3 Impacto sobre a digestibilidade total e a digestibilidade da fibra	19
2.3 Período de adaptação em ensaios de digestibilidade in vivo	19
3 HIPÓTESE	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Local e época.....	23
4.2 Ensaio 1– Avaliação do Consumo, digestibilidade e síntese de proteína microbiana	23
4.2.1 Animais, dietas e delineamento experimental.....	23
4.2.2 Condução do experimento	24
4.2.3 Coletas de amostras	25
4.3 Ensaio 2 – Avaliação dos parâmetros de fermentação ruminal	26
4.3.1 Animais, dietas e delineamento experimental.....	26
4.3.2 Degradação e aderência microbiana	28
4.3.3 Atividade enzimática bacteriana ruminal.....	29
4.4 Análises químicas	31
4.5 Cálculos	31
4.6 Análise estatística	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Ensaio 1 Consumo, digestibilidade e excreção urinária.....	33
5.2 Ensaio 2: Fermentação ruminal	38
5.3 Avaliação dos indicadores de adaptação	40
6 CONCLUSÕES	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	52

1 INTRODUÇÃO

A avaliação do valor nutritivo dos alimentos consumidos pelos animais é um desafio constante para os nutricionistas. Uma forma de avaliar a qualidade do alimento é através da determinação de sua digestibilidade. A digestão pode ser definida como um processo de conversão de macromoléculas dos nutrientes em compostos mais simples, que podem ser absorvidos a partir do trato gastrintestinal (VAN SOEST, 1994).

Os primeiros ensaios de digestibilidade foram conduzidos na Estação Experimental da Weende da Universidade de Goettingen, na Alemanha, e começou antes de 1860 (SCHNEIDER; FLATT, 1975). Desde então, um grande número de ensaios de digestibilidade foram conduzidos em todo o mundo e relatados em uma gama de publicações científicas.

Inerente ao problema de se chegar a um coeficiente de digestão aparente válido, diversas dificuldades de variada magnitude afetam a exatidão dos valores determinados. É, portanto, de grande importância que a influência dos fatores responsáveis por esta variação sejam reduzidos ao mínimo (LLOYD et al, 1956).

Em pesquisas prévias que avaliaram fontes de erros em ensaios de digestão Schneider; Lucas (1950); Donefer (1966); Barnes (1968) notaram considerável variação entre laboratórios na determinação do coeficiente de digestão de uma mesma forragem. Existem diversos fatores a serem considerados na condução de ensaios de digestibilidade, entre eles a estrutura e o tamanho do período experimental.

Experimentos de digestão geralmente consistem de duas fases, o período pré-experimental e o período de coleta de amostras. A proposta do período pré-experimental é estabelecer o nível de consumo, assegurando que os resíduos de dietas anteriores tenham passado completamente pelo trato gastrointestinal e permitir um tempo de adaptação da população microbiana ruminal à dieta a ser avaliada (COCHRAN; GALYEAN, 1994). Em casos com mudança significativa na dieta, um tempo maior é necessário tanto para adaptação dos microorganismos ruminais a uma nova dieta quanto para a limpeza de resíduos de dietas prévias do trato digestivo (BURROUGHS *et al*, 1950; LLOYD *et al*, 1956).

A maioria das recomendações ficam em torno de 10 a 14 dias de adaptação (STAPLES; DINUSSON, 1951; BLAXTER et al, 1956, LLOYD et al, 1956). No entanto o uso de períodos pré-experimentais menores que 10 dias não é aconselhado (COCHRAN; GALYEAN, 1994).

O efeito do comprimento do período de alimentação preliminar sobre a precisão dos coeficientes de digestibilidade aparente tem recebido pouca atenção experimental. No entanto, para obter-se uma estimativa exata da digestibilidade de um alimento é importante que sejam adotadas técnicas bem estabelecidas e uma reavaliação da duração do período de alimentação preliminar necessária em ensaios de digestão parece justificada. Esta necessidade é enfatizada quando uma ração experimental é muito diferente, física e quimicamente, a partir da anteriormente ofertada ao animal. Além disso, existe a necessidade de se conhecer os parâmetros relacionados com os processos que ocorrem no sistema digestivo dos ruminantes que possam ser utilizados como possíveis indicadores de adaptação a uma dieta.

O estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da mudança de dieta sobre variáveis nutricionais, incluindo consumo voluntário, digestibilidade e variáveis da fermentação ruminal, e o tamanho de período de alimentação necessário para se obter valores reproduzíveis destas variáveis.

2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

2.1 Fatores que afetam o consumo de alimentos por ruminantes

O consumo de nutrientes é um dos principais fatores limitantes da produção de ruminantes, uma vez que a capacidade ingestiva desses animais é influenciada por vários fatores que interagem entre si, e que somados as peculiaridades metabólicas decorrentes do complexo sistema digestivo ainda é um desafio para os nutricionistas.

Os primeiros estudos para investigar a regulação da quantidade de alimento ingerida consideram como fator limitante a temperatura (BROBECK, 1948), a concentração sérica de glicose (MAYER, 1953) e estoques de gordura corporal (KENNEDY, 1953). Balch; Campling (1962) propuseram que a ingestão de alimentos provavelmente não é controlada apenas por um mecanismo e sim através de controle do sistema nervoso central, sensações orofaríngeas, distensão e contração gástrica, mudanças na produção de calor e mudanças nos níveis de metabólitos circulantes. Em 1977, Forbes concluiu que a energia ou preenchimento gástrico teriam papel preponderante na regulação da ingestão de alimentos. Mais tarde, Forbes (1995) propôs uma teoria de controle de ingestão de alimentos: a digestão estomacal, regulação da temperatura no hipotálamo, concentração de glicose sanguínea, reservas de gordura corpórea e aminoácidos circulantes no plasma seriam fatores que agiriam de maneira integrada e Van Soest (1994) usou a digestibilidade e utilização dos nutrientes como exemplos de aspectos qualitativos da ingestão líquida de alimentos.

O controle da ingestão do alimento está muito relacionado ao valor nutritivo da dieta, assim dietas de baixa digestibilidade promovem aumento do consumo de alimentos, até um ponto em que a distensão ruminal não permite uma ingestão maior e o consumo é limitado por alguma restrição na capacidade do trato digestivo (MERTENS, 1994). Logo, se a dieta é de baixa digestibilidade conseqüentemente ocorrerá distensão do tubo digestivo, fato que muitas vezes inibe o consumo de MS antes que esteja satisfeita a demanda total de energia do animal (INGVARTSEN;

ANDERSEN, 2000). Uma estimativa de quanto o animal pode comer é calculada a partir das exigências de proteína, fibra em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA), extrato etéreo (EE), nutrientes digestíveis totais (NDT), além de níveis em vitaminas e minerais segundo a exigência da categoria animal (NRC, 1996). A ingestão é controlada por uma série de mecanismos de retro alimentação a partir do trato digestivo, fígado e outros órgãos em resposta à presença de nutrientes. Além disso, os animais instruem-se sobre o consumo de nutrientes levando em conta propriedades sensoriais específicas e podem então usar sua experiência para escolher alimentos no qual eles tiveram uma experiência prévia (Forbes, 2000).

Existem vários receptores no estômago, intestino e fígado que informam o sistema nervoso central acerca do volume, osmolaridade, pH e concentração de alguns metabólitos específicos na digesta e no sangue portal, e uma vez na circulação geral os metabólitos estão disponíveis para suportar as várias atividades metabólicas. Um maior desbalanço entre a entrada do material na circulação e sua taxa de remoção é postulado como um “desconforto metabólico” no qual está associado as propriedades sensoriais do alimento recém consumido, induzindo a recusa do alimento quando novamente encontrado pelo animal (FORBES, 2000).

A ingestão de um alimento causa mudança no grau de enchimento e na composição química da digesta, no qual pode ser sentido na parede do rúmen que são sensíveis a componentes químicos incluindo os ácidos produzidos pela fermentação ruminal e pelo estiramento de receptores e quimiorreceptores presentes no trato digestivo (FORBES, 2000), o que poderia influenciar negativamente o consumo, devido à relação negativa entre distensão ruminal e ingestão de matéria seca (VILLALBA et al., 2009).

Os ingredientes utilizados nas rações e as taxas de fermentação de seus nutrientes exercem influência sobre a síntese dos produtos finais da fermentação microbiana, os quais podem ter efeito sobre a ingestão (PROVENZA et al., 2003). Quanto maior a capacidade do animal em selecionar dietas mais nutritivas, maior será o consumo de matéria seca, pois ocorre redução no tempo de retenção, com a redução do efeito do enchimento ruminal, os animais poderão ao longo do dia consumir mais forragem (BRÂNCIO et al., 2003).

Além disso, o equilíbrio nutritivo da dieta também influencia a ingestão de alimentos. Hoover; Stokes (1991), sugeriram que máxima ingestão de MS seria alcançada quando a dieta contivesse entre 10% a 13% de proteína degradável no

rúmen e 56% dos carboidratos totais como carboidratos não estruturais. Em contrapartida, Orskov (1982) postulou que a deficiência de nitrogênio produz uma série de conseqüências, basicamente relacionadas com o fenômeno da diminuição no ritmo da degradação do alimento no rúmen resultando na depressão do consumo face à redução da digestibilidade que está relacionada com a intensidade da atividade microbiana, ou seja, uma dieta com uma relação energia:proteína alta leva a um desequilíbrio nutritivo, que se traduz em diminuição no consumo devido ao atraso no crescimento microbiano e na atividade fermentativa do rúmen. Quando a relação energia:proteína é baixa também pode haver redução no consumo, pois teores elevados de proteína na dieta diminuem a eficiência energética devido à necessidade de eliminação da amônia circulante pela síntese hepática de ureia, além disso, o excesso de amônia ou o desequilíbrio nos teores de aminoácidos no sangue reduz a ingestão de alimento (NRC, 1996)

2.2 Impacto da adição de concentrado sobre o consumo, fermentação ruminal e digestibilidade

2.2.1 Impacto sobre o consumo de volumoso e consumo total

Via de regra o objetivo da suplementação é aumentar o consumo total de energia, além de melhorar ou racionalizar o aproveitamento do volumoso que representa a alimentação base dos sistemas de produção em ruminantes. Em geral, respostas positivas á suplementação aparecem quando há carência absoluta ou relativa de um nutriente na dieta basal.

O limite superior de consumo ocorre quando a ração tem densidade mínima de energia e nutrientes necessários para atender às exigências do animal, neste caso, o fator limitante do consumo seria o enchimento ruminal. Por outro lado, o limite mais baixo de consumo em ruminantes é definido pela ração de densidade energética mais alta, desde que não prejudique a fermentação ruminal, não cause acidose ou

anorexia, nem uma queda significativa na gordura do leite de vacas em lactação (MERTENS, 1992). Este caso, geralmente, é observado quando os animais recebem algum tipo de suplementação com alimentos concentrados.

A principal alteração que ocorre com o fornecimento de suplementos para animais mantidos com dieta a base de volumoso é a ocorrência de efeito associativo, que conceitualmente é definido como a mudança que ocorre na digestibilidade e/ou consumo da dieta basal (forragem), quando do fornecimento do suplemento (HART, 1987). O efeito associativo pode ser de três tipos: substitutivo, aditivo ou suplementar e combinado. O efeito substitutivo é caracterizado pela diminuição do consumo de energia digestível oriunda do volumoso, enquanto observa-se aumento no consumo de concentrado, mantendo assim constante o consumo total de energia digestível (CTED), indicando que a ingestão do suplemento substituiu a do volumoso. O efeito aditivo ou suplementar refere-se ao aumento do CTED devido ao incremento no consumo do concentrado, podendo o consumo de forragem permanecer o mesmo ou aumentar. No efeito combinado, observa-se ambos os efeitos substitutivo e aditivo, ou seja, há decréscimo no consumo de forragem e ao mesmo tempo elevação no de concentrado, o que resulta em maior CTED (MOORE, 1980).

2.2.2 Impacto sobre o pH e ambiente ruminal

O pH é consequência da atividade microbiana e das condições fermentativas no rúmen, porque está diretamente relacionado aos produtos finais da fermentação e ao crescimento dos microrganismos ruminais (Wang et al., 2009).

A introdução de grandes quantidades de carboidratos prontamente fermentáveis na alimentação dos ruminantes resulta numa grande redução das bactérias fibrolíticas e rápido crescimento de bactérias amilolíticas e uma diminuição do pH do rúmen (GOAD et al, 1998;. TAJIMA et al, 2001). Uma mudança abrupta de uma dieta a base de forragem para outra a base de concentrado pode resultar em acidose aguda ou sub-aguda (GOAD et al, 1998;. COE et al, 1999). A acidose ocorre quando a produção de ácidos graxos voláteis pela fermentação bacteriana, excede a

capacidade de tamponamento da saliva e de absorção pelo rúmen, reduzindo o pH ruminal abaixo do nível fisiológico por períodos prolongados (DIJKSTRA et al., 1993; OWENS et al., 1998). Dietas com altos níveis de amido altamente fermentável aumentam a disponibilidade de glicose livre para o rúmen e propiciam o crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico, ocorrendo uma produção exacerbada de lactato diminuindo o pH ruminal. Quando o pH atinge valores abaixo de 6,0, as bactérias celulolíticas e protozoários são inibidos e quando atinge valores de 5,2 a microflora diversa do rúmen é intensivamente substituída por bactérias tolerantes à acidez como o *Streptococcus. bovis* e *Lactobacillus spp* (produtoras de ácido láctico). Com o pH abaixo de 5,0 as bactérias que metabolizam o lactato não resistem ao baixo pH e morrem, aumentando ainda mais as concentrações do ácido láctico no rúmen (OWENS; GOETSCH, 1993; DIJKSTRA et al., 2012).

Tajima et al., (2001) demonstraram que a microbiota ruminal é altamente responsiva à dieta. Fernando et al., (2010) detectaram uma alteração significativa na estrutura da população bacteriana ruminal de animais no período de adaptação a dietas com alto teor de concentrado. Estes autores trabalharam com dietas múltiplas de adaptação variando as relações de volumoso:concentrado de 80:20 (dieta 1), 60:40 (dieta 2), 40:60 (dieta 3) e 20:80 (dieta 4) e verificaram que não houve mudanças quando os animais receberam a dieta 1 e 2 , mas ao receberem as dietas 3 e 4 a mudança na estrutura da população microbiana foi claramente observada. Os autores atribuíram essa mudança na população microbiana ao aumento de substrato fermentável presente na dieta, favorecendo o crescimento de espécies amilolíticas. Os autores ainda sugerem uma maior diversidade na população bacteriana nos animais alimentados a base de volumoso comparada aos animais alimentados com dietas concentradas.

Estudos *in vitro* (HADDAD; GRANT, 2000; GRANT; MERTENS, 1992) demonstraram que a digestibilidade da fibra é limitada em pH em torno de 6,0 e pode ser também afetada negativamente pela presença de carboidratos solúveis (RUSSEL, 1998). Por outro lado, uma baixa disponibilidade de açúcares para o crescimento de populações celulolíticas também podem limitar a atividade destas espécies (KOZLOSKI, et al. 2006a).

2.2.3 Impacto sobre a digestibilidade total e a digestibilidade da fibra

A suplementação energética é um mecanismo útil para incrementar o consumo de energia, mas pode provocar competição entre bactérias amilolíticas e celulolíticas, reduzindo a digestibilidade da fração fibrosa da dieta.

Diversos estudos têm mostrado que a aumento de carboidratos prontamente fermentáveis na dieta de ruminantes é diretamente proporcional a digestibilidade da matéria orgânica (Kozloski et al., 2006b; Kozloski et al., 2006c; Kozloski et al., 2006d; Kozloski et al., 2007; Kozloski et al., 2009). Por outro lado, com o aumento da taxa de passagem da digesta ao longo do trato gastrointestinal, a degradação da FDN é prejudicada.

Mould et al. (1983) deixam claro, o efeito negativo que o incremento na proporção de açúcares solúveis, na dieta, exerce sobre a digestibilidade da fibra, mesmo sem a redução significativa do pH. Os autores descrevem dois aspectos negativos que carboidratos rapidamente fermentáveis no rúmen exercem sobre a celulólise: a redução da celulólise que não pode ser atenuada pelo aumento do pH ruminal foi designado “efeito de carboidrato” e a parte devido à redução do pH foi designado “efeito do pH”. Huhtanen e Khalili (1991; 1992) também constataram que a taxa de digestão da FDN e da atividade da carboximetilcelulase *in situ* foi menor quando sacarose (1 kg / d) foi infundida no rúmen quando comparada a digestão sem infusão de sacarose. Grigsby et al. (1993) sugerem que a competição, entre os diferentes grupos de bactérias, é a primeira razão para a inibição da celulólise, principalmente, quando uma fonte de amido é adicionado a dieta, estimulando o crescimento das bactérias amilolíticas, inibindo as celulolíticas e afetando negativamente a digestão da fibra.

2.3 Período de adaptação em ensaios de digestibilidade in vivo

Em estudos de digestão o período de adaptação do animal a uma determinada dieta é assunto em discussão, alguns autores recomendam que o período deve ser compreendido entre o tempo que o animal leva para estabilizar o

nível de consumo, para que todos os resíduos de uma dieta prévia deixem o trato gastro intestinal e também para permitir que a população microbiana do rúmen se adapte a dieta que será avaliada (MERCHEN, 1988). Outros autores (BURROUGHS et al, 1950; LLOYD et al, 1956; NICHOLSON et al.,1956) citam que em algumas situações, principalmente quando há mudanças significativas na dieta, a população microbiana irá exigir um tempo maior para adaptar-se as novas condições de fermentação ruminal, pois a competição microbiana por substrato no interior do rúmen faz com que haja uma mudança no crescimento de populações que degradam esses diferentes substratos (TAJIMA, 2001).

Lloyd et al. (1956) avaliaram o efeito na mudança de duas rações sobre o tamanho do período de adaptação necessário na obtenção de coeficientes de digestões reproduzíveis em ovinos e concluíram que parece haver pouca justificativa para aumentar a duração do período de adaptação a dieta além de 10 dias. Por outro lado, Nicholson et al. (1956) investigaram a influência de diferentes tamanhos de período pré-experimental sobre a digestibilidade de dietas com grande diferença na composição. Os autores observaram que quando mudanças radicais são realizadas pra proporção feno:concentrado da dieta, 16 dias de adaptação não foi tempo suficiente para a obtenção de dados confiáveis e que períodos de adaptação de 16 a 30 dias são necessários quando a relação feno:concentrado varia bastante, adicionalmente, eles concluíram que para dietas em que a relação feno:grão é constante, períodos de 7 dias parecem ser adequados.

Fernando et al., (2010) verificaram aumentos significativos na população de *Megasphaera elsdenii*, *Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium* e *Prevotella bryantii* durante a adaptação à dieta de alto teor de concentrado, enquanto que as populações de *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Fibrobacter succinogenes* diminuíram gradualmente quando os animais foram adaptados à dieta de alto concentrado. *Fibrobacter succinogenes* são bactérias fibrolíticas, predominantes quando os animais estão submetidos a dietas ricas em conteúdo fibroso. Desta forma, a diminuição desta população é esperada em dietas concentradas. *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium* utilizam o ácido láctico produzido no rúmen, prevenindo o acúmulo de ácido e, por consequência, a acidose (OWENS; GOETSCH, 1993). Desta forma, aumento destas espécies no rúmen é desejável quando se aumenta teor de concentrado na dieta, demonstrando a importância de

adaptações gradativas à nova dieta quando carboidratos prontamente fermentáveis são adicionados (Fernando et al., 2010).

Monteils et al. (2011), observaram um equilíbrio instável na maioria dos parâmetros do ecossistema ruminal ao longo de um período de 15 semanas de alimentação com dietas de baixo ou alto teor de fibra (27 e 44% de fibra em detergente neutro (FDN), respectivamente) na dieta consumida por novilhos. As mudanças observadas ao longo do período foram relacionadas com flutuações aleatórias em torno de um valor médio, no entanto a magnitude das variações foram maiores para a dieta pobre em fibras.

Em um experimento realizado com ovinos, Brossard et al (2003) verificaram que após um período de alimentação de duas semanas com uma dieta acidótica, onde foi induzida uma acidose sub aguda seguida de uma recuperação com uma dieta volumosa, o efeito a longo prazo da primeira dieta nas reservas alcalinas do sangue sugere um longo período de recuperação o qual foi observado também a partir dos parâmetros ruminiais. Adicionalmente, Bevans et al., (2005) mostraram que a variação do pH ruminal foi muito mais intensa quando bovinos foram adaptados gradualmente a uma dieta com adição de grãos em período curto (5 dias) quando comparado com período de 17 dias, aumentando o risco de acidose. Demonstrando que protocolos de adaptação em ensaios de digestibilidade com períodos excessivamente curtos podem permitir a ocorrência de distúrbios ruminiais.

3 HIPÓTESE

Após mudança na dieta de uma a base de volumoso para outra contendo concentrado, ou vice-versa, os ruminantes estabilizam o consumo e os processos digestivos após um tempo de adaptação à nova dieta.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e época

Foram conduzidos dois ensaios de digestibilidade *in vivo* com ovinos nas instalações do Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria, RS. Os estudos foram conduzidos no período de setembro de 2011 a julho de 2012.

4.2 Ensaio 1– Avaliação do Consumo, digestibilidade e síntese de proteína microbiana

4.2.1 Animais, dietas e delineamento experimental

O protocolo de pesquisa seguiu as diretrizes recomendadas pela Comissão de Ética e bem estar no uso de animais para pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria.

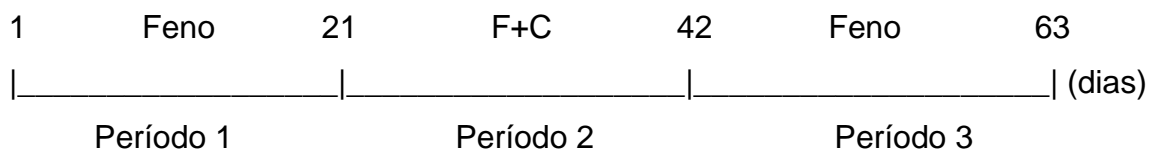
Foram utilizados dez ovinos, machos castrados da raça Corriedale (34 ± 5 kg de peso vivo (PV)), em um delineamento experimental inteiramente casualizado em um esquema de dupla reversão.

Antes da fase experimental, os animais passaram por um período pré-experimental de uma semana para adaptação às instalações e manejo, quando receberam também tratamento antiparasitário.

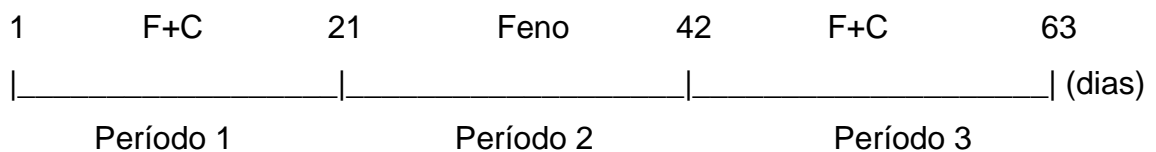
4.2.2 Condução do experimento

Os animais foram mantidos durante 63 dias em gaiolas de metabolismo em um galpão coberto e constante acesso à água e sal mineral. Os mesmos foram divididos em dois grupos de cinco animais, distribuídos nos seguintes protocolos de alimentação:

- Grupo A: dieta a base de feno de tifton, durante 21 dias. Após este período os animais passaram a ser alimentados com feno + concentrado (F+C) por mais 21 dias, e nos 21 dias finais do experimento os ovinos voltaram a receber a primeira dieta (feno), conforme esquema abaixo:



- Grupo B: nos primeiros 21 dias do experimento os animais foram alimentados com feno de tifton + concentrado (F+C), a seguir foi ofertado feno durante mais 21 dias, retornando a dieta F+C nos últimos 21 dias (esquemática abaixo):



O feno foi oferecido *ad libitum*, com ajuste de sobras entre 10 e 15% do ofertado, em ambos os grupos e períodos. A oferta de concentrado foi calculada diariamente com base no consumo de feno: 50% de ração em relação a média do consumo de volumoso dos três dias anteriores. O feno de tifton foi triturado em partículas de ± 5 cm antes de ser fornecido

O alimento concentrado era composto de 58% de milho, 21% de farelo de soja e 21% de farelo de trigo, a dieta composta por F+C foi formulada para suprir as

demandas proteicas energéticas dos animais pelo sistema Cornell Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) (FOX et al., 1992) O feno e o concentrado eram ofertados separadamente, em cochos individuais, e a dieta dividida em duas refeições diárias, às 08:30h e 17h.

4.2.3 Coletas de amostras

O alimento ofertado e as sobras foram pesados diariamente para a determinação do consumo. Após um período de 14 dias em que os animais estavam recebendo suas respectivas dietas, se deu início a coleta das amostras. A digestibilidade das dietas foi estimada através da coleta de fezes, e, a retenção de nitrogênio e excreção de alantoína, pela coleta de urina dos animais.

Foram realizadas coletas totais de fezes, de urina e de sobras de alimento diariamente, durante todo o período experimental a partir do 14º dia do ensaio, e seus valores registrados para cálculos posteriores.

As amostras de alimentos, sobras e fezes foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 55°C durante pelo menos 72 horas, moídas através de peneira de 2mm (moinho Willey, Arthur H. Thomas, Filadélfia, PA, EUA) e armazenadas para posterior análise.

As fezes foram coletadas através de bandejas coletoras de aço inoxidável e telas de nylon para separar a urina das fezes. As fezes contaminadas com urina eram pesadas a fim de se obter a excreção fecal total, no entanto somente fezes que não tiveram contato com a urina foram amostradas.

A urina foi coletada através de bandeja coletora, de aço inoxidável, na qual a urina era conduzida a um recipiente contendo 100 mL de uma solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 20% (v/v) suficiente para reduzir o pH a valores abaixo de 2. Da urina retirou-se uma amostra de 10 mL em balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completado com água destilada e armazenado em congelador (-20°C) para posterior análise.

A composição química dos alimentos é apresentada na tabela 1.

Tabela 1 – Composição química¹ dos alimentos no ensaio 1

Item ¹	Concentrado	Feno de Tifton
MS (%)	94,1	92
Composição (% da MS)		
MO	96,4	89,9
N total	3,0	1,82
FDN	17,7	74,8
MM	3,6	10,1

¹MS= matéria seca; MO= matéria orgânica; N total= nitrogênio total; FDN= fibra em detergente neutro; MM= matéria mineral.

4.3 Ensaio 2 – Avaliação dos parâmetros de fermentação ruminal

Este experimento foi realizado para avaliar os seguintes parâmetros de fermentação ruminal: degradação ruminal dos alimentos, aderência microbiana, atividade de enzimas bacterianas ruminais e pH.

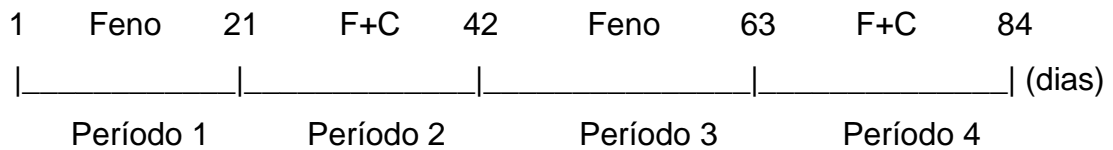
4.3.1 Animais, dietas e delineamento experimental

Foram utilizados quatro ovinos, machos castrados da raça Santa Inês (65 ± 5 kg de peso corporal (PC)), implantados cirurgicamente com uma cânula ruminal, em um delineamento experimental inteiramente casualizado com dupla reversão.

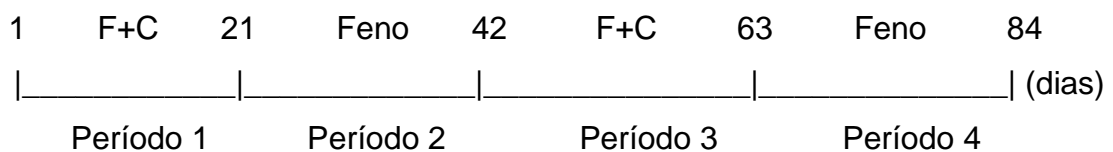
Após a cirurgia de implantação da cânula no rúmen, os animais foram alojados em baias providas de cochos para volumoso, concentrado, sal mineral e bebedouro com água permanentemente disponível, onde permaneceram durante todo o período experimental.

O manejo e as dietas experimentais foram semelhantes aos descritos anteriormente, entretanto, foram utilizados dois animais para cada grupo alimentar e o período experimental foi de 84 dias, incluindo mais uma troca de dieta:

- Grupo A: feno (21 dias) → feno + concentrado (21 dias) → feno (21 dias) → feno + concentrado (21 dias):



- Grupo B: feno + concentrado (21 dias) → feno (21 dias) → feno + concentrado (21 dias) → feno (21 dias).



O concentrado foi formulado somente a base de milho 60% e farelo de soja 40% (CNCPS, 1992), porém o cálculo da sua oferta foi realizado como descrito anteriormente. A composição química dos alimentos está descrita na Tabela 2.

A degradação, a aderência microbiana as partículas de alimento, bem como o pH ruminal foram mensurados diariamente e a atividade enzimática bacteriana a cada dois dias a partir do 14º dia do período experimental. Para a medida do pH era coletado uma amostra de conteúdo ruminal imediatamente antes da alimentação da manhã (jejum) e quatro horas após a primeira alimentação (alimentado). Uma pequena quantidade de resíduo era retirado do rúmen através da cânula e o conteúdo era espremido manualmente para a retirada da parte líquida, onde a seguir era realizada a leitura do pH (peagâmetro digital MB 10 Master).

Tabela 2 – Composição química¹ dos alimentos no ensaio 2

Item ¹	Concentrado	Feno de Tifton
MS (%)	92,0	93,2
Composição (% da MS)		
MO	93,0	91,68
N total	4,2	2,10
FDN	14,0	70,63
MM	7,0	8,32

¹MS= matéria seca; MO= matéria orgânica; N total= nitrogênio total; FDN= fibra em detergente neutro; MM= matéria mineral.

4.3.2 Degradação e aderência microbiana

Amostras parcialmente seca e moída (2 mm) de feno de tifton (1 g), milho e farelo de soja (1,5 g) foram pesadas e colocadas, individualmente, em saquinhos de poliéster de tamanho 5 x 5 cm e porosidade 50 micras, selados e incubados durante 24 horas no rúmen dos ovinos. Para cada tipo de amostra foram confeccionados 2 saquinhos por animal, os quais, no momento da incubação, foram colocados dentro de sacos maiores de tecido sintético com grande porosidade presos a uma peça de metal, com a função de manter os sacos na parte ventral do rúmen, e fixados externamente com uma corda de nylon. Ao final da incubação os saquinhos foram retirados do rúmen, lavados em água corrente até que a água fluísse límpida, submersos em solução salina 0,9% durante aproximadamente 10 minutos, para retirada das bactérias não aderidas, e lavados novamente com água destilada e secos em estufa de ar forçado a 55°C por 72 horas. A seguir os saquinhos foram pesados para determinação da degradação da matéria parcialmente seca (MPS).

Posteriormente, no resíduo da incubação das amostras de feno foi determinado o teor de fósforo (P), o qual é relacionado com a aderência bacteriana ruminal as partículas (FARENZENA *et al.*, 2014). Foram pesadas aproximadamente 0,15 g do resíduo da incubação de cada saquinho em béckeres e queimados em mufla à 600°C por quatro horas. Após, foi adicionado 10 mL de uma solução ácida contendo 3 partes de ácido clorídrico (HCl) 10% e 1 parte de ácido nítrico (HNO₃) 10%, colocados em uma chapa de aquecimento e deixados em fervura até evaporar e restar um volume residual no becker de aproximadamente 2 mL. Este conteúdo foi transferido, lavando-se com água destilada, para um balão volumétrico de 25 ml completando-se o volume com água destilada. Esta solução foi então filtrada em papel de filtração rápida para posterior determinação colorimétrica de fósforo. Para isso, foram pipetados em um tubo de ensaio, 1000 µl do filtrado, 1000 µl de uma solução complexante e 100 µl de solução redutora. Este meio de reação foi mantido durante 20 minutos em temperatura ambiente e a absorbância foi lida em espectrofotômetro com comprimento de onda em 660 nanômetros (nm) contra um

branco que incluiu HCl 0,1 N em vez do filtrado. Adicionalmente, nas amostras originais e nos resíduos de incubação de feno foi também analisado o teor de fibra em detergente neutro (FDN). Para tal, as amostras foram submetidas à solução em detergente neutro em saquinhos de poliéster e em autoclave a 110°C durante 40 minutos, sendo em seguida lavados e secos em estufa a 105°C (SENGER et al, 2008). Posteriormente determinou-se a concentração de P. Este procedimento foi realizado para descontar do teor de P total do resíduo, aquele associado à forragem, insolúvel durante a fermentação. O P associado às bactérias aderidas foi estimado então pela diferença entre o teor de P no resíduo não tratado menos o P do resíduo tratado com solução detergente neutro. A aderência bacteriana foi expressa como mg de P/g de MS residual.

4.3.3 Atividade enzimática bacteriana ruminal

A atividade das enzimas bacterianas foi estimada, de acordo com Farenzena et al (2014), a cada dois dias a contar 14º dia experimental a partir da incubação *in situ* de amostras de feno no rúmen e processadas da seguinte maneira:

Aproximadamente 1 g de amostra, moídas em peneira de 2 mm foram colocadas em saquinhos de nylon selados para posterior incubação. Foram confeccionados 2 saquinhos para cada animal, os quais foram incubados durante 24 horas no rúmen dos ovinos, conforme procedimento descrito anteriormente.

Imediatamente após os saquinhos serem retirados do rúmen e lavados, o conteúdo residual de cada saquinho foi processado como descrito na Figura 1.

As amostras filtradas, assumido conter as enzimas, foram incubadas com o substrato CMC (SIGMA – Carboximetilcelulose sódica de baixa viscosidade) 2%: em tubos de ensaio foram adicionados 2 mL de filtrado e 4 mL do substrato. Os tubos foram submetidos à incubação em banho-maria a 39°C durante 240 minutos. Ao final desse período, as amostras eram, imediatamente, colocadas em outro banho-maria, a 100°C por seis minutos, com a finalidade de interromper a atividade das enzimas. Essa incubação teve o propósito de determinar a atividade enzimática das amostras pela degradação do substrato.

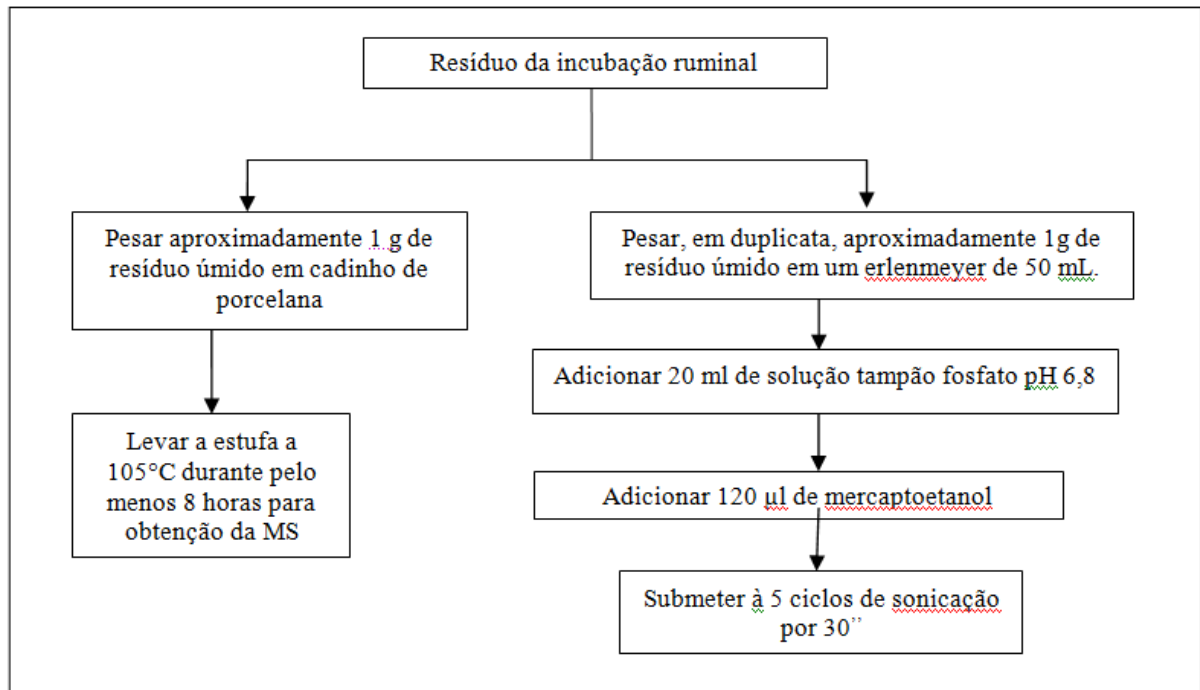


Figura 1 - Fluxograma do processo de extração de enzimas nas amostras de resíduo ruminal.

Neste material foi determinada a concentração de açúcares redutores pelo método DNS (3,5-dinitro-salicilato), adaptado de Miller et al (1960): em um tubo de ensaio era pipetado 500 µL de amostra e 500 µL da solução DNS, os tubos eram agitados e levados à incubação em banho-maria de aproximadamente 100° C por 10 minutos. O material foi resfriado, adicionado 4 mL de água destilada e agitado em vortex. Foi realizada leitura de absorvância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 575 nm contra o branco (500 µL de água + 500 µL da solução DNS + 4 mL de água), o padrão utilizado na curva de calibração foi uma solução de glicose (1g/L).

A atividade enzimática foi expressa em nmol de açúcares redutores/g MS incubada/ minuto de incubação.

Adicionalmente, no filtrado enzimático foram determinados os teores de proteína pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Esta análise foi realizada a fim de expressar a atividade enzimática em função da concentração proteica do fluido enzimático, conforme proposto por Prauchner et al. (2013). Foram pipetados em

tubos de ensaio, 1 mL de amostra e em seguida eram acrescentados 2,5 mL de reagente de Bradford. As misturas eram agitadas em vortex e a leitura de absorbância era realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 595nm. Entre as leituras de cada amostra a cubeta do espectrofotômetro era lavada com álcool 70% a fim de evitar misturas das amostras e assim garantir uma leitura fidedigna com as concentrações obtidas na dosagem das proteínas. Para confecção da curva padrão foi utilizada albumina sérica bovina. A atividade das enzimas foi então expressa em nmol de glicose liberada/ mg de proteína/ minuto.

4.4 Análises químicas

O teor de matéria seca (MS) das amostras de alimento, sobras e fezes foram determinadas por secagem em estufa a 105°C por pelo menos 12 horas. A matéria mineral (MM) foi determinada pela queima em mufla a 600°C durante 4 horas. O nitrogênio total (N) foi determinado por método Kjeldahl (Método 984.13, AOAC, 1997). A análise dos teores de fibra em detergente neutro (FDN) foi baseada em Mertens (2002). Contudo, as amostras foram pesadas em saquinhos de poliéster (porosidade de 16 µ) e tratadas com solução detergente neutro em autoclave a 110°C, durante 40 minutos (SENGER et. al., 2008).

Nas amostras de urina, o N total foi determinado como descrito acima e a concentração de alantoína foi determinadas colorimetricamente de acordo com Chen; Gomes (1992).

4.5 Cálculos

A proteína bruta das amostras foi obtida pela multiplicação do N por 6,25.

A digestibilidade aparente da matéria orgânica (DMO), foi calculada como:

$$\text{DMO (\%)} = (\text{MO consumida (g/dia)} - \text{MO fecal (g/dia)}) / \text{MO consumida (g/dia)}$$

x 100

A digestibilidade da fibra em detergente neutro (DFDN) foi calculada como:

$$\text{DFDN (\%)} = \frac{\text{Consumo de FDN (g/dia)} - \text{FDN fecal (g/dia)}}{\text{Consumo de FDN (g/dia)}} \times 100$$

As frações de excreção fecal utilizadas para o cálculo das digestibilidades foram calculadas de duas maneiras: com a produção correspondentes a 48 horas após a ingestão do alimento; ou com o consumo médio de 5 dias e a produção fecal do sexto dia de coleta.

4.6 Análise estatística

As análises descritas a seguir foram aplicadas para cada uma das variáveis observadas em ambos ensaio. Realizou-se análise de variância para verificar o efeito do tipo de dieta e período, assim como sua interação, sobre as variáveis nutricionais pelo procedimento MIXED do SAS (2009).

Adicionalmente, o efeito do tempo (dias) após a mudança da dieta sobre as variáveis nutricionais em cada animal e dieta e período, excluindo-se o período 1 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 adaptação à nova dieta. 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) (ANEXOS Q, R e S). Posteriormente, os valores de R de cada uma das variáveis em cada dieta foram submetidos à análise de variância para avaliar o efeito da dieta sobre o ponto de quebra.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio 1 Consumo, digestibilidade e excreção urinária

Os resultados médios de consumo de matéria orgânica (CMO), digestibilidade da matéria orgânica (DMO), excreção fecal de matéria orgânica (EFMO), consumo de FDN (CFDN), digestibilidade da FDN (DFDN), excreção fecal de FDN (EFFDN), consumo de nitrogênio (CN), excreção fecal de nitrogênio (EFN), excreção urinária de nitrogênio (EUN) e excreção urinária de alantoína em cada grupo alimentar ao longo dos períodos experimentais estão representadas graficamente nos ANEXOS A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e L, respectivamente, nos quais fica evidente o efeito das diferentes dietas sobre os parâmetros avaliados ao longo de todo o período experimental. Estes resultados já eram esperados, em função da composição das dietas. Muito embora em algumas variáveis essa observação tenha sido menos acentuada, através das figuras é possível identificar claramente o momento da troca entre as dietas, representadas pelas mudanças nas respostas dos processos digestivos. Além disso, também é possível identificar que de acordo com o tipo de troca essa mudança varia.

Quando a mudança da dieta ocorre do F+C pra feno a mudança no CMO é mais brusca quando compara a troca de dieta a fase de feno para F+C. O consumo pode ser limitado nos animais consumindo basicamente forragens como resultado de um fluxo restrito da digesta através do trato gastrintestinal, além disso, na dieta mais energética o consumo é crescente a medida que a dieta anterior (mais fibrosa) vai saindo do rúmen. Uma maior taxa de passagem das partículas de alimento faz com que o consumo seja maior. Essas observações também se refletem sobre a excreção fecal, contudo, a digestibilidade apresenta variações de maior magnitude em comparação ao consumo e a excreção de fezes ao longo do ensaio, muito embora esta variação seja atenuada quando foi calculada com o consumo médio de 5 dias.

Foi observado efeito de grupo sobre o consumo, digestibilidade e excreção fecal de matéria orgânica (CMO, DMO e EFMO), bem como para excreção fecal de

fibra em detergente neutro (EFFDN) (Tabela 3). Como esperado, o grupo B apresentou média superior ($P < 0,05$) em relação ao grupo A, pois o grupo B recebeu a dieta F+C, mais energética, por maior número de dias em relação ao outro grupo. Assim ao ingerirem uma dieta mais fibrosa por mais tempo os animais do grupo A apresentaram consumo e digestão de MO inferiores, confirmando que as dietas experimentais utilizadas neste estudo apresentam distintos valores nutritivos. Neste caso, efeitos associativos positivos podem ocorrer, especialmente, se a suplementação oferecer melhoras nas condições no meio ruminal para a celulólise (MOULD, 1988). Bargo et al. (2003) afirmou que fornecimento de suplementação aumenta a ingestão de MS, muito embora a dieta contendo concentrado rico em amido ou em carboidratos facilmente fermentáveis no retículo-rúmen poderia provocar um efeito substitutivo negativo, ou seja, a suplementação aumentaria o consumo de matéria seca total, mas reduziria o consumo de matéria seca da forragem.

Sobre o consumo (CFDN) e digestão (DFDN) da fibra em detergente neutro não se observou efeito de grupo, provavelmente devido a diferença na composição de FDN das dietas e na ingestão de MO, uma vez que o grupo que ingeriu maior quantidade de MO também recebeu a dieta com menor teor de FDN por mais tempo ao longo do período experimental, o que anulou o efeito sobre CFDN e DFDN. Estes resultados podem ser explicados por teorias baseadas no enchimento físico do retículo-rúmen (ALLEN, 1996; MERTENS, 1994). Mertens (1992) sugeriu que a limitação por enchimento pode ser correlacionada ao nível de FDN de uma ração e propôs o valor médio de consumo de 1,2% do peso vivo em FDN como nível de consumo regulado por mecanismos físicos. Allen (2000) também postulou que o teor de FDN da dieta é um dos principais determinantes da regulação física do consumo tornando-se possivelmente o fator que mais afeta o consumo à medida que o requerimento energético do animal e o efeito de enchimento das dietas aumentam.

O efeito de período sobre as variáveis consumo, digestibilidade e excreção fecal de MO e FDN ($P < 0,05$) não era esperado, no entanto influências aleatórias como comportamento ingestivo, adaptação às gaiolas e distintos dias de coleta de amostras entre período 1 vs período 2 e 3 podem ter resultado nestes efeitos, apesar das condições experimentais ao longo dos períodos tenham sido controladas de modo a serem as mais semelhantes possíveis. Além disso, observou-se interação

entre grupo e período para a maioria das variáveis de consumo, digestibilidade e excreção fecal ($P < 0,05$) (Tabela 3).

Raymond (1969) enfatizou a necessidade de uma rígida standardização das condições sobre a qual o consumo é medido. Isso é necessário não somente para reduzir as variações nas medidas de consumo, mas também para aumentar a comparabilidade de medidas entre estações experimentais, e para garantir que as características da forragem e não que os fatores relacionados ao animal e situações de alimentação sejam grandemente medidos. No entanto, Nascimento et al. (2009) afirma que outros fatores principalmente relacionados com o animal parecem estar envolvidos na taxa de degradação dos alimentos pelos microorganismos, pois embora uma fração das partículas ruminais possua tamanho adequado para atravessar o orifício retículo-omasal, elas permanecem no rúmen, influenciando sobre o consumo e a digestibilidade da dieta.

De acordo com o esperado, verificou-se efeito de grupo sobre o consumo de N (CN), excreção fecal de N (EFN), retenção de N (RN), excreção urinária de N (EUN) e excreção urinária de alantoína ($P < 0,01$). Houve interação entre grupo e período ($P < 0,01$) e também foi observado efeito de período ($P < 0,01$) para todas estas variáveis (Tabela 4).

Tabela 3 - Consumo, digestibilidade e excreção fecal de matéria orgânica (CMO, DMO e EFMO) e fibra em detergente neutro (CFDN, DFDN e EFFDN) por ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação.

Grupo ¹	A						B						P ³		
	1		2		3		1		2		3				
Dieta ²	Feno		F+C		Feno		F+C		Feno		F+C		G	Per	G*Per
	Média	C.V.	Média	C.V.	Média	C.V.	Média	C.V.	Média	C.V.	Média	C.V.			
CMO (g/kg PV)	16,3	13,09	24,8	15,37	20,7	11,63	24,0	18,27	19,7	12,41	27,8	15,88	<0,001	0,001	<0,001
DMO (48h)	0,62	5,89	0,66	6,23	0,62	7,17	0,67	8,86	0,61	7,35	0,68	7,32	<0,001	0,009	<0,001
DMO (5d)	0,64	4,54	0,64	5,07	0,63	5,90	0,67	6,88	0,62	5,90	0,67	6,00	0,098	<0,001	<0,001
EFMO (g/kg PV)	6,2	18,44	8,3	20,18	7,9	13,70	7,5	26,94	7,3	24,15	8,8	23,96	0,023	<0,001	<0,001
CFDN (g/kg PV)	13,8	11,18	15,1	15,43	16,8	11,72	14,7	18,49	15,2	17,55	16,7	16,61	0,245	<0,001	0,283
DFDN (48h)	0,69	5,88	0,59	9,54	0,67	6,90	0,66	8,21	0,65	9,15	0,62	10,06	0,170	<0,001	<0,001
DFDN (5d)	0,69	4,00	0,60	6,98	0,66	5,70	0,66	6,21	0,65	7,34	0,63	7,67	0,729	<0,001	<0,001
EFFDN (g/kg PV)	4,4	18,46	6,0	22,93	5,6	15,52	5,3	28,49	5,4	25,24	6,3	25,44	0,034	<0,001	<0,001

¹Grupo A: 21 d consumindo feno – média dos últimos 7 dias (período 1), 21 d consumindo F+C (período 2) e 21 d alimentados com feno (período 3); Grupo B: 21 d consumindo F+C – média dos últimos 7 dias (período 1), 21 d consumindo feno (período 2) e 21 d alimentados com F+C (período 3); ² F+C: feno + concentrado; ³Probabilidade do erro tipo I da análise de variância onde: G= grupo; P = período; G*Per = interação entre grupo e período.

Tabela 4 - Consumo (CN), excreção fecal (EFN), retenção (RN), excreção urinária (EUN) de Nitrogênio e excreção de alantoína por ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação.

Grupo ¹	A						B						P ³		
	1		2		3		1		2		3				
	Feno		F+C		Feno		F+C		Feno		F+C				
	Média	C.V.	Média	C.V.	Média	C.V.	Média	C.V.	Média	C.V.	Média	C.V.	G	Per	G*Per
CN (g/kg PV)	0,33	16,19	0,59	16,18	0,43	12,98	0,58	18,79	0,39	17,38	0,68	15,79	<0,001	<0,001	<0,001
EFN (g/kg PV)	0,13	18,61	0,18	24,05	0,15	15,25	0,17	25,79	0,14	24,12	0,19	25,13	<0,001	<0,001	<0,001
R N (g/kg PV)	0,10	45,14	0,28	19,87	0,09	70,55	0,27	28,12	0,16	34,07	0,19	42,15	<0,001	<0,001	<0,001
EUN (g/kg PV)	0,087	19,55	0,116	25,49	0,207	24,49	0,128	17,99	0,095	36,37	0,280	22,37	<0,001	<0,001	<0,001
Alantoína (mg/kg PV)	16,00	24,72	27,54	30,86	26,30	27,66	29,22	29,17	21,61	26,11	36,82	26,61	<0,001	<0,001	<0,001

¹Grupo A: 21 d consumindo feno (período 1), 21 d consumindo F+C (período 2) e 21 d alimentados com feno (período 3); Grupo B: 21 d consumindo F+C (período 1), 21 d consumindo feno (período 2) e 21 d alimentados com F+C (período 3);

² F+C: feno + concentrado;

³Probabilidade do erro tipo I da análise de variância onde: G= grupo; P = período; G*Per = interação entre grupo e período.

5.2 Ensaio 2: Fermentação ruminal

Observou-se efeito de período sobre a degradação ruminal *in situ*, de amostras de feno, aderência bacteriana as partículas de alimento, atividade enzimática bacteriana e pH ruminal, tanto no jejum quanto após a alimentação ($P < 0,05$) (Tabela 5). O grupo de alimentação exerceu efeito sobre a degradação ruminal do feno bem como sobre o pH ruminal no estado de jejum e 4 horas após a alimentação ($P < 0,05$). Houve interação entre grupo e período para todas as variáveis avaliadas neste ensaio ($P < 0,05$), exceto para o pH ruminal em jejum. A degradação, aderência bacteriana, atividade enzimática, expressa com base na MS e na proteína, e pH ruminal, no jejum e após a alimentação, diários ao longo do período experimental em cada grupo são apresentados nos ANEXOS M, N, O e P, respectivamente. Assim como no ensaio anterior, o efeito do dia ao longo de cada período sobre as variáveis de fermentação dentro de cada grupo foi variável.

Tabela 5 - Degradação ruminal in situ de feno (Deg, %), aderência bacteriana ruminal (Ader, mg P/g MS), atividade enzimática bacteriana (A. E. P., nmol de glicose/mg proteína/minuto), atividade enzimática bacteriana (A. E. MS, nmol de glicose/g MS/minuto), pH antes da alimentação (pHj) da manhã e pH após 4 horas de alimentação (pHa) por ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação

Grupo ¹	A								B								P		
	1		2		3		4		1		2		3		4				
Período	Feno		F+C		Feno		F+C		F+C		Feno		F+C		Feno		G	Per	G*Per
Dieta ²	Média	C.V.	Média	C.V.	Média	C.V.	Média	C.V.	Média	C.V.	Média	C.V.	Média	C.V.	Média	C.V.			
Deg.	73,9	3,9	65,7	12,4	67,3	10,4	58,2	16,3	67,7	5,7	63,0	11,7	55,1	19,5	59,5	13,6	<0,001	<0,001	<0,001
Ader.	0,78	20,1	0,54	36,4	0,65	37,0	0,59	43,0	0,71	23,1	0,57	37,1	0,59	44,8	0,66	41,6	0,667	<0,001	0,051
A. E. Pr	770	33,3	766	44,1	645	36,9	498	37,8	651	37,0	769	38,8	548	52,7	553	39,0	0,115	<0,001	0,031
A. E. MS	752	28,7	935	51,7	810	38,5	653	36,9	626	36,5	1061	46,5	648	45,9	709	37,4	0,442	<0,001	0,003
pHj	6,36	3,1	6,34	7,2	6,35	7,9	6,21	6,9	6,17	6,8	6,23	7,1	6,30	8,5	5,82	8,88	0,002	<0,001	0,090
pHa	6,59	2,7	6,26	5,6	6,51	5,3	6,16	4,7	6,25	5,4	6,30	7,53	5,97	6,43	6,24	7,54	<0,001	0,030	<0,001

¹Grupo A: 21 d consumindo feno – média dos últimos 7 dias (período 1), 21 d consumindo F+C (período 2), 21 d alimentados com feno (período 3) e 21 d alimentados com F+C (período 4); Grupo B: 21 d consumindo F+C – média dos últimos 7 dias (período 1), 21 d consumindo feno (período 2), 21 d alimentados com F+C (período 3) e 21 alimentados com feno (período 4);

² F+C: feno + concentrado;

³Probabilidade do erro tipo I da análise de variância onde: G= grupo; P = período; G*Per = interação entre grupo e período.

5.3 Avaliação dos indicadores de adaptação

Adaptação de animais consumindo dietas a base forragem substituídas por dietas baseadas em concentrado provoca alterações marcantes no ambiente ruminal, e o estabelecimento de uma microbiota ruminal estável durante o período de transição de uma dieta de forragem para concentrado não é imediato. No entanto, quando essa troca é inversa, substituindo-se uma dieta concentrada por dieta volumosa, também se faz necessário adaptar o ambiente ruminal a nova alimentação.

Podem-se considerar bons indicadores aquelas variáveis que tenham uma representatividade satisfatória dos processos que acontecem no sistema digestório dos ruminantes, além disso, é ideal que estas variáveis apresentem alta precisão nas análises, diminuindo a variação dos dados encontrados. Contudo o que se espera é que estes indicadores apresentem uma estabilização após um tempo de consumo de uma mesma dieta, podendo assim ser considerado que o animal esteja adaptado aquela dieta.

O modelo “broken line” aplicado aos dados do presente estudo é um modelo regressão segmentada que permite identificar o momento em que não há mais o efeito de dia do período sobre a variável em questão. Este ponto indica o momento que os processos digestivos alcançam um platô/estabilização após a troca da uma dieta e podem vir precedidos de uma linearidade crescente ou decrescente. Muito embora se tenha observado pontos de quebras para todas as variáveis, nem todas as observações realizadas (i. e.: por animal e por período alimentar) se ajustaram ao modelo proposto. Além disso, os pontos de quebras médios foram diferentes entre as variáveis, apresentando uma variação de seis até treze dias, para as variáveis alantoína e nitrogênio fecal, respectivamente (TABELA 6). Dentre todas as medidas observadas, as variáveis de consumo parecem ser as mais adequadas para indicar a adaptação de um ruminante a uma nova dieta, pois apresentaram maior número de observações que se ajustaram ao modelo de broken line: com 18, 17 e 16 observações para o CMO, CN e CFDF, respectivamente. No entanto para a retenção de nitrogênio apenas três pontos de quebra foram significativos e sequer foi possível compará-los entre as dietas. Dentre todos os parâmetros rotineiramente avaliados

em ensaios de digestibilidade, a retenção de N não constitui-se em bom indicador de adaptação a ser utilizado nestes ensaios de curta duração, pois apresenta variabilidade muito alta.

De todas as variáveis de fermentação analisadas no ensaio 2, somente as medidas de pH ruminal 4 horas após a alimentação se ajustaram ao modelo de análise segmentada, apresentando ponto de quebra aos 9 dias de alimentação. A análise de regressão segmentada para degradação, atividade enzimática e aderência bacteriana no resíduo de incubação *in situ* do feno, não foi significativa para a maior parte dos animais, não sendo possível realizar a análise variância para comparação dos pontos de quebra entre as dietas, portanto pode-se inferir que não constituem bons indicadores de adaptação a dieta.

Tabela 6 - Ponto de quebra (R, dias), número de observações (N), média (X) e probabilidade (P) de efeito das dietas dos dias de adaptação (R) sobre variáveis nutricionais¹ em ovinos alimentados com feno ou feno+concentrado (F+C)

	R		N ²	X Geral	P (efeito dieta) ³	DP
	Feno	F+C				
CMO	11,5	10,2	18	10,9	0,358	2,93
DMO 48h	9,0	11,6	9	10,7	0,414	4,37
DMO 5d	12,0	10,2	12	11,0	0,251	2,54
EFMO	11,1	12,0	15	11,6	0,501	2,32
CFDN	10,5	9,9	16	10,2	0,470	1,65
DFDN 48h	9,6	8,0	9	8,5	0,353	2,30
DFDN 5d	9,4	10,9	11	10,2	0,490	3,39
EFFDN	9,7	11,7	15	10,8	0,274	3,35
CN	11,8	10,0	17	11,0	0,194	2,68
EFN	13,2	11,4	12	12,1	0,475	4,14
EUN	9,05	8,7	9	6,6	0,075	2,68
Alantoína	6,0	13,0	9	7,5	0,037	3,41
pH jejum	9,9	7,8	8	9,1	0,196	1,97
pH aliment.	10,0	8,8	7	9,7	0,594	1,97

¹CMO, consumo de matéria orgânica; DMO, digestibilidade da matéria orgânica; EFMO, excreção fecal da matéria orgânica; CFDN, consumo de fibra em detergente neutro; DFDN, digestibilidade da de fibra em detergente neutro; EFFDN, excreção fecal de fibra em detergente neutro; CN, consumo de N; EFN, excreção fecal de N; EUN, excreção urinária de N; excreção urinária de alantoína, pH antes da alimentação e pH 4 horas após a alimentação

²N: número de dados que se ajustaram ao modelo de regressão segmentada (broken line)

³Probabilidade do erro tipo I da análise de variância

6 CONCLUSÕES

A maior parte das variáveis nutricionais avaliadas nesse estudo foram impactadas pela mudança da dieta (i.e feno ou feno+concentrado). O tempo de adaptação à nova dieta variou de seis a treze dias, independentemente do tipo de dieta. Os resultados do presente estudo indicam que o período mínimo de adaptação em ensaios de digestibilidade *in vivo* deveria ser de 14 dias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 7, p. 1598–1624, jul., 2000.

ALLEN, M. S. Physical constraints on voluntary intake of forage by ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 12, p. 3063–3075, dec, 1996.

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

BALCH, C. C.; CAMPLING, R. C. Rate of passage of digesta through the ruminant digestive tract. In: DOUGHERTY, R. W. **Physiology of digestion in the ruminant**. Washington: Butterworths, 1965. p. 108-123.

BARGO, F.; MULLER L.D.; KOLVER E.S. et al. Invited review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n. 1, p.1-42, jan., 2003.

BARNES, R. F. Variability within and among Experiment Stations in the Determination of In Vivo Digestibility and Intake of Alfalfa. **Journal of animal Science**, Champaign, v. 27, n. 2, p. 519-524, mar., 1968.

BEVANS, D.W.; BEAUCHEMIN, K.A.; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN; MCKINNON, J.J.; MCALLISTER, T.A. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.83, n.5, p.1116-1132, may., 2005.

BLAXTER, K. L., GRAHAM, N. McC, WAINMAN, F.W. Some observations on the digestibility of food by sheep and on related problems. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v 10, n. 2, p 69-91, may, 1956.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York., v.72, n. 1/2, p.248-254, may, 1976.

BRÂNCIO, P. A.; EUCLIDES, V. P. B.; NASCIMENTO JÚNIOR, D. et al. Avaliação de três cultivares de Panicum maximum Jacq. sob pastejo: Comportamento ingestivo de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, n.5, p.1045-1053, 2003.

BROBECK, J. R. Food intake as a mechanism of temperature regulation. **Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, v. 20, n. 6, p. 545-552, jul., 1948.

BROSSARD, L.; MARTIN, C.; MICHALET-DOREAU, B. Ruminal fermentative parameters and blood acid-basic balance changes during the onset and recovery of induced latent acidosis in sheep. **Animal Research**, v.52, n. 6, p.513-530, nov/dec., 2003.

BURROUGHS, W , GERLAUGH, P.AND BETHKE, R. M. The influence of casein upon roughage digestion in cattle with rumen bacterial studies. **Journal of animal Science**, Champaign , v. 9, n. 2, p. 207-213, may., 1950.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – An overview of the technical details. **International Feed Resources Unit Rowett Research Institute**, Rowett Research Institute, Aberdeen. p.22. 1992

COCHRAN, R. C.; GALYEAN, M. L. Measurement of in vivo forage digestion by ruminants. In: G. C. Fahey, Jr., M. Collins, D. R. Mertens, and L. E. Moser (ed.) **Forage Quality, Evaluation and Utilization**, p 613–643. 1994.

COE, M. L.; NAGARAJA, T. G.; SUN, Y. D., et al. Effect of Virginamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, no. 8, p. 2259–2268, ago., 1999.

DIJKSTRA J.; BOER H.; VAN BRUCHEM J., et al. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH, and rumen liquid volume. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 69, n. 2, p. 385–396, mar., 1993.

DIJKSTRA, J.; ELLIS, J. L.; KEBREAB, L., et al. Ruminal pH regulation and nutritional consequences of low pH. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 172, n. 1/2, p. 22 – 33, feb., 2012.

DONEFER, E. Collaborative in vivo studies on alfalfa hay. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 25, n. 4, p. 1227-1232, nov., 1966.

FARENZENA, F.; KOZLOSKI, G. V.; MEZZOMO, M. P., et al. Forage degradability, rumen bacterial adherence and fibrolytic enzyme activity in vitro: effect of pH or

glucose concentration. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 152, n. 02, p. 325-332, apr., 2014.

FERNANDO, S. C.; PURVIS I. I.; NAJAR, H. T., et al. Rumen Microbial Population Dynamics during Adaptation to a High-Grain Diet. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v.76, n. 22, p. 7482–7490, nov., 2010.

FORBES, J. M. Interrelationships between physical and metabolic control of voluntary food intake in fattening, pregnant and lactating mature sheep: a model. **Animal Production**, Bletchley, v. 24 , n. 1, p. 91-101, feb, 1977.

FORBES, J. M. **The voluntary food intake and diet selection of farm animals**. Wallingford: CAB International, 532 p, 1995.

FORBES, J. M.; PROVENZA, F. D. Integration of learning and metabolic signals into a theory of dietary choice and food intake. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON RUMINANT PHYSIOLOGY, 9, 2000, Wallingford. **Proceedings...** Wallingford: CAB Internacional, 2000.

FOX, D.G.; SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. III. Cattle requirements and diets adequacy. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.70, n.11, p.3578-3596, nov., 1992.

GOAD, D. W., C. L. GOAD, AND T. G. NAGARAJA. Ruminant microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 234–241, jan., 1998.

GRANT, R. J.; MERTENS, D.R. Influence of buffer pH and raw corn starch addition on in vitro fibre digestion kinetics. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 10, p. 2762-2768, Oct. 1992

GRIGSBY, K. N. et al. Combinations of starch and digestible fibre in supplements for steers consuming a low-quality bromegrass hay diet. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 4, p. 1057–1064, apr. ,1993.

HADDAD, S. G.; GRANT, R. J. Influence of nonfibre carbohydrate concentration on forage fibre digestion in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 86, n. 1 - 2, p. 107– 115, jul, 2000.

HART, S.P. Associative effects of sorghum silage and sorghum grain diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 6, p. 1179-1789, jun., 1987.

HOOVER, W. H.; STOKES, S. R. Balancing Carbohydrates and Proteins for Optimum Rumen Microbial Yield. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3630-3644, oct, 1991.

HUHTANEN, P.; KHALILI, H. Sucrose supplements in cattle given grass silage-based diet. 3. Rumen pool size and digestion kinetics. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v, 33, n. 3-4, p. 275 - 287, June, 1991.

_____. The effect of sucrose supplements on particle-associated carboxymethyl cellulase (EC 3.2.1.4) and xylanase (EC 3.2.1.8) activities in cattle given grass-silage-based diet. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 67, n. 2, p. 245 - 255, mar., 1992.

INGVARTSEN, K. L.; J. B. ANDERSEN. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 7, p. 1573-1597, july., 2000.

KENNEDY, G. C. The Role of Depot Fat in the Hypothalamic Control of Food Intake in the Rat. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 140, n. 901, p. 578-592, jan, 1953.

KOZLOSKI, G.V. SANCHEZ, L. M. B.; CADORIN JR., R.L., et al. Intake and digestion by lambs fed just dwarf elephant grass hay (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Mott) or supplemented with urea and different levels of cracked corn grain. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 125, n. 1 -2, p. 111 - 122, Jan., 2006a.

KOZLOSKI, G. V.; NETTO D. P.; SANCHEZ, L. M. B., et al., Nutritional value of diets based on a low-quality grass hay supplemented or not with urea and levels of cassava meal. **African Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 3, p. 038-046, oct., 2006b

KOZLOSKI, G. V.; SANCHEZ, L. M. B.; HÄRTER, C. J. et al., Níveis de fibra em detergente neutro na dieta de cordeiros: consumo, digestibilidade e fermentação ruminal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n.5, p. 893-900, oct, 2006c.

KOZLOSKI, G. V.; REFFATTI, M. V.; SANCHEZ, L. M. B., et al. Intake and digestion by lambs fed a low-quality grass hay supplemented or not with urea, casein or

cassava meal. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 136, n.3-4, p. 191-202, aug., 2007.

KOZLOSKI, G. V.; CADORIN JR, R. L.; HÄRTER, C. J., et al. Effect of supplemental nitrogen source and feeding frequency on nutrient supply to lambs fed a kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) hay-based diet. **Small Ruminant Research**, Amsterdam v. 81, n. 2, p. 112-118, feb., 2009.

LLOYD, L. E.; ECKHAM, H. E. P.; CRAMPTON, E. W. The effect of change of the ration on the required length of preliminary feeding period in digestion trials with sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 15, n. 3, p. 846-853, aug., 1956.

MAYER, J. Glucostatic Mechanism of Regulation of Food Intake. **New England Journal of Medicine**, v. 249, p.13-16, n. 1. July, 1953.

MERCHEN, M.R. Digestion, absorption and excretion in ruminants. In: D.C. Church (ed.), **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. Prentice Hall, Englewood Cliffs. N.J., p. 172-201, 1988.

MERTENS, D.R. Análise da fibra e sua utilização na avaliação de alimentos e formulação de rações. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES, 1992, Lavras. Lavras: UFLA, p.188-219, 1992.

MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: FAHEY, G.C. (Ed.) **Forage quality, evaluation and utilization**. 1.ed. Madison: American Society of Agronomy p.450-493. 1994.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: a collaborative study. **Journal of AOAC**. Washington, v. 85, n. 6, p. 1217 - 1240, Nov./Dec, 2002.

MILLER, G. L.; BLUM, R.; GLENNON; W.E., et al. Measurement of carboxymethylcellulase activity. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 1, n. 2, p. 127-132, 1960.

MONTEILS, V.; REY, M.; CAUQUIL, L., et al. Random changes in the heifer rumen in bacterial community structure, physico-chemical and fermentation parameters, and in vitro fibre degradation. **Livestock Production Science**, Amsterdam, vol. 141, n. 2-3, p. 104-112, nov., 2011.

MOORE, J. E. Forage crops. In: HOVELAND, C.S. (Ed.). **Crop quality, storage, and utilization**. Madison: Crop Science Society of America, 227 p., 1980.

MOULD, F. L. Associative effects of feeds. In: **Feed Science World**. Animal Science, B4, pp. 279–292 [ER Ørskov, editor]. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV., Amsterdam, v.40, p.279-292, 1988.

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

NASCIMENTO, P. M. L.; FARJALLA, Y. B.; Nascimento, J. L. Consumo voluntário de bovinos. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 10, n. 10, Oct., 2009.

National Research Council. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7.ed. Washington, DC: National Academy Press, 242 p., 1996.

NICHOLSON, J. W. G.; HAYNES, E. H.; WARNER, R. G., et al. Digestibility of various rations by steers as influenced by the length of preliminary feeding trial. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 15, n. 4, p.1172-1179, nov., 1956.

ØRSKOV, E.R. Protein nutrition in ruminants. London: Academic Press. 160 p.,1982.

OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. Ruminal Fermentation. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **The Ruminant Animal: digestive physiology and nutrition**. 5.ed. New Jersey: Englewood, Cliffs, p.145-171, 1993.

OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; HILL, W. J., et al. Acidosis in cattle: A review. **Journal of Animal Science**, Champaign , v. 76, n. 1, p. 275-286, jan., 1998.

PRAUCHNER, C. A.; KOZLOSKI, G. V.; FARENZENA, R. Evaluation of sonication treatment and buffer composition on rumen bacteria protein extraction and carboxymethylcellulase activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 7, p. 1733-1736 , May, 2013

PROVENZA, F.D.; VILLALBA, J.J.; DZIBA, L.E. et al. Linking herbivore experience, varied diets, and plant biochemical diversity. **Small Ruminant Research**, v.49, p.257–274, 2003.

RAYMOND, W. F. The Nutritive Value Of Forage Crops. **Advances in Agronomy**, v. 21, n. null, p. 1-108, 1969.

ROBBINS, K.L. A method, SAS program, and example for fitting the broken-line to growth data. Tennessee: University of Tennessee, Agricultural Experiment Station, 1986. 8p. (Research Report 86/09).

SAS. Institute Inc. **SAS language reference**. Version 9.2. Cary, NC: SAS institute. 2009.

SCHNEIDER, B. H.; FLATT, W. P. The Evaluation of Feeds Through Digestibility Experiments . University of Georgia Press, Athens, USA, 423 pp. 1975.

SCHNEIDER, B. H.; LUCAS, H. L. The magnitude of certain sources of variability in digestibility data. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 9, n. 4, p. 504–512, nov., 1950.

SENGER, C.; KOZLOSKI, G. V.; SANCHEZ, L. M. B., 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. 169–174, sep., 2008

STAPLES, G. E.; DINUSSON, W. E. A comparison of the relative accuracy between seven-day and ten-day collection periods in digestion trials. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 10, n. 1, p. 244-250, jan., 1951.

STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; BRYANT, M. P. The rumen bacteria. In: **The rumen microbial ecosystem**. 2nd ed. London: [s.n.], 719 p., 1997.

TAJIMA, K; AMINOV, R.I.; NAGAMINE, T., et al. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed wthi real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 6, p. 2766-2744, 2001.

VAN SOEST, P .J. **Nutritional ecology of the ruminant**, 2nd ed. New York: Cornell University Press, 1994. 476 p.

VAN SOEST, P.J. 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, aug., 1965.

VILLALBA, J. J.; PROVENZA, F. D.; STOTT, R. Rumen distension and contraction influence feed preference by sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 1, p.340-350, jan., 2009.

WANG, H.R.; WANG, M.Z., YU L.H. Effects of dietary sources on the microorganisms and fermentation of goats. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.8, n.7, p.1392-1401, 2009.

ANEXOS

Anexo A - Gráfico do consumo de matéria orgânica (ensaio 1)

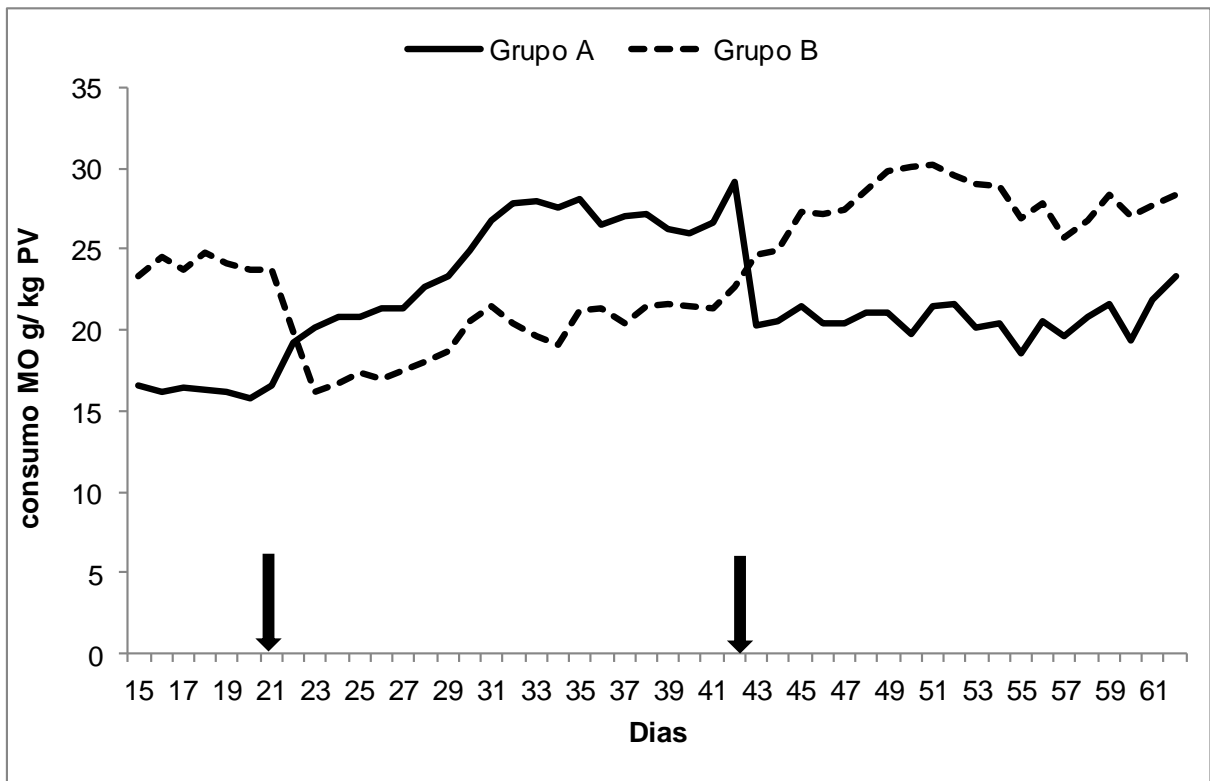


Figura A- Consumo de matéria orgânica diário por ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21º dia (d) do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22º ao 42º d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43º ao 63º d: os grupos retornavam a sua dieta inicial. Setas indicam as trocas de dietas. n=5 por grupo.

Anexo B - Gráfico da digestibilidade da matéria orgânica (ensaio 1)

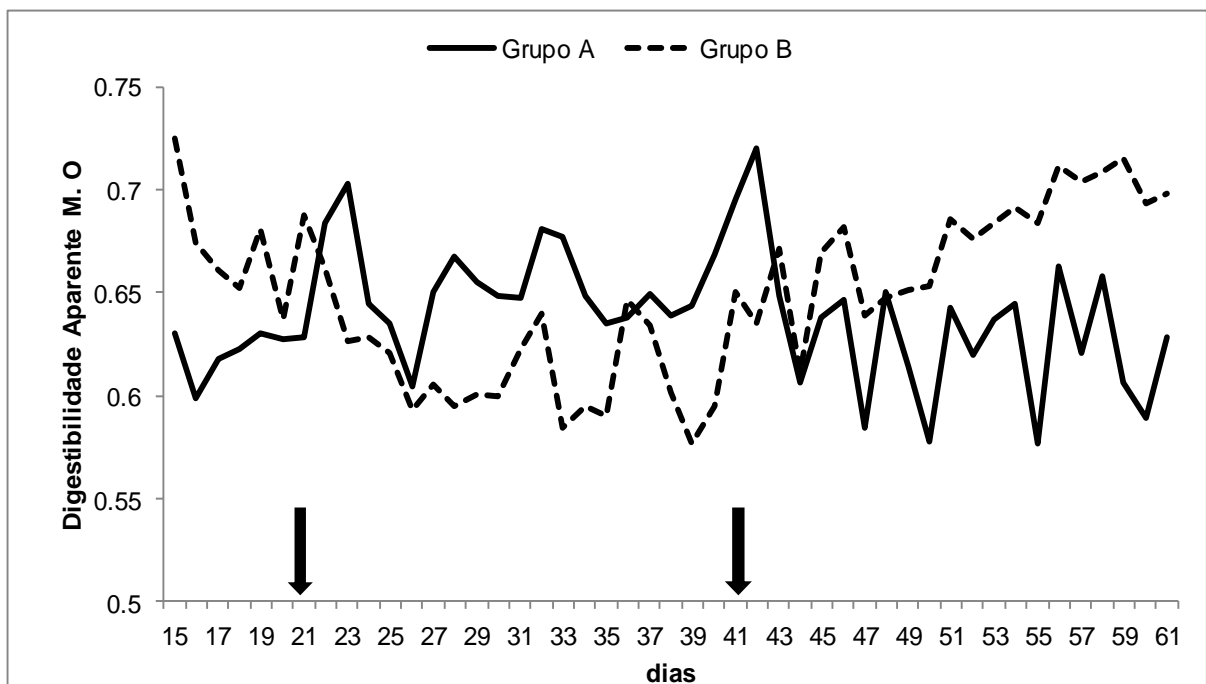


Figura B1 – Digestibilidade aparente da matéria orgânica diária (calculada com base na excreção fecal diária após 48 h do consumo do alimento) em ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21º dia (d) do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22º ao 42º d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43º ao 63º d: os grupos retornavam a sua dieta inicial. Setas indicam as trocas de dietas.. n=5 por grupo.

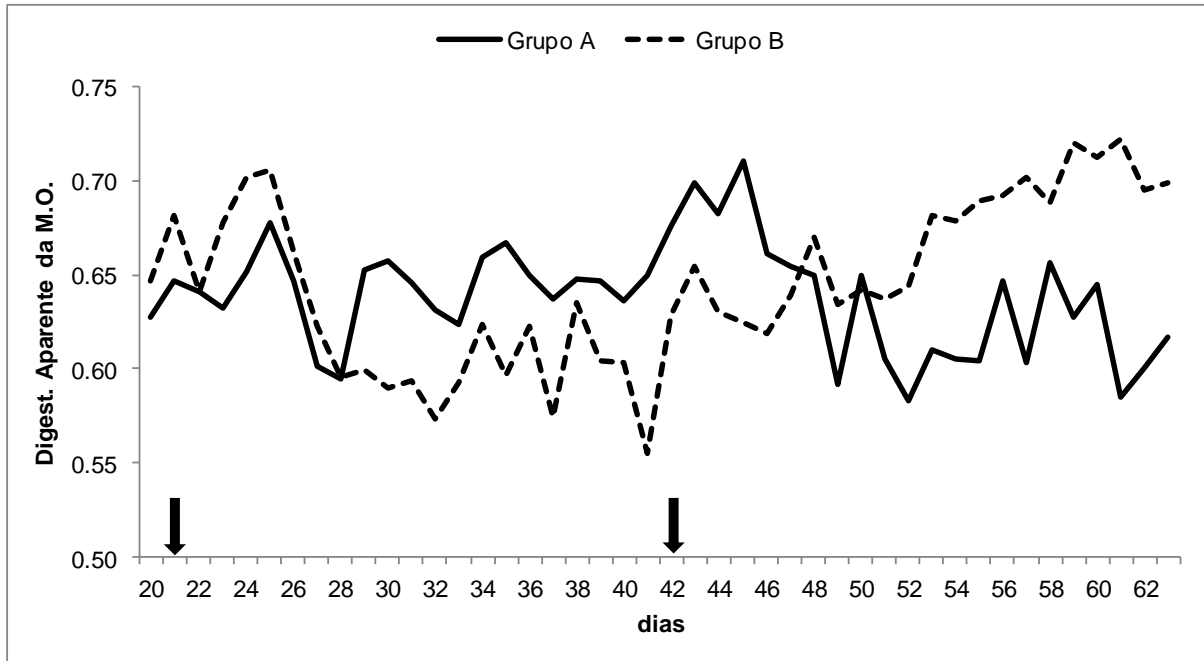


Figura B2 – Digestibilidade aparente da matéria orgânica diária (calculada com base no consumo médio de 5 dias e excreção fecal do 6º dia) em ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21º dia (d) do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22º ao 42º d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43º ao 63º d: os grupos retornavam a sua dieta inicial. Setas indicam as trocas de dietas.. n=5 por grupo.

Anexo C - Gráfico da excreção fecal de matéria orgânica (ensaio 1)

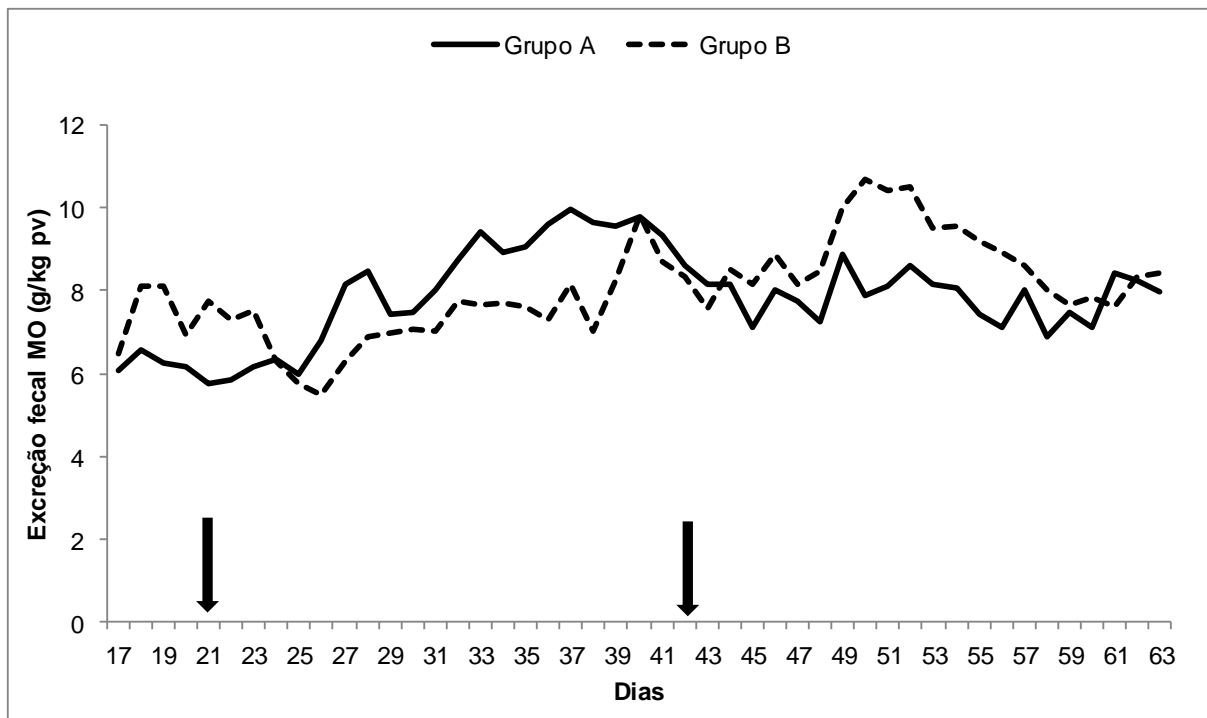


Figura C – Excreção fecal de matéria orgânica por ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21º dia (d) do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22º ao 42º d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43º ao 63º d: os grupos retornavam a sua dieta inicial. Setas indicam as trocas de dietas. n=5 por grupo.

Anexo D - Gráfico do consumo de fibra em detergente neutro (ensaio 1)

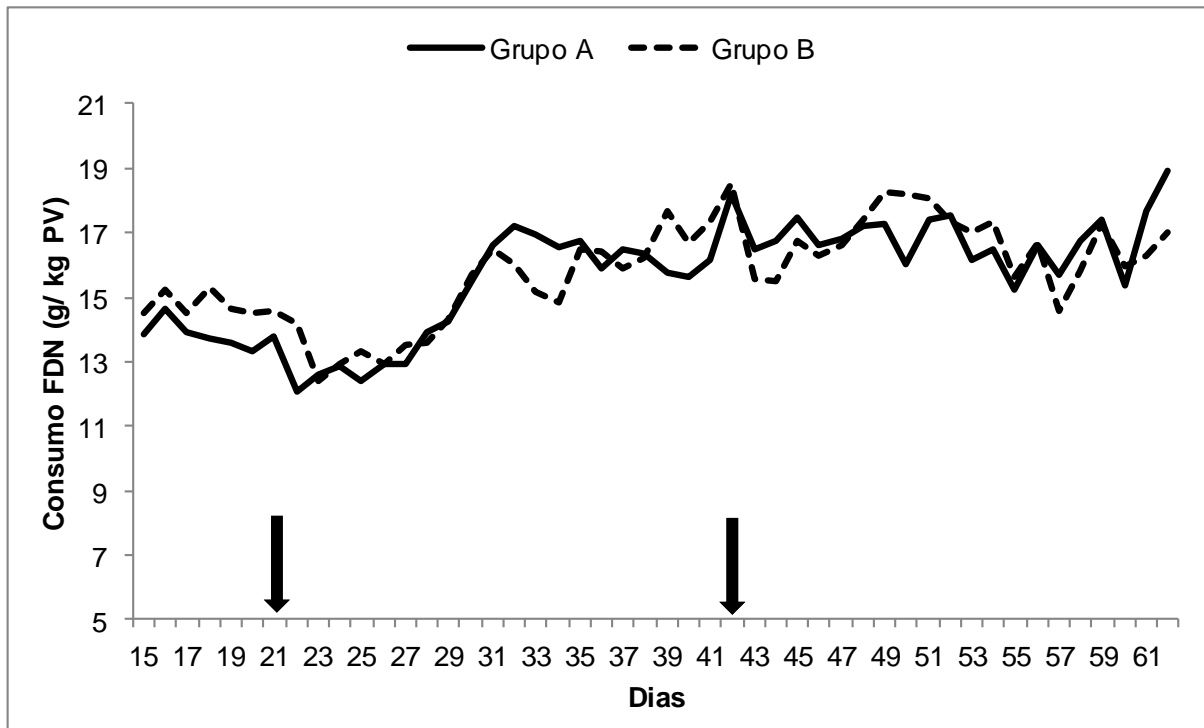


Figura D - Consumo de fibra em detergente neutro por ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21^o dia (d) do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22^o ao 42^o d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43^o ao 63^o d: os grupos retornavam a sua dieta inicial. Setas indicam as trocas de dietas. n=5 por grupo.

Anexo E - Gráficos da digestibilidade da fibra em detergente neutro (ensaio 1)

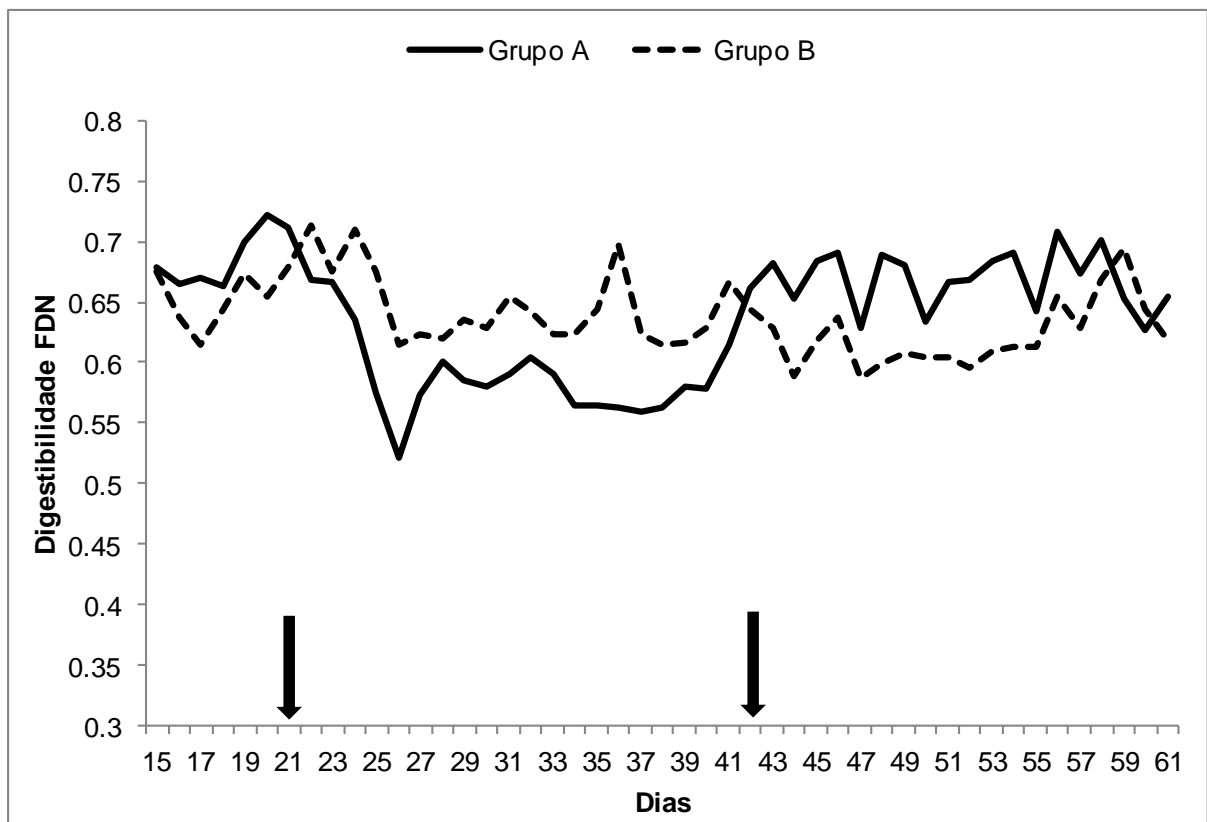


Figura E1 - Digestibilidade da fibra em detergente neutro (calculada com base na excreção fecal diária após 48 h do consumo do alimento) em ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21º dia (d) do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22º ao 42º d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43º ao 63º d: os grupos retornavam a sua dieta inicial. Setas indicam as trocas de dietas. n=5 por grupo.

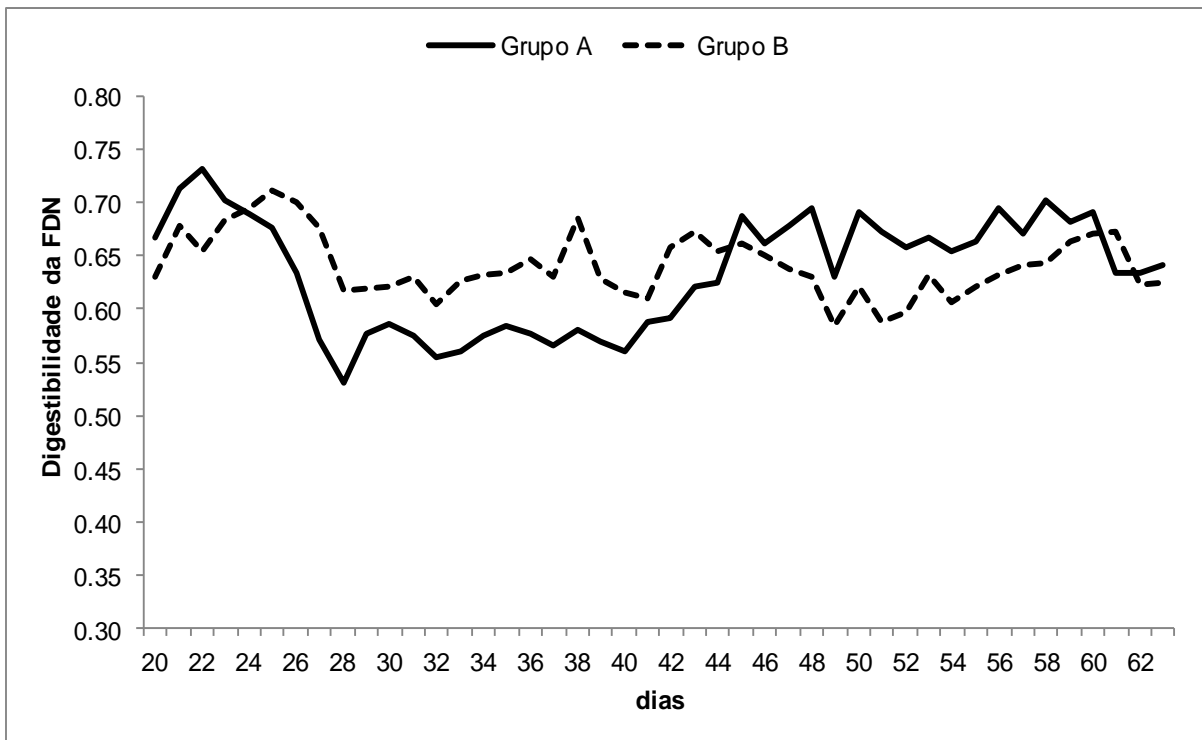


Figura E2 - Digestibilidade da fibra em detergente neutro (calculada com base no consumo médio de 5 dias e excreção fecal do 6º dia) em ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21º dia (d) do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22º ao 42º d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43º ao 63º d: os grupos retornavam a sua dieta inicial. Setas indicam as trocas de dietas. n=5 por grupo.

Anexo F - Gráfico da excreção fecal da fibra em detergente neutro (ensaio 1)

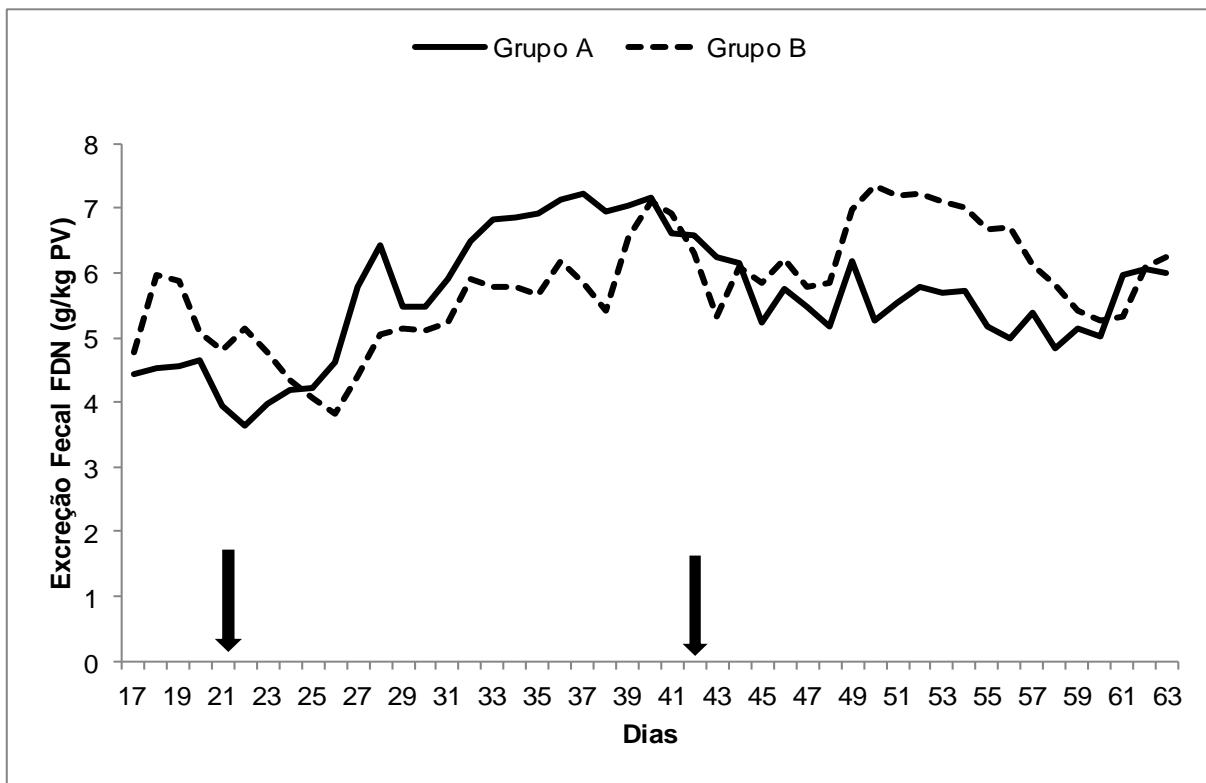


Figura F - Excreção fecal de fibra em detergente neutro por ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21º (d) dia do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22º ao 42º d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43º ao 63º d: os grupos retornavam a sua dieta inicial. Setas indicam as trocas de dietas. n=5 por grupo.

Anexo G - Gráfico do consumo de Nitrogênio (ensaio 1)

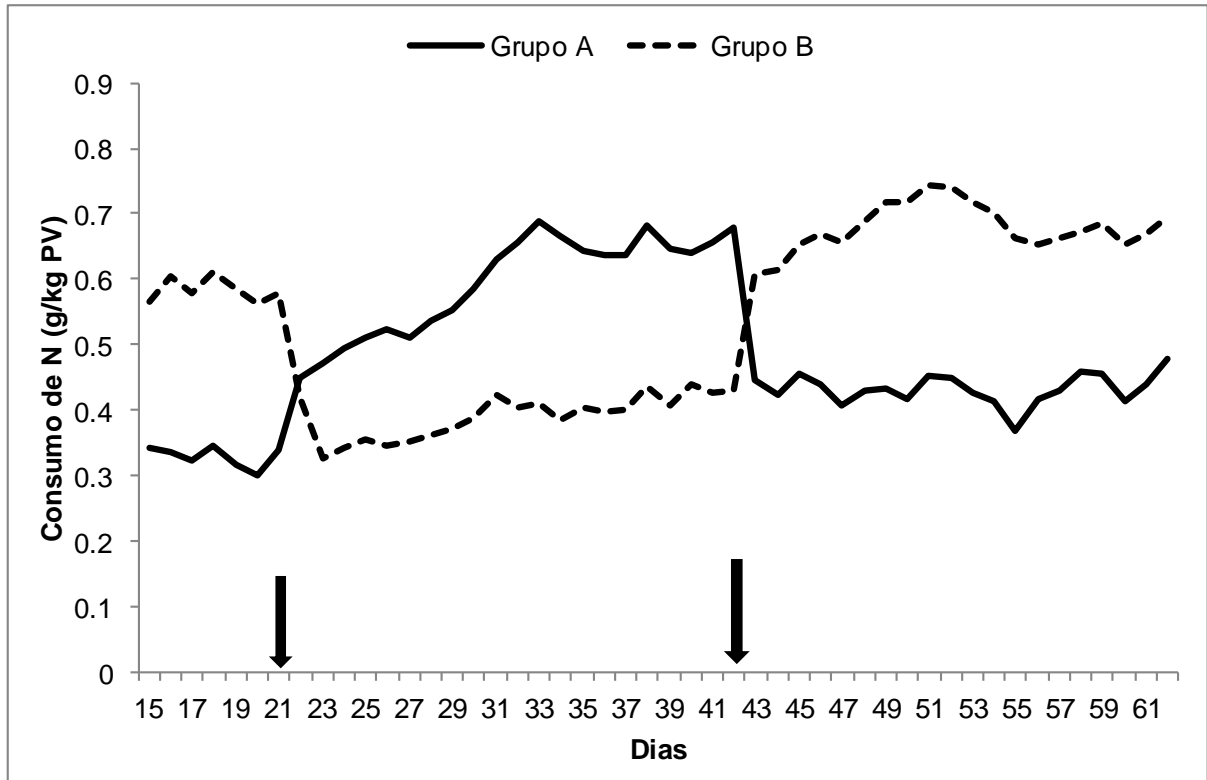


Figura G – Consumo de N por ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21^o (d) dia do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22^o ao 42^o d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43^o ao 63^o d: os grupos retornavam a sua dieta inicial. Setas indicam as trocas de dietas. n=5 por grupo.

Anexo H - Gráfico da excreção fecal de Nitrogênio (ensaio 1)

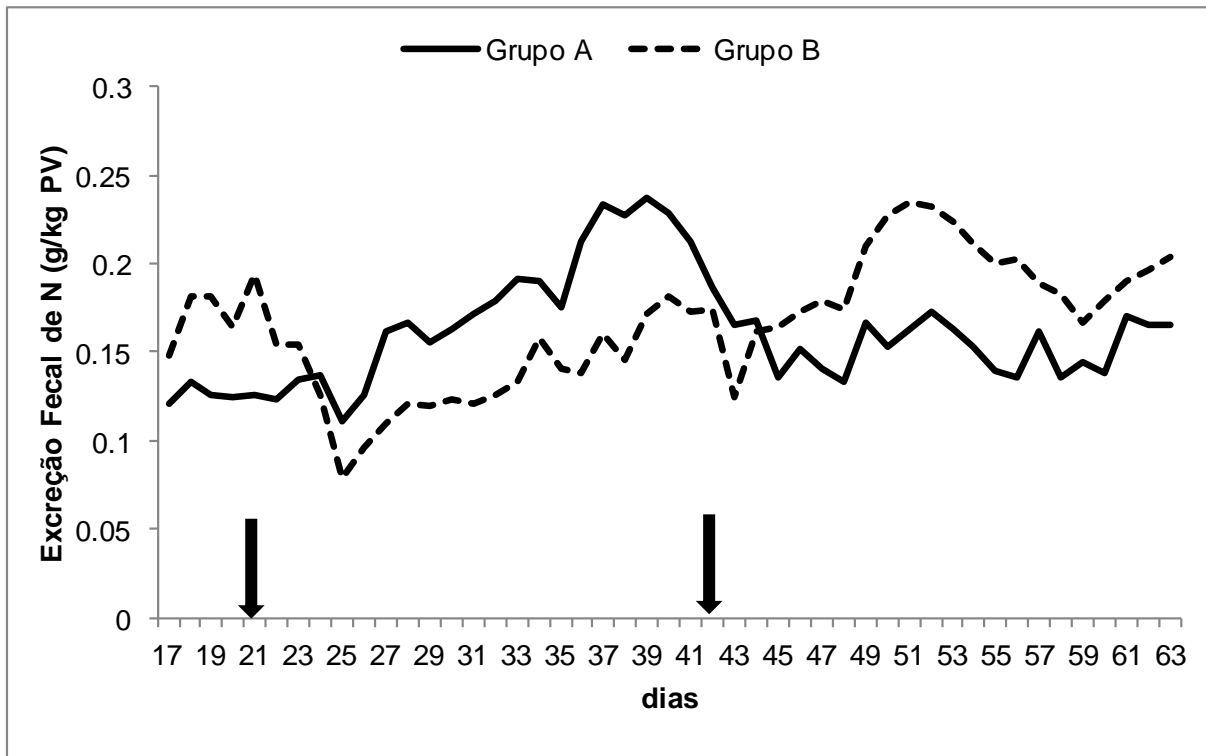


Figura H - Excreção fecal de N por ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21º (d) dia do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22º ao 42º d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43º ao 63º d: os grupos retornavam a sua dieta inicial. Setas indicam as trocas de dietas. n=5 por grupo.

Anexo I - Gráfico da retenção de Nitrogênio (ensaio 1)

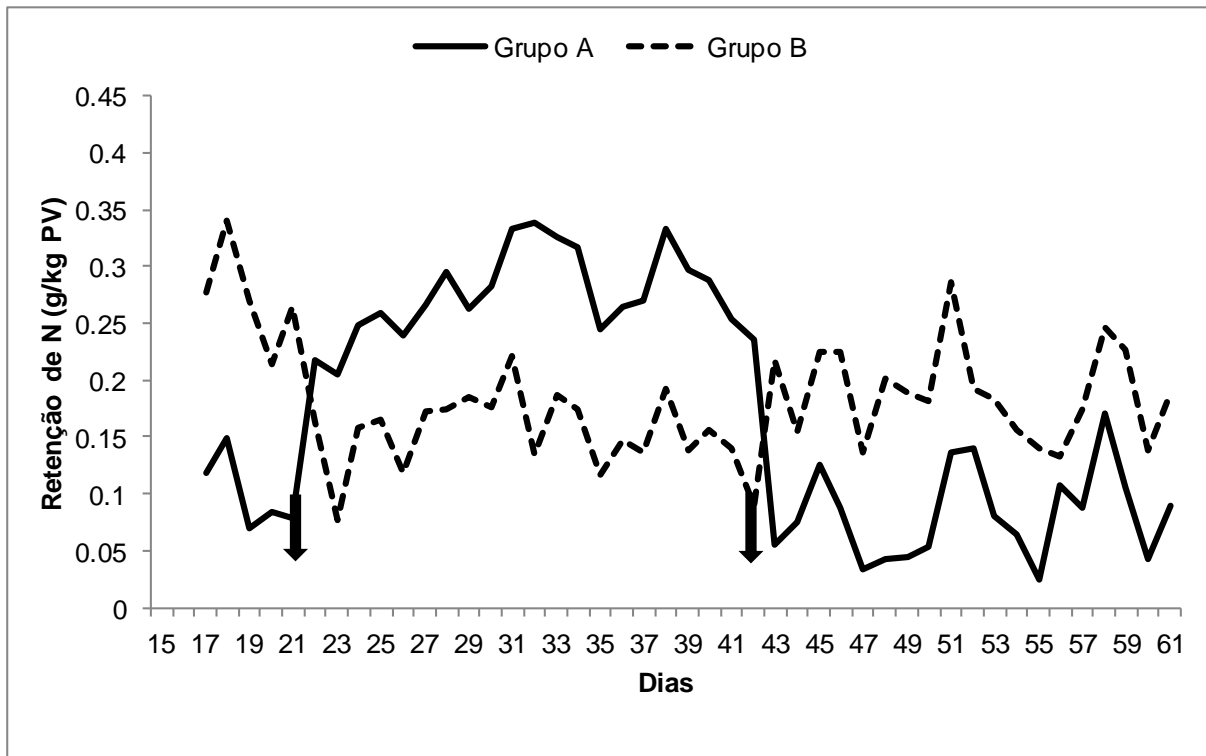


Figura I - Retenção de N por ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21º (d) dia do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22º ao 42º d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43º ao 63º d: os grupos retornavam a sua dieta inicial. Setas indicam as trocas de dietas. n=5 por grupo.

Anexo J - Gráfico da excreção urinária de N (ensaio 1)

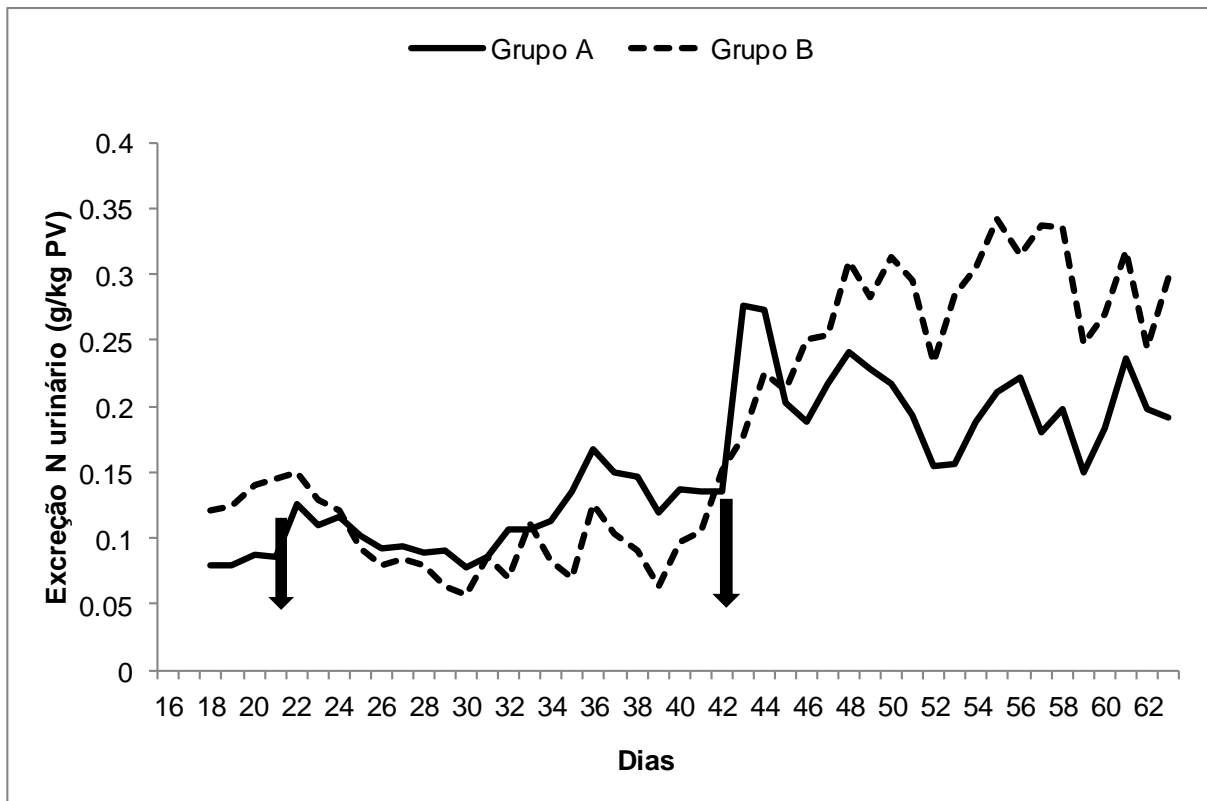


Figura J - Excreção urinária de N por ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21º (d) dia do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22º ao 42º d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43º ao 63º d: os grupos retornavam a sua dieta inicial. Setas indicam as trocas de dietas. n=5 por grupo.

Anexo L - Gráfico da excreção urinária de alantoína (ensaio 1)

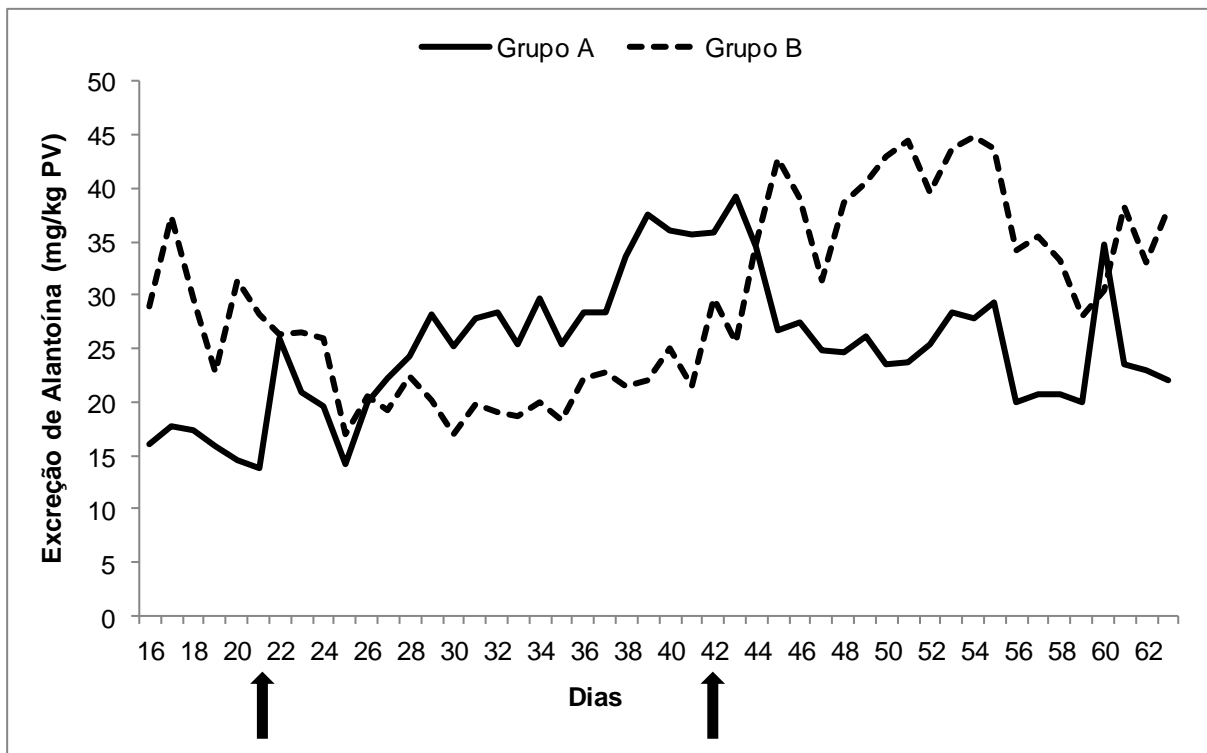


Figura L - Excreção urinária de alantoína por ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21^o (d) dia do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22^o ao 42^o d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43^o ao 63^o d: os grupos retornavam a sua dieta inicial. Setas indicam as trocas de dietas. n=5 por grupo.

Anexo M - Gráfico da degradação ruminal da matéria parcialmente seca (ensaio 2)

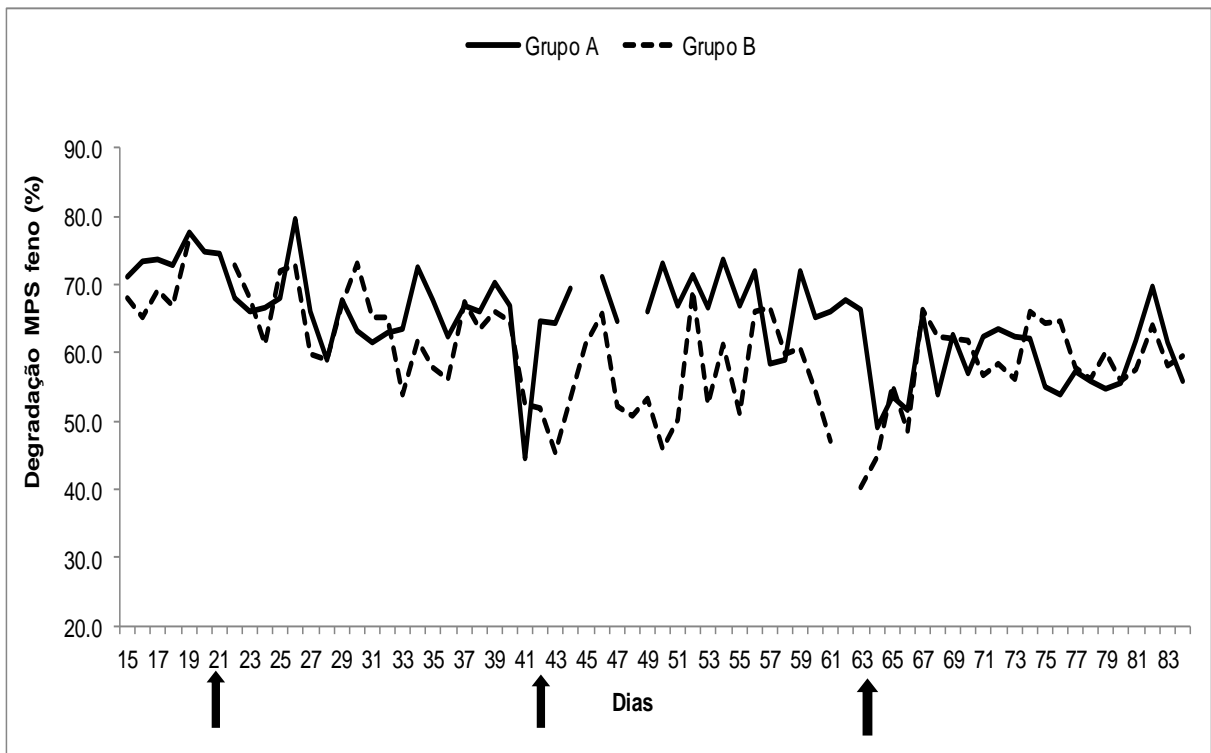


Figura M – Degradação ruminal da matéria parcialmente seca de feno por ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21^o (d) dia do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22^o ao 42^o d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43^o ao 63^o d: os grupos retornavam a sua dieta inicial; 64^o ao 84^o d: os grupos voltaram a receber a segunda dieta. Setas indicam as trocas de dietas. n=4 por grupo.

Anexo N - Gráfico da aderência bacteriana ruminal (ensaio 2)

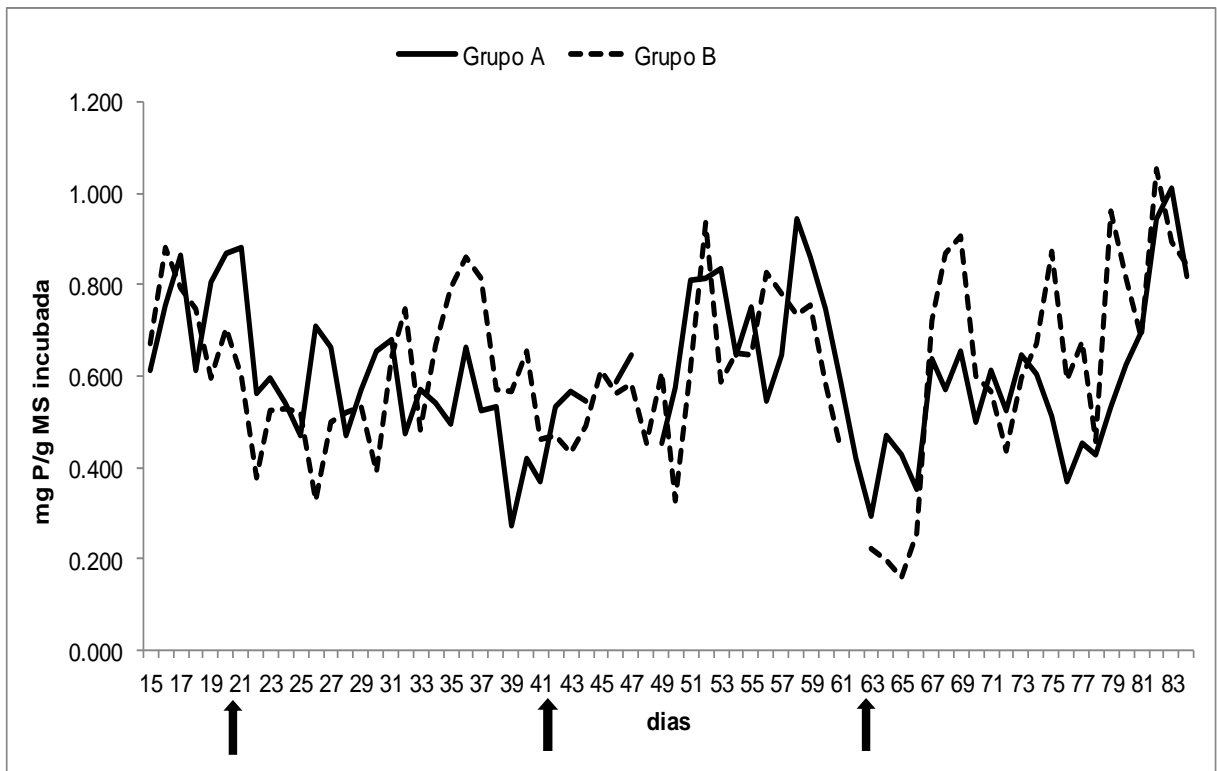


Figura N – Aderência bacteriana ruminal em ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21º (d) dia do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22º ao 42º d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43º ao 63º d: os grupos retornavam a sua dieta inicial; 64º ao 84º d: os grupos voltaram a receber a segunda dieta. Setas indicam as trocas de dietas. n=4 por grupo.

Anexo O - Gráficos da atividade enzimática bacteriana ruminal (ensaio 2)

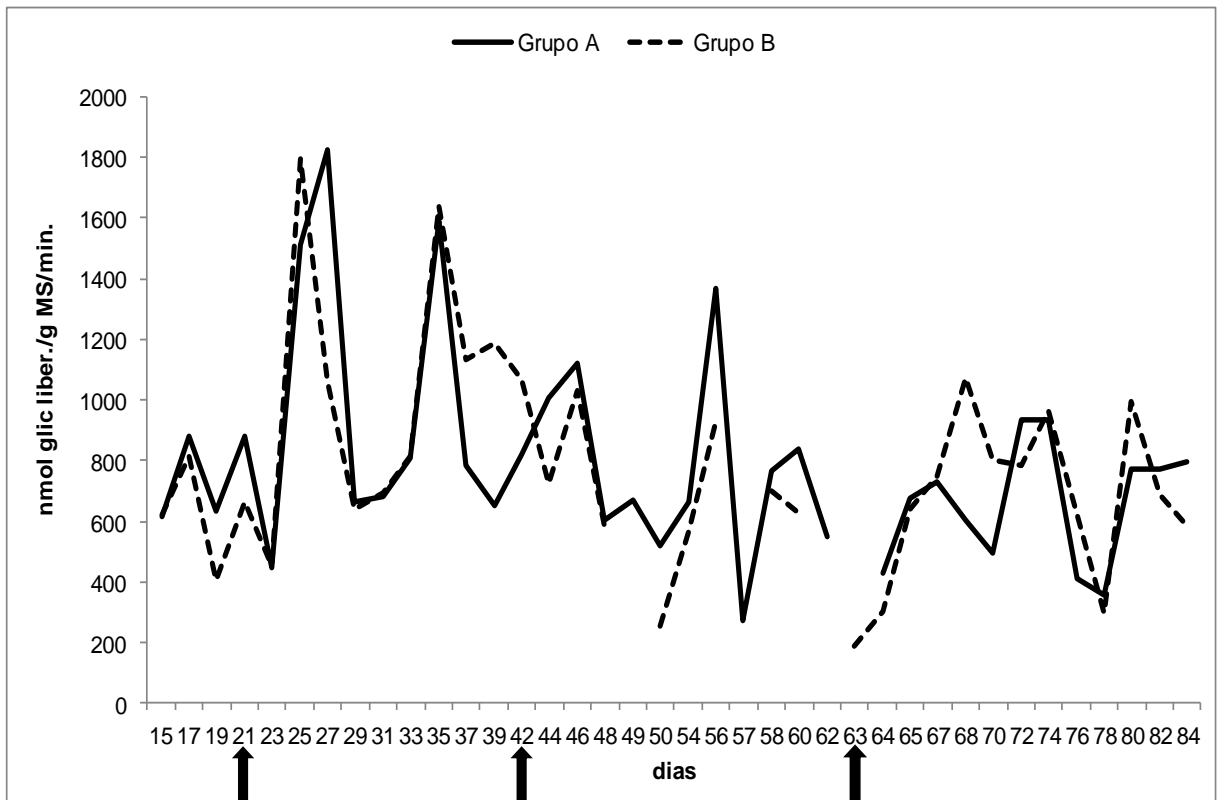


Figura O1 – Atividade enzimática bacteriana ruminal, expressa na MS, em ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21º (d) dia do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22º ao 42º d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43º ao 63º d: os grupos retornavam a sua dieta inicial; 64º ao 84º d: os grupos voltaram a receber a segunda dieta. Setas indicam as trocas de dietas. n=4 por grupo

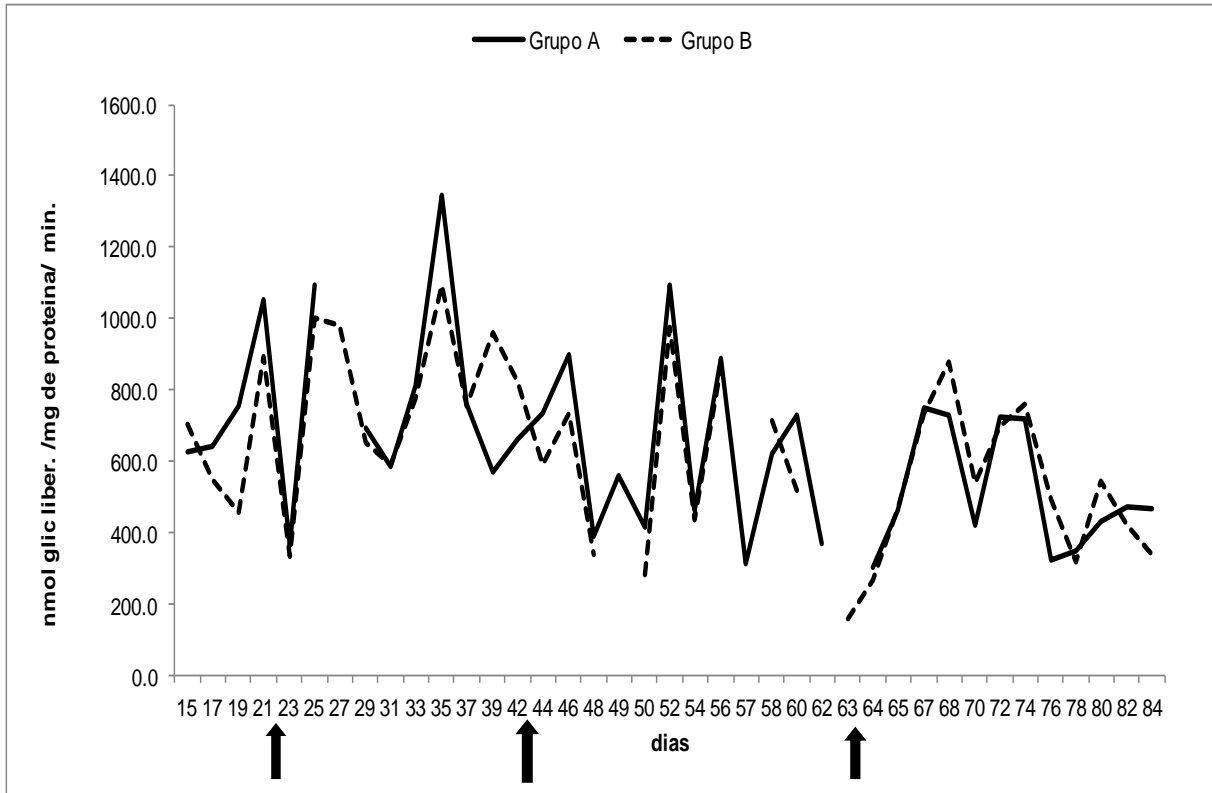


Figura O2 – Atividade enzimática bacteriana ruminal, expressa por mg de proteína, em ovinos consumindo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21º (d) dia do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22º ao 42º d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43º ao 63º d: os grupos retornavam a sua dieta inicial; 64º ao 84º d: os grupos voltaram a receber a segunda dieta. Setas indicam as trocas de dietas. n=4 por grupo

Anexo P - Gráficos do pH ruminal (ensaio 2)

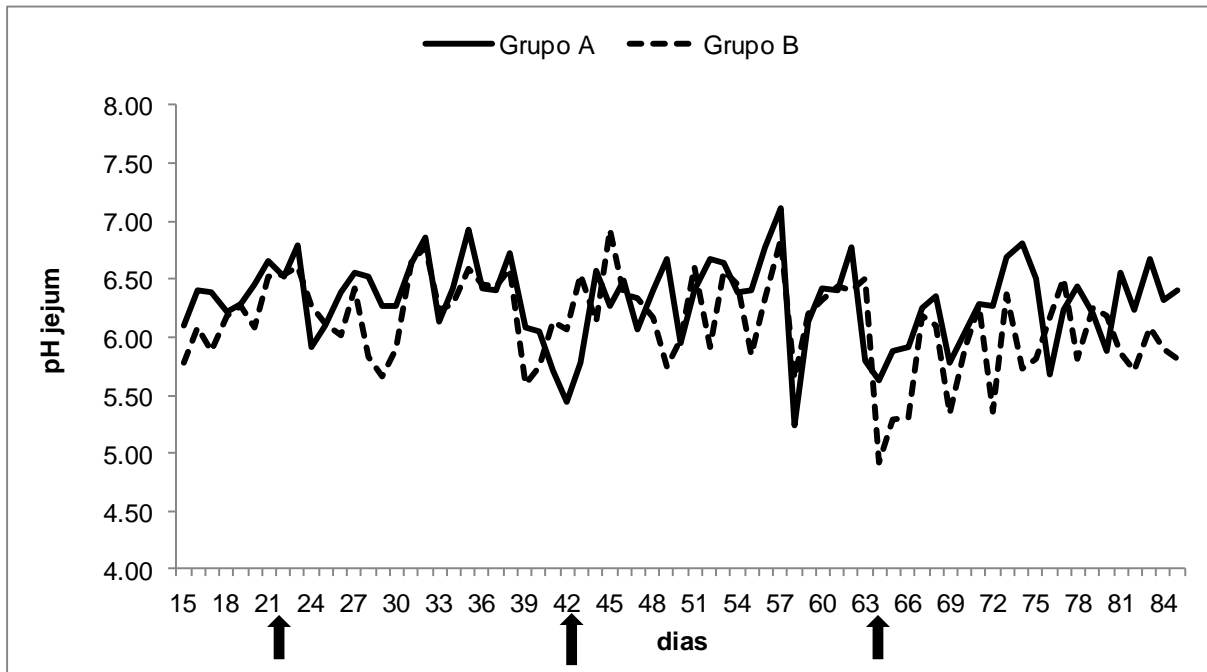


Figura P1 – ph ruminal de ovinos em jejum alimentados com dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21º (d) dia do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22º ao 42º d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43º ao 63º d: os grupos retornavam a sua dieta inicial; 64º ao 84º d: os grupos voltaram a receber a segunda dieta. Setas indicam as trocas de dietas. n=2 por grupo

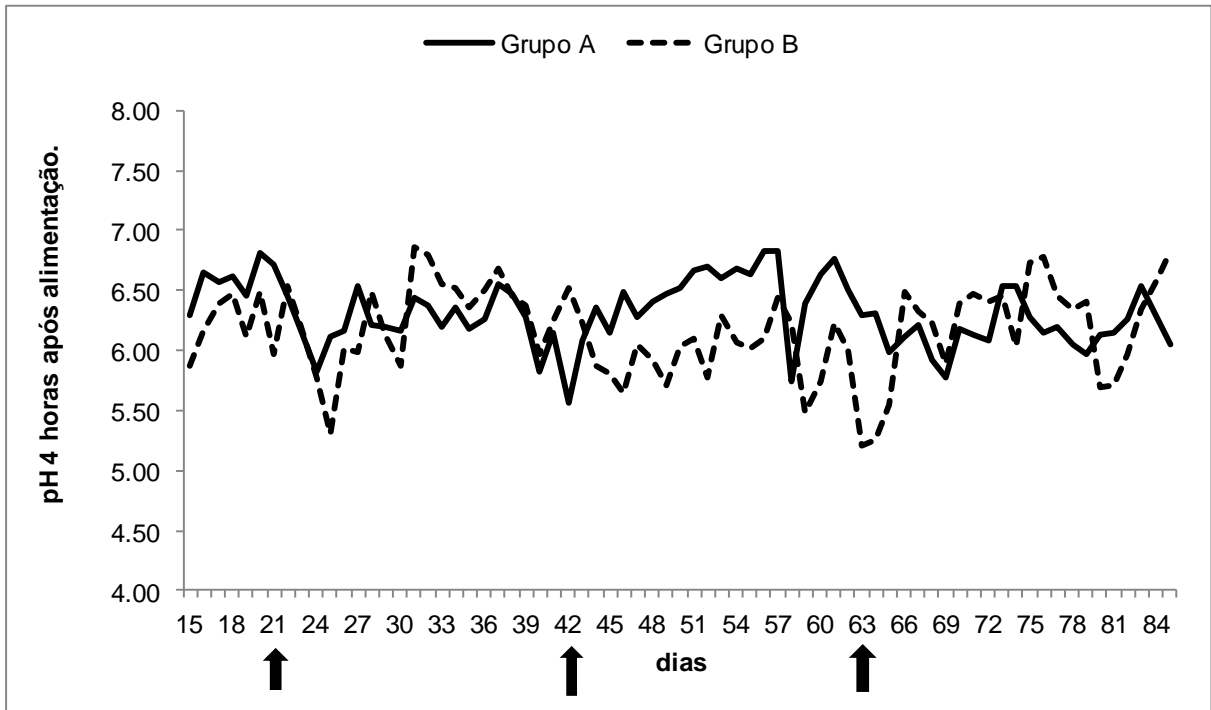


Figura P2– pH ruminal de ovinos 4 horas após a alimentação recebendo dois tipos de dietas, divididos em dois grupos de alimentação. Até o 21^o (d) dia do período experimental: grupo A consumindo feno e grupo B, feno + concentrado; do 22^o ao 42^o d: grupo A Feno + concentrado e grupo B feno; do 43^o ao 63^o d: os grupos retornavam a sua dieta inicial; 64^o ao 84^o d: os grupos voltaram a receber a segunda dieta. Setas indicam as trocas de dietas. n=2 por grupo

Anexo Q - modelo de input do SAS para a análise de Broken Line

Consumo de matéria orgânica do animal 11, no segundo período experimental

```

Data G1;
options formdlim='*';
input G A D Per Diarel D CMO;
cards;
A    11    FC    2    1    22    20.8
A    11    FC    2    2    23    22.1
A    11    FC    2    3    24    22.9
A    11    FC    2    4    25    20.3
A    11    FC    2    5    26    22.3
A    11    FC    2    6    27    21.6
A    11    FC    2    7    28    24.3
A    11    FC    2    8    29    23.9
A    11    FC    2    9    30    25.6
A    11    FC    2    10   31    28.3
A    11    FC    2    11   32    29.8
A    11    FC    2    12   33    28.1
A    11    FC    2    13   34    27.7
A    11    FC    2    14   35    28.7
A    11    FC    2    15   36    25.5
A    11    FC    2    16   37    27.2
A    11    FC    2    17   38    26.8
A    11    FC    2    18   39    27.0
A    11    FC    2    19   40    27.1
A    11    FC    2    20   41    28.5
;
proc nlin data=g1; *straight broken-line;
parameters L=20 U=1 R=10;
z1= (diarel<R)*(R-diarel);
model CMO = L + U* (z1);
output out=ppp p=predy;
run;
proc gplot;
title2 'linear broken lines';
goptions hpos=35 vpos=35 ftext=swiss;
symbol1 v=dot c=black;
symbol2 i=join v=none c=black;
plot cmo*diarel  predy*diarel/overlay;
run;

```

Anexo R - modelo de out put do SAS para a análise de Broken Line

Consumo de matéria orgânica do animal 11, no segundo período experimental

```
The SAS System

The NLIN Procedure
Dependent Variable CMO
Method: Gauss-Newton

Iterative Phase
```

Iter	L	U	R	Sum of Squares
0	20.0000	1.0000	10.0000	856.4
1	27.7000	-0.4783	7.3361	156.2
2	27.2462	-0.3179	15.9972	63.0238
3	27.2831	-0.4534	12.5631	46.4972
4	27.3087	-0.7329	9.5883	43.9328
5	27.6894	-0.4852	13.3859	43.6642
6	27.2595	-0.7234	9.6777	42.4950
7	27.4795	-0.6010	11.6234	35.5540
8	27.4114	-0.7644	10.3954	33.2862
9	27.6330	-0.6597	11.9388	33.0683
10	27.5172	-0.7253	11.1015	31.1725
11	27.4926	-0.7393	10.9717	31.0394
12	27.5032	-0.7334	11.0527	31.0348
13	27.4888	-0.7415	10.9751	30.9975
14	27.4973	-0.7367	11.0381	30.9868
15	27.4862	-0.7430	10.9763	30.9762
16	27.4937	-0.7388	11.0314	30.9619
17	27.4889	-0.7415	11.0042	30.9219

18	27.4877	-0.7422	10.9975	30.9209
19	27.4883	-0.7418	11.0019	30.9177
20	27.4879	-0.7421	10.9995	30.9161
21	27.4880	-0.7420	11.0003	30.9152
22	27.4879	-0.7420	10.9998	30.9152
23	27.4880	-0.7420	11.0001	30.9150
24	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9148
25	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9148
26	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
27	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
28	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
29	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
30	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
31	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
32	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
33	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
34	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
35	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
36	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
37	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
38	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
39	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
40	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
41	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
42	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
43	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
44	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147
45	27.4879	-0.7420	11.0000	30.9147

WARNING: Step size shows no improvement.

WARNING: PROC NLIN failed to converge.

Estimation Summary (Not Converged)

Method	Gauss-Newton
Iterations	45

Subiterations	128
Average Subiterations	2.844444
R	0.198965
PPC(U)	0.115456
RPC	.
Object	1.15E-15
Objective	30.91473
Observations Read	20
Observations Used	20
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Model	2	132.4	66.2214	36.42	<.0001
Error	17	30.9147	1.8185		
Corrected Total	19	163.4			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
L	27.4879	0.4264	26.5882	28.3876
U	-0.7420	0.1485	-1.0553	-0.4288
R	11.0000	1.3680	8.1137	13.8863

The NLIN Procedure

Approximate Correlation Matrix

	L	U	R
L	1.000000	0.000000	0.4200840
U	0.000000	1.000000	0.8043997
R	0.4200840	0.8043997	1.000000

Anexo S - Modelo de gráfico do SAS para a análise de Broken Line

Consumo de matéria orgânica do animal 11, no segundo período experimental

