



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM - RS
CURSO DE AGRONOMIA

IRINEU BIGATON NETO

PRODUÇÃO
DE GASES “IN VITRO” DE DIETAS COM BLEND DE ÓLEOS
ESSENCIAIS PARA RUMINANTES

ERECHIM - RS

2019

IRINEU BIGATON NETO

PRODUÇÃO
DE GASES “*IN VITRO*” DE DIETAS COM BLEND DE ÓLEOS
ESSENCIAIS PARA RUMINANTES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Erechim - RS, como requisito parcial para a aprovação na disciplina de Trabalho de conclusão de curso.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Berenchein

Coorientador: Prof. Dr. Hugo Von Linsingen Piazzetta

ERECHIM-RS

2019

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Bigaton Neto, Irineu

Produção de gases in vitro de dietas com blend de óleos essenciais para ruminantes / Irineu Bigaton Neto.

-- 2019.

19 f.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Berenchtein.

Co-orientador: Prof. Dr. Hugo Von Linsingen Piazzetta.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Agronomia, Erechim, RS, 2019.

1. Produção de gases in vitro de dietas com blend de óleos essenciais. I. Berenchtein, Bernardo, orient. II. Piazzetta, Hugo Von Linsingen, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

IRINEU BIGATON NETO

PRODUÇÃO
DE GASES “*IN VITRO*” DE DIETAS COM BLEND DE ÓLEOS
ESSENCIAIS PARA RUMINANTES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Dr. Bernardo Berenchtein

Coorientador: Dr. Hugo Von Linsingen Piazzetta

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e
aprovado pela banca em: / /

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Bernardo Berenchtein – UFFS

Prof. Dr. Nerandi Luiz Camerini – UFFS

Eng. Agr. Dolisete Levandoski - UFFS

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela força, coragem e resiliência durante toda esta longa e incrível caminhada. Agradeço a minha família, e minha amada Nadieli, pelo apoio e pela compreensão nos momentos de crise. Agradeço aos meus professores, em especial ao Prof. Dr. Bernardo Berenchtein, que tiveram paciência e que me ajudaram a concluir este trabalho e, também aos demais professores que durante toda a graduação me ensinaram e me mostraram o caminho a seguir para alcançar os meus objetivos. Agradeço imensamente aos componentes do grupo GEPAAFS e ao LANA, que me assistiram com os materiais necessários e também com auxílio na instalação e conclusão desse trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Gráfico do volume de gases produzidos em até 2 horas de incubação em bioensaios das dietas..... 11
- Figura 2:** Gráfico do volume de gases produzidos e acumulados emitidos em até 8 horas de incubação..... 12
- Figura 3:** Gráfico do volume de gases emitidos e acumulados em até 24 horas de incubação..... 12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado do volume de produção de gás no período de 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas.
..... 10

Tabela 2: Resultado do volume de produção de gás no período de 24 horas..... 12

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	8
MATERIAL E MÉTODOS	9
1. Separação das rações.....	9
2. Produção de gases.....	9-10
RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
1. Resultados das avaliações “ <i>in vitro</i> ”	10
CONCLUSÃO	14
REFERÊNCIAS	15

PRODUÇÃO
DE GASES “IN VITRO” DE DIETA COM BLEND DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA
RUMINANTES

“In vitro” gas production of *essencial oil Blend diet for ruminants*

Irineu Bigaton Neto^{(1)*}

(1) Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Agronomia com Ênfase em Agroecologia, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.

*Autor correspondente.

E-mail: irineu.bigaton@live.com

RESUMO: Objetivou-se no presente estudo avaliar a produção de gases de dietas suplementadas com *blend de* óleos essenciais da casca da castanha do caju e da mamona (Essentil® – Oligo Basics) para ruminantes, através da produção de gases “in vitro”. As análises de produção de gases (PG) foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo (LANA/CENA/USP) em Piracicaba-SP. As análises foram realizadas com substratos de óleo essencial puro (OP), Dieta pré-parto aniônica convencional (DPC), Dieta pré-parto com óleo essencial *blend* (DPO), Dieta pós-parto com monensina (DM), ração sem aditivo (RSAD) e ração com aditivo (RCAD). Sendo introduzidos em recipientes de vidro (160 mL) na presença de solução tampão e inóculo ruminal de ovinos fistulados. As pressões foram medidas (PDL800) e os gases foram estimados através da equação proposta por Godoy (2007). De forma geral, o presente estudo confere segurança na adição de óleo essencial da casca da castanha de caju e da mamona para ruminantes. Contudo, observa-se a possibilidade e a necessidade de novas pesquisas com a adição de óleo essencial *blend* para dieta de ruminantes.

Palavras-chave: ruminante; aditivos; nutrição; bovinos.

ABSTRACT: The purpose of this present study was to differentiate the production of gases from diets supplemented with essential oil blend of cashew nut shell and castor oil (Essential® - Oligo Basics) for ruminants through the production of in vitro gases. Gas production (PG) analyzes were performed at the Animal Nutrition Laboratory of the Center for Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo (LANA / CENA / USP) in Piracicaba-SP. The analyzes were performed with pure essential oil (OP) substrates, Conventional Anionic Prepartum Diet (DPC), Blend Essential Oil Prepartum Diet (DPO), Monensine Postpartum Diet (DM), Feed without additive (RSAD) and additive feed (RCAD). Being introduced into glass containers (160 mL) in the presence of buffer solution and rumen inoculum from fistulated sheep. The pressures were measured (PDL800) and the gases were estimated through the equation proposed by Godoy (2007). Overall, the present study provides safety in the addition of essential oil from the cashew nut and castor bean shells for ruminants. However, there is a possibility and need for further research with the addition of essential oil to the ruminant diet.

Keywords: ruminants; additives; nutrition; cattle.

INTRODUÇÃO

No mundo, a pecuária gera mais gases de efeito estufa se comparada a outras fontes de alimentos, sendo aproximadamente 14,5 por cento de todas as emissões antropogênicas, de forma direta (fermentação entérica e manejo do estrume) ou indireta (produção de alimentos e manejo de floresta em pastagem) (FAO, 2018).

Visando a diminuição de gases de efeito estufa de animais ruminantes, sem perder a qualidade dos produtos acendidos, é necessário que haja a constante busca de alimentos de propriedade nutricional, assim tornando-se atraente os sistemas sustentáveis. Diante disto, é importante a utilização de metodologias que sejam céleres e ao mesmo tempo competentes na avaliação de dietas para o funcionamento equilibrado do sistema metabólico do ruminante.

Diversas estratégias nutricionais foram testadas para melhorar a fermentação ruminal, especialmente para diminuir a produção de metano, possibilitando aumentar a performance animal e a eficiência do uso dos alimentos (JOUANY & MORGAVI, 2007). Essas táticas podem ser feitas diminuindo o H⁺ metabólico disponível para metanogênese, com redutores alternativos para eliminação de H⁺ (BODAS et al., 2012).

Os óleos essenciais extraídos de plantas podem afetar uma extensa gama de microrganismos do rúmen (WALLACE, 2004), abrangendo bactérias gram-positivas (produtoras de acetato e butirato, na maioria), gram-negativas (produtoras de propionato), metanogênicas, fúngicas e protozoárias (PATRA & SAXENA, 2009, CIESLAK et al., 2013). Em decorrência, podem modular a fermentação (FRUTOS et al., 2004, BUSQUETS et al., 2006), diminuir a síntese de metano (KHIAOSA-ARD et al., 2013), e promover o desenvolvimento de animais quando usado em quantidades corretas (DURMIC & BLACHE, 2012).

É de extrema importância analisar a qualidade bromatológica, assim como as análises de degradabilidade verdadeira e produção de gases da matéria orgânica, sendo estas realizadas em ensaio “*in vitro*” para saber o quanto destes nutrientes serão degenerados pelos animais conforme evidencia MAURÍCIO et al. (1998) e BUENO et al. (2005). Sendo assim, os métodos *in vitro* são alternativas exequíveis para avaliações de alimentos, que permitem simular o proveito do alimento em um estágio pertinente a atmosfera ruminal e outro ligado à digestão pós-ruminal (BUENO, 2002). E por meio dos resultados obtidos, pode-se avaliar qual a melhor dieta para bovinos, dentre as estudadas. Objetivou-se no presente estudo avaliar a produção de gases de dietas suplementadas com *blend de* óleos essenciais da casca da castanha do caju e da mamona (Essential® – Oligo Basics) para ruminantes, através da produção de gases “*in vitro*”.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi administrado no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo (LANA/CENA/USP), localizado em Piracicaba/SP.

1. Dietas

- Óleo essencial puro (OP)
- Dieta pré-parto aniônica convencional (DPC)
- Dieta pré-parto com óleo essencial *blend* (DPO)
- Dieta pós-parto com monensina (DM)
- Ração sem aditivo (RSAD)
- Ração com aditivo (RCAD)

2. Produção de gases

No laboratório de Nutrição Animal, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo (LANA/CENA/USP) em Piracicaba-SP, foram realizadas as análises de produção total de gases, em ensaio “*in vitro*” de produção de gases, com as devidas dietas sendo incubadas em garrafas de vidro (160 mL) na presença de solução tampão e inóculo ruminal de ovinos, de acordo com MAURÍCIO et al. (1998) e BUENO et al. (2005). O inóculo foi constituído de conteúdo ruminal de ovinos machos adultos castrados, da raça Santa Inês, criados no biotério do LANA/CENA/USP, estes providos de cânula ruminal permanente e alimentados a pasto com suplementação diária de 500g de concentrado comercial.

Para o preparo do inóculo, as frações líquida e sólida do conteúdo ruminal foram coletadas separadamente e misturadas na proporção de 50% de material da fase sólida e 50% da fase líquida, as quais foram homogeneizadas em liquidificador por 10 segundo, visando a recuperação dos microrganismos celulolíticos que se aderem fortemente a fração sólida. O material resultante foi filtrado em três camadas de tecido de algodão (fralda), onde estas frações filtradas foram misturadas e mantidas em banho-maria a 39°C, com dióxido de carbono insuflado sobre o inóculo continuamente (GODOY, 2007).

A pressão gerada pelos gases produzidos, foram mensurados às 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h após incubação, que foi feita por meio de um transdutor – medidor de pressão (PDL800, LANA/CENA/USP, Piracicaba/SP). A quantidade de gases foi estimada através da equação 01, seguida e proposta por GODOY (2007).

$$\text{Eq 01: } V=0,1171P^2 + 4,7659P$$

Onde V é o volume de gases (mL) e P é a pressão medida (psi).

À cada leitura de pressão que foi realizada, deve-se subtrair o total produzido pelas garrafas sem substrato (branco), referente a cada amostra. Os parâmetros da produção de gases foram ajustados de acordo com o modelo de FRANCE et al. (1993), com o intuito de demonstrar a geração de gases pelos microrganismos ruminais como forma de avaliar o potencial nutritivo de cada forrageira.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Resultados da avaliação de gás “*in vitro*”

Tabela 1: Resultado do volume de produção de gás no período de 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas.

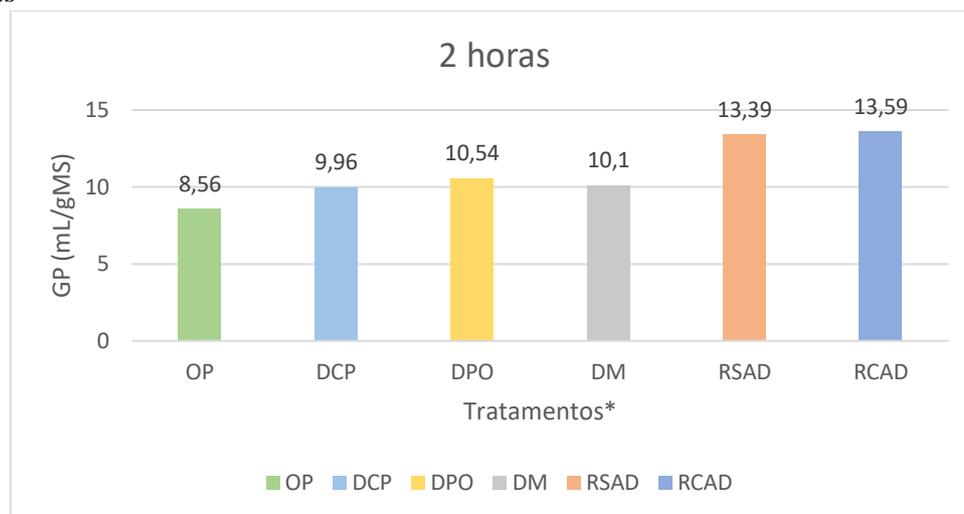
Tratamento	GP (mL/gMS)						
	2h	4h	6h	8h	12h	24h	TOTAL
OP	8,56 ^b	3,94 ^c	2,91 ^c	2,56 ^c	2,97 ^c	3,06 ^d	24,01 ^d
DPC	9,96 ^b	7,22 ^b	7,63 ^{ab}	10,68 ^{ab}	21,01 ^b	43,22 ^c	98,52 ^c
DPO	10,54 ^b	7,84 ^{ab}	6,56 ^b	9,52 ^{ab}	21,19 ^{ab}	47,28 ^{bc}	102,94 ^{bc}
DM	10,10 ^b	7,26 ^b	6,72 ^b	8,65 ^b	20,97 ^b	49,54 ^{bc}	103,24 ^{bc}
RSAD	13,39 ^a	9,49 ^a	8,12 ^a	10,86 ^{ab}	25,94 ^a	62,13 ^a	129,94 ^a
RCAD	13,59 ^a	9,84 ^a	8,69 ^a	11,13 ^a	23,14 ^{ab}	53,39 ^{ab}	119,79 ^{ab}
CV%	11,37	14,81	10,74	14,24	14,24	11,77	10,21
P	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

*Óleo essencial puro (OP), Dieta pré-parto aniônica convencional (DPC), Dieta pré-parto com óleo essencial *blend* (DPO), Dieta pós-parto com monensina (DM), Ração sem aditivo (RSAD), Ração com aditivo (RCAD).

Diferenças significativas foram observadas para todas as variáveis. No período inicial de duas horas (figura 1) foi observado um maior índice de produção de gases para a RCAD (13,59) por apresentar valor nutritivo maior para os micro-organismos no rúmen. Analisando o OP (8,56), vemos que a produção de gás inicial foi menor por conter apenas o óleo essencial puro, sem valor nutritivo para os micro-organismos presentes no rúmen, tendo assim uma

menor fermentação. Segundo Jouany e Morgavi (2007), os aditivos ideais (óleos essenciais) devem diminuir a produção de metano, reduzindo a taxa de degradação de carboidratos facilmente fermentáveis, para assim reduzir o risco de acidose ruminal e ter uma melhora na digestão das fibras.

Figura 1: Gráfico do volume de gases produzidos em até 2 horas de incubação em bioensaios das dietas

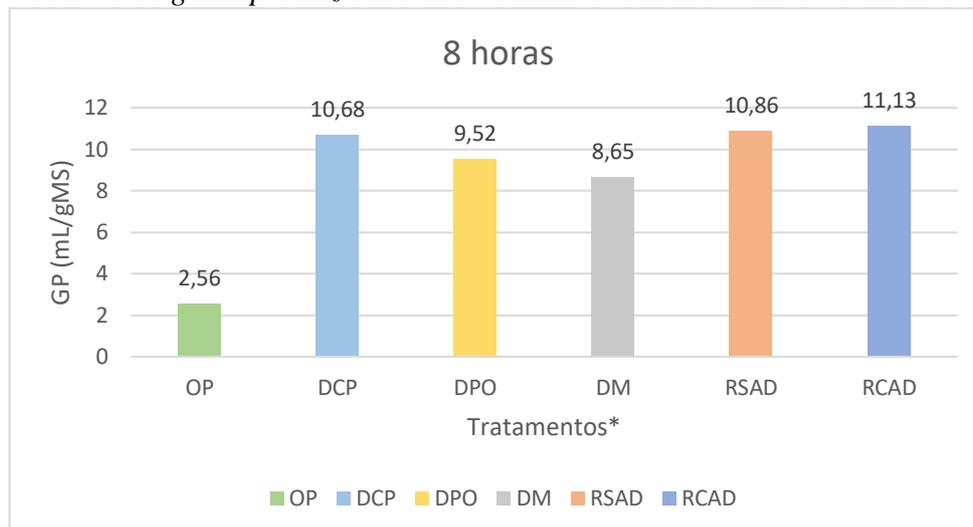


*Óleo essencial puro (OP), Dieta pré-parto aniônica convencional (DCP), Dieta pré-parto com óleo essencial *blend* (DPO), Dieta pós-parto com monensina (DM), Ração sem aditivo (RSAD), Ração com aditivo (RCAD).

A quantidade de gases acumulados ao longo do tempo é gradativa em função da melhor disposição dos micro-organismos no rúmen. Segundo Wallace (2004), compostos secundários (óleos essenciais extraídos de plantas) podem afetar uma ampla gama de microrganismos no rúmen. Sendo eles bactérias gram-positivas (produtoras de acetato e butirato) e gram-negativas (produtoras de propianatos) (Patra & Saxena, 2009, Cieslak et al., 2013). Podendo assim, alterar a fermentação (Frutos et al., 2004, Busquets et al., 2006), reduzir a síntese de metano (Kim et al., 2013), e promover o crescimento de animais quando usado em doses adequadas (Durmic & Blache, 2012).

No período de 8 horas observamos uma mudança significativa na produção de gases causados pela fermentação oriunda da degradabilidade da dieta pelos microrganismos dispostos no rúmen (figura 2). Diante disso, temos a RCAD com o maior índice de emissão de gases por apresentar degradação preferencial pelos microrganismos, mostrando eficiência na adição do *blend* à dieta

Figura 2: Volume de gases produzidos e acumulados emitidos em até 8 horas de incubação.



*Óleo essencial puro (OP), Dieta pré-parto aniônica convencional (DPC), Dieta pré-parto com óleo essencial *blend* (DPO), Dieta pós-parto com monensina (DM), Ração sem aditivo (RSAD), Ração com aditivo (RCAD).

Existe a possibilidade da diminuição do gás metano pela alteração da fermentação ruminal, obtida por modificação do volumoso, da quantidade de carboidrato suplementado à dieta, e pela manipulação da microbiota do rúmen com aditivos alimentares (Mohammed et al., 2004), através da adição do *Blend* à dieta do ruminante. Conseguimos entender melhor a fermentação ruminal com o aditivo *Blend* quando olhamos para o período de 24 horas (Tabela 2) na tabela abaixo.

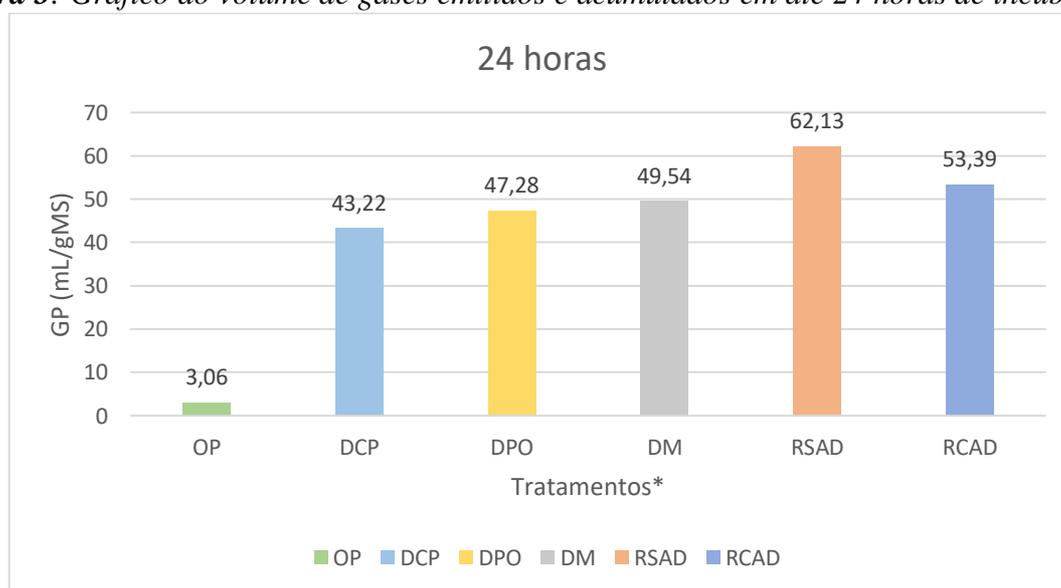
Tabela 2: Resultado do volume de produção de gás no período de 24 horas.

Treatment	Média GP (mL/gMS)
OP	3,06 ^d
DCP	43,22 ^c
DPO	47,28 ^{bc}
DM	49,54 ^{bc}
RSAD	62,13 ^a
RCAD	53,39 ^{ab}
CV%	11,77
P	0,001

*Óleo essencial puro (OP), Dieta pré-parto aniônica convencional (DPC), Dieta pré-parto com óleo essencial *blend* (DPO), Dieta pós-parto com monensina (DM), Ração sem aditivo (RSAD), Ração com aditivo (RCAD).

Diante dessa tabela observamos que o DPC não se diferenciou significativamente do DPO. Já o DM, RSAD e a RCAD teve diferença significativa no total de produção de gases. A dieta com monensina não foi diferente da ração com aditivo, mas se diferenciou da ração sem aditivo. Isso significa que o essencial pode de alguma maneira substituir a monensina sódica, pois a mesma poderá ser proibida futuramente por se tratar de um antibiótico. Esses aditivos são usados para melhorar a relação simbiótica entre os microrganismos presentes no rúmen e seu hospedeiro, favorecendo os processos fermentativos no rúmen em animais que recebem dietas com alto teor de carboidratos não fibrosos (Franzolin et al., 2000). Desta forma, aumenta o desempenho animal e a eficiência da utilização dos alimentos por melhorar geneticamente os microrganismos ruminais (Jouany & Morgavi, 2007). Como podemos observar melhor na figura expressando graficamente melhor os gases emitidos no período de 24 horas (figura 3).

Figura 3: Gráfico do volume de gases emitidos e acumulados em até 24 horas de incubação.



*Óleo essencial puro (OP), Dieta pré-parto aniônica convencional (DPC), Dieta pré-parto com óleo essencial *blend* (DPO), Dieta pós-parto com monensina (DM), Ração sem aditivo (RSAD), Ração com aditivo (RCAD).

Os óleos essenciais possuem inúmeras substâncias químicas diferentes, tais como álcoois, aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, ésteres e éteres (Benchaar et al., 2007). Esses óleos possuem atividade antioxidante devido a presença de compostos fenólicos. Ao ponto que, compostos como os flavonóides e terpenóides também apresentam atividade antioxidante. Essas substâncias podem interceptar e neutralizar radicais livres, impedindo o aumento de processos oxidativos (Hui, 1996).

CONCLUSÃO

De forma geral, o presente estudo confere segurança na adição de óleo essencial *blend* da casca da castanha de caju e da mamona para ruminantes. Contudo, observa-se a possibilidade e a necessidade de novas pesquisas com a adição de óleo essencial *blend* para dieta de ruminantes.

REFERÊNCIAS

BUENO, I. C. S.; CABRAL FILHO, S. L. S.; GOBBO, S. P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M. S. S.; ABDALLA, A. L. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, v.123–124, p.95–105, 2005.

MAURÍCIO, R. M.; PEREIRA, L. G. R.; GONÇALVES, L. C.; RODRIGUEZ, N. M. Relação entre pressão e volume para implantação da técnica in vitro semi-automática de produção de gases na avaliação de forrageiras tropicais. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2003.

BUENO, I.C.S. **Cinética digestiva e síntese microbiana ruminal em ovinos alimentados com fenos de três qualidades distintas**. 2002. 97f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Ciências, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

DURMIC, Z. & BLACHE, D. Bioactive plants and plant products: effects on animal function, health and welfare. **Animal Feed Science and Technology** 176, 150–162, 2012.

KHIAOSA-ARD R, ZEBELI Q. Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. **Journal Animal Science** 91:1819–30, 2013.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A; KAMEL, C. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. **Journal Dairy Science** 89:761–771, 2006.

FRUTOS P, HERVÁS G, GIRÁLDEZ FJ, MANTECÓ AR. Review. Tannins and ruminant nutrition. **Spanish Journal Agriculture Research**. 2:191–202, 2004.

CIEŚLAK, A. et al. Plant components with specific activities against rumen methanogens. **Animal** 7(2): 253–265, 2013.

PATRA AK, SAXENA J. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. **Nutr Res Rev.**; 22:204–219. 2009.

WALLACE RJ. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proc. of Nutr. Soc.**, 63:621-629, 2004.

BODAS, R. et al. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and Technology** 176: 78-93, 2012.

JOUANY, J.P. & MORGAVI, D.P. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. **Animal**, 1. p. 1443-1466, 2007.

ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of official Analytical Chemist**. Washington, 1990. 1015 p.

DETMANN, E. et al. Degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de forragem tropical de baixa qualidade em função da suplementação com proteína verdadeira e/ou nitrogênio não-proteico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [S.l.], v. 40, n. 6, p.1272-1279, jun. 2011.

FRANCE, J. et al. A model to interpret gas accumulation profiles with in vitro degradation of ruminant feeds. **Journal of Theoretical Biology**, v.163, p.99-111, 1993.

FAO. More than meat: Shaping the future of livestock. **FAO points the way for low-carbon animal products to support nutrition and rural livelihoods**. Disponível em: <http://www.fao.org/news/story/en/item/1098231/icode/>. Acesso em: 20 ago. 2019.

PIRES, A.J.V. et al. Degradabilidade ruminal da matéria seca, da fração fibrosa e da proteína bruta de forrageiras. **Embrapa Informação Tecnológica: Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 4, p.643-648, abr. 2006.

PIRES, A.J.V et al. Degradabilidade ruminal da matéria seca, da proteína bruta e da fração fibrosa de silagens de milho, de sorgo e de *Brachiaria brizantha*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l.], v. 62, n. 2, p.391-400, fev. 2010.

SANTOS, V.P. **Degradabilidade *in situ* da matéria seca, matéria orgânica, fibra em detergente neutro e ácido e digestibilidade *in vitro* da cana-de-açúcar fresca ou ensilada e silagem de milho em diferentes ambientes ruminais**. 2006. 76f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Ciência Animal e Pastagens, Universidade de São Paulo.

SILVA, D.J; QUEIROZ, A.C. **Análise de Alimentos: Métodos Químicos e Biológicos.**
Viçosa: UFV, 2009. 235p.

VAN SOEST, P.J.; WINE, R.H. Use of detergent in the analysis of farmers feeds. IV.
Determination of plant cell wall constituents. **Journal of THE AOAC**, v.50, p.50-55, 1967.

VAN SOEST, P.J. et al. Method for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch
polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583-3597,
1991.