

**BIBIANA LIMA FONSECA**

**SUPLEMENTAÇÃO DE SILAGEM DE MILHO PARA OVINOS  
ALIMENTADOS COM DUAS OFERTAS DE SILAGEM PRÉ-  
SECADA DE AZEVÉM ANUAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito para obtenção do título de mestre.

**Orientador:** Dr. Henrique Mendonça Nunes Ribeiro Filho.

**LAGES – SC**

**2014**

F676s Fonseca, Bibiana Lima

Suplementação de silagem de milho para ovinos alimentados com duas ofertas de silagem pré-secada de azevém anual/ Bibiana Lima Fonseca. -Lages, 2014. 68p.:il.;21 cm

Orientador: Henrique Mendonça Nunes Ribeiro Filho  
Bibliografia:56-64p  
Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

1. Consumo. 2. *Loliummultiflorum*. 3. Taxa de substituição.4.*Zea mays*.I. Fonseca, Bibiana Lima. II.Ribeiro Filho, Henrique Mendonça Nunes. III.Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

CDD: 636.0852 - 20.ed.

**BIBIANA LIMA FONSECA**

**SUPLEMENTAÇÃO DE SILAGEM DE MILHO PARA OVINOS  
ALIMENTADOS COM DUAS OFERTAS DE SILAGEM PRÉ-  
SECADA DE AZEVÉM ANUAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração: Produção Animal.

**Banca Examinadora:**

Orientador: \_\_\_\_\_  
Zootecnista, Prof. Dr. Henrique M. N. Ribeiro Filho  
Universidade do Estado de Santa Catarina-UDESC

Membro: \_\_\_\_\_  
Zootecnista, Prof. Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira  
Universidade do Estado de Santa Catarina-UDESC

Membro: \_\_\_\_\_  
Eng Agrônoma, Profa. Dra. Alda Lucia Gomes Monteiro  
Universidade Federal do Paraná –UFPR

**Lages, 24 de fevereiro de 2014**

Ao meu esposo Álvaro e meus filhos  
Ana Luísa e Gonsalo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por essa oportunidade de aprimoramento intelectual e espiritual.

A minha família pelo apoio incondicional a este projeto e pela compreensão da ausência, especialmente meus pais Ana e Celso, meu esposo Álvaro e meus filhos Ana Luísa e Gonsalo.

Quero deixar um agradecimento especial ao Prof. Dr. Henrique Ribeiro Filho, pela oportunidade ímpar na minha vida profissional, por seus esclarecedores conselhos e sua disponibilidade. Meu reconhecimento pelo trabalho dedicado e competente que faz em prol da ciência.

Aos colegas e amigos que fiz nesta jornada, especialmente João Gabriel Rossini Almeida, Ederson Andrade e Gutierri Raup que colaboraram de forma decisiva na condução do experimento. À Lucélia Hans Dallastra pela amizade.

Aos colegas Daniel Schmitt, Deisy Padilha, Diego Liz, Elvis Ticiani, Gabriela Trevisan, Gabriela Guzzati, Jean Dal Pizzol, Marcolino Miguel, Tiago Alvez, pela oportunidade do convívio e por sempre estarem prontos em ajudar. Aos colaboradores do experimento Ana Paula Pinho, Bruna Miara, Bruna Renata, Cristiane Gracietti, Henrique Ramos, Maurício Camera, Raphael Pereira. Espero ter deixado o melhor de mim, pois vou levar comigo o melhor de vocês.

À Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC/CAV, e aos professores e funcionários deste centro, que colaboraram com o mestrado.

Ao Laboratorista Maurílio dos Santos Júnior, pelo suporte nas análises.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudo.

## RESUMO

FONSECA, Bibiana Lima. **Suplementação de silagem de milho para ovinos alimentados com duas ofertas de silagem pré-secada de azevém anual**. 2014. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Lages, 2014

O consumo é determinante no processo produtivo, e pode ser modificado, quando é fornecido mais de um tipo de forragem na dieta. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação com silagem de milho + farelo de soja (9:1 com base na MS) na proporção de 10 g de MS/kg PV, para cordeiros recebendo silagem pré-secada de azevém (*Lolium multiflorum* Lam) em duas ofertas de forragem: à vontade ou restrito (60% do consumo à vontade). Oito ovinos machos castrados cruza Texel × Crioula (média de  $31,5 \pm 2,2$  kg de peso vivo, PV) foram usados em um delineamento experimental em Quadrado Latino  $4 \times 4$ . Cada período experimental foi realizado durante 19 dias, com 14 de adaptação e 5 de medidas. Os animais foram alimentados três vezes ao dia (08:00 h, 11:30 h e 16:30 h). Animais suplementados receberam silagem de milho às 08:00 h e silagem pré-secada de azevém às 11:30 h e às 16:30 h. As taxas de substituição foram 0,93 nos animais com oferta de azevém à vontade e zero nos que recebiam o mesmo em quantidade restrita. O consumo de MO digestível e a retenção nitrogenada não variaram com a suplementação nos animais que receberam o azevém à vontade, mas aumentaram nos animais com oferta restrita. Contudo, os animais com oferta restrita e suplementados tiveram menor consumo de MOD e retenção nitrogenada que a média dos que receberam azevém à vontade. A digestibilidade da MO e a eficiência de síntese de proteína microbiana não foram afetadas pelos tratamentos, mas a digestibilidade do FDN e FDA foi menor nos animais suplementados em comparação aos não suplementados e nos de oferta restrita em comparação a oferta à vontade. Mesmo com a suplementação, a restrição alimentar da forragem de base pode limitar a ingestão diária de MO digestível e a retenção diária de N em ovinos.

**Palavras-chave:** consumo, *Lolium multiflorum*, taxa de substituição, *Zea mays*.

## ABSTRACT

FONSECA, Bibiana Lima. **Corn silage supplementation to wethers fed with two offer haylage ryegrass.** 2014. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Lages, 2014.

The forage intake is determinant on animal performance and can be changed when more than one type of forage are used. The aim of this work was to assess the effects of corn silage supplementation + soybean meal (9:1 as DM basis) fed as a proportion of 10 g DM kg<sup>-1</sup> LW, to wethers receiving ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) haylage with two forage offers: *ad libitum* or restrict amount, (60% of *ad libitum* DM intake). Eight wethers (average 31.5±2.2 kg of body live weight, LW) were used in a replicated 4 × 4 Latin Square design. Each experimental period conducted over 19 d, with a 14 of adaptation and 5 of measurements. Animals were fed three times a day (08:00h, 11:30h and 16:30h). Supplemented animals received corn silage at 08:00h and ryegrass haylage at 11:30h and 16:30h. The substitution rate was 0.93 in supplemented group *ad libitum* and zero in animal receiving restricted amount of ryegrass haylage. The digestible OM intake and N retention were similar in animals receiving ryegrass haylage *ad libitum*, but increased when ryegrass haylage was restricted. However, even with the supplementation animals receiving restricted amount of ryegrass haylage showed lower OM digestible intake and N retention compared to animals average of receiving ryegrass *ad libitum*. The OM digestibility and efficiency of rumen microbial protein synthesis were not affected by treatments, but the NDF and ADF digestibility were lower in supplemented animals compared to unsupplemented ones and in restricted compared to *ad libitum* diets. The corn silage supplementation could not be enough to avoid reductions on OM digestible intake and N retention to wethers receiving restrict amounts of ryegrass haylage.

**Keywords:** intake, *Lolium multiflorum*, substitution rate, *Zea mays*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Parâmetros de fermentação ruminal de ovinos alimentados com silagem pré-secada de azevém em oferta à vontade ou restrita (60% da oferta à vontade) ..... 42
- Figura 2** – Parâmetros de fermentação ruminal de ovinos alimentados com silagem pré-secada de azevém suplementados ou não com silagem de milho na proporção de 10g/kg PV ..... 45
- Figura 3** – Correlação do N retido × CMOT (Consumo de Matéria Orgânica Total)..... 52

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Composição química dos alimentos oferecidos ..... 33
- Tabela 2** – Consumo de nutrientes em ovinos alimentados com oferta à vontade ou restrita de silagem pré-secada de azevém (*Lolium multiflorum*) suplementados ou não com silagem de milho (*Zea mays*) + farelo de soja (*Glycine max*) na proporção de 9:1 da matéria seca..... 38
- Tabela 3** – Efeito da oferta e suplementação na digestibilidade da MS, MO, PB e fração fibrosa da dieta em ovinos alimentados com silagem pré-secada de azevém (*Lolium multiflorum*) como forragem base e suplementados com silagem de milho (*Zea mays*) + farelo de soja (*Glycine max*) na proporção de 9:1 da matéria seca. .... 39
- Tabela 4** – Efeito da oferta e suplementação no consumo, excreção fecal, urinária e retenção de compostos nitrogenados em ovinos alimentados com silagem pré-secada de azevém (*Lolium multiflorum*) como forragem base e suplementados com silagem de milho (*Zea mays*) + farelo de soja (*Glycine max*) na proporção de 9:1 da matéria seca. .... 40
- Tabela 5** – Efeitos da oferta e suplementação na fermentação ruminal de ovinos alimentados com silagem pré-secada de azevém (*Lolium multiflorum*) como forragem base e suplementados com silagem de milho (*Zea mays*) + farelo de soja (*Glycine max*) na proporção de 9:1 da matéria seca. .... 41

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>20</b>
2.1	REGULAÇÃO DO CONSUMO .....	20
2.2	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO.....	23
2.3	TAXA DE SUBSTITUIÇÃO .....	26
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES.....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
4.1	ANIMAIS, TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	32
4.2	AMOSTRAGEM.....	34
4.3	ANÁLISES LABORATORIAIS.....	34
4.4	CÁLCULOS .....	35
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	37
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
5.1	CONSUMO .....	38
5.2	DIGESTIBILIDADE E CONSUMO DE MO DIGESTÍVEL..	39
5.3	CONSUMO E UTILIZAÇÃO DOS COMPOSTOS NITROGENADOS .....	40
5.4	PARÂMETROS RUMINAIS.....	41
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
6.1	EFEITO DOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS SOBRE A UTILIZAÇÃO DOS COMPOSTOS NÃO NITROGENADOS .....	49
6.2	EFEITO DOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS SOBRE CONSUMO A UTILIZAÇÃO DOS COMPOSTOS NITROGENADOS E O CRESCIMENTO MICROBIANO ....	51
6.3	EFEITO DOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS SOBRE A CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO RUMINAL.....	53
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>
	APÊNDICE 1: ANÁLISE DE VARIÂNCIA ANOVA PROC MIXED SAS ..	65
	APÊNDICE 2: TESTE DE MATRIZ DE CORRELAÇÃO .....	66
	APÊNDICE 3: ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO RUMEN PROCMIXED.....	68

## 1 INTRODUÇÃO

A capacidade de transformar eficientemente alimentos volumosos, ricos em fibras, com altos teores de carboidratos estruturais em produtos de origem animal é uma característica que diferencia os ruminantes. Por essa característica, os ruminantes ocupam um nicho importante na agricultura moderna. No futuro, as demandas diretas de grãos por seres humanos farão com que a utilização eficiente de volumosos seja cada vez mais importante (OMER et al., 2012).

Para que os sistemas produtivos que dependem da utilização de volumosos não tenham sua eficiência comprometida, em função da disponibilidade de forragens que varia com a estação do ano em qualidade, quantidade e espécie, é necessário nos períodos de baixo crescimento das pastagens o uso de suplementação, a qual pode ser realizada com outro tipo de volumoso, aproveitando essa capacidade dos ruminantes. As forragens conservadas vêm se confirmando com uma opção a esses sistemas, pois podem apresentar bom valor nutritivo, por um custo menor, sem competir com os seres humanos, como é o caso de suplementos concentrados.

O uso de dois tipos de volumosos na dieta de ruminantes, ainda não está completamente esclarecido, pois não se conhece os efeitos e interações que ocorrem no complexo sistema digestivo desses animais, e numa situação como essa é mais difícil prever o consumo, já que muitos fatores interferem, podendo comprometer os resultados esperados. Além disso, alguns sistemas de alimentação consideram que a taxa de substituição de um alimento volumoso por outro é constante, de 1:1, independente das condições de manejo (INRA, 2007).

Desta forma, objetivou-se determinar o efeito da suplementação com silagem de milho, sobre o consumo de matéria seca nos diferentes níveis de oferta da silagem pré-secada de azevém, sobre a digestibilidade da matéria orgânica da dieta, e por fim quantificar o nível de substituição.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os ruminantes são capazes de transformar alimentos ricos em fibra, em proteína de alta qualidade, por suas particulares características anatômicas, fisiológicas, nutricionais e comportamentais, sendo um mecanismo altamente complexo e que pode variar dentro e entre os animais (GROVUM, 1993). Seu trato digestivo é especializado e eficiente processador de alimentos com grandes quantidades de celulose digerível (VAN SOEST, 1994). Os microorganismos que habitam o rúmen se desenvolvem por uma relação simbiótica com o ruminante permitindo o crescimento das várias espécies de bactérias que por sua vez realizam a fermentação da fibra resultando na produção de ácidos graxos voláteis (principal fonte energética para o animal) e proteína microbiana (KOZLOSKI, 2011). Essas características dos ruminantes permitem a utilização de alimentos volumosos, geralmente ricos em fibra, podendo dispensar ou pelo menos reduzir o uso de commodities que oneram os custos de produção e geram impactos de ordem ambiental e social, pela competição com os humanos por alimentos. O uso extensivo de volumoso resulta em várias características específicas que se relacionam com comportamento alimentar, digestão e metabolismo e que têm implicações nos mecanismos de controle da ingestão de alimentos (FAVERDIN, 1999). O entendimento dos mecanismos que regulam a ingestão dos alimentos volumosos, bem como as interações que ocorrem, quando mais de um tipo de volumoso é utilizado na dieta são desafios para a pesquisa. No caso dos animais ruminantes, a complexidade do sistema digestivo e conseqüentes peculiaridades metabólicas, além da importante função como produtores de alimentos e outros produtos para a humanidade constituem razões especiais do interesse sobre o tema (SILVA, 2009).

### 2.1 REGULAÇÃO DO CONSUMO

A regulação do consumo em ruminantes é um processo multifatorial, referente ao animal (peso vivo, nível de produção, estado fisiológico, etc.), ao alimento (fibra, demanda energética, volume, etc.) e às condições de alimentação, como disponibilidade de alimento, frequência de alimentação e tempo de acesso ao alimento (MERTENS, 1992). O consumo voluntário determina o desempenho animal.

O local central da regulação do consumo voluntário é o hipotálamo, onde existem duas regiões que controlam o comportamento

ingestivo dos animais: hipotálamo lateral, onde está o centro da fome que atua nas refeições e o hipotálamo ventromedial, onde está o centro da saciedade e é estimulado pelas reservas corporais e peso do animal. (BORGES et al., 2009).

O consumo pode ser regulado por fatores de curto e de longo prazo. Os fatores de curto prazo interferem no início e fim da refeição diária sem necessariamente alterar a ingestão diária, ou seja, podem alterar o número de refeições e/ou o seu tamanho, mas não a ingestão diária total. Os fatores de longo prazo interferem, além das refeições diárias, na ingestão de alimentos, e estão ligados a fatores nutricionais como as exigências energéticas e manutenção das reservas corporais. Apesar de muitos estudos de controle de ingestão focarem nos efeitos de curto prazo, os efeitos da regulação da ingestão a longo prazo são mais importantes na produção animal (FAVERDIN et al., 1995). Estes mecanismos são mais complexos, porém mais interessantes, uma vez que modificam a ingestão de alimentos em geral e não apenas a cinética de ingestão de alimento, e buscam a seleção de alimentos para otimizar o funcionamento do rúmen e a satisfação do equilíbrio nutricional que o organismo necessita (FAVERDIN, 1999).

Dentre os fatores de curto prazo destacam-se os relacionados aos aspectos físicos e fisiológicos. Os físicos são determinados principalmente pela capacidade de distensão do retículo-rúmen, através de receptores localizados na parede ruminal e que sofrem interferência do teor de FDN, da taxa de degradação do alimento, do tempo de ruminação, da taxa de passagem e da digestibilidade. Entre os fatores fisiológicos de curto prazo destaca-se a produção de AGVs, principal fonte de energia para os ruminantes, e entre eles, o propionato desempenha um papel especial como sinal de controle da ingestão de alimentos (FAVERDIN, 1999). A estimulação de receptores que transmitem sinais para os centros de saciedade do cérebro é determinada por alterações na concentração ou fluxo do nutriente estimulador ou combustível metabólico. Assim, o grau de estimulação de receptores epiteliais ruminais por AGV e os receptores hepáticos de propionato são determinados pela velocidade e extensão da fermentação dos alimentos no retículo rúmen. (ALLEN, 2000). Segundo Faverdin et al. (1995) esse mecanismo de saciedade permite controlar a ingestão para prevenir desordens fisiológicas. Os fatores físicos e fisiológicos agem de forma integrada no comportamento ingestivo prevenindo excessos.

A degradação ruminal de proteínas resulta na formação de  $\text{NH}_3$  no rúmen, permitindo as bactérias fazer os seus próprios aminoácidos e

síntese de proteína. A amônia formada é absorvida rapidamente pela parede do rúmen e pode ficar tóxica em grandes doses quando a capacidade de desintoxicação do fígado se excede. Como a proteína chega ao intestino muito depois da ingestão, este fator pode ser considerado de médio prazo na regulação do consumo. (FAVERDIN, 1999).

Os mecanismos de regulação do consumo a longo prazo nos ruminantes parecem ser capazes de permitir que os animais selecionem alimentos tanto para otimizar o funcionamento ruminal como satisfazer o equilíbrio nutricional do organismo (FAVERDIN, 1999). Um dos principais fatores se refere a reservas corporais. Segundo a “teoria lipostática” proposta por Kennedy em 1953, as reservas corporais enviam sinais ao hipotálamo (SNC) mediado pela ação hormonal da leptina, que está presente nos tecidos adiposos, informando o nível dessas reservas e caso ocorra uma diminuição, haverá aumento da ingestão para atingir o ponto de equilíbrio. (FAVERDIN; BAREILLE, 1999).

Em animais que ingerem dietas ricas em energia, a regulação se dá pela demanda energética, enquanto em dietas de baixa energia, a ingestão se dará pelo poder de repleção do rúmen (PEREIRA et al., 2003).

Outro fator importante relacionado à regulação do consumo é denominado por alguns autores psicogênico, e envolve o comportamento do animal diante de fatores que inibem ou estimulam a ingestão relacionada ao alimento ou ao ambiente (MERTENS, 1994).

Segundo Faverdin et al. (1995) os ruminantes usam os sentidos para antecipar os efeitos pós ingestivos e usam experiências anteriores associando-as a esses efeitos. A experiência inicial da dieta pode ter um efeito significativo no consumo de volumosos de baixa qualidade e em situações de livre escolha da dieta (DISTEL et al., 1994).

Para Fischer (2002), os animais devem desenvolver sensibilidade ao *feedback* pós ingestivo e a capacidade de selecionar alimentos com conseqüências pós ingestivas positivas. Os animais usam seus sentidos para aprender a associar os efeitos pós ingestivos com as características sensoriais do alimento. O registro de ingestão durante os primeiros minutos após a exposição do alimento ao animal gera uma confusão dos limites de palatabilidade com fatores pós ingestivos. A palatabilidade geralmente designa as características do alimento que provocam respostas sensoriais nos animais e são consideradas conseqüências do apetite do animal. Essas respostas podem ser medidas

pela taxa de ingestão inicial em animais que não podem escolher o alimento e pela preferência em animais que podem escolher (BAUMONT, 1996).

## 2.2 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO

Maximizar o consumo de volumosos em ruminantes e atender às exigências nutricionais de animais de alta produção é um grande desafio. Normalmente os sistemas de produção dispõem de uma forragem base em pastejo, que os animais tem acesso *ad libitum* e usam suplementos concentrados, até porque, ocorre uma variação da oferta dessas forrageiras para pastejo ao longo das estações. Pouco se sabe sobre a utilização de suplementos volumosos e seus efeitos de interação na ingestão, digestibilidade, digestão da fibra, taxa de passagem no rúmen, quando associados a um volumoso base.

O consumo da forragem de base quando ela e o suplemento são fornecidos juntos pode ser maior ou menor do que quando a forragem de base é fornecida separadamente. Estas interações decorrem dos efeitos associativos (DIXON; STOCKDALE, 1999). Estes efeitos são evidenciados também quando a digestibilidade aparente de uma mistura de alimentos não é igual à média ponderada das digestibilidades de seus componentes (MOULD, 1988).

Segundo Benez (2007), os efeitos associativos podem ser positivos ou negativos. Os positivos ou aditivos serão obtidos quando o suplemento é capaz de contornar as limitações nutricionais da forragem base, geralmente de baixa qualidade, seja para o bom funcionamento do rúmen ou para o animal, melhorando seu desempenho produtivo. Os efeitos associativos negativos ou substitutivos ocorrem quando há diminuição do consumo de forragem base, sem melhorar o desempenho animal (BARBOSA et al., 2001; GOES et al., 2003). A maioria dos efeitos associativos são negativos (não-aditivos), com a digestibilidade aparente de uma mistura de alimentos menor do que a média das digestibilidades individuais destes alimentos (MOULD, 1988). Os efeitos de substituição são geralmente muito maiores sobre o consumo voluntário de forragem do que sobre a digestibilidade dos componentes fibrosos, embora a mudança no consumo de forragem possa ser consequência da mudança na taxa de digestão dos componentes fibrosos (DIXON; STOCKDALE, 1999).

De acordo com Moore (1980), o fornecimento de suplementos apresenta efeito associativo em relação à utilização da forragem

disponível na pastagem, ou seja, acarreta mudanças na digestibilidade e ou consumo do volumoso da dieta basal, podendo-se observar os efeitos substitutivos, aditivos e combinados. Os efeitos associativos positivos são geralmente observados quando a fonte de forragem suplementar é capaz de fornecer o nutriente que é limitante na forragem base. (VRANIC, 2007).

Vranic (2008) estudando os efeitos das interações entre silagens de gramíneas de baixa e média qualidade, silagem de milho e as misturas dessas silagens em diferentes proporções para ovinos, registrou efeitos associativos positivos em todos os parâmetros de consumo e digestibilidade medidos quando foi fornecida silagem de gramíneas de baixa qualidade, em contrapartida encontrou esses mesmos efeitos em apenas alguns parâmetros, quando oferecida silagem de gramíneas de média qualidade, provavelmente devido a qualidade da silagem de milho que não foi suficiente para melhorar a utilização da silagem base de média qualidade.

Quando os suplementos concentrados são incluídos nas dietas de animais em pasto, efeitos associativos podem ocorrer se as interações digestivas e metabólicas entre eles mudar a ingestão de energia. Um aumento na digestibilidade total pode ser esperado com a inclusão de concentrado na dieta, pois são normalmente mais elevados do que na digestibilidade da pastagem. No entanto, as interações entre a digestão de concentrados e pastagens pode reduzir a digestão da fibra (DIXON; STOCKDALE, 1999).

Além dos efeitos no consumo e digestibilidade, o uso de um volumoso suplementar pode alterar o ambiente ruminal e eficiência de uso do nitrogênio. Isso também ocorre com o uso de concentrados na suplementação, onde os efeitos são bastante conhecidos, diferentemente do volumoso.

Da dieta oferecida, a proteína é degradada por bactérias e protozoários no rúmen em aminoácidos e amônia que são utilizados para síntese de proteína microbiana, enquanto os carboidratos são fermentados em ácidos graxos voláteis (AGV), que são usados na produção de energia (ALVES et al., 2002). Para ótimo crescimento microbiano e síntese protéica deve haver um sincronismo entre a degradação ruminal da proteína e dos carboidratos da dieta (RUSSEL; HESPEL, 1981). Este equilíbrio de N e carboidratos podem influenciar a utilização de N, de carboidratos e ingestão de alimentos.

É essencial que o rúmen seja saudável, para oferecer um ambiente adequado a sua população de microorganismos, mantendo o

pH, para obter satisfatoriamente os produtos finais da fermentação ( $\text{NH}_3$ , AGV) e permitir a síntese de compostos glicogênicos e lipogênicos. (WANAPAT, 2000).

Os ruminantes precisam de volumosos em suas dietas para manter este ambiente saudável e estável no rúmen, pois esse tipo de alimento tem a capacidade de estimular a mastigação, atividade que está relacionada com a produção de tampões salivares, necessários para neutralizar os ácidos da fermentação (ALLEN, 1997). O balanço entre a produção dos ácidos da fermentação e a secreção de tampão pela saliva é o principal determinante do pH ruminal. Apesar do rúmen ser bem tamponado pela secreção salivar, se a quantidade de fibra da dieta for restrita, ou a taxa de fermentação dos carboidratos for muito rápida pode ocorrer queda do pH (VALADARES FILHO; PINA, 2006).

Baixo pH ruminal pode diminuir a ingestão de matéria seca, a digestibilidade da fibra e produção microbiana e tem efeitos negativos diretos sobre o consumo de energia e proteína absorvida, que são os principais fatores que limitam a produção de animais de alta performance. A significativa redução do pH ruminal leva à problemas de saúde dos animais (ALLEN, 1997).

Dixon e Stockdale (1999) afirmaram que a redução da taxa de digestão da fibra é devido ao baixo pH do rúmen ou insuficiência dos substratos essenciais ao crescimento microbiano (amônia e esqueletos de carbono- não tem no texto original). Esses efeitos associativos negativos decorrentes dessas interações podem ser minimizados oferecendo suplemento que garanta os substratos essenciais aos microorganismos ruminais.

O pH e as concentrações de amônia do rúmen são ferramentas importantes para o entendimento da eficiência de utilização dos alimentos, pelo fornecimento de informações a respeito do processo fermentativo (NAGARAJA et al., 1997). Conforme Hoover e Stocks (1991) a ótima digestão da fibra será quando o fluido ruminal apresentar pH variando entre 6,7 e 7,1, e um pH reduzido, entre 6,5 e 5,5 implica em menor digestão das proteínas, celulose, hemicelulose, pectina e amido.

Segundo Waldo (1967) são três as fontes de nitrogênio para os ruminantes: o alimento, a saliva e o fluxo de N através da parede ruminal, que é uma função principalmente da concentração de uréia do sangue. E são três as vias de desaparecimento do N no rúmen: a absorção da amônia pelo rúmen, sendo uma função do gradiente de concentração, a absorção de aminoácidos, e a passagem do N ao longo

do trato gastrointestinal, a qual se constitui na principal via de desaparecimento do N. A excreção de N na urina e fezes são vias improdutivas de perdas. O nitrogênio pode afetar o consumo de duas maneiras: se for insuficiente retarda a digestão da fibra, o que reduz o consumo e se for em excesso em relação à energia pode produzir altas concentrações de amônia no rúmen, reduzindo o consumo. A reciclagem de nitrogênio nos ruminantes também é proporcionalmente maior, dinamicamente mais complexa e nutricionalmente mais importante que nos monogástricos. (KOZLOSKI, 2011).

O nitrogênio amoniacal ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) tem sido relatado como um composto importante no apoio a fermentação ruminal eficiente e é a principal fonte de nitrogênio para crescimento e síntese de proteína microbiana (WANAPAT; PIMPA, 1999). Perdok e Leng (1990) descobriram que um maior nível de  $\text{NH}_3$  ruminal-N (15 - 20 mg) aumenta a ingestão de matéria seca e digestibilidade em bovinos alimentados com volumoso de baixa qualidade. O aumento no rúmen de  $\text{NH}_3$  em níveis acima de 30 mg/dl diminui significativamente a relação  $\text{C}_2 + \text{C}_4/\text{C}_3$ , e aumenta a síntese de proteína microbiana (WANAPAT, 2000).

Embora a concentração de AGV ruminal esteja relacionada negativamente ao pH ruminal, a relação não é forte presumivelmente por causa da variação de tamponamento e neutralização no rúmen (ALLEN, 1997).

### 2.3 TAXA DE SUBSTITUIÇÃO

O oferecimento de suplementos para animais em pastejo pode resultar em diminuição do consumo do pasto, em função da substituição da pastagem pelo suplemento (PÉREZ-PRIETO et al., 2011). Isto é conhecido como taxa de substituição (TS) e é calculada como o (consumo de MS de pasto do tratamento não suplementado - consumo de MS de pasto no tratamento suplementado) / consumo de MS do suplemento (BARGO et al., 2003).

Uma  $\text{TS} < 1$  significa que o consumo de MS total do tratamento suplementado é superior ao consumo de MS total do tratamento não suplementado. Uma  $\text{TS} = 1$  significa que o consumo de MS total do tratamento suplementado é a mesma do que o consumo de MS total da não suplementado (BARGO et al., 2003).

A TS é influenciada pelas características do animal, pelo tipo, pela qualidade e quantidade de suplemento fornecido, por época e

manejo da suplementação e pelas características do pasto (BOWMAN et al., 1995). Para Rearte (2001) a taxa de substituição para ruminantes em pastejo é variável e depende da qualidade da forragem consumida.

A substituição entre concentrado e forragem pastejada é geralmente semelhante tanto para os ovinos como para os bovinos (BOCQUIER et al., 1988).

Morrison e Patterson (2007) definiram a taxa de substituição como a mudança na ingestão de MS da forragem por kg de MS ingerida do suplemento. Segundo ele os concentrados têm sido usados como suplemento para a maioria dos rebanhos, devido ao seu elevado valor nutritivo, facilidade de alimentação e baixa taxa de substituição. Este autor testou diferentes tipos de suplementos, para vacas leiteiras pastejando azevém perene, e a taxa de substituição nos tratamentos com concentrados foi menor do que a dos tratamentos com silagens. A taxa de substituição para os diferentes suplementos com silagem foi semelhante.

A taxa de substituição entre forragens e concentrados é definida por Faverdin (1992), como sendo a variação do consumo da forragem oferecida *ad libitum*, relacionada ao aumento no consumo do concentrado. Em um trabalho para avaliar os efeitos de três tipos de volumosos, três tipos de concentrados e três níveis de oferecimento do concentrado obteve uma TS média com dietas à base de silagem de milho muito mais elevada do que as obtidas com dietas à base de silagem de gramíneas (0,70 contra 0,53 em média). Neste caso o tipo de forragem determina as diferenças significativas nas taxas de substituição. A natureza da forragem parece estar envolvida em fenômenos de substituição não apenas pela ingestão de alimentos, mas também pelo seu valor energético e balanço energético que gera. Na verdade, os três fatores de variação de TS estudados nestes ensaios (proporção de alimento concentrado, natureza da forragem e alimentos concentrados) parecem estar unidos em um único conceito fisiológico: o nível de satisfação das necessidades de energia do animal.

Após compilação de dados de estudos, Bargo et al., (2003) estratificando os tratamentos como de baixa ou alta oferta de forragem, a TS média foi de 0,20 kg de pastagem/kg de concentrado em baixa oferta de forragem, e 0,62 kg de forragem/kg de concentrado para alta oferta de forragem.

Stockdale (2000) compilou dados de experimentos com vacas leiteiras em pastagem com o objetivo de demonstrar os fatores que afetam a taxa de substituição e a produção de leite, quando são

suplementadas com concentrados, sendo eles: pastagem, animal, e suplemento. Os fatores mais importantes relacionados ao pasto são a oferta, a altura, as espécies forrageiras presentes, a massa de forragem e seu valor nutritivo. Os fatores mais importantes relacionados ao suplemento são a quantidade e o tipo de suplementação, e os relacionados ao animal são o mérito genético, o nível de produção e o estágio de lactação.

Taxas de substituição são normalmente altas em ruminantes com elevado consumo de forragem de alta digestibilidade, provavelmente devido aos mecanismos metabólicos que controlam a ingestão voluntária reduzindo o consumo da forragem de base. Taxas de substituição são frequentemente baixas, quando os animais estão consumindo forragem de baixa e média digestibilidade, uma vez que a ingestão voluntária de tais forragens é provavelmente determinada pela capacidade física do rúmen e pela taxa de digestão das fibras de forragem (DIXON; STOCKDALE, 1999)

Suplementação com forragem resulta em níveis mais altos de substituição, do que as observadas com concentrados. Em oferta baixa e alta de pastagem, a TS variou de 0,84 - 1,02 kg/kg para a suplementação de silagem de gramíneas e 0,11 - 0,50 kg/kg de suplementação concentrada (MAYNE; WRIGHT, 1988). Stockdale (2000) analisando dados de estudos em pastoreio concluiu que a suplementação com forragens, como feno ou silagem de milho, resultou em maior TS do que a suplementação com concentrados. Segundo Mayne e Wright (1988), os suplementos de forragem resultam frequentemente em níveis mais elevados de substituição que aqueles observados com concentrados como resultado de reduções no tempo de pastejo. Isto pode ocorrer devido ao volume associado com muitos suplementos de forragem, e sua potencial lenta taxa de digestão no rúmen, em conjunto com a sua baixa digestibilidade. Estas variações no nível de substituição atribuída a diferentes suplementos são mais propensos a ser um problema quando os níveis de suplementação alimentar e/ou ofertas de pastagens são altas. (STOCKDALE, 2000).

Quando o consumo de forragem é restrito e a silagem é oferecida *ad libitum*, o consumo de silagem vai depender do nível de restrição do pasto. Se a silagem é de menor qualidade ou semelhante à forragem, a inclusão de silagem na dieta geralmente resulta numa depressão do desempenho dos animais comparada a uma oferta não restrita da forragem. Quando a oferta de forragem não é restrita, a oferta de silagem diminui o consumo de MS da forragem, mas aumenta a

ingestão total de MS. Nesta situação o desempenho animal poderia ser melhorado (Phillips, 1988).

Stockdale (1999b) encontrou, no entanto, que as TS foram similares quando vacas em pastos de azevém/trevo branco foram suplementadas com grão ou feno, o que mostra que o efeito do tipo de suplemento na TS pode não ocorrer se ambos, a oferta e a quantidade de suplementação são baixos.

Delagarde et al. (2011) sugerem um modelo de previsão de consumo para vacas em lactação alimentadas à base de pasto, o qual prevê um aumento médio na taxa de substituição de 0,03 por kg de matéria seca adicional da ingestão do concentrado. O modelo prevê maiores taxas de substituição para volumosos do que para concentrados, juntamente com o aumento da taxa de substituição com o aumento da oferta de forragem. A previsão da taxa de substituição média entre silagem de milho e pastagem (gramíneas) é de 0,8 para condições de pastoreio habituais, variando nas simulações para baixa a alta oferta de forragem de 0,4 a 1,1, respectivamente. .

Avaliando o consumo de vacas em lactação apenas em pastagem ou suplementadas com silagem de gramíneas antes e depois da ordenha, Strauch et al. (1999) encontraram um consumo superior da pastagem no grupo testemunha, em relação aos suplementados e atribuiu isso a taxa de substituição que foi de 0,78 e 0,73 respectivamente para os grupos suplementados antes e depois da ordenha, considerando que a oferta da pastagem não foi restritiva. O consumo da suplementação variou conforme a oferta e qualidade da pastagem, sendo superior quando a qualidade e a oferta da pastagem diminuíram.

Pérez-Prieto et al. (2011) avaliou o efeito da oferta de silagem de milho em ofertas restritas de pastagens de azevém perene em vacas leiteiras. Com o aumento da suplementação, a diminuição do consumo da forragem de base foi menor na baixa em comparação à alta oferta de pasto (-4,0 para -5,8 kg de MS/d). A taxa de substituição foi menor na baixa em comparação à alta oferta de pasto, em média 0.51 e 0.75, respectivamente. Entretanto, foi observada uma alta variação na taxa de consumo diário, relatada apenas sob severas restrições de tempo de acesso diário à pastagem (Perez-Ramirez et al., 2009) ou, simultaneamente, diminuindo o tempo de acesso e suplementação de silagem de milho (Graf et al., 2005). A diminuição relativa do consumo em tratamentos suplementados seria, portanto, mais bem explicado pela diminuição na taxa de consumo (~ 60%) do que pela diminuição no tempo (~ 40%) de pastoreio.

Quando a disponibilidade de forragem é limitada a taxa de substituição é nula, ou seja, o consumo do suplemento não vai afetar o consumo da forragem base e neste caso pode se obter incrementos na produção de leite, entretanto se a oferta de forragem for alta, ocorre uma TS alta, sem efeitos da suplementação na resposta da produção de leite. PÉREZ-PRIETO et al. (2011).

A taxa de substituição é um dos principais fatores que explicam a variação observada na resposta de produção de leite à suplementação. Geralmente há uma relação negativa entre TS e resposta na produção de leite. Quando a TS é grande, resultando em um pequeno aumento no consumo de MS total e a resposta da produção de leite é baixa. (KELLAWAY E PORTA, 1993)

Para concluir, a taxa de substituição é um efeito associativo negativo, que ocorre em taxas mais altas quando a disponibilidade de forragem é maior, sem melhorar a produtividade e TS são menores quando a disponibilidade da forragem base é baixa podendo ser observado incremento de produtividade. Entretanto como citado acima à grande maioria dos trabalhos referem-se à taxa de substituição entre volumoso – concentrado. A taxa de substituição entre dois volumosos, tendo geralmente uma pastagem como forragem base e o uso de uma forragem conservada (por exemplo: silagem de milho) como suplemento ainda é pouco conhecida, sobretudo com ovinos, justificando portanto a realização deste trabalho.

### **3 HIPÓTESES**

A hipótese principal deste trabalho é que a substituição provocada pela suplementação com a silagem de milho aumenta à medida que se eleva a oferta da forragem de base (silagem pré-secada de azevém).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS, TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O trabalho foi realizado no Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), em Lages, no período de setembro a dezembro de 2012. O experimento foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UDESC.

Foram utilizados oito ovinos machos, castrados, frutos de cruzamento das raças Texel × Crioula, com peso médio de  $31,5 \pm 2,2$  kg, com aproximadamente 8 meses de idade, distribuídos num delineamento experimental em Quadrado Latino  $4 \times 4$ , com quatro períodos de 19 dias (sendo 14 de adaptação e cinco de coleta).

Previamente ao período experimental quatro animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de rumenotomia, para implantação de cânulas ruminais no Hospital de Clínica Veterinária do CAV (Centro de Ciências Agroveterinárias) UDESC.

Para a técnica de rumenotomia os animais foram higienizados e devidamente preparados com tricotomia ampla da região abdominal lateral esquerda, passando por jejum alimentar de 48 horas e hídrico de 12 horas. No pós-operatório os animais receberam antibiótico a base de penicilina benzatina, na dose de 40.000 UI/kg, administrado em três aplicações sequenciais, pela via intramuscular, com intervalo de 48 horas entre cada aplicação. A analgesia pós-operatória foi realizada com cloridrato de tramadol na dose de 6 mg/kg associado à dipirona sódica na dose de 25 mg/kg, ambos administrado pela via intramuscular, a cada oito horas durante 3 dias consecutivos. Também foi utilizado o meloxicam na dose de 0,1 mg/kg pela via subcutânea, administrado a cada 24 horas durante cinco dias.

Passado o período pós-operatório, os animais foram alojados em gaiolas metabólicas individuais no interior de um galpão coberto, com acesso a água e suplementação mineral à vontade.

As dietas dos animais constituíram-se de silagem pré-secada de azevém fornecido à vontade ou restrito (60% do consumo à vontade), suplementados ou não com silagem de milho+farelo de soja na proporção de 10g MS/kg PV, arrançados da seguinte forma:

Silagem pré-secada de azevém à vontade;

Silagem pré-secada de azevém à vontade + (Sil. de milho + far. de soja, na proporção 9:1);

60% da silagem pré-secada de azevém à vontade;

60% da silagem pré-secada de azevém à vontade + (Sil. de milho + far. de soja na proporção 9:1).

Para o cálculo da quantidade de MS da forragem de base a ser oferecida no tratamento com restrição foi utilizado o valor de 3,0% do PV, o qual foi medido em experimento prévio, realizado com ovinos.

A proporção de farelo de soja foi ajustada de acordo com o sistema proteína digestível no intestino (PDI, INRA, 2007), para que o N não fosse limitante, para o crescimento microbiano.

Os animais foram alimentados três vezes ao dia (08:00 h, 11:30 h e 16:30 h), sendo que os suplementados receberam a silagem de milho às 08:00 h, quando eram retiradas e pesadas as sobras da silagem pré-secada de azevém do dia anterior. A quantidade de silagem pré-secada oferecida nos tratamentos à vontade foi calculada pelo consumo do dia anterior permitindo sobras de 20%.

**Tabela 1** – Composição química dos alimentos oferecidos

	Silagem pré-secada de azevém	Silagem de milho	Farelo de soja
MS (g/kg)	478	264	878
MO (g/kg MS)	879	950	934
PB (g/kg MS)	179	59	521
FDN (g/kg MS)	567	523	177
FDA (g/kg MS)	327	254	89
LIG (g/kg MS)	26	6	4

MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; LIG = Lignina

Fonte: produção do próprio autor

O azevém foi plantado entre março e maio de 2011, numa densidade de 40 kg sementes/ha. O corte foi realizado entre julho e outubro, quando atingiu uma altura de aproximadamente 50 cm permanecendo de 2 a 3 dias entre o corte e a ensilagem. A silagem de milho foi produzida na área experimental do CAV, plantado no mês de outubro de 2011 e ensilado no mês de abril de 2012. A composição química dos alimentos oferecidos encontra-se na Tabela 1.

## 4.2 AMOSTRAGEM

Amostras da forragem oferecida foram coletadas a partir do décimo quarto dia experimental pela manhã e à tarde. Amostras das sobras de forragem foram coletadas a partir do décimo quinto dia. Essas amostras foram secas em estufa com ventilação forçada a 60° C durante 72 horas e armazenadas para posteriormente serem analisadas.

Amostras de fezes foram coletadas do décimo quinto ao décimo nono dia de cada período experimental. O total de fezes produzida por animal diariamente foi pesado e amostras foram coletadas na razão de 100 g/animal. Após, as amostras foram secas em estufa com ventilação forçada a 60° C por 72 horas e moídas em peneira de 1,0 mm para realização das análises laboratoriais.

O volume total de urina produzido diariamente por animal foi quantificado do décimo quinto ao décimo nono dia de cada período experimental. A urina foi coletada em frascos contendo 100 ml de solução de ácido sulfúrico a 20% e retiradas alíquotas de 1%, filtradas em gaze e diluídas em balões volumétricos de 100 ml com água destilada. As amostras diárias de urina constituíram uma amostra composta por animal por período, que foi armazenada a temperatura de -20°C.

Foram coletadas amostras de líquido ruminal no décimo nono dia de cada período experimental às 7h, 9h, 11h, 13h, 15h, 17h, 19h, 21h e 23h para determinação dos parâmetros de fermentação ruminal (pH, NH<sub>3</sub> e ácidos graxos voláteis), via cânula ruminal, através de uma bomba adaptada para tal fim. Foi realizada a imediata determinação do pH em peagâmetro digital. O fluido foi filtrado em 2 camadas de gaze de onde foram retiradas duas alíquotas. Uma alíquota de 18ml foi acidificada com 2 ml de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 20% para determinação de NH<sub>3</sub> e outra de 20 ml conservada com 0,4 ml de solução de Na OH 10% (v/v) para determinação de ácidos graxos voláteis (AGV) (CECAVA, 1991). Essas amostras foram congeladas à -20° C para análises.

## 4.3 ANÁLISES LABORATORIAIS

Nas amostras do alimento oferecido, sobras e fezes foram determinados o teor de matéria seca (MS) por secagem em estufa a 105°C por 20 horas e a matéria mineral (MM) por queima em forno mufla a 580 °C durante 4 horas. O teor de nitrogênio total (N) foi

determinado pelo método Kjeldahl (AOAC, 1995). Os teores de FDN foram determinados conforme proposto por Mertens (2002), exceto pelo uso do equipamento ANKOM, onde as amostras pesadas nos sacos filtrantes foram tratadas com solução em detergente neutro. As concentrações de fibra em detergente ácido e lignina foram analisadas conforme o método nº 973.18 do AOAC (1997). Nas amostras de líquido ruminal a concentração de N amoniacal foi medida pelo procedimento descrito por Weatherburn (1967). A determinação dos AGV foi por cromatografia líquida de alta performance em um cromatógrafo HPLC, com a colaboração do laboratório da Epagri-Itajaí. Foi utilizado um equipamento da marca Shimadzu - modelo LC10-VP, dotado de bomba para gradiente quaternário, injetor automático com suporte para amostras termostaticado (10 oc.), forno de colunas (40 oc.) e detector Ultra-Violeta (UV) ajustado para 210nm no presente trabalho. A coluna utilizada foi a Aminex HPX-87H (BioRad), associada a uma pré-coluna. A fase móvel utilizada foi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM, isocrático, com fluxo de 0,6mL/minuto. O volume de injeção foi de 20uL. Foi preparada uma curva de calibração para os ácidos oxálico (0-40ug/mL), cítrico (0-375ug/mL), tartárico (0-25ug/mL), málico (0-500ug/mL), aconítico (0-10ug/mL), láctico (0-750ug/mL), fumárico (0-2,5ug/mL), acético (0-1000ug/mL), propiônico (0-125ug/mL) e butírico (0-2000ug/mL). As concentrações foram escolhidas de acordo com as respostas dos ácidos ao detector UV. A síntese de proteína microbiana ruminal foi estimada com base na excreção urinária dos derivados de purina (alantoína e ácido úrico) de acordo com o descrito por Chen e Gomes (1995), com a colaboração do Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes, da Universidade Federal de Santa Maria.

#### 4.4 CÁLCULOS

O consumo de forragem foi medido pela diferença entre a quantidade de forragem oferecida e as sobras entre o décimo quinto e o décimo nono dia de cada período. Os consumos de matéria orgânica e dos constituintes da matéria orgânica das forragens foram calculados a partir da quantidade de nutriente oferecido menos a quantidade do mesmo encontrado nas sobras.

$$\text{Consumo} = \text{oferecido} - \text{sobras}$$

A taxa de substituição foi calculada pela relação entre a quantidade que deixou de ser ingerida de forragem base pela quantidade consumida de forragem suplementar:

$$TS = \frac{(CFBe - CFBs)}{CFS}$$

Onde:

CFBe = consumo médio da forragem base nos animais sem suplementação

CFBs = consumo médio da forragem de forragem base nos animais suplementados;

CFS = consumo médio da forragem suplementar

A digestibilidade aparente da matéria seca, da matéria orgânica e dos constituintes da matéria orgânica da silagem foi calculada pela proporção da quantidade ingerida que não foi excretada nas fezes.

$$DA = (\text{ingerido} - \text{excretado nas fezes}) / \text{ingerido}$$

A digestibilidade verdadeira da matéria orgânica (DVMO) foi estimada de acordo com Mulligan et al. (2002), considerando que a MO excretada de origem alimentar é o FDN excretado nas fezes:

$$DVMO (\%) = \frac{(\text{consumo de MO} - \text{FDN excretado}) \times 100}{\text{Consumo de MO}}$$

A estimativa da síntese de proteína microbiana em função dos derivados de purinas foi estimada com base na equação descrita por Chen e Gomes (1995):

$$Y = 0,84X + (0,150PV^{0,75} e^{-0,25X}),$$

Onde, Y (mmol / d) é excreção de derivados de purina na urina e X (mmol / d), é a absorção de purinas microbianas.

O cálculo de retenção de X (g/dia) baseado no valor de Y foi realizado utilizando o método de Newton-Raphson como segue:

$$X(n+1) = X_n - \frac{(0,84X + (0,150 PV^{0,75} e^{-0,25X})) - Y}{0,84 - (0,038 PV^{0,75} e^{-0,25X})}$$

Onde, 70 é a concentração de N nas purinas (mg/mmol); 0,83 é a digestibilidade verdadeira das purinas; 0,116 é a relação de N purinas : N microbiano.

A eficiência da síntese de proteína microbiana no rúmen (ESPM) foi calculada pela relação do nitrogênio microbiano (NM) e do consumo de matéria orgânica digestível (CMOD):

$$\text{ESPM} = \frac{\text{NM (g/dia)}}{\text{CMOD (kg)}}$$

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento PROC MIXED do pacote estatístico SAS (SAS, 1996). O modelo utilizado incluiu os efeitos aleatórios de animal e período, e os efeitos fixos da oferta (à vontade ou restrita) e da suplementação (com ou sem), além da interação oferta × suplementação,

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \rho_j + o_k + \sigma_l + o_k \times \sigma_l + e_{ijkl}$$

Onde:

$Y_{ijk}$  = valor observado no i-ésimo animal e j-ésimo período para o k-ésimo tratamento;

$\mu$  = média geral;

$\alpha_i$  = efeito aleatório do i-ésimo animal;

$\rho_j$  = efeito aleatório do j-ésimo período;

$o_k$  = efeito fixo do k-ésimo fator oferta;

$\sigma_l$  = efeito fixo do k-ésimo fator suplementação;

$o_k \times \sigma_l$  = efeito da interação dos fatores oferta e suplementação;

$e_{ijkl}$  = erro experimental associado à  $Y_{ijkl}$ .

Os parâmetros de fermentação ruminal também foram analisados utilizando o procedimento PROC MIXED do SAS. O modelo de matriz de covariância utilizada foi escolhido de acordo com o critério de informação de Akaike (WOLFINGER et al., 1993), sendo que a matriz de covariância que melhor se adequou ao conjunto de dados foi a do Tipo VC, e as medidas repetidas no tempo, foram espaçadas igualmente.

As análises foram realizadas considerando as medidas repetidas no tempo e o modelo levou em consideração os efeitos aleatórios de animal e período, além dos efeitos fixos de oferta, suplementação, hora de coleta e as interações oferta × suplementação, oferta × hora de coleta, suplementação × hora de coleta e oferta × suplementação × hora de coleta.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CONSUMO

O consumo de MS, MO e FDN da forragem de base (silagem pré-secada de azevém) diminuiu quando os animais recebendo esta forragem à vontade foram suplementados, mas não variou quando a oferta foi restrita (interação oferta × suplementação:  $P < 0,001$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2** – Consumo de nutrientes em ovinos alimentados com oferta à vontade ou restrita de silagem pré-secada de azevém (*Lolium multiflorum*) suplementados ou não com silagem de milho (*Zea mays*) + farelo de soja (*Glycine max*) na proporção de 9:1 da matéria seca

	Restrito		À vontade		epm <sup>1</sup>	valor de P		
	S/Supl.	C/Supl.	S/Supl.	C/Supl.		Oferta	Supl.	O × S
<i>Consumo de azevém</i>								
MS (g/dia)	560 <sup>c</sup>	566 <sup>c</sup>	921 <sup>a</sup>	680 <sup>b</sup>	27,9	<0,001	0,001	0,001
FDN (g/dia)	314 <sup>c</sup>	320 <sup>c</sup>	519 <sup>a</sup>	384 <sup>b</sup>	15,3	<0,001	0,001	0,001
MS (g/kg PV)	16,4 <sup>c</sup>	16,0 <sup>c</sup>	25,6 <sup>a</sup>	19,2 <sup>b</sup>	0,728	<0,001	0,001	0,001
MO (g/kg PV <sup>0.75</sup> )	34,8 <sup>c</sup>	34,2 <sup>c</sup>	55,0 <sup>a</sup>	41,2 <sup>b</sup>	1,58	<0,001	0,001	0,001
<i>Consumo sil.de milho</i>								
MS(g/dia)	0	280	0	258	6,22	0,109	<0,001	0,109
FDN (g/dia)	0	131	0	117	3,41	0,068	<0,001	0,068
MS (g/kg PV)	0	7,91 <sup>a</sup>	0	7,31 <sup>b</sup>	0,100	0,008	<0,001	0,008
MO (g/kg PV <sup>0.75</sup> )	0	18,3 <sup>a</sup>	0	16,9 <sup>b</sup>	0,239	0,010	<0,001	0,010
<i>Consumo total</i>								
MS(g/dia)	560 <sup>c</sup>	845 <sup>b</sup>	921 <sup>a</sup>	939 <sup>a</sup>	25,2	<0,001	<0,001	<0,001
FDN (g/dia)	314 <sup>c</sup>	451 <sup>b</sup>	519 <sup>a</sup>	502 <sup>a</sup>	13,7	<0,001	0,001	<0,001
MS (g/kg PV)	16,4 <sup>c</sup>	23,9 <sup>b</sup>	25,6 <sup>ab</sup>	26,5 <sup>a</sup>	0,675	<0,001	<0,001	0,001
MO (g/kg PV <sup>0.75</sup> )	34,8 <sup>c</sup>	52,5 <sup>b</sup>	55,0 <sup>ab</sup>	58,1 <sup>a</sup>	5,42	<0,001	<0,001	<0,001

MS= matéria seca; FDN= fibra em detergente neutro; MO=matéria orgânica; epm<sup>1</sup>=erro padrão das médias. Quando o efeito da interação foi significativo, médias seguidas de letras desiguais na mesma linha diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).

Fonte: produção do próprio autor

A ingestão total de MS se elevou com a suplementação nos animais recebendo a forragem de base em quantidade restrita, mas não variou nos animais que recebiam a silagem pré-secada à vontade (interação oferta × suplementação:  $P < 0,001$ ).

## 5.2 DIGESTIBILIDADE E CONSUMO DE MO DIGESTÍVEL

Não houve efeito da interação entre oferta e suplementação para a digestibilidade da MS, MO, PB e fração fibrosa da dieta (Tabela 3).

**Tabela 3** – Efeito da oferta e suplementação na digestibilidade da MS, MO, PB e fração fibrosa da dieta em ovinos alimentados com silagem pré-secada de azevém (*Lolium multiflorum*) como forragem base e suplementados com silagem de milho (*Zea mays*) + farelo de soja (*Glycine max*) na proporção de 9:1 da matéria seca.

	Restrito		À vontade		epm <sup>1</sup>	valor de P		
	S/supl	C/Supl	S/supl	C/Supl		Oferta	Supl.	O × S
Digestibilidade								
MS	0,64	0,658	0,67	0,678	0,009	0,086	0,082	0,503
MO	0,67	0,674	0,68	0,697	0,008	0,023	0,132	0,719
PB	0,64	0,64	0,66	0,67	0,007	0,006	0,510	0,885
FDN	0,71	0,662	0,73	0,696	0,011	0,033	0,001	0,404
FDA	0,71	0,651	0,73	0,703	0,012	0,009	0,002	0,142
DVMO	0,81	0,798	0,82	0,818	0,006	0,026	0,128	0,476
CMOD (g/dia)	328 <sup>c</sup>	515 <sup>b</sup>	552 <sup>ab</sup>	592 <sup>a</sup>	18,5	<0,001	<0,001	0,001
CMOD(g/kg PV <sup>0.75</sup> )	23,1 <sup>c</sup>	35,4 <sup>b</sup>	37,6 <sup>ab</sup>	40,5 <sup>a</sup>	1,18	<0,001	<0,001	0,001
CMOVD(g/dia)	402 <sup>c</sup>	610 <sup>b</sup>	668 <sup>ab</sup>	693 <sup>a</sup>	20,3	<0,001	<0,001	0,001

MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; DVMO = digestibilidade verdadeira da matéria orgânica; CMOD = consumo da matéria orgânica digestível; CMOVD = consumo da matéria orgânica verdadeiramente digestível; epm = erro padrão das médias;

Fonte: produção do próprio autor

As digestibilidades aparentes da MS e da MO foram semelhantes entre os tratamentos, mas as digestibilidades da FDN e FDA foram menores ( $P < 0,05$ ) nos animais suplementados em

comparação aos não suplementados e nos que receberam a silagem pré-secada em quantidade restrita em comparação aos que receberam a silagem pré-secada à vontade. A ingestão total de MO digestível se elevou com a suplementação nos animais recebendo a silagem pré-secada em quantidade restrita, mas não variou nos animais que recebiam a silagem pré-secada à vontade (interação oferta × suplementação:  $P < 0,001$ ).

### 5.3 CONSUMO E UTILIZAÇÃO DOS COMPOSTOS NITROGENADOS

O consumo de nitrogênio aumentou com a suplementação nos animais recebendo a silagem pré-secada em quantidade restrita, mas não variou nos animais que recebiam esta forragem à vontade (interação oferta × suplementação:  $P < 0,01$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4** – Efeito da oferta e suplementação no consumo, excreção fecal, urinária e retenção de compostos nitrogenados em ovinos alimentados com silagem pré-secada de azevém (*Lolium multiflorum*) como forragem base e suplementados com silagem de milho (*Zea mays*) + farelo de soja (*Glycine max*) na proporção de 9:1 da matéria seca.

	Restrito		À vontade		epm <sup>1</sup>	valor de P		
	S/ supl.	C/Supl.	S/ supl.	C/Supl.		Oferta	Supl.	O × S
N Ingerido	16,9 <sup>c</sup>	21,5 <sup>b</sup>	27,0 <sup>a</sup>	24,6 <sup>a</sup>	1,00	<0,001	0,323	0,003
N exc. Fezes	5,69 <sup>c</sup>	7,31 <sup>b</sup>	8,58 <sup>a</sup>	7,58 <sup>b</sup>	0,299	<0,001	0,315	0,001
N exc. Urina	10,7	10,7	13,2	11,0	0,588	0,028	0,073	0,077
N retido	0,539 <sup>c</sup>	3,45 <sup>b</sup>	5,22 <sup>a</sup>	5,99 <sup>a</sup>	0,457	<0,001	0,001	0,032
N mic	4,45 <sup>b</sup>	7,90 <sup>a</sup>	7,88 <sup>a</sup>	8,80 <sup>a</sup>	0,414	<0,001	<0,001	0,007
ESPM	10,8	12,9	11,7	13,0	0,710	0,470	0,029	0,556

N ingerido, N excretado nas fezes, N excretado na urina, N retido (g/dia); N mic = nitrogênio de origem microbiana (g/dia); ESPM = eficiência de síntese de proteína microbiana (N microbiano (g/dia) / consumo MO digestível no rúmen (kg/dia))

Fonte: produção do próprio autor

O N excretado na urina ( $P < 0,05$ ) e a retenção de N ( $P < 0,001$ ) foram superiores nos animais recebendo a forragem de base à vontade em comparação aos que recebiam esta forragem em quantidade restrita, sendo a menor retenção de N observada nos animais com oferta restrita sem suplementação. A produção de N microbiano foi inferior nos animais com oferta restrita e não suplementados em comparação aos demais tratamentos, os quais não diferiram entre si (interação oferta  $\times$  suplementação:  $P < 0,01$ ). A eficiência de síntese de proteína microbiana (ESPM) não variou com a oferta, mas foi superior nos animais suplementados em comparação aos não suplementados ( $P < 0,05$ ).

#### 5.4 PARÂMETROS RUMINAIS

Os maiores valores de pH ruminal e as menores concentrações de AGV foram observados nos animais sem suplementação e com oferta restrita, enquanto a maior proporção de acetato foi observada nos animais não suplementados com oferta à vontade (interação oferta  $\times$  suplementação:  $P < 0,001$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5** – Efeitos da oferta e suplementação na fermentação ruminal de ovinos alimentados com silagem pré-secada de azevém (*Lolium multiflorum*) como forragem base e suplementados com silagem de milho (*Zea mays*) + farelo de soja (*Glycine max*) na proporção de 9:1 da matéria seca.

	Restrito		À vontade		epm <sup>1</sup>	valor de P		
	S/ supl.	C/ Supl.	S/ supl.	C/ Supl.		Oferta	Supl.	O $\times$ S
pH	6,64 <sup>a</sup>	6,39 <sup>c</sup>	6,56 <sup>b</sup>	6,46 <sup>c</sup>	0.025	0.768	<0,001	0.004
NH3 (mmol/l)	8.79	9.08	9.41	8.57	0.332	0.865	0.407	0.095
AGV (mmol/l)	89,9 <sup>c</sup>	104 <sup>a</sup>	101 <sup>a</sup>	95,7 <sup>b</sup>	1.18	0.4155	0.011	<0,001
Acetato (%)	72,0 <sup>b</sup>	71,3 <sup>b</sup>	73,3 <sup>a</sup>	71,6 <sup>b</sup>	0.261	0.0015	<0,001	0,047
Propionato(%)	22.6	21.4	21.3	20.7	0.204	<0,001	<0,001	0.092
C2 + C4/C3 †	3.46	3.74	3.74	3.88	0.045	<0,001	<0,001	0.111

† (acetato + butirato)/propionato

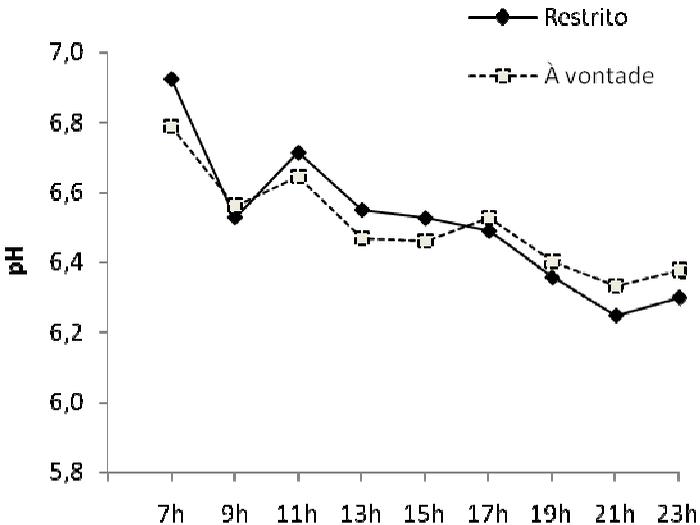
Fonte: produção do próprio autor

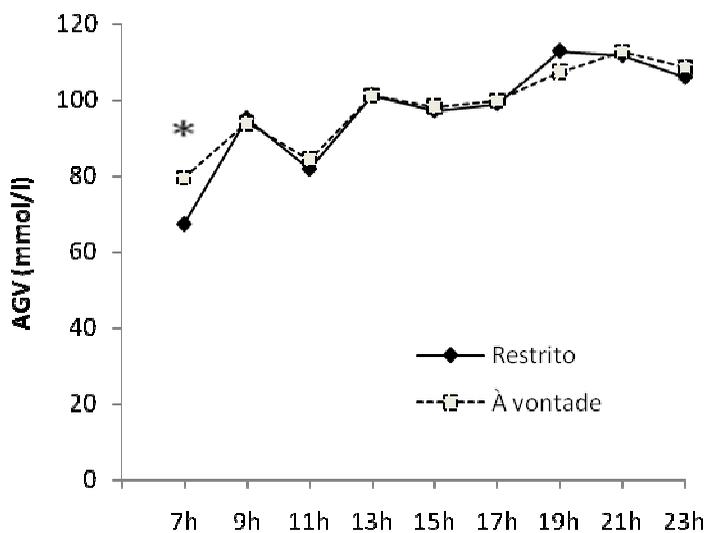
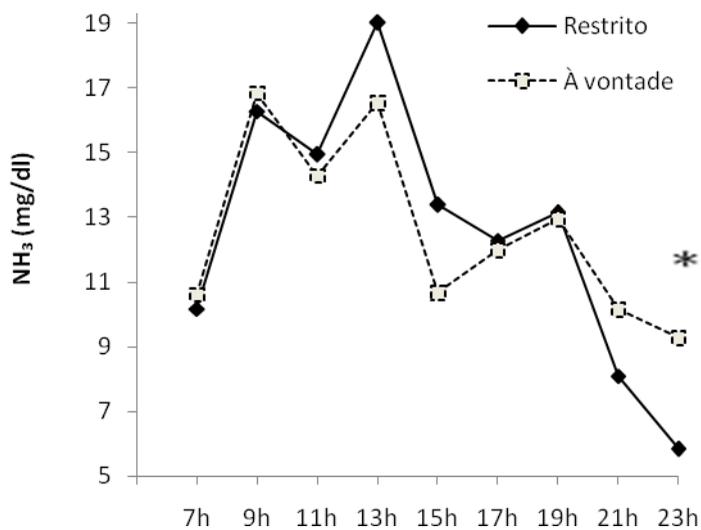
As concentrações de propionato reduziram ( $P < 0,001$ ) e as relações (acetato+butirato)/propionato aumentaram ( $P < 0,001$ ) nos animais suplementados em comparação aos não suplementados,

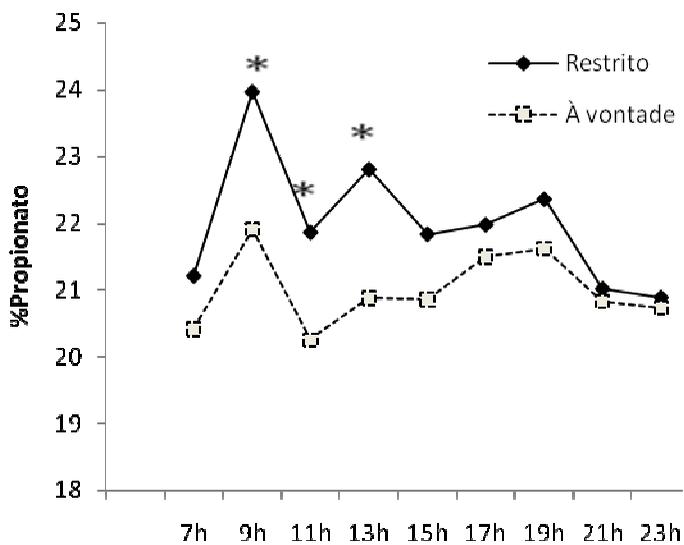
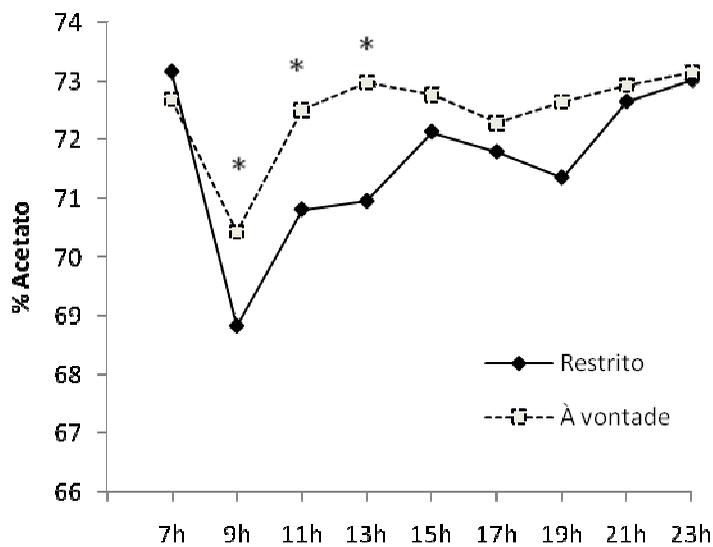
independente da oferta. A concentração média de  $N-NH_3$  não variou com a oferta e nem com a suplementação.

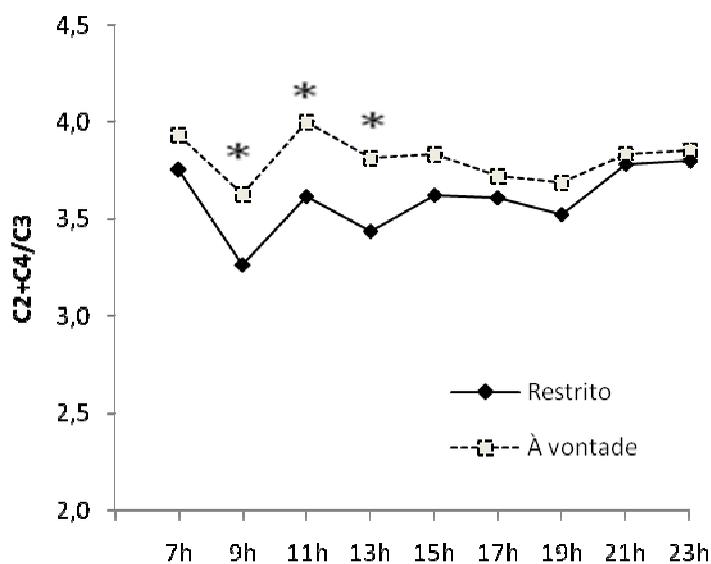
Ao longo do dia, o pH ruminal e as concentrações de  $N-NH_3$  e AGV foram pouco afetadas pela restrição do oferecimento da forragem de base (Figura 1). No intervalo entre 9 e 13h as concentrações de acetato e as relações (acetato+butirato)/propionato foram superiores e as concentrações de propionato inferiores nos animais recendo o pré-secado de azevém à vontade em comparação aos que o receberam em quantidade restrita (Figura 2). O pH ruminal foi inferior ( $P<0,05$ ) às 11h, 13h, 15h, 17h e 21h e a concentração de N amoniacal foi superior ( $P<0,05$ ) às 11h e 13h nos animais suplementados comparados aos não suplementados (Figura 3). A relação acetato + butirato/ propionato foi superior nos animais suplementados comparados aos não suplementados às 9h, 13h, 17h, 19h e 23h

**Figura 1** – Parâmetros de fermentação ruminal de ovinos alimentados com silagem pré-secada de azevém em oferta à vontade ou restrita (60% da oferta à vontade)



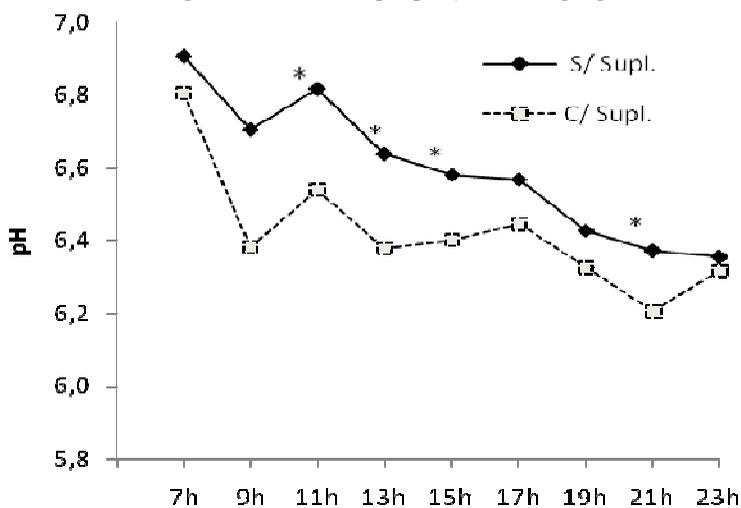


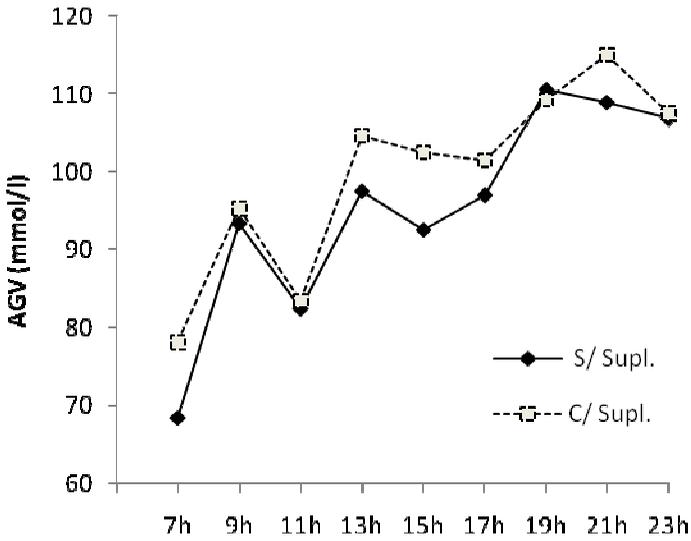
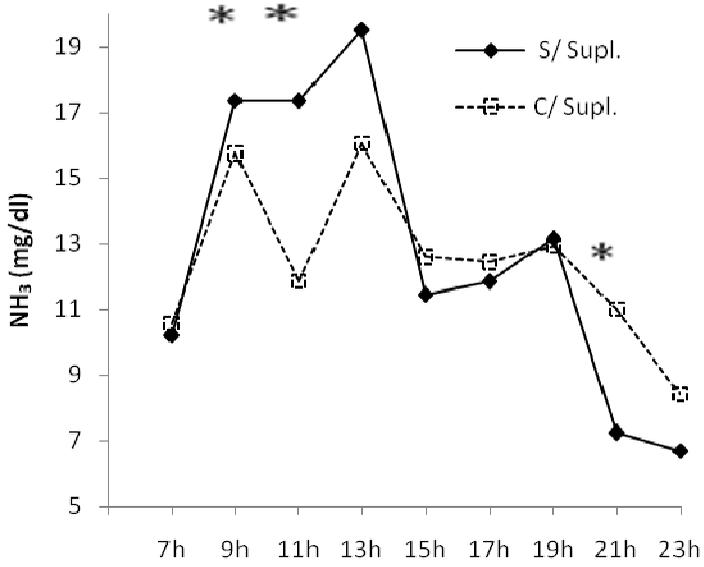


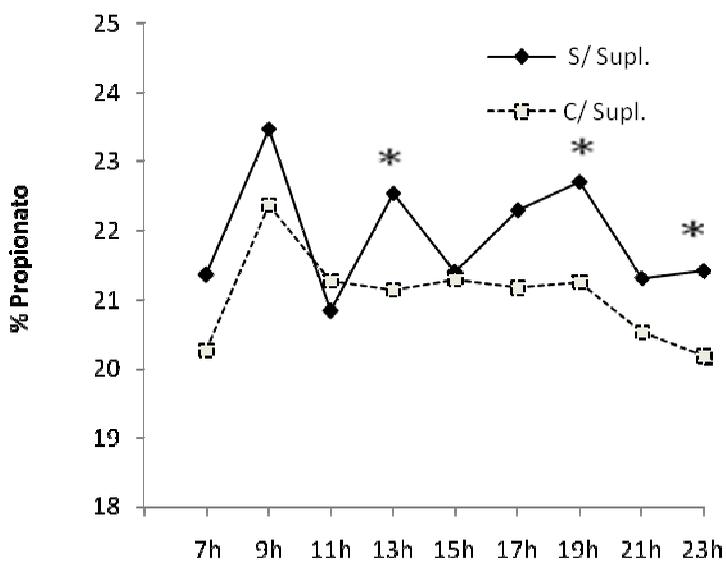
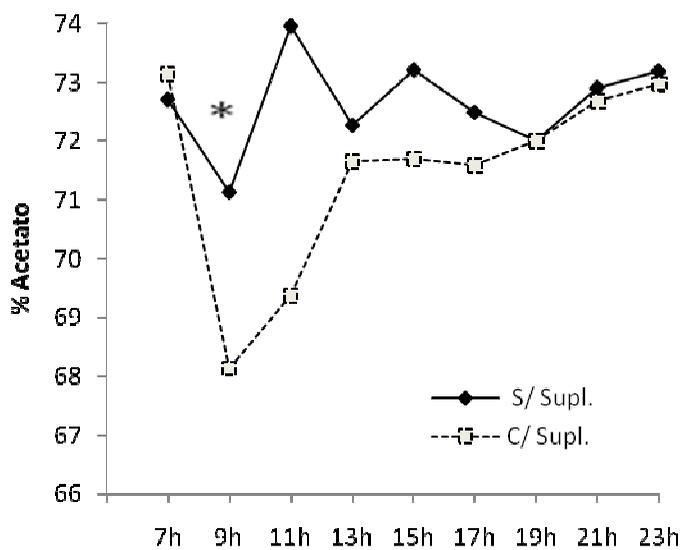


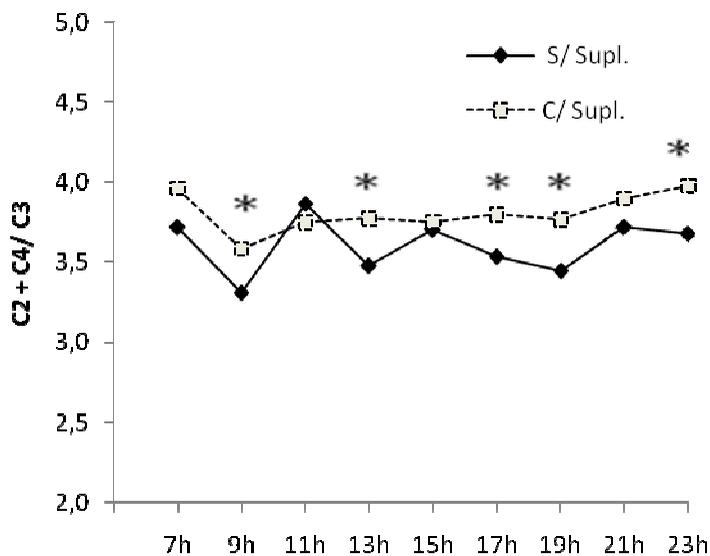
Fonte: produção do próprio autor

**Figura 2** – Parâmetros de fermentação ruminal de ovinos alimentados com silagem pré-secada de azevém suplementados ou não com silagem de milho na proporção de 10g/kg PV









Fonte: produção do próprio autor

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 EFEITO DOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS SOBRE A UTILIZAÇÃO DOS COMPOSTOS NÃO NITROGENADOS

A hipótese principal desta dissertação foi confirmada, uma vez que a variação do consumo de MS da silagem pré-secada de azevém nos animais que receberam a forragem de base à vontade, quando suplementados com silagem de milho, resultou numa taxa de substituição de 0,93, enquanto os animais que receberam a forragem base na oferta restrita tiveram taxa de substituição igual a zero. A taxa de substituição encontrada para a oferta à vontade da forragem de base, está dentro da faixa relatada pela literatura quando são utilizadas forragens como suplemento, com valores variando de 0,2 a 1,2 (MORRISON E PATTERSON, 2000). Phillips (1988) relatou em sua revisão, taxas de substituição entre forragem pastejada e suplementos com forragens, valores de 0,3 a 1,0. Delagarde et al. (2011) encontraram uma taxa de substituição média entre silagem de milho e pastos de clima temperado de 0,8, variando de 0,3 a 1,1 em condições de baixa e alta oferta de forragem base, respectivamente. A taxa de substituição encontrada para a oferta restrita de forragem de base foi igual a zero, provavelmente por que a quantidade de alimento oferecida não foi suficiente para atender as exigências de energia dos animais. No tratamento da oferta restrita suplementado, a suplementação não afetou o consumo da forragem base. Isto está de acordo com diversos autores que relatam taxas de substituição menores ou nulas quando a oferta da forragem de base diminui (BARGO et al. 2003, MAYNE E WRIGHT, 1988). Woodward et al. (2002) relataram taxas de substituição de 0,10 e 0,14 para vacas suplementadas com silagem de gramíneas e silagem de milho respectivamente, sendo esta taxa de substituição mais baixa, reflexo da oferta restrita de pasto oferecido no estudo.

O menor consumo de MO digestível dos animais não suplementados em oferta restrita ocorreu em função do menor consumo de MO neste tratamento, já que a digestibilidade da MS, MO, PB e fração fibrosa não foi afetada pelos tratamentos. O coeficiente de digestibilidade verdadeira da matéria orgânica foi em média 0,81. Segundo NRC (2001), a digestibilidade depende do nível de consumo, pois quanto maior o CMS menor é a digestibilidade. Neste trabalho, os animais do tratamento restrito sem suplementação receberam 1,8% MS

PV, da silagem base (silagem pré-secada de azevém), que foi totalmente consumida, indicando que suas exigências nutricionais não estavam sendo atendidas. Segundo Phipps et al.(1992) aumentando a proporção de silagem de milho na dieta também aumenta o consumo de MS, indicando que a digestibilidade não é o fator primordial para controlar o consumo de forragem. Vranic (2007) oferecendo silagem de gramíneas e de milho em diferentes proporções e sozinhas para ovinos, verificou um aumento no consumo de MO, com o aumento dos níveis de silagem de milho e atribuiu a um efeito associativo positivo entre as forragens.

A diminuição da digestibilidade da fração fibrosa (FDN e FDA) para os tratamentos suplementados pode estar relacionada com a menor digestibilidade da silagem de milho, como encontrado por Browne et al. (2004) testando silagem de gramíneas e silagem de milho que verificaram um declínio da digestibilidade aparente do FDN e FDA, com a inclusão da silagem de milho. Cavalcante et al. (2004) comparando o uso de feno de Tifton (*Cynodon spp.*) e silagem de milho em diferentes proporções, encontraram um efeito quadrático na digestibilidade da FDN de acordo com as proporções de silagem de milho no volumoso das dietas e atribuíram a redução na digestibilidade da FDN, pelo teor de carboidratos não-fibrosos mais elevado neste alimento que no feno de capim-tifton. No caso da diminuição da digestibilidade do FDN para a oferta restrita, provavelmente tenha sido em função da baixa disponibilidade de energia da dieta que por sua vez afetou o aporte de nutrientes para os microorganismos fermentadores de carboidratos fibrosos e, por sua vez, a digestão da fibra. A redução da digestibilidade do FDN causada pela adição de amido na dieta poderia, ainda, ser atribuída a um valor de pH mais baixo no rúmen ou diretamente a presença de amido no rúmen. (REARTE, 2001).

A redução do pH ruminal, frequentemente citada como a maior causa da redução na digestibilidade da fibra, nem sempre explica decréscimos na digestibilidade (Caton & Dhuyvetter, 1997). O efeito do pH ruminal na digestibilidade da celulose tem sido frequentemente confundido com alterações decorrentes do aumento no consumo de alimentos ou da concentração de fibra na dieta, fatores que também alteram sua digestibilidade. O aumento na taxa de passagem normalmente reduz a digestibilidade dos componentes da dieta e, em especial, dos componentes mais resistentes à degradação, como a fibra (Russell & Wilson, 1996). Neste trabalho o pH não baixou a níveis que comprometessem a degradação da fibra pelas bactérias celulolíticas.

A suplementação não foi suficiente para que os animais recebendo a forragem de base em quantidade restrita obtivessem consumo de MS e retenção de nitrogênio equivalente aos animais que receberam a silagem pré-secada à vontade. A silagem pré-secada de azevém oferecida em quantidade restrita foi totalmente consumido pelos animais, entretanto a suplementação de silagem de milho oferecida no período da manhã, teve recusas. Isto pode estar relacionado ao manejo alimentar, pois os animais recebiam a silagem de milho, uma única vez na primeira oferta do dia às 8h, e as sobras eram coletadas na segunda oferta às 11h 30 min quando era oferecido a silagem pré-secada de azevém. Desta forma, o período de tempo que os animais permaneceram com a silagem de milho pode não ter sido suficiente para compensar a restrição alimentar imposta nas horas anteriores. Em situação de pastejo Pérez – Ramirez (2008) afirmaram que períodos curtos de oferta podem limitar a ingestão de forragem se os animais não são capazes de se adaptar para ingerir alimento suficiente em um curto período de tempo.

## 6.2 EFEITO DOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS SOBRE CONSUMO A UTILIZAÇÃO DOS COMPOSTOS NITROGENADOS E O CRESCIMENTO MICROBIANO

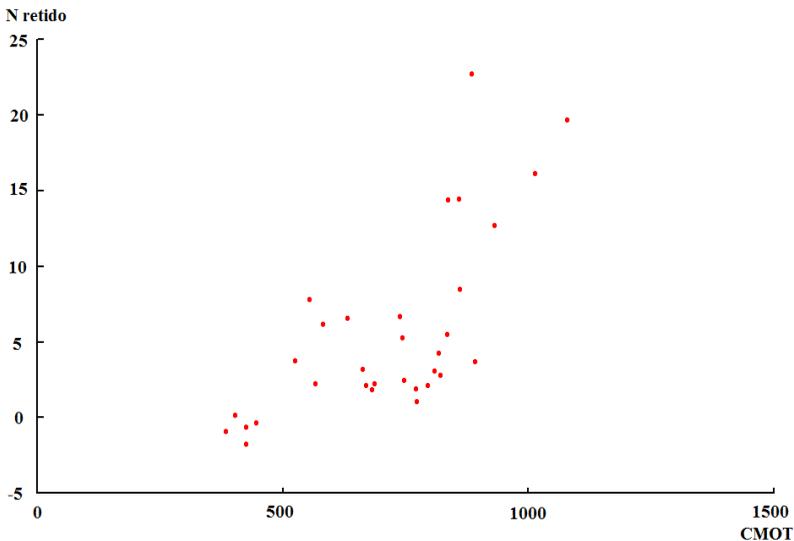
As concentrações de amônia encontradas neste trabalho variaram de 5,8 a 19,0 mg/dl de fluido ruminal e estão acima do nível mínimo de  $\text{NH}_3$  no rúmen, não sendo portanto limitante para um eficiente crescimento e síntese de proteína microbiana. Esta afirmação é parcialmente embasada no trabalho de Wanapat e Pimpa (1999), os quais encontraram resultados dos níveis ruminais de  $\text{NH}_3$  entre 13,6-34,4 mg/dl, sugerindo que o nível de  $\text{NH}_3$ -desejado seria maior do que 15 mg/dl. Para Satter e Slyter, (1974) valores abaixo de 5 mg/dl de fluido ruminal são limitantes para o crescimento microbiano. Desta forma, pode-se afirmar que a retenção de nitrogênio que variou de 3,1 a 29% do N consumido, foi determinada pela ingestão de N e de MO digestível (Figura 3), a qual foi insuficiente para adequado crescimento microbiano nos animais que receberam a forragem de base em oferta restrita.

A retenção de nitrogênio não variou para os animais que tiveram oferta à vontade, mas em oferta restrita foi superior para os animais suplementados. Com um consumo de apenas 0,95% do PV os animais da dieta restrita sem suplementação, não tiveram matéria orgânica digestível suficiente que permitisse maior crescimento microbiano e retenção de N. Vranic et al. (2007) atribuíram a existência

de maior retenção de N ao efeito associativo positivo quando duas fontes de forragem foram usadas, pois uma pode ter fornecido o nutriente que é deficiente na outra. No caso deste estudo, a suplementação foi capaz de fornecer energia para os animais recebendo a forragem de base em quantidade restrita. Segundo Cameron et al. (1991), a síntese de proteína microbiana e o crescimento microbiano dependem de adequada quantidade de energia e nitrogênio para a síntese e assimilação de aminoácidos. Um sincronismo entre a degradação ruminal da proteína e dos carboidratos da dieta é necessário para ótimo crescimento microbiano e síntese protéica (Russel & Hespel, 1981). As perdas ruminais de nitrogênio na forma de amônia dependem da disponibilidade da energia e da sua utilização pelas bactérias ruminais (REARTE, 2001).

Os valores de N excretado nas fezes na oferta restrita variaram de acordo com o consumo de MOD, como encontrado por Giráldez et al. (1997) que as perdas de N fecal e ingestão de MOD tiveram uma relação positiva, pois a maioria do nitrogênio excretado nas fezes é de origem microbiana e é referida como de origem endógena (KOZLOSKI, 2011).

**Figura 3** – Correlação do N retido × CMOT (Consumo de Matéria Orgânica Total)



Fonte: produção do próprio autor

Apesar de não ter variado com a oferta ( $P > 0,001$ ), a eficiência de síntese microbiana foi superior nos animais suplementados com silagem de milho comparado aos animais não suplementados em ambas as ofertas ( $P > 0,05$ ). Como as concentrações de amônia encontradas no fluido ruminal não foram limitantes para nenhum dos tratamentos, a eficiência de síntese de proteína microbiana (ESPM) não influenciou diretamente a retenção de nitrogênio. Entretanto, a melhora na ESPM nos animais suplementados pode ser justificada pela presença de amido da silagem de milho, que melhora a degradação ruminal do nitrogênio, como encontrado por Hvelplund et al. (1987). A suplementação energética na forma de silagem de milho melhora a atividade microbiana, pelo desenvolvimento de um melhor ambiente para a fermentação ruminal e reduz os materiais indigestíveis da dieta. (MATSUI et al., 1988). Dessa forma, a melhoria no balanço de N com a adição de silagem de milho pode estar relacionado à presença de carboidratos mais facilmente fermentáveis, melhorando o uso do N microbiano no rúmen (MOSS et al., 1992). Sabe-se que o rendimento da proteína microbiana não depende apenas da solubilidade de proteína bruta na dieta, mas também no fornecimento de fontes de energia fermentáveis e do grau de sincronização ruminal da PB e carboidratos (BEEVER, 1993).

### 6.3 EFEITO DOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS SOBRE A CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO RUMINAL

Os maiores valores de pH e a menor concentração de AGV foram encontrados nos animais com oferta restrita e sem suplementação, em função do menor consumo de MO digestível neste tratamento. Os valores de pH variaram de 6,2 a 6,9 mantendo-se dentro da faixa ótima para o crescimento bacteriano e digestão da fibra, que fica entre 6,0 e 7,0 (WEIMER, 1996). Segundo Allen (1997) os ácidos que são produzidos no rúmen são derivados dos alimentos como produtos finais da fermentação da matéria orgânica (MO) ingerida. O balanço entre a produção desses ácidos de fermentação e de secreção tampão é o principal determinante do pH ruminal. Os volumosos têm a capacidade de estimular a mastigação que está diretamente relacionada com o fluxo de tampões salivares para o interior do rúmen, necessários para neutralizar os ácidos de fermentação e manter o pH ruminal. Portanto, os maiores valores de pH encontrados nos animais não suplementados e em oferta restrita, tiveram uma fração de MO

fermentável fornecida pela silagem pré-secada de azevém, que não foi suficiente para provocar diminuição nesses valores. O aumento dos valores de pH e queda na concentração de AGVs no pós prandial nas duas ofertas, pode ser resultante do fato de que a fermentação produz AGV, que, por sua vez, reduz o pH quando sua produção é mais rápida que a absorção no rúmen. As variações de pH ruminal refletem o saldo líquido entre ácido orgânico e a substância tampão gerado pela fermentação após a alimentação (WANG et al., 2008).

Além disso, embora a concentração ruminal de AGV seja relacionada negativamente ao pH ruminal a relação não é necessariamente forte, presumivelmente por causa de variação de tamponamento e de neutralização no rúmen. O aumento da degradabilidade ruminal da MO é desejável para maximizar o consumo de energia e produção de proteína microbiana, mas o aumento de ácidos de fermentação tem de ser compensado pelo aumento de teor de FDN da dieta (ALLEN, 1997).

As menores concentrações de AGV foram observados nos animais sem suplementação e com oferta restrita, pois a quantidade de material degradável ou matéria orgânica digestível disponível para fermentação neste tratamento, foi menor (OMER et al., 2012). A maior concentração de acetato, menor de propionato nos animais com forragem de base à vontade comparados aos com oferta restrita após a primeira refeição diária, assim como a maior relação  $(C2+C4)/C3$  é uma resposta inesperada. A maior relação de AGV lipogênicos/glicogênicos se deu em função da menor proporção de propionato. Entretanto na oferta à vontade a proporção de propionato deveria ser maior em função da sua clara associação com a maior disponibilidade de carboidratos solúveis, como observado por Ribeiro Filho et al. (2012) trabalhando com vacas leiteiras em pastejo. Também podemos considerar inesperada a maior relação  $(C2+C4)/C3$  nos animais suplementados comparados aos não suplementados, pois a suplementação disponibiliza mais carboidratos solúveis, portanto proporção de propionato deveria ser maior e a relação AGV lipogênico/glicogênico deveria ser menor.

## 7 CONCLUSÃO

A substituição da forragem de base pelo suplemento varia conforme a oferta da primeira, sendo nula quando esta oferta é restrita em níveis de 60% do consumo *ad libitum*. Neste sentido, a suplementação com silagem de milho aumenta o consumo de MO digestível e a retenção nitrogenada quando ovinos recebem silagem pré-secada de azevém em quantidade restrita, mas não tem efeito quando a forragem de base é fornecida à vontade. Entretanto, mesmo com a suplementação, a restrição alimentar pode limitar a ingestão de MO digestível e a retenção de N em comparação aos animais que recebem a forragem de base à vontade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, supl. (7), p. 1598-624, 2000.

ALLEN, M. S. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1447-1462, 1997.

ALVES, T. C. et al. Efeitos de dietas com níveis crescentes de milho no metabolismo ruminal de energia e proteína em bubalinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, nº10, p.2001-2006, 2009.

AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists: edited Ig W. Horwitz 16ª ed. Washington, 850p. v.2. 1997.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Arlington: AOAC, 1995.

BARBOSA, N. G. S. et al. Consumo e fermentação ruminal de proteínas em função de suplementação alimentar energética e protéica em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, nº 5, p. 1558-1565, 2001.

BARGO, F. et al. Invited Review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p.1-42, 2003.

BAUMONT, R. et al. How Forage Characteristics Influence Behaviour and Intake in Small Ruminants: a Review. **Livestock Production Science**, v.64. supl. (1), p.15-28, 2000.

BAUMONT, R. Palatability and feeding behavior in ruminants. A review. **Annales De Zootechnie**, v. 45, p. 385-400, 1996.

BEEVER, D. E. Ruminant animal production from forages: present position and future opportunities. In: Baker, M.J. **Grasslands for our World**. SIR Publishing, p. 158–164, 1993.

BENEZ, A. L. C. Parâmetros ruminais e consumo voluntário de feno de *Brachiaria decumbens* stapf por bovinos recebendo suplementação protéico-energética. 2007. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

BOCQUIER, F. et al. Alimentation des ovins. In: JARRIGE, R. **Alimentation des Bovins, Ovins & Caprins**. INRA Pub., p. 249-279, 1988.

BORGES, A. L. C. C. et al. Regulação da Ingestão de Alimentos. IN: GONÇALVES, L.C et al. **Alimentação de Gado de Leite**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2009. 412 p.

BOWMAN, J. G. P.; SOWELL, B. F.; PATERSON, J.A. Liquid supplementation for ruminants fed low-quality forage diets: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.55, p.105-138, 1995.

BROWNE, E.M. et al. Apparent digestibility and nitrogen utilisation of diets based on maize and grass silage fed to beef steers. **Animal Feed Science and Technology**, v.119, p. 55–68, 2005.

CAMERON, M. R. et al. Effects of urea and starch on rumen fermentation, nutrient passage to the duodenum, and performance of cows. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.1321-1331, 1991.

CATON, J. S.; DHUYVETTER, D. V. Influence of energy supplementation on grazing ruminants: requirements and responses. **Journal of Animal Science**, v.75, p.533-542, 1997.

CAVALCANTE, A. C. R.. et al. Dietas Contendo Silagem de Milho (*Zea maiz L.*) e Feno de Capim-Tifton 85 (*Cynodon spp.*) em Diferentes Proporções para Bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, Supl. (3), p.2394-2402, 2004.

CECAVA, M. J. et al. Effects of Dietary Energy Level and Protein Source on Nutrient Digestion and Ruminal Nitrogen Metabolism in Steers. **Journal of Animal Science**, v.69, p. 2230-2243, 1991.

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**. Bucksburn Aberdeen: UK, 1995

DELAGARDE, R. et al. GrazeIn: a Model of Herbage Intake and Milk Production for Grazing Dairy Cows. 3. Simulations and External Validation of the Model. **Grass and Forage Science**, v.66. suppl. (1), p.61-77, 2011.

DISTEL, R. A. et al. Effects of early experience on voluntary intake of low quality roughage by sheep. **Journal Animal Science**, v.72, p. 1191-1195, 1994.

DIXON, R. M.; STOCKDALE, C. R. Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilisation. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.50, p. 757-774, 1999.

FAVERDIN P.; Baumont R. e Ingvarlsen, K. L. Control and prediction of feed intake in ruminants. In: Journet, M.; Grenet, E.; Farce, M-H.;Thériez, M.; Demarquilly, C. **Recent developments in the nutrition of Herbivores Proceedings** of the IVth International Symposium on the Nutrition of Herbivores.Paris: INRA Editions, 1995. p. 95-120.

FAVERDIN, P. ; BAREILLE, N. Lipostatic Regulation of Feed Intake in Ruminants. In: HEIDE, D. et al.. **Regulation of feed intake**. CAB International, 1999, p. 88-102,.

FAVERDIN, P. et al. Substitution of roughage by concentrates for dairy cows. **Livestock Production Science**, v.27, p. 137-156, 1991.

FAVERDIN, P. The effect of nutrients on feed intake in ruminants. **Proceedings of the Nutrition Society**. v.58, p.523-531, 1999.

FISHER, D. S. A review of a few key factors regulating voluntary feed intake in ruminants. **Crop Science**, v.42, p.1651-1655, 2002.

GIRÁLDEZ, F. J. et al. The influence of digestible organic matter and nitrogen intake on faecal and urinary nitrogen losses in sheep. **Livestock Production Science**, v.51, p. 183-190, 1997.

GOES, R. H. T. B. et al. Recria de novilhos mestiços em pastagem de *Brachiaria brizantha*, com diferentes níveis de suplementação, na região Amazônica. Consumo e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, nº5, p. 1730 - 1739, 2005.

GRAF, C. M., et al.. Effects of supplement alfay and corn silage versus full-time grazing on ruminal pH and chewing activity of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p.711–725. 2005

GROVUM, W.L. Apetito, sapidez y control del consumo de alimentos. IN: CHURCH, D.C. **El ruminante fisiología digestiva y nutrición**. Zaragoza: Acribia, 1993. 641p.

HOOVER, W. H.; STOCKS, S.R. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yeld. **Journal of Dairy Science**, , v. 74, p. 3630-3644, 1991.

HVELPLUND, T. et al. Protein evaluation and recommendations for dairy cattle. In: Andersen, B.B., Retersen, P.H., Andersen, E., Ostergaard, V., Jensen, B. (Eds.), **Research in Cattle Production**. Danish Status and Perspectives. 1987. p. 117–125.

INRA, Institut National de la Recherche Agronomique. **Alimentation des bovins, ovins et caprins**. Paris: Éditions Quae, 2007. 310p.

KELLAWAY, R.; PORTA, S. Feeding concentrates supplements for dairy cows. **Dairy Research and Development Corporation**, 1993.

KENNEDY, G. C. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in rats. **Proceedings of the Royal society of London, series B, Biological Sciences**, v. 137, p. 535-549, 1953

KOSLOSKY, G.V. **Bioquímica dos Ruminantes**. 3 ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2011. 214p.

MATSUI, H. e tal. Use of ration of digested xylan to digested cellulose (X/C) as na index of fiber digestion in plant cell-wall material by ruminal micoorganisms. **Animal Feed Science and Technology**, v. 71, p. 207-215, 1998.

MAYNE, C. S., WRIGHT I. A. Herbage intake and utilization by the grazing dairy cow. In: **Nutrition and lactation in the dairy cow**. Ed. PC Garnsworthy. Butterworths: London, UK, 1988, p. 280–293.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beackers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.

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

MERTENS, D.R. Análise da fibra e sua utilização na avaliação de alimentos e formulação e rações. IN: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES, REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 29,1992, Lavras, MG. **Anais...** Lavras: Sociedade Brasileira de zootecnia, 1992.p.188-219

MOORE, J. E. et al. Effects of supplementation on voluntary forage intake, diet digestibility, and animal performance. **Journal of Animal Science**, v. 77, supl. (2), p.122 – 135, 1999.

MORRISON, S. J.; PATTERSON D. C. The Effects of Offering a Range of Forage and Concentrate Supplements on Milk Production and Dry Matter Intake of Grazing Dairy Cows. **Grass and Forage Science**, v. 62, p. 332-345, 2007.

MOSS, A. R. et al. Digestibility and energy value of combinations of forage mixtures. **Animal Feed Science and Technology**. v. 39, p. 151–172, 1992.

MOULD, F. L. Associative effects of feeds. In: ORSKOV, E. R. **Feed science**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1988. 336p.

NAGARAJA, T. G. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In HODSON, P. N. STEWART, C. S. **The rumen microbial ecosystem**. . 2 ed. New York, 1997. p 524-600.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington D.C.: National Academy of Sciences, 2001. 381p.

OMER, H. A. A. et al. Feed and Water Consumptions, Digestion Coefficients, Nitrogen Balance and Some Rumen Fluid Parameters of Ossimi Sheep Fed Diets Containing Different Sources of Roughages. **Life Science Journal**, v. 9, n° 3, p. 805-816, 2012.

PERDOK, H. B.; LENG, L.A. Effect of supplementation with protein meal on the growth of cattle given a basal diet of untreated ammoniated Rice straw. **Asian- Australasian Journal of Animal Science**, v.3, p. 269-279, 1990

PEREIRA, E. S. et al. Consumo voluntário em ruminantes. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n°1, p. 191-196, 2003.

PÉREZ-PRIETO, L. A. et al. Substitution rate and milk yield response to corn silage supplementation of late-lactation dairy cows grazing low-mass pastures at 2 daily allowances in autumn. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p.3592 – 3604, 2011.

PEREZ-RAMIREZ, E. et al. Herbage intake and behavioural adaptation of grazing dairy cows by restricting time at pasture under two feeding regimes. **Animal**, v. 2, p. 1384–1392, 2008.

PEREZ-RAMIREZ, E.; PEYRAUD, J. L.; DELAGARDE, R. Restricting daily time at pasture at low and high pasture allowance: Effects on pasture intake and behavioral adaptation of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 3331-3340, 2009.

PHILLIPS C. J. C. The use of conserved forage as a supplement for grazing dairy cows. **Grass and Forage Science**, v. 43, p. 215–230, 1988.

PHIPPS, R. H., Sutton, J.D., Jones, B.A.,. Forage mixtures for dairy cows: the effect on dry matter intake and milk production of incorporating either fermented or urea-treated whole-crop wheat, brewers' grains, fodder beet or maize silage into diets based on grass silage. **Journal of Animal Science**, v. 61, p. 491–496, 1995.

REARTE D.H.; PIERONI, G.A., Supplementation of temperate pasture. **Proceedings of the XIX International Grassland Congress 2001**, p. 679–689.

RIBEIRO FILHO, H. M. N.; PEYRAUD, J. L.; DELAGARDE, R. Foraging behavior and ruminal fermentation of dairy cows grazing ryegrass pasture alone or with white clover. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n° 3, p.458-465, 2012.

RUSSEL, J. B.; HESPELL, R. B. Microbial rumen fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n° 6, p.1153-1169, 1981.

RUSSELL, J. B.; WILSON, D. B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1503-1509, 1996.

SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal of Nutrition**, v. 32, p.199-208, 1974.

SILVA, J. F. C. da. Mecanismos reguladores de consumo. IN: BERCHIELLI, T.T. et al. **Nutrição de Ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. 616p.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE – SAS. **SAS/STAT**. User's guide, version 6.11. Cary, 1996.

STOCKDALE, C. R. Levels of pasture substitution when concentrates are fed to grazing dairy cows in northern Victoria. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.40, p.913–921, 2000.

STOCKDALE, C. R.. Effects of cereal grain, lupins-cereal grain or hay supplements on the intake and performance of grazing dairy cows.

**Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 39, p. 811–817, 1999.

STRAUCH, O. B. et al. Momento de suplementación con ensilaje de pradera a vacas lecheras en pastoreo estival. *Agricultura Técnica (Chile)*. v.59, supl. (2), p. 107-121, 1999.

VALADARES FILHO, S. C. e PINA, D. S. Fermentação Ruminal. IN: BERCHIELLI, T. T. et al. **Nutrição de Ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 583 p L

VAN SOEST, Peter J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Cornell University Press, 476p, 1994

VRANIĆ, M. et al. Feeding value of low quality grass silage supplemented with maize silage for sheep. **Agricultural and food science**, v.16, p.17-24, 2007.

VRANIĆ, M. et al. Effects of Replacing Grass Silage Harvested at Two Maturity Stages with Maize Silage in the Ration Upon the Intake, Digestibility and N Retention in Wether Sheep. **Livestock Science**, v.114, p.84-92, 2008.

WALDO, D. R., Symposium: Nitrogen Utilization by the Ruminant Nitrogen Metabolism in the Ruminant., **Journal of Dairy science** . v. 51, n. 2 (Presented at the Sixty-second Annual Meeting of the American Dairy Science Association, Ithaca, New York, 1967.

WANAPAT, M. and PIMPA, O. Effect of ruminal NH<sub>3</sub>-N levels on ruminal fermentation, purine derivatives, digestibility and rice straw intake in swamp buffaloes. **Asian- Australasian Journal of Animal Science**. v.12, p. 904-907, 1999.

WANAPAT, M. Rumen Manipulation to Increase the Efficient Use of Local Feed Resources and Productivity of Ruminants in the Tropics. . **Asian- Australasian Journal of Animal Science**. v.13, Supl. July. p. 59-67, 2000.

WANG, D. et al. Alfalfa as a supplement of dried cornstalk diets: Associative effects on intake, digestibility, nitrogen metabolism,

rumen environment and hematological parameters in sheep. **Livestock Science**, v.113, p.87–97, 2008

WEATHERBURN, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v.39, p.971-974, 1967.

WEIMER, P. J., 1996. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? **Journal of Dairy Science**, v.79, p. 1496-1502, 1996.

WOLFINGER, R.D. Covariance structure selection in general mixed models. **Communications in Statistics Simulation and Computation**, v.22, p.1079-1106, 1993

WOODWARD, S.L. et al. Supplementing pasture-fed dairy cows with pasture silage, maize silage, Lotus silage or sulla silage in summer – does it increase production? **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**, v. 64 ,p. 85–89, 2002.

## APÊNDICE 1: ANÁLISE DE VARIÂNCIA ANOVA PROC MIXED SAS

```
data n retido;
input animal of supl per resp;
cards;

run;
/*proc univariate plot;
run;*/
proc mixed method= ml;
class of supl per animal;
model resp = of supl animal per of*supl/solution;
random animal per;
lsmeans of / pdiff;
lsmeans supl / pdiff;
lsmeans of*supl / pdiff;
ods output diffs=ppp lsmeans=mmm;
ods listing exclude diffs lsmeans;
run;
%include ' C:\pdmix800.sas';
%pdmix800(ppp,mmm,alpha=.05,sort=no)run;
```

## APÊNDICE 2: TESTE DE MATRIZ DE CORRELAÇÃO

```

Data rumen;
cards;
run;
/*proc univariate plot;
run;*/
proc mixed method= ml;
class animal per of supl hora;
model resp = animal of supl per hora of*supl of*hora supl*hora
of*supl*hora;
repeated animal/ type=ar(1);
proc mixed method= ml;
class animal per of supl hora;
model resp = animal of supl per hora of*supl of*hora supl*hora
of*supl*hora;
repeated animal/ type=arh;
proc mixed method= ml;
class animal per of supl hora;
model resp = animal of supl per hora of*supl of*hora supl*hora
of*supl*hora;
repeated animal/ type=arma;
proc mixed method= ml;
class animal per of supl hora;
model resp = animal of supl per hora of*supl of*hora supl*hora
of*supl*hora;
repeated animal/ type=hf;
proc mixed method= ml;
class animal per of supl hora;
model resp = animal of supl per hora of*supl of*hora supl*hora
of*supl*hora;
repeated animal/ type=un;
proc mixed method= ml;
class animal per of supl hora;
model resp = animal of supl per hora of*supl of*hora supl*hora
of*supl*hora;
repeated animal/ type=vc;
proc mixed method= ml;
class animal per of supl hora;

```

```
model resp = animal of supl per hora of*supl of*hora supl*hora  
of*supl*hora;  
repeated animal/ type=toep;  
proc mixed method= ml;  
class animal per of supl hora;  
model resp = animal of supl per hora of*supl of*hora supl*hora  
of*supl*hora;  
repeated animal/ type=toeph;  
run;
```

### APÊNDICE 3: ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO RUMEN PROC MIXED

```

Data rumen;
proc mixed method= ml;
class animal per of supl hora;
model resp = animal of supl per hora of*supl of*hora supl*hora
of*supl*hora ;
repeated animal / type=vc;
random animal;
lsmeans of / pdiff;
lsmeans supl / pdiff;
lsmeans hora / pdiff;
lsmeans of*supl / pdiff;
lsmeans of*hora / pdiff;
lsmeans supl*hora / pdiff;
*lsmeans of*supl*hora / pdiff;
ods output diffs=ppp lsmeans=mmm;
ods listing exclude diffs lsmeans;
run;
%include ' C:\pdmix800.sas';
%pdmix800(ppp,mmm,alpha=.05,sort=no,slice=hora);
run;

```