

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOSSISTEMAS**

**FEZES DE BOVINOS COMO INÓCULO PARA ENSAIOS DE
DIGESTIBILIDADE *IN VITRO***

MARIANE ABREU SILVEIRA

Florianópolis
2015

Mariane Abreu Silveira

**FEZES DE BOVINOS COMO INÓCULO PARA ENSAIOS DE
DIGESTIBILIDADE *IN VITRO***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agroecossistemas, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Kazama

Coorientadores: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos

Prof. Dr. Luciano Soares de Lima

Florianópolis
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silveira, Mariane Abreu

Fezes de bovinos como inóculo para ensaios de digestibilidade in vitro / Mariane Abreu Silveira ; orientador, Ricardo Kazama ; coorientador, Geraldo Tadeu dos Santos , Luciano Soares de Lima. - Florianópolis, SC, 2015.

64 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas.

Inclui referências

1. Agroecossistemas. 2. Agroecossistemas. 3. Digestibilidade in vitro da matéria seca. 4. Inóculo de fezes. 5. Incubadora artificial DAISYII. I. Kazama, Ricardo . II. , Luciano Soares de Lima, Geraldo Tadeu dos Santos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. IV. Título.

“Fezes de bovinos como inóculo para ensaios de digestibilidade in vitro”

Por

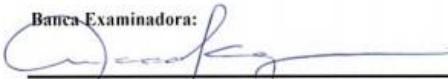
Mariane Abreu Silveira

Dissertação julgada adequada, em 26 de junho de 2015, e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Agroecossistemas. Área de Concentração, no Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias/UFSC.

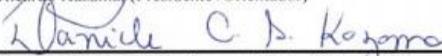


Prof. Dr. Ademir Antonio Cazella (Coordenador do Programa)

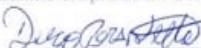
Banca Examinadora:



Dr. Ricardo Kazama, (Presidente / Orientador)



D^{ra} Daniele Cristina da Silva Kazama (Titular/PGA-UFSC)

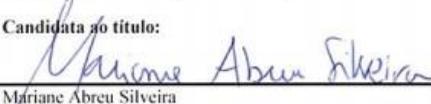


Dr. Diego Peres Netto (Titular Externo/DZDR-UFSC)



Dr. Carlos Eduardo Nogueira Martins (Titular Externo/IFC, Araquari)

Candidata ao título:



Mariane Abreu Silveira

Florianópolis, 26 de junho de 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Marlene, e meu pai, Oscar, que me ensinaram a importância do conhecimento e por serem exemplos de perseverança, e ainda pelo amor incondicional e o apoio nos momentos mais difíceis dessa jornada.

Agradeço a Deus por ser o maior fomentador de minhas conquistas.

Agradeço ao CNPq por ter possibilitado e financiado esta pesquisa.

Agradeço ao Professor Ricardo Kazama por ter me guiado com muita paciência e atenção durante esta etapa.

Agradeço ao Professor Geraldo Tadeu dos Santos e o Professor Luciano Soares de Lima por terem me orientado e apoiado durante minha estada em Maringá.

Agradeço ao querido Célio da Fazenda Experimental Iguatemi, por todo seu carinho e atenção, e por ajudar a alimentar a 522 e a 1032 todos os dias com um sorriso no rosto.

Agradeço ao Edson Eugenio por todas as conversas empreendedoras, os passeios e festinhas que fizemos em Maringá.

Agradeço Maria Betânia Niehues e o Guilherme Koerich pelo auxílio nos experimentos realizados e por tornar a estadia em Maringá menos saudososa de casa.

Agradeço também a meus antigos e novos amigos que sempre me fazem sorrir e que tanto amo estar perto: Vitor, Ramon, Mari, Thi, Gui, Luana Poderosa, Vavo, Dani, Gi, Carol e o Rafa.

Agradeço especialmente a linda Vanessa e ao Bond maravilhoso por terem sido tudo que eu precisei durante esse processo, por terem me dado à calma nos momentos turbulentos e por terem sido minha rocha.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a substituição do inóculo ruminal pelo inóculo fecal através da técnica de digestibilidade *in vitro* de alimentos volumosos e concentrados. Para tanto, foram realizados 2 ensaios. No primeiro, avaliou-se diferentes diluições (FZ₃₀₀, FZ₄₀₀, FZ₅₀₀) do inóculo fecal (solução tampão:fezes) em ensaios de digestibilidade *in vitro* de forrageiras e farelos. Em seguida, avaliou-se o inóculo fecal como substituto do inóculo ruminal em ensaios de digestibilidade *in vitro* da matéria seca e fibra em detergente neutro de forrageiras. Estes ensaios foram conduzidos na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Para a determinação da DIVMS e DIVFDN foi utilizada a técnica descrita por Tilley & Terry (1963) adaptada para o Fermentador Ruminal DAISY^{II} - ANKOM[®]. Não se encontraram diferenças entre as diluições testadas para a DIVMS dos alimentos. Não houve diferença entre os inóculos utilizados para a DIVMS de farelos e para leguminosas, porém, o inóculo fecal proporcionou valores inferiores de DIVMS para gramíneas frescas e fenos. Para análise de DIVFDN houve diferença entre os inóculos para todos os alimentos analisados (gramíneas frescas, fenos e leguminosas). Por isso, recomenda-se a as seguintes equações de correção para matéria seca e fibra em detergente neutro: $DIVMS(\%) = 27,59 + 0,71DIVMSFZ$ ($r^2=0,6620$); $DIVFDN(\%) = 22,68 + 0,82DIVFDNFZ$ ($r^2=0,5444$), respectivamente. Assim conclui-se que o inóculo fecal de bovinos possui grande potencial em substituir o inóculo ruminal nos ensaios de digestibilidade *in vitro* matéria seca e fibra em detergente neutro para os alimentos avaliados. Recomenda-se a diluição de 300g de fezes para 1000mL de solução tampão (FZ₃₀₀) como sendo a mais apropriada para a substituição do inóculo ruminal no método de DIVMS e DIVFDN.

Palavras-chave: diluição, fermentadora DAISY^{II}, fibra em detergente neutro, gramíneas, líquido ruminal, matéria seca

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the replacement of rumen fluid by fecal inoculum for *in vitro* digestibility technique used in fermenting Artificial DAISYII (ANKOM®) in roughages and concentrate feeds analyzes. For this purpose 2 trials were performed. At first, different dilutions (FZ₃₀₀, FZ₄₀₀, FZ₅₀₀) of fecal inoculum (buffer: feces) on *in vitro* digestibility trials of forage and grains/concentrate were evaluated. After, fecal inoculum was evaluated as a substitute for rumen fluid in roughages *in vitro* dry matter and neutral detergent fiber digestibility analysis. These researches were conducted at Fazenda Experimental Iguatemi at Universidade Estadual de Maringá, Maringá city, Paraná state. Two non-lactating Holstein cows, fistulated in the rumen, averaging 654 kg of body weight were used as donors of ruminal liquid and feces (FZ). IVDMD and IVNDFD were analyzed the Tilley and Terry (1963) technique adapted to Fermenter Rumen DAISY^{II}, which was developed by ANKOM® Technology Corporation, NY, USA. There was no difference among treatments for IVDMD of concentrate feeds and legumes forages, but feces inoculum reduced IVDMD of fresh forages and hays. There was no difference among dilutions for IVDMD of feedstuffs. Thus, great potential of bovine feces to replace ruminal inoculum at IVDMD assays was found, and our results suggests that 300 g of feces per 1000 mL of buffer solution as adequate dilution. Therefore, adjusting equations have been developed for digestibility data using feces as inoculum. For IVDMD and IVNDFD, positive correlations of 81.41% and 73.79% were observed with the following equations: $IVDMD(\%) = 27.59 + 0.71IVDMDFC$ ($r^2 = 0.6620$); $IVNDFD(\%) = 22.68 + 0.82IVNDFDFC$ ($r^2 = 0.5444$), respectively. There was a linear effect for IVDMD and IVNDFD, suggesting that it is possible to replace rumen fluid by feces as inoculum source for *in vitro* dry matter and neutral detergent fiber digestibility for the evaluated feeds. It is recommended dilution of 300 g feces to 1000 ml of buffer (FZ300) as the most appropriate for the replacement of the rumen fluid at IVDMD and IVNDFD methods.

Key-words: dilution, DAISY^{II} fermenter, neutral detergent fiber, grass, ruminal liquid, dry matter

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química da grama-estrela (<i>Cynodon dactylon</i>) e do suplemento consumido pelos animais doadores.....	37
Tabela 2 – Composição química dos alimentos avaliados.....	38
Tabela 3 – Valores médios de matéria seca (g/kg) das diferentes diluições de fezes (FZ ₃₀₀ , FZ ₄₀₀ , FZ ₅₀₀), das fezes sem diluição (FZ) e do líquido ruminal (LR).....	43
Tabela 4 – Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS g/kg) dos alimentos incubados com diferentes fontes de inóculo: líquido ruminal (LR) e as diluições de fezes (FZ ₃₀₀ , FZ ₄₀₀ e FZ ₅₀₀).....	43
Tabela 5 – Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS) de forrageiras incubadas com inóculo ruminal ou fecal.....	47
Tabela 6 – Digestibilidade <i>in vitro</i> da fibra em detergente neutro (DIVFDN) de forrageiras incubadas com inóculo ruminal ou fecal	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AFO – Amendoim Forrageiro
AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta
BBX – Pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés
BHL – Pastagem de *Brachiaria humidicola* cv. Llanero
CaCl₂.2H₂O – Cloreto de cálcio di-hidratado
CCA – Centro de Ciências Agrárias
CH₄ – Gás Metano
CO₂ – Gás Carbônico
DIV – Digestibilidade *in vitro*
DIVFDN – Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro
DIVFDN_{FZ} – Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro sob inóculo de fezes
DIVMS – Digestibilidade *in vitro* da matéria seca
DIVMSFZ – Digestibilidade *in vitro* da matéria seca sob inóculo fecal
EE – Extrato etéreo
FAF – Feno de alfafa
FAV – Feno de aveia
FCC – Feno de Coast-Cross
FDA – Fibra em detergente ácido
FDN – Fibra em detergente neutro
FEI – Fazenda Experimental Iguatemi
FMI – Farelo de milho
FSO – Farelo de soja
FTF – Feno de Tifton 85
FTR – Farelo de trigo
FZ – Fezes
FZ₃₀₀ – 300g fezes /1000mL solução tampão
FZ₄₀₀ – 400g fezes /1000mL solução tampão
FZ₅₀₀ – 500g fezes /1000mL solução tampão
H₂O – Água
HCl – Ácido Clorídrico
KH₂PO₄ – Fosfato monopotássico
LR – Líquido ruminal
MgSO₄.7H₂O – Sulfato de Magnésio heptahidratado
MM – Matéria mineral
MS – Matéria seca
N – Nitrogênio
n – Número de dados
Na₂CO₃ – Carbonato de sódio

Na₂S.9H₂O – Sulfeto de Sódio nonahidratado
NaCl – Cloreto de Sódio
NC – Cidade de Carolina do Norte
n° – Número
NY – Cidade de Nova Iorque
Pb – Preto e branca
PB – Proteína bruta
PC – Peso corporal
pH – Potencial de hidrogênio
PMM – Pastagem de *Panicum maximum* cv. Mombaça
SAS – Sistema de Análises Estatísticas
SMI – Silagem de milho
SPE – Soja Perene
UEM – Universidade Estadual de Maringá
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
USA – Estados Unidos da América

LISTA DE SÍMBOLOS

% – Porcentagem
® – Marca registrada
 cm^2 – Centímetros cuadrados
g – Gramas
g/100mL – gramas por 100 mililitros
g/kg – Gramas por quilogramas
g/L – Gramas por litros
h – Horas
kg – Quilogramas
mL – Mililitros
mm – Milímetros
°C – Graus Célsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	CARACTERÍSTICAS DA DIGESTÃO DE RUMINANTES... ..	25
2.2	DIGESTIBILIDADE DE ALIMENTOS	26
2.3	TÉCNICA DE DIGESTIBILIDADE IN VITRO (DIV)	28
2.4	RÚMEN.....	30
2.5	MICROBIOTA RUMINAL E FECAL	31
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	METODOLOGIA	37
4.1	ENSAIOS	39
4.1.1	Ensaio 1	39
4.1.2	Ensaio 2	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
5.1	DIFERENTES DILUIÇÕES FEZES:TAMPÃO PARA DIVMS DE FARELOS E FORRAGEIRAS.....	43
5.2	UTILIZAÇÃO DE FEZES BOVINA PARA DETERMINAÇÃO DA DIVMS E DIVFDN DE FORRAGEIRAS.....	46
	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	53
	ANEXOS	63
	ANEXO 1 – PARECER N°29/2014.....	63
	ANEXO 2 - PARECER N°157/2014.....	64

1 INTRODUÇÃO

O manejo nutricional de ruminantes induz alterações na fisiologia ruminal, uma vez que o tipo da dieta altera a população de microrganismos, taxa de passagem do alimento, a motilidade e a velocidade de absorção dos nutrientes com impacto sobre a digestibilidade. Nesse sentido, para a obtenção de um bom desempenho produtivo na criação de ruminantes deve-se atentar para interações entre o animal e o processo digestório, a fim de que o custo energético dos ajustes fisiológicos sejam os menores possíveis (FURLAN; MACARI; FARIA FILHO, 2006).

Os métodos químicos utilizados para caracterizar a composição nutritiva dos alimentos, denominados químico-bromatológicas, constituem como etapa inicial do processo de avaliação do alimento, porém, insuficientes para determinar a eficiência de utilização e transformação pelo animal em, por exemplo, lã, carne e leite. Para isso, necessita-se utilizar os métodos biológicos, nos quais consistem em determinar os coeficientes de digestibilidade e, também, degradabilidade do alimento.

Os métodos *in vivo* de determinação da digestibilidade das dietas (matéria seca e dos nutrientes) é de grande confiabilidade, porém, oneroso, demorado e controverso quanto ao uso dos animais. O método *in vitro* é uma boa opção para avaliar vários alimentos simultaneamente em laboratório, porém, assim como o método *in situ*, são técnicas que necessitam da coleta de inóculo ruminal (SILVA et al., 2003), que é comumente recolhido a partir de animais munidos de fístula ruminal, ou, ainda, de animais recém abatidos (CUTRIGNELLI et al., 2005) ou através do esôfago via sonda esofágica (MOULD et al., 2005). A fistulação e implantação da cânula no rúmen e nos intestinos são realizadas mediante intervenção cirúrgica, que varia conforme o tipo de cânula utilizada (MUZZI; MUZZI; GABELLINI, 2009).

A necessidade de fistular animais levanta uma série de problemas práticos, como por exemplo, instalações cirúrgicas, cuidados constantes para evitar infecções (especialmente nos trópicos) e custos associados com a manutenção a longo prazo destes animais. Além disso, há certo número de considerações éticas relacionadas com estas técnicas no que diz respeito ao bem-estar dos animais (MAURICIO et al., 2001; MOULD et al., 2005). Por isso, é imprescindível desenvolver técnicas *in vitro*, que sejam menos dependentes de líquido ruminal de animais fistulados.

Na literatura, Akhter (1994) não encontrou nenhuma diferença significativa na digestibilidade *in vitro* utilizando inóculo fecal de doadores alimentados com diferentes dietas concentrado-feno. E, ainda, muitos autores têm recomendado a utilização de fezes como uma potencial alternativa de fonte de inóculo para a digestibilidade *in vitro* pelo método desenvolvido por Tilley e Terry (AKHTER et al., 1999; CONE; VAN GELDER; BACHMANN, 2002; EL SHAER; OMED; CHAMBERLAIN, 1987) e, também, por intermédio da técnica de produção de gás *in vitro* (CHEN; ZHAO, 2004; HARRISON; BLAUWIEKEL; STOKES, 1994; MAURICIO et al., 2001; THEODOROU et al., 1994) devido ao seu potencial para simular a cinética de fermentação no rúmen e prever digestibilidade e degradabilidade *in vivo*, principalmente, de forragens.

Akhter & Hossain, (1998) verificando a substituição de líquido ruminal por fezes de bovinos na digestibilidade *in vitro*, encontraram valores absolutos de digestibilidade menores para o inóculo com fezes, apresentando, porém, alta correlação ($r^2=0,95$) com o líquido ruminal.

Mauricio et al. (2001) compararam os inóculos ruminal e fecal de vacas como fonte de microrganismos para técnica de produção de gás *in vitro* e encontraram na curva de fermentação um tempo de colonização (*lag phase*) superior para o inóculo fecal, devido à menor atividade ou concentração de microrganismos, porém com grande potencial como inóculo alternativo para a técnica *in vitro*.

Embora haja um consenso geral na literatura quanto ao potencial do inóculo fecal como fonte de inóculo microbiano em sistemas de fermentação ruminal *in vitro*, existem limitações nos trabalhos já realizados e, por isso, muitos autores discutem a real viabilidade deste método. São levantadas discussões quanto: à eficiência do mesmo através de uma ampla gama de alimentos, pois a maioria dos trabalhos utiliza apenas um único ingrediente, como substrato para a incubação; a falta de padronização das dietas consumidas pelos animais doadores, já que cada estudo utiliza uma dieta específica, isto é, não se tem definido qual relação concentrado/volumoso é mais apropriada para que o inóculo fecal tenha microbiota, no âmbito quantitativo e qualitativo, adequados ao método; além disso, discute-se qual seria a quantidade de material fecal necessária para fornecer a concentração ótima destes micróbios para os valores de digestibilidade; e ainda quais são os microrganismos que colonizam o material fecal de estudo, isto é, fornecer características específicas do inóculo, o qual muitas vezes é a parte mais variável e mal descrita do método em artigos científicos (CHEN; ZHAO, 2004; MAURICIO et al., 2001; MOULD et al., 2005;

OMED; LOVETT; AXFORD, 2000; THEODOROU et al., 1994; ZICARELLI et al., 2011).

É pertinente, não só para permitir a comparação entre os estudos, mas para limitar possíveis erros, ter um conjunto de diretrizes aceitas, incluindo a gestão dos animais, as técnicas de amostragem e preparação dos inóculos, o conhecimento dos microrganismos (protozoários e bactérias) presentes nestes, e, ainda, que os sistemas de digestibilidade *in vitro* sigam um protocolo padrão para o uso alternativo de inóculo ruminal (MOULD et al., 2005). Assim, tornaria possível a utilização e validação de métodos utilizando inóculo fecal em avaliações biológicas *in vitro*, o qual seria uma excelente alternativa aos atuais métodos por ser menos invasiva aos animais, de simples execução e menos oneroso.

Deste modo, objetivou-se determinar diretrizes de avaliação de digestibilidade de alimentos diversos (forrageiras) através da técnica de digestibilidade *in vitro* utilizando-se de inóculo fecal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS DA DIGESTÃO DE RUMINANTES

Os ruminantes possuem pré-estômagos com estruturas anatômicas próprias para a realização do processo de fermentação, permitindo o aproveitamento do material fibroso das plantas. Isto porque, apresentam simbiose com bactérias, fungos e protozoários que tem a capacidade enzimática para processar carboidratos estruturais (celulose e hemicelulose) como fonte de energia e compostos nitrogenados não proteicos como fonte de proteína (FURLAN; MACARI; FARIA FILHO, 2006). Para que esses órgãos, principalmente o rúmen, se tornasse a eficiente, complexa e simbiótica “máquina” capaz de degradar paredes celulares vegetais levaram-se milhares de anos (VALADARES FILHO; PINA, 2006). Por isso tentar recriar este compartimento digestório *in vitro* e ainda modificá-lo ao não uso do inóculo ruminal, como se propõe este trabalho, é uma tarefa hercúlea.

O manejo nutricional induz alterações na fisiologia ruminal, uma vez que o tipo de alimento altera a população de microrganismos, taxa de passagem do alimento, a motilidade e a velocidade de absorção dos nutrientes com impacto sobre a digestão dos ruminantes. Quando se refere ao alimento, diz-se de seus atributos nutricionais e para tal deve-se notar, principalmente, que a fibra em detergente neutro (FDN) é o componente que mais se aproxima dos valores do conteúdo da parede celular de um vegetal, sendo o componente que melhor representa os constituintes de baixa digestibilidade da dieta (MERTENS, 1989). Assim, quanto maior o teor de %FDN menor será a digestibilidade de um alimento.

Nesse sentido, para a obtenção de um bom desempenho produtivo na criação de ruminantes deve-se atentar para interações entre o animal e o processo digestório, a fim de que o custo energético dos ajustes fisiológicos sejam os menores possíveis (FURLAN; MACARI; FARIA FILHO, 2006). Os pré-estômagos (retículo, rúmen e omaso) têm a função de reter o alimento nesse segmento para ação fermentativa dos microrganismos ruminais por meio da fermentação anaeróbia. Já o abomaso é o estômago verdadeiro, glandular e com grande capacidade de digestão de nutrientes. Além disso, o processo digestivo dos ruminantes apresenta a particularidade da ruminação, que é o ato de remastigar o bolo alimentar, isto para que haja a redução das partículas a fim de facilitar a agregação dos microrganismos a estas durante a

fermentação (FURLAN; MACARI; FARIA FILHO, 2006). É importante salientar que a natureza da dieta influencia diretamente na ruminação; o teor de fibra é positivamente relacionado ao tempo de ruminação e ao tempo de ingestão, enquanto o tamanho da partícula é positivamente relacionado com a duração do tempo de ruminação e mastigação (VAN SOEST, 1994). E, também, na microbiota do rúmen, a composição da dieta, geralmente, determina a distribuição da população microbiana que utiliza os nutrientes dos alimentos no rúmen. Assim, dietas enriquecidas com proteína favorecem microrganismos proteolíticos, enquanto as enriquecidas com amido, que são pobres em fibra, estão associadas a grandes grupos utilizadores de amido (amilolíticas) (VALADARES FILHO; PINA, 2006).

Tendo em vista as particularidades dos ruminantes, deve-se ter grande atenção na formulação de dietas, para que estas atendam a demanda de manutenção e produção do animal. Um importante critério no cálculo da área necessária para pastagens em sistemas extensivos e semi-intensivos é o consumo voluntário, que é empregado para designar o limite máximo do apetite, sob condições de alimentação *ad libitum* e, ainda, a ingestão de matéria seca que influencia o desempenho animal, pois é o primeiro ponto determinante do ingresso de nutrientes, principalmente energia e proteína (PEREIRA et al., 2008).

Deve-se conhecer também os compostos complexos (carboidratos, proteínas, gorduras, vitaminas e sais minerais) que constituem os alimentos das dietas empregadas a bovinos. A composição dos alimentos pode ser conhecida através de análises bromatológicas, que definem estes compostos de forma quantitativa e qualitativa. Contudo, somente conhecer a composição do alimento é insuficiente, pois o animal possui limitações fisiológicas para a absorção de seus componentes. Por isso, análises que estudam a interação alimento-animal, como por exemplo, as análises biológicas, são de grande importância. Neste caso, podem-se citar as análises de digestibilidade ruminal.

2.2 DIGESTIBILIDADE DE ALIMENTOS

A proporção de uma alimentação que não é excretada nas fezes é assumida como absorvida pelo animal, e esta é definido como a digestibilidade aparente da ração. Contudo, esta não é a digestibilidade verdadeira. Os resíduos de alimentos não digeridos e as fezes contêm enzimas e outras substâncias secretadas no intestino que não são reabsorvidas. As partes do tubo digestivo, que se desprendem quando a

ração passa através do intestino, são também excretadas nas fezes (MCDONALD et al., 1995). A quantidade deste material metabólico que é inevitavelmente perdida é diretamente proporcional à matéria seca (MS) do consumo, independentemente do tipo de forragem. A determinação do coeficiente de digestibilidade verdadeira, em vez de digestibilidade aparente pode ser cientificamente mais precisa (MINSON, 1990), devido ao fato de considerar as perdas endógenas presentes nas fezes e na urina.

Segundo Mertens (1992), o consumo voluntário de alimento é responsável por 70% da variação no potencial de produção animal; os 30% restantes ficam por conta da digestibilidade e eficiência de utilização dos alimentos. Por isso, a obtenção de estimativas de digestibilidade dos alimentos constitui aspecto básico para o conhecimento de seu valor energético, notadamente via nutrientes digestíveis totais (NDT), permitindo o balanceamento adequado de dietas que atendam as demandas para manutenção e produção dos animais (DETMANN et al., 2006).

No entanto, mesmo constituindo parâmetro digestivo estático, ou seja, podendo ser representado por uma estimativa pontual, o acesso à digestibilidade de um alimento ou de seus respectivos componentes químicos constitui processo oneroso e demorado, sobretudo quando realizado pelos métodos clássicos *in vivo* (DETMANN et al., 2006).

As técnicas biológicas de fermentação, alternativas ao método *in vivo*, usadas para avaliar a valor nutricional de alimentos incluem métodos *in vitro* e digestão com microrganismos do rúmen, como por exemplo: o método adaptado de Tilley & Terry (1963); indiretamente através da técnica de produção de gás (MENKE et al., 1979; THEODOROU et al., 1994); pelo método de determinação da digestibilidade real da matéria orgânica (GOERING; VAN SOEST, 1970); e, também, pelo método de degradação enzimática com celulase de células livre de fungos (BOEVER et al., 1986).

Diversos grupos de estudos ressaltam as desvantagens de utilização de líquido ruminal recém-recolhido de animais permanentemente fistulados (CHEN; ZHAO, 2004; MAURICIO et al., 2001; THEODOROU et al., 1994; ZICARELLI et al., 2011). A necessidade de fistular animais levanta uma série de problemas práticos, como por exemplo, instalações cirúrgicas, cuidados constantes para evitar infecções (especialmente nos trópicos) e custos associados com a manutenção a longo prazo destes animais. Além disso, há certo número de considerações éticas relacionadas com estas técnicas no que diz respeito ao bem-estar dos animais (MAURICIO et al., 2001; MOULD et

al., 2005). Muitos estudos tem analisado a possibilidade de substituição do inóculo ruminal por uma suspensão a partir de inóculo fecal, como os realizados por Cutrignelli et al. (2005); Dhanoa et al. (2004); Mauricio et al. (2001); Omed et al. (1998) e Zicarelli et al. (2011).

2.3 TÉCNICA DE DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* (DIV)

Estudos revisados por Omed et al. (2000), demonstraram que fezes de animais ruminantes têm grande potencial como alternativa de inóculo para técnicas de DIV. O sucesso usando inóculo fecal nesta técnica foi observado em diversos trabalhos estimando a digestibilidade de uma variedade de alimentos com inóculos provindos de bubalinos (CUTRIGNELLI et al., 2005), ovinos (CONE; VAN GELDER; BACHMANN, 2002; ZICARELLI et al., 2011), equinos (EARING et al., 2010) e bovinos (MAURICIO et al., 2001).

Cutrignelli et al. (2005) avaliaram a utilização do inóculo fecal de búfalos como alternativa ao fluído do rúmen, para a avaliação de alimentos por meio da técnica da produção de gás *in vitro*. O inóculo ruminal foi coletado a partir de animais em jejum por cerca de doze horas e, dessa forma, o autor explica a baixa atividade dos microrganismos e que por isso o inóculo fecal não diferiu do ruminal quanto ao tempo de colonização e, ainda, a produção de gás total foi maior para o inóculo fecal.

Cone et al. (2002) realizaram trabalho utilizando inóculos fecais e ruminais provenientes de bovinos e ovinos, e verificaram que o inóculo ruminal de ovinos pode ser utilizado como uma alternativa ao de bovinos para determinar com precisão as diferenças na produção total de gás em 24 e 48 horas. Ainda, os autores informaram que o inóculo fecal de bovinos não pode ser substituto do ruminal para determinação em 24 horas de incubação através da técnica de produção de gases, contudo, quando a estimativa é feita para tempos de incubação de 48 horas o inóculo fecal demonstra-se uma boa alternativa. Isto porque, este apresenta atividade microbiana menor comparado ao inóculo ruminal e assim o tempo de colonização (*lag phase*) é maior e não se tem correlações significativas para baixos tempos de incubação.

Zicarelli et al. (2011), também trabalhou com ovinos, e obteve que a maioria dos parâmetros de fermentação foram influenciados pela dieta e o inóculo. Para ambos os inóculos (fecal e ruminal) a degradabilidade da matéria orgânica, a produção cumulativa de gás e a taxa de fermentação máxima aumentaram à medida que a quantidade de concentrado na dieta aumentou. A taxa de fermentação máxima foi

menor no inóculo fecal comparativamente ao inóculo ruminal; a degradabilidade da matéria orgânica foi maior para o inóculo fecal quando comparado com o inóculo ruminal; a interação dieta – inóculo foi significativa. Como esperado, para ambos os inóculos, a taxa de fermentação máxima aumentou à medida que o teor de fibra em detergente neutro (FDN) da dieta diminuiu. Correlações significativas foram obtidas entre os dois inóculos para a produção cumulativa de gás/degradabilidade da matéria orgânica e gás/ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), enquanto que a correlação AGCC/degradabilidade da matéria orgânica foi significativa apenas para inóculo fecal. A produção de biomassa microbiana calculada pela análise estequiométrica para todas as dietas foi maior para o inóculo fecal e para este a matéria orgânica utilizada para o crescimento microbiano mostrou uma tendência global decrescente à medida que a quantidade de concentrado na dieta aumentou.

Recentemente a alternativa mais eficiente para o uso do método de Tilley e Terry (1963) foi desenvolvido usando o incubador DAISY^{II} (ANKOM[®] Technology Corp., Fairport, NY) (EARING et al., 2010), que permite a incubação simultânea de diferentes alimentos em sacos selados de poliéster no mesmo vaso de incubação. Trabalhos mostraram que o uso de fluido ruminal ou fecal em um sistema fechado de fermentação, incubadora DAISY^{II}, fornece estimativas válidas de matéria seca e digestibilidade de fibra para forragens e grãos (TUFARELLI et al., 2010).

O trabalho de Earing et al. (2010) objetivou determinar se as metodologias *in vitro* desenvolvidos para a incubadora DAISY^{II} poderiam produzir estimativas precisas para digestibilidade *in vivo* de equinos para matéria seca e para fibra em detergente neutro quando utilizado inóculo fecais destes. As estimativas de digestibilidade podem ser obtidas num curto período de tempo com menos esforço do que o requerido pelos métodos tradicionais. As fezes de equinos foram determinadas como sendo uma fonte adequada de inóculo microbiano para determinação da DIV de dietas de equinos. A dieta dos doadores de inóculo teve pouca influência sobre a digestibilidade da dieta. Consequentemente, as alterações nas populações microbianas que podem ter resultado de composição da dieta teve efeito mínimo sobre a digestão *in vitro*. No entanto, esta experiência não avaliou dietas com alto teor de concentrado.

2.4 RÚMEN

O efeito geral entre a microbiota do rúmen e o animal hospedeiro é uma relação benéfica recíproca, denominada simbiose mutualística (MACKIE; WHITE, 1997). Casos de predação, competição, mutualismo e antibiose são outros exemplos de interações entre os microrganismos do rúmen, evoluídas durante 70 milhões de anos. Consequentemente qualquer estratégia de manipulação da fermentação ruminal deve levar em consideração esses aspectos ecológicos (HOFMANN, 1989; MACKIE; WHITE, 1997) e, ainda, as características inerentes ao rúmen. O rúmen pode ser definido como uma câmara de fermentação estável (temperatura, pressão osmótica, equilíbrio iônico) capaz de fornecer substrato à microbiota (nutrientes na forma de alimento e água recém-ingeridos) e, ainda, remover os produtos da fermentação (ácidos graxos de cadeia curta /AGCC, células microbianas, resíduos não digeridos) (ARCURI; LOPES; CARNEIRO, 2006).

Existe no rúmen um grande número de espécies de microrganismos (bactérias, fungos e protozoários), e não há consenso entre autores quanto à determinação de espécies autóctones neste compartimento. De acordo com Hungate (1966), uma bactéria é considerada importante no processo fermentativo quando esta encontrasse na proporção de 10^6 células por grama de conteúdo ruminal fresco, ter sido isolada pelo menos dez vezes em dois ou mais animais e ter sido isolada, em no mínimo, duas diferentes localidades geográficas. Para Stewart et al. (1997) uma espécie é considerada como parte da microbiota ruminal ao apresentar capacidade de efetivo crescimento no rúmen, ser anaeróbia e produzir subproduto(s) encontrado(s) no rúmen, isto é, possuir metabolismos compatíveis com as reações que ocorrem no ambiente ruminal normal. Entretanto, mesmo uma parcela menor da população ruminal pode ser muito importante, se exercer um impacto ecológico sobre outra (RASKIN et al., 1997).

O rúmen pode ser considerado um sistema multicompartmentado, devido as diferentes camadas formadas dentro deste, pela fermentação dos alimentos ingeridos, e os diferentes microrganismos que colonizam os diferentes substratos.

A camada superior é formada pelos gases da fermentação (CO_2 , CH_4 , entre outros), abaixo deste está uma camada flutuante formada pelo alimento grosseiramente mastigado, o qual se supõe residir uma pequena porção da microbiota ruminal, porém fundamental, estes na sua maioria bactérias celulolíticas, com tempo de geração elevado e associados a outros grupos, em consórcio e/ou em pares metabólicos,

com elevada interdependência e atividades metabólicas (KRAUSE et al., 2003; VAN SOEST, 1994). Partículas sólidas com dimensões médias de 2 mm, que já passaram pelo processo de ruminação, tem grande número de bactérias e filamentos (hifas) de fungos aderidos. Nas partículas sólidas também se encontram protozoários ciliados por estratégia de sobrevivência, devido ao seu tempo de geração, normalmente, ser maior do que a taxa de passagem da fase sólida (AKIN; BENNER, 1988; AKIN; LYON; WINDHAM, 1989; AKIN, 1987).

Sob a camada mais grosseira de alimento e sobre a camada líquida encontra-se uma fase intermediária que de acordo com Czerkawski (1986), tem função de transferência de material microbiano, de nutrientes e de produtos da fermentação entre as populações das fases que o circundam; e devido sua elevada atividade metabólica cria um gradiente de concentração que pode auxiliar tanto no suprimento de nutrientes, quanto na remoção.

Abaixo da fase intermediária, encontra-se a fase líquida com uma concentração microbiana menor e reduzida atividade metabólica (CZERKAWSKI, 1986). No entanto, Costerton & Cheng (1982) e Costerton et al. (1981) afirmam que ali estão presentes microrganismos aptos a colonizarem alimentos recém-ingeridos ou superfícies de tecidos recém-expostas, o que os leva atribuir grande atividade metabólica.

Como observado o rúmen é um meio complexo, difícil caracterização e que, por isso, cria divergentes opiniões. Dessa forma, o uso de ferramentas moleculares é um instrumento valioso para o estudo da ecologia microbiana ruminal (ARCURI et al., 2003; RASKIN et al., 1997).

2.5 MICROBIOTA RUMINAL E FECAL

A digestão em ruminantes é realizada, na sua maior porção, pela microflora do retículo-rúmen (HUNGATE, 1966). Van Gylswyk et al. (1992) afirmaram que os microrganismos ruminais que ocorrem em números significativos possuem taxas de crescimento suficiente para colonizar conteúdo ruminal, que está em constante rotatividade. Ainda, que as dietas de ruminantes que são, tipicamente, deficientes em um ou mais fatores de crescimento permitem o crescimento rápido de espécies minoritárias, as chamadas espécies "especialistas", como *Ruminobacter amylophilus* (amilolítica) e a *Fibrobacter succinogenes* (celulolítica). As espécies de bactérias ruminais mais abundantes são as "generalistas" ou "não específica", tal como *Prevotella ruminicola* e *Butyrivibrio fibrosolvens*, que degradam uma ampla gama de polímeros, ou como a

Selenomonas ruminantium que utilizam uma ampla variedade de produtos finais.

Quando comparado isolados provindos do rúmen e de material fecal encontrou-se a viabilidade total e o número de espécies celulolíticas de 10 a 1000 vezes maior no conteúdo ruminal (KERN et al., 1974; LATHAM; SHARPE; SUTTON, 1971). Contudo, identificaram-se espécies similares e em proporção diferente para cada um dos inóculos. As bactérias celulolíticas, por exemplo, do gênero *Butyrivibrio* são mais dominantes no rúmen, enquanto, as *Ruminococcus* prevalecem nas fezes (LEWIS, S.M., DEHORITY, 1985; MANN; ØRSKOV, 1973; SHARPE; LATHAM; REITER, 1975). Similarmente, El-meadaway et al. (1998), encontraram uma população mais diversificada e um maior conteúdo total de bactérias no rúmen com as espécies dominantes do gênero *Prevotella*, *Butyrivibrio* e *Selenomonas*. Em contraste, observaram uma população celulolíticas muito menor nas fezes, com população predominante dos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*.

Latham et al. (1971) substituindo todo o feno da dieta por alimento concentrado (milho e cevada) encontrou número de bactérias semelhante para a dieta a base de volumoso e concentrado ($2,95$ a $5,13 \times 10^8$). Contudo o número de bactérias celulolíticas decresceu de 10^7 para 10^6 , na troca do feno para cevada e para 10^3 com a troca por milho. Esse efeito da dieta foi observado por Lewis & Dehority (1985) também na população de bactérias das fezes quando bovinos foram submetidos a dietas de 100:0 e 20:80 (Feno de Timothy e grão de milho moído). Observou-se conteúdo total viável de 6×10^8 e 5×10^{10} /mL de bactérias, respectivamente, mas não houve diferença na população celulolítica (12×10^5 e 4×10^5 /mL).

A população de protozoários em bovinos é de apenas em média de 10^6 /mL, mas representam cerca de metade da biomassa microbiana e são responsáveis por cerca de 25% da atividade celulolítica microbiana do rúmen e ainda ajudam a manter o pH alto realizando o englobamento de grânulos de amido. Devido ao baixo pH do abomaso os protozoários não sobrevivem a passagem por ele (HOBSON, 1971), e desta forma, as fezes não apresentam atividade de protozoários.

A maioria dos fungos é capaz de fermentar amido e glicogênio, para além de polissacarídeos da parede celular, embora preferencialmente utilizem açúcares simples (GORDON; PHILLIPS, 1998). Davies et al. (1993), encontraram sua maior concentração no rúmen, com o declínio gradativo do abomaso até o intestino delgado,

mas com aumento significativo no intestino grosso. Dessa forma, encontra-se atividade de fungos também nas fezes.

As populações de microrganismos celulolíticos que ficam agregados às partículas sólidas durante a passagem do rúmen, se deslocam para o omaso, em seguida abomaso e intestinos, sofrem massivas perdas, devido à digestão verdadeira (MOULD et al., 2005). A maioria dos microrganismos do rúmen não utiliza proteínas, lipídeos e ácidos graxos de cadeia curta como fontes de energia, para seu crescimento, e sim carboidratos como sua principal fonte de energia (NOCEK; RUSSELL, 1988). Somado a isto, os microrganismos que fermentam carboidratos fibrosos (celulose, hemicelulose e lignina) apresentam lenta taxa de crescimento e usam somente amônia como fonte de nitrogênio; já os microrganismos que utilizam carboidratos não-fibrosos (pectina, amido) crescem mais rapidamente que os primeiros e podem utilizar amônia, peptídeos e aminoácidos como fonte de nitrogênio (N) para seu crescimento (RUSSELL et al., 1983).

Por consequência, quando comparamos o líquido ruminal com o inóculo fecal exibe-se diferença marcante na população fibrolítica (quebra de carboidratos fibrosos) e semelhança acentuada na população amilolítica (quebra de carboidratos não-fibrosos).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o inóculo fecal de bovinos em substituição ao inóculo ruminal na determinação *in vitro* da digestibilidade dos alimentos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar diferentes diluições do inóculo fecal (solução tampão:fezes) em ensaios de digestibilidade *in vitro* de forrageiras e farelos;
- Avaliar a correlação existente entre o inóculo fecal e o inóculo ruminal em ensaios de digestibilidade *in vitro* da matéria seca e fibra em detergente neutro de forrageiras;
- Avaliar as características químicas dos alimentos (análise bromatológica);
- Analisar a regressão linear simples e a regressão linear múltipla existente entre os inóculos ruminal e fecal para a digestibilidade *in vitro* da matéria seca e fibra em detergente neutro.

4 METODOLOGIA

O trabalho foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e nos Laboratórios de Análises de Alimentos e Nutrição Animal e Digestibilidade *in vitro* e Metabolismo Animal, do Departamento de Zootecnia da UEM, Maringá, Estado do Paraná. O presente estudo foi aprovado pelas Comissões de Ética no Uso de Animais da UEM e da UFSC, sob parecer nº29/2014 (Anexo 1) e nº157/2014 (Anexo 2), respectivamente.

Os animais doadores de inóculos foram duas vacas secas da raça Holandesa Pb, fistuladas no rúmen, com peso corporal (PC) médio de 654 kg. As vacas eram mantidas em piquetes com pastagem de grama-estrela (*Cynodon dactylon*) e suplementadas (0,5% PC) com mistura concentrada (Tabela 1), de manhã (08:00 h) e de tarde (16:00 h). A mistura concentrada era composta por 60% de farelo de milho, 12% de farelo de soja, 25% de farelo de trigo e 3% de sal mineral Bovipasto®. Além disso, disponibilizou-se sombra e água *ad libitum* às doadoras. O período de adaptação à dieta foi de 15 dias.

Tabela 1 – Composição química da grama-estrela (*Cynodon dactylon*) e do suplemento consumido pelos animais doadores.

Nutrientes	MS g/kg	g/kg MS				
		EE	PB	MM	FDN	FDA
Grama-estrela	277,8	13,2	227,6	87,2	674,7	319,6
Suplemento	895,7	36,2	218,1	83,5	205,3	78,4

MS: matéria seca; EE: extrato etéreo; PB: proteína bruta; MM: matéria mineral; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido.

Os alimentos testados foram: silagem de milho (*Zea mays*), feno de Coast-Cross (*Cynodon dactylon*), feno de aveia (*Avena strigosa*), feno de alfafa (*Medicago sativa*), feno de tifton 85 (*Cynodon spp.*), *Brachiaria humidicola* cv. Llanero, *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés, *Panicum maximum* cv. Mombaça, Amendoim Forrageiro (*Arachis pintoi*), Soja Perene (*Neonotonia wightii*), farelo de milho (*Zea mays*), farelo de soja (*Glycine max*) e farelo de trigo (*Triticum spp.*).

As forrageiras *B. humidicola*, Xaraés e Mombaça foram colhidas no ponto de maior produtividade e teor nutricional, isto é, quando a planta atinge 95% de interceptação de luz (SANTOS & VIEIRA, 2011) no outono/inverno. Procedeu-se a secagem destes alimentos em estufa

de circulação de ar forçado a 55°C por 72 horas e depois processados em moinho do tipo faca (MARCONI[®]), provido de peneira com crivos de 1mm.

Os alimentos selecionados foram avaliados quanto à concentração de matéria seca e composição química (Tabela 2). Para as análises de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE), usou-se a metodologia de Silva e Queiroz (2002). As análises de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas segundo Mertens (2002) e Van Soest et al. (1991).

Tabela 2 – Composição química dos alimentos avaliados.

Alimento	MS g/kg	g/kg MS				
		MM	EE	PB	FDN	FDA
Gramíneas Frescas						
<i>B. humidicola</i>	218,9	55,6	16,2	90,9	742,2	410,4
<i>P. Mombaça</i>	240,5	63,5	8,8	112,9	745,9	390,5
<i>B. Xaraés</i>	193,5	78,2	20,1	104,7	678,6	368,3
Conservados						
Coast cross, feno	926,2	37,2	4,2	44,0	835,1	449,4
Aveia, feno	946,7	81,1	9,9	84,3	758,9	440,0
Tifton 85, feno	847,8	43,3	6,8	54,3	837,4	436,1
Alfafa, feno	876,6	96,9	11,1	231,9	519,1	356,5
Milho, silagem	293,6	48,4	29,9	90,8	463,4	268,2
Farelos						
Soja, farelo	881,9	64,1	20,6	543,4	134,6	108,6
Milho, farelo	885,8	14,6	43,7	87,5	171,0	31,9
Trigo, farelo	887,7	40,0	31,8	191,7	360,1	99,7
Leguminosas						
Amendoim Forrageiro	228,9	107,7	11,6	209,3	463,1	318,3
Soja perene	219,2	84,3	17,9	239,9	448,8	328,4

MS: Matéria Seca, MM: Matéria Mineral, EE: Extrato Etéreo, PB: Proteína Bruta, FDN: Fibra em Detergente Neutro, FDA: Fibra em Detergente Ácido.

4.1 ENSAIOS

A dissertação foi subdividida em dois ensaios, pois cada um destes visou responder a um dos objetivos específicos:

- Ensaio 1 – Determinação da diluição (tampão:fezes) mais adequada de inóculo fecal para técnica de DIVMS dos alimentos;
- Ensaio 2 – Correlação entre o inóculo ruminal e o inóculo fecal mais adequado obtido no Ensaio 1 para determinar a DIVMS e DIVFDN dos alimentos.

4.1.1 Ensaio 1

TRATAMENTOS

Os tratamentos consistiram em diferentes fontes de inóculo microbiano, líquido ruminal (LR) e fezes (FZ), para análise de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de alguns alimentos na Fermentadora Artificial DAISY^{II} (ANKOM[®]).

O líquido ruminal foi preparado seguindo as recomendações da ANKOM na proporção 1:5 (400mL de LR para 1600mL de solução tampão), enquanto as FZ foram preparadas em três diferentes diluições, nas seguintes proporções de fezes para solução tampão: 300g/1000mL (FZ₃₀₀), 400g/1000mL (FZ₄₀₀) e 500g/1000mL (FZ₅₀₀), perfazendo assim quatro tratamentos.

Para avaliar a eficiência dos inóculos, foram testados 9 alimentos: feno de Coast-Cross (FCC), feno de aveia (FAV), pastagem de *Brachiaria humidicola* cv. Llanero (BHL), pastagem de *Panicum maximum* cv. Mombaça (PMM), Amendoim Forrageiro (AFO), Soja Perene (SPE), farelo de milho (FMI), farelo de soja (FSO) e farelo de trigo (FTR).

TÉCNICA

Para a determinação da DIVMS foi utilizada a técnica descrita por Tilley & Terry (1963) adaptada para o Fermentador Ruminal DAISY^{II}, desenvolvida pela empresa ANKOM[®] Technology Corporation, NY, USA, conforme descrito por HOLDEN (1999).

Os alimentos foram previamente processados em moinho do tipo faca (MARCONI[®]), provido de peneira com crivos de 1mm, e pesados em duplicata contendo 0,25g de amostra em cada bolsa F57 (5×5,5cm²,

ANKOM[®]), para posteriormente, serem acondicionados nos jarros providos de inóculo.

A solução tampão (saliva artificial) foi preparada com a mistura das soluções A e B em uma relação de 5:1, apresentando pH final de 6,8 a temperatura de 39°C. A solução A (g/L) composta por: 10,0g KH₂PO₄; 0,5g MgSO₄.7H₂O; 0,5g NaCl; 0,1g CaCl₂.2H₂O e 0,5g uréia, e a solução B (g/100mL): 15,0g Na₂CO₃; 1,0 g Na₂S.9H₂O.

O líquido ruminal foi colhido antes da suplementação matinal, através de fístula ruminal. Para o inóculo ruminal, manteve-se uma proporção de 50% de material da fase sólida (colhida manualmente) e 50% de material líquido (colhido através de bomba de sucção). Em seguida, o inóculo foi transferido para a garrafa térmica pré-lavada e pré-aquecida a 39°C, adicionando-se CO₂ antes e após a colocação do inóculo líquido ruminal, juntamente com o material na fase sólida por aproximadamente 30 segundos, lacrando-se a garrafa para o transporte até o laboratório.

As fezes foram coletadas (3 coletas) diretamente do reto, cerca de 1,5kg de fezes de cada animal por coleta, no mesmo horário da coleta do líquido ruminal. Após a coleta, as fezes foram colocadas em garrafa térmica, pré-lavada e pré-aquecida a 39°C, antes e após a colocação do material injetou-se CO₂, então, as garrafas foram lacradas e transportadas ao laboratório.

Em seguida, o material fecal foi diluído em solução tampão (pH 6,8; 39°C) nas seguintes proporções: 300g/1000mL, 400g/1000mL e 500g/1000mL. Em seguida, procedeu-se à homogeneização das diluições e do líquido ruminal, no liquidificador, pré-aquecido (39°C) e purgado com CO₂, durante aproximadamente 30 segundos. Após a obtenção dos inóculos, LR, FZ₃₀₀, FZ₄₀₀, FZ₅₀₀, foram filtrados individualmente em 4 camadas de tecido de 100% algodão (gaze) e espremidos à mão até serem obtidos 400mL de cada inóculo para cada jarro. Cada um dos inóculos foi preparado isoladamente para cada um dos animais doadores.

Em cada jarro foi adicionado 1600mL de saliva artificial, as amostras em bolsas F57 e 400mL de inóculo. Antes e depois da colocação dos inóculos adicionou-se CO₂ durante 30 segundos, para imediatamente fechá-los com tampa dotada de válvula de escape de gases. A temperatura foi mantida a 39°C e os sacos-filtro foram incubados por 48 horas.

O método de 2 estágios foi completado pela adição de cerca de 30mL de HCl (6 Normalidade) e 8g de pepsina (1:10.000) em cada jarro, mantendo a temperatura à 39°C por mais 24 horas. A pepsina foi

dissolvida em 35mL de H₂O destilada e, em seguida, foi verificado o valor do pH (2 - 3,5).

No término desse período, os jarros foram drenados e os sacos lavados no próprio jarro fermentador, 6 vezes com água destilada. O gás contido nos sacos foi removido com delicada pressão das mãos sobre os mesmos. Os sacos foram secos a 105°C em estufa por 24 horas para a secagem definitiva e determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS).

Após serem retirados da estufa, os sacos foram colocados em dessecador para atingirem a temperatura ambiente. Em seguida, foram pesados em balança analítica com precisão de 0,0001g para se determinar a matéria seca (MS). A DIVMS foi calculada pela diferença da quantidade incubada do resíduo que ficou após a incubação, por meio da seguinte fórmula:

$$DIVMS = \frac{MS \text{ do alimento} - MS \text{ do resíduo}}{MS \text{ do alimento}}$$

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos (LR, FZ₃₀₀, FZ₄₀₀, FZ₅₀₀) e 6 repetições (2 animais x 3 incubações). Os efeitos dos tratamentos foram estudados por análise de variância e os contrastes de médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, por meio do Sistema de Análises Estatísticas (SAS) desenvolvido pelo SAS Institute Inc., Cary, NC, USA (2002).

4.1.2 Ensaio 2

TRATAMENTOS

Os tratamentos analisados constituíram de inóculo do líquido ruminal (LR) e das fezes (FZ), para determinação da DIVMS e DIVFDN (DAISY^{II} – ANKOM[®]) de alimentos volumosos. O inóculo fezes foi calibrado na diluição 300g/1000mL (FZ₃₀₀), conforme resultados do Ensaio 1.

Para avaliar a eficiência dos inóculos, foram utilizadas 8 forragens: silagem de milho (SMI), feno de Tifton 85 (FTF), feno de aveia (FAV), feno de alfafa (FAF), pastagem de *Brachiaria humidicola* cv. Llanero (BHL), pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés (BBX), pastagem de *Panicum maximum* cv. Mombaça (PMM) e Amendoim Forrageiro (AFO).

TÉCNICA

Para a determinação da DIVMS e DIVFDN utilizou-se a técnica descrita por Tilley e Terry (1963) adaptada para o Fermentador Ruminar DAISY^{II}, conforme descrito por HOLDEN (1999). Contudo, para a determinação da DIVFDN excluiu-se a segunda etapa da digestão enzimática, sendo os filtros (F57) lavados, logo após a primeira etapa da fermentação ruminal, e submetidos à análise da determinação de FDN (ANKOM²⁰⁰ Fiber Analyzer, ANKOM[®] Technology Corporation, NY, USA).

Os procedimentos de coleta, manuseio e preparo dos inóculos, fezes e líquido ruminal, e amostras foram realizadas conforme descrito no Ensaio 1, porém, as amostras foram pesadas em triplicata e foram realizadas 4 coletas de material fecal e ruminal.

A DIVMS foi calculada pela diferença da quantidade incubada e o resíduo que ficou após a incubação, por meio da seguinte fórmula:

$$DIVMS = \frac{MS \text{ do alimento} - MS \text{ do resíduo}}{MS \text{ do alimento}}$$

A DIVFDN foi calculada pela diferença da quantidade que foi incubada e o resíduo que ficou após a análise de FDN do material incubado, por meio da seguinte fórmula:

$$DIVFDN = \frac{FDN \text{ do alimento} - FDN \text{ do resíduo}}{FDN \text{ do alimento}}$$

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 2 tratamentos (LR e FZ₃₀₀) e 8 repetições (2 animais x 4 incubações). Os efeitos dos tratamentos foram avaliados por análise de variância e os contrastes de médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ainda analisou-se a regressão linear simples e a regressão linear múltipla (modelo linear de 2° grau) existente entre os tratamentos, por meio do SAS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 DIFERENTES DILUIÇÕES FEZES:TAMPÃO PARA DIVMS DE FARELOS E FORRAGEIRAS

Os diferentes tratamentos (LR, FZ₃₀₀, FZ₄₀₀, FZ₅₀₀, Tabela 3) não influenciaram as DIVMS dos farelos e das leguminosas (Tabela 4). Estes alimentos possuem menores teores de carboidratos fibrosos e maior teor proteico (Tabela 2) quando comparados com as forrageiras frescas (BHL e PMM) e os conservados (FCC e FAV).

Tabela 3 – Valores médios de matéria seca (g/kg) das diferentes diluições de fezes (FZ₃₀₀, FZ₄₀₀, FZ₅₀₀), das fezes sem diluição (FZ) e do líquido ruminal (LR).

Matéria Seca (g/kg)	FZ*	FZ ₃₀₀	FZ ₄₀₀	FZ ₅₀₀	LR
	144,3	0,069	0,094	0,121	0,659

*Material assim como colhido dos animais doadores.

Tabela 4 – Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS g/kg) dos alimentos incubados com diferentes fontes de inóculo: líquido ruminal (LR) e as diluições de fezes (FZ₃₀₀, FZ₄₀₀ e FZ₅₀₀).

Alimentos	DIVMS (g/Kg de MS)				n	p value	Erro Padrão
	LR	FZ ₃₀₀	FZ ₄₀₀	FZ ₅₀₀			
Gramíneas Frescas							
BHL	663,6 a	516,5 b	525,8 b	531,9 b	23	0,0013	10,71
PMM	658,8 a	536,6 b	558,6 b	542,6 b	23	0,0009	6,56
Conservados							
FCC	434,0 a	306,2 bc	319,6 b	263,7 c	21	0,0004	5,69
FAV	560,4 a	393,0 bc	422,0 b	374,2 c	21	0,0001	3,72
Farelos							
FSO	951,2	914,2	922,1	893,1	24	0,1788	7,56
FMI	923,2	907,4	914,8	913,0	24	0,6327	1,85
FTR	821,0	797,5	812,4	798,7	24	0,0985	1,21
Leguminosas							
AFO	669,8	635,0	639,8	651,3	22	0,3923	5,84

SPE	670,9	609,5	630,6	622,6	21	0,1055	5,20
-----	-------	-------	-------	-------	----	--------	------

Médias na linha seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si ($p>0,05$).

BHL: Pastagem de *Brachiaria humidicola* cv. Llanero, PMM: Pastagem de *Panicum maximum* cv. Mombaça, FCC: Feno de Coast-Cross, FAV: Feno de aveia, FSO: Farelo de soja, FMI: Farelo de milho, FTR: Farelo de trigo, AFO: Amendoim Forrageiro, SPE: Soja Perene.

Alcalde et al. (2001), comparando o líquido de rúmen com diferentes diluições de fezes de bovino, encontraram valores semelhantes de DIVMS dos farelos de soja (FSO), milho (FMI) e trigo (FTR) de 98,78%, 95,79% e 80,19%, respectivamente. Além disso, os referidos autores também não observaram efeito dos diferentes inóculos sobre a DIVMS dos farelos. A ausência de efeito dos inóculos também foi observada por Silva et al. (2003) sobre a DIVMS da casca de soja e milho moído. Já Mabeesh et al. (2000) registraram valores médios inferiores para o FTR e FMI; suas médias de DIVMS com inóculo ruminal foram de 63,4% e 85,9%, respectivamente.

As leguminosas forrageiras, amendoim forrageiro (AFO) e soja perene (SPE), apresentam escassez de dados na literatura, sendo que a disponibilidade de dados destes alimentos parte na forma conservada. O feno de AFO possui valor de DIVMS de 78,29% (FERNANDES et al., 2011) e digestibilidade aparente de 64,4% (LADEIRA et al., 2002), enquanto que o feno de SPE apresenta valor de 44,3% de digestibilidade aparente da matéria seca (LADEIRA et al., 2002). O software CQBAL 3.0 apresenta valor de 68,68% de DIVMS do AFO, forragem verde, contudo este valor é baseado em apenas um trabalho ($n=1$). Contudo, as leguminosas forrageiras, bem como os farelos, possuem características químicas (menor quantidade de carboidratos fibrosos e maior quantidade de proteína) e estruturais (parede celular menos robusta) que possibilitam a substituição do inóculo ruminal por inóculo fecal para a técnica de DIVMS, sendo que não foi observada diferença entre as diferentes diluições de inóculo fecal.

No entanto, observou-se diferença de DIVMS ($P<0,05$) de gramíneas frescas e feno incubados com inóculo ruminal ou fecal, cabe salientar que as diferentes diluições resultaram em resultados semelhantes de digestibilidade para as gramíneas frescas, enquanto para os fenos a diluição FZ500 mostrou médias inferiores as demais diluições.

Os fenos apresentaram DIVMS inferiores ao observado por outros autores, como o FCC avaliado por Alcalde *et al.* (2001), o qual

observou 80,54%FDN e 61,01%DIVMS. Outro exemplo é Palhano & Haddad (1992), que para este alimento em diferentes idades de corte (20 a 70 dias), obtiveram valores entre 74,5 e 51,2% de DIVMS pelo método Tilley & Terry (1963). Já o FAV analisado por Ferreira et al. (1993), com 15% de umidade, apresentou DIVMS de 67,22% (TILLEY; TERRY, 1963).

As gramíneas frescas apresentaram valores de DIVMS superior aos observados por Pereira et al. (1992) e Alencar et al. (2009), os quais encontraram para BHL (quatro estações) e PMM (outono/inverno, 70,15%FDN) as DIVMS de 41,4% e 60,49%, respectivamente.

Dessa forma, sugere-se que alimentos com altos teores de carboidratos fibrosos, baixos teores de carboidratos prontamente digestíveis e baixo conteúdo de proteína, os volumosos e principalmente os conservados, em análises de DIVMS na fermentadora DAISY^{II}, são sensíveis à substituição do inóculo ruminal pelo inóculo fecal. Essas diferenças ocorrem principalmente pelas diferenças existentes na população microbiológica destes inóculos (MOULD et al., 2005). Quando comparamos o líquido ruminal com o inóculo fecal exibe-se diferença marcante (indivíduos/mL, espécies) dos microrganismos que fermentam carboidratos fibrosos e semelhança acentuada das populações que fermentam carboidratos não-fibrosos (MOULD et al., 2005), sendo que a população de bactérias celulolíticas do líquido ruminal pode ser de 10 a 1000 vezes maior do que aquelas encontradas no líquido fecal (KERN et al., 1974; LATHAM; SHARPE; SUTTON, 1971) e ainda observa-se uma diversidade maior destas espécies no líquido ruminal (EL-MEADAWAY et al., 1998). Dessa forma, infere-se que os microrganismos presentes nas fezes não proporcionam a mesma intensidade de fermentação anaeróbica aos alimentos. Isto se fortalece quando estudos são realizados de degradabilidade (técnica de produção de gases) ao observa-se um maior tempo de colonização (*lag phase*) quando se faz uso de fezes como inóculo, isto porque, este apresenta atividade microbiana menor comparativamente ao inóculo ruminal (CONE; VAN GELDER; BACHMANN, 2002; ZICARELLI et al., 2011). Contudo, ainda acredita-se no potencial do método de análise de DIVMS com a substituição metodológica do líquido ruminal por fezes, necessitando de ajustes (equações) para equacionar as diferenças observadas na DIVMS de forrageiras utilizando estes inóculos (MULLER, 2000).

Os alimentos com elevados conteúdos de carboidratos prontamente digestíveis e também proteínas mostram DIVMS indiferentes à substituição do inóculo. Dessa forma, para estes alimentos

a substituição direta do LR pelas FZ faz-se possível. Contudo, supõe-se que a pepsina e o HCl, na segunda etapa da metodologia, ocasionam o mascaramento das diferenças de digestibilidade total ocasionadas pelas distintas fontes de material microbiológico, pois estes simulam a digestibilidade realizada no abomaso (estômago verdadeiro), onde ocorre a quebra das proteínas dos alimentos e, também, da proteína de origem microbiana. Para tal confirmação seria necessário à repetição deste trabalho com a inclusão da análise digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN).

Não houve diferença entre as diluições testadas para a DIVMS dos alimentos. Diante disso, verifica-se que menores diluições, com maiores concentração de material orgânico, não ocasionam o aumento do desempenho fermentativo do inóculos. Dessa forma, a simplificação do preparo da solução deve ser levada em conta na escolha da melhor diluição.

A diluição de 300 g de fezes por 1000mL de solução tampão ocasiona menor quantidade de fezes coletada e maior facilidade e rapidez no preparo do inóculo, especialmente durante a filtragem da solução fezes/tampão em 4 gases.

5.2 UTILIZAÇÃO DE FEZES BOVINA PARA DETERMINAÇÃO DA DIVMS E DIVFDN DE FORRAGEIRAS

Os valores de DIVMS de gramíneas frescas e conservadas foram diferentes ($P < 0,05$) entre os tratamentos, sendo que a incubação com inóculo fecal representou, respectivamente, 82,76% e 82,65% dos valores de DIVMS com inóculo ruminal (Tabela 5).

A pastagem de BBX apresentou valor de DIVMS superior ao observado por Alencar et al. (2009) e Sobrinho & Carneiro (2009) de 60,81% e 54,10%, respectivamente, de acordo com o método de Tilley & Terry (1963). Do mesmo modo, a SMI e o FAV apresentaram valores médios superiores aos observados na literatura. Contudo, ressalta-se a grande variação na composição da SMI dependendo do método de ensilagem (SENGER et al., 2005). Segundo este autor, a planta de milho cortada com 90 dias e ensilada com densidade de 625 kg de MV.m⁻³, proporcionou uma SMI com 25,80% de MS, 54,50% de FDN e 52,20% de DIVMS pelo método de Tilley & Terry (1963). Em outro exemplo, a planta de milho cortada com 125 dias, proporcionou uma SMI com 27,77% de MS, 48,68% de FDN e 73,75% de DIVMS na fermentadora DAISY^{II} (Oliveira et al., 2011). O FTF, segundo dados da literatura,

apresenta valores de DIVMS entre 59,89% a 67,66% (ALCALDE et al., 2001; SILVA et al., 2003).

Tabela 5 – Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de forrageiras incubadas com inóculo ruminal ou fecal.

Forrageiras	DIVMS (g/kg de MS)		n	p value	Erro Padrão
	Inóculo Ruminal	Inóculo Fecal			
Gramíneas frescas					
BHL	679,0	523,2	2 4	<0,000 1	2,74
BBX	676,7	568,6	2 5	0,0002	9,25
PMM	675,9	589,3	2 6	0,0032	10,46
Conservados					
FAV	569,5	411,5	2 5	<0,000 1	4,88
FTF	448,0	378,4	1 4	0,0076	5,27
SMI	751,6	685,6	2 7	0,0012	2,45
Leguminosas					
AFO	696,10	692,90	2 5	0,7259	1,58
FAF	598,00	596,50	1 5	0,9460	8,98

BHL: pastagem de *Brachiaria humidicola* cv. Llanero, PMM: pastagem de *Panicum maximum* cv. Mombaça, BBX: Pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés, FAV: feno de aveia, SMI: Silagem de Milho, FTF: Feno de Tifton 85, AFO: amendoim forrageiro, FAF: feno de alfafa.

O FAF apresentou valor de DIVMS semelhante ao encontrado na literatura de 53,60% a 58,91% (HOLDEN, 1999; MABJEESH et al., 2000). Os valores de DIVMS de leguminosas forrageiras foram semelhantes, independente do tipo de inóculo utilizado. Com isso, permite-se inferir que para as leguminosas, a substituição do inóculo ruminal pelo fecal pode ser realizada sem adaptações.

Observa-se que forrageiras com maiores teores de carboidratos fibrosos, apresentaram valores inferiores de digestibilidade,

corroborando com as informações de Mertens (1989). Nestes alimentos, o tipo do inóculo utilizado (ruminal ou fecal) influenciou os resultados de DIVMS, o qual, segundo Mould et al. (2005), o inóculo fecal apresenta baixo conteúdo biológico fibrolítico, ocasionando em menor intensidade de fermentação anaeróbica.

Sendo assim, para utilizar o inóculo fecal para determinação da DIVMS de volumosos (alto teor de fibra e baixo teor de proteína), torna-se necessário a correção dos dados, por meio de uma equação correlativa e corretiva. Para tanto, utilizou-se os valores de DIVMS das forrageiras BHL, PMM, BBX, FAV, FTF e SMI, incubadas com inóculo ruminal ou fecal. Os dados proporcionaram uma correlação positiva de 81,41%, indicando um efeito linear (enquanto, a regressão linear múltipla não simulou o modelo), com coeficiente de determinação (r^2) de 0,6620, resultando na seguinte equação de correção:

$$DIVMS(\%) = 27,5915 + 0,7072 \times DIVMS_{Fz}(\%), \text{ onde:}$$

DIVMS: digestibilidade *in vitro* da matéria seca correspondente ao inóculo ruminal; $DIVMS_{Fz}$: digestibilidade *in vitro* da matéria seca utilizando o inóculo fecal.

O forte efeito de linearidade confirma o grande potencial do inóculo fecal no ensaio de digestibilidade *in vitro* da matéria seca, e, mostra a necessidade de mais dados (n) para aumentar o coeficiente de determinação da equação de correção para as forrageiras.

A utilização de diferentes inóculos acarretou em diferença ($P < 0,05$) nos valores de digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN) das forrageiras avaliadas (Tabela 6). Os valores de DIVFDN das gramíneas frescas, conservadas e leguminosas, quando incubadas com inóculo fecal, representaram 72,91%, 74,14% e 82,77% dos valores obtidos com inóculo ruminal, respectivamente. Conforme discutido nos resultados do Ensaio 1, a ação da pepsina e do HCl utilizados no segundo estágio da metodologia de DIVMS estaria excluindo o efeito dos diferentes inóculos para alimentos com menor teor de carboidratos fibrosos e/ou ricos em proteína. Diante disso, visto que na metodologia da DIVFDN exclui-se o segundo estágio, o efeito do uso de diferentes inóculos foi percebido. E dessa forma, reforçam-se as diferenças microbiológicas existentes entre os inóculos analisados e o menor potencial de fermentação de carboidratos fibrosos do inóculo fecal.

Os valores médios de DIVFDN encontrados na literatura para as gramíneas frescas, BHL, PMM e BBX, foram inferiores aos

observados neste trabalho. Para *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola* encontraram-se as digestibilidade *in vivo* de 35,99% e 31,53%, respectivamente (BRITO; RODELLA; DESCHAMPS, 2003). Para o *Panicum maximum* observou-se a digestibilidade *in vivo* variando entre 49,77 – 61,38% (CASTRO; RODRIGUEZ, 2008).

Tabela 6 – Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN) de forrageiras incubadas com inóculo ruminal ou fecal

Forrageiras	DIVFDN (g/kg de FDN)		n	p value	Erro Padrão
	Inóculo Ruminal	Inóculo Fecal			
Gramíneas frescas					
BHL	700,1	485,8	1 6	<0,00 01	6,87
BBX	706,5	512,9	1 6	<0,00 01	8,38
PMM	702,2	538,9	1 6	<0,00 01	4,64
Conservados					
FAV	560,3	393,2	1 6	0,000 3	10,63
FTF	514,3	382,4	1 5	0,000 2	5,35
SMI	638,2	497,0	1 6	0,000 6	4,3
Leguminosas					
AFO	623,5	507,4	1 6	<0,00 01	4,25
FAF	539,9	454,4	1 4	0,017 4	11,36

BHL: pastagem de *Brachiaria humidicola* cv. Llanero, PMM: pastagem de *Panicum maximum* cv. Mombaça, BBX: Pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés, FAV: feno de aveia, SMI: Silagem de Milho, FTF: Feno de Tifton 85, AFO: amendoim forrageiro, FAF: feno de alfafa.

Para os alimentos conservados, SMI e FAV, as médias de DIVFDN observadas por outros autores foram inferiores, para SMI entre 45,75% e 61,50% (GONÇALVES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2002) e para o FAV o valor observado foi de

52,33% (MIZUBUTI et al., 2002). Enquanto para o FTF encontrou-se valores superiores variando de 55,90% a 61,50% (GONÇALVES et al., 2003; WEST et al., 1998).

A DIVFDN das leguminosas observadas na literatura foi inferior para o AFO, 53,40% (LADEIRA et al., 2002), e semelhança para o FAF, 51,00% (FORSTER et al., 1991).

Assim como, ocorreu com a análise de DIVMS, a análise de DIVFDN demonstrou-se necessidade da correção de dados quando realizada com inóculo fecal. Por isso, fez-se necessária a elaboração de uma equação correlativa e corretiva. Para isso, utilizando os alimentos volumosos que apresentaram influência ($p < 0,05$) dos inóculos para DIVFDN (FAV, FTF, BHL, PMM, BBX, FAF e AFO), correlacionou-se a DIVFDN realizada com inóculo fecal e ruminal. Dessa forma, obteve-se a correlação positiva de 67,67%, indicando alta força da existência do relacionamento linear entre as variáveis avaliadas, com um coeficiente de determinação (r^2) de 0,4579, que resultou na seguinte equação de correção:

$$DIVFDN(\%) = 21,3537 + 0,8185 \times DIVFDN_{FZ}(\%), \text{ onde:}$$

DIVFDN: digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro correspondente ao inóculo ruminal; $DIVFDN_{FZ}$: digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro utilizando o inóculo fecal.

Os coeficientes encontrados de correlação da análise de DIVFDN com inóculo fecal e ruminal mostram médias correlações lineares existentes entre as duas variáveis. Notando-se, que assim como na análise de DIVMS, faz-se necessário o aumento do número de dados (n) para que se melhore e consolide o coeficiente de determinação encontrado e que os regressores possam explicar melhor a correção definida.

6 CONCLUSÃO

Fezes bovinas podem substituir o inóculo ruminal em análises de digestibilidade *in vitro* da matéria seca e fibra em detergente neutro, pelo método da fermentadora artificial DAISY^{II}, sendo apropriado a utilização da diluição de 300 g de fezes por 1000 mL de solução tampão. Sendo que em análises de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de farelos e leguminosas a substituição do inóculo ruminal pelo inóculo fecal é direta e sem necessidade de correção de dados, enquanto para gramíneas frescas e fenos faz-se necessário a correção dos dados através da equação de regressão: $\text{DIVMS}(\%) = 27,5915 + 0,7072 \times \text{DIVMS}_{\text{Fz}}(\%)$ ($r^2=0,6620$). Enquanto para análises de digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN) de leguminosas, gramíneas frescas e fenos precisam de correções nos dados através da equação de regressão: $\text{DIVFDN}(\%) = 21,3537 + 0,8185 \times \text{DIVFDN}_{\text{Fz}}(\%)$ ($r^2=0,4579$). Ainda assim, fazem-se necessários avanços nas pesquisas a fim de que se aumente a acurácia das equações obtidas.

7 REFERÊNCIAS

AKHTER, S. **Use of cow faeces to provide microorganisms for the in vitro digestibility assay of forages**. UK: University of Reading, 1994.

AKHTER, S. et al. Bovine faeces as source of microorganisms for the in vitro digestibility of forages. **Grass and Forage Science**, v. 54, p. 219–226, 1999.

AKHTER, S.; HOSSAIN, M. M. Cow faeces in in vitro digestibility assays of forages. **Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 11, n. 1, p. 51–54, 1998.

AKIN, D. E. Association of rumen fungi with various forage grasses. **Animal Feed Science and technology**, v. 16, p. 273, 1987.

AKIN, D. E. .; BENNER, R. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1117, 1988.

AKIN, D. E. .; LYON, C. E. .; WINDHAM, W. R. Physical degradation of lignified stem tissues by ruminal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 611, 1989.

ALCALDE, C. R. et al. Digestibilidade in vitro de alimentos com inóculos de líquido de rúmen ou de fezes de bovinos. **Acta Scientiarum. ...**, v. 23, n. 4, p. 917–921, 2001.

ALENCAR, C. A. B. DE et al. Valor Nutritivo De Gramíneas Forrageiras Tropicais Irrigadas Em Diferentes Épocas Do Ano. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 1, p. 20–27, 28 dez. 2009.

ARCURI, P. B. . et al. Polyethylene glycol and polyvinylpyrrolidone effect on bacterial rRNA extraction and hybridization from cells exposed to tannins. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1073–1081, 2003.

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. DA C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, TELMA TERESINHA; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. DE (Eds.). .

Nutrição de ruminantes. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p. 111 – 140.

BOEVER, J. L. DE. et al. The use of an enzymic technique to predict digestibility, metabolisable and net energy of compound feedstuffs for ruminants. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 14, p. 203–214, 1986.

BRITO, C. J. F. A. DE; RODELLA, R. A.; DESCHAMPS, F. C. Perfil químico da parede celular e suas implicações na digestibilidade de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6 - Supl. 2, p. 1835–1844, 2003.

CASTRO, G. H. DE F.; RODRIGUEZ, N. M. **Silagens de capim Tanzânia (*Panicum maximum* cv Tanzânia) em diferentes idades.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

CHEN, X. J. .; ZHAO, G. Y. The suitability of a faecal suspension of sheep as inoculum for the estimation of utilizable crude protein of feeds by in vitro incubation. **Archives of Animal Nutrition**, v. 58, p. 137 – 148, 2004.

CONE, J. W.; VAN GELDER, A. H.; BACHMANN, H. Influence of inoculum source on gas production profiles. **Animal Feed Science and Technology**, v. 99, n. 1-4, p. 221–231, ago. 2002.

COSTERTON, J. W. .; CHENG, K.-J. Colonization of tissue surfaces by autochthonous bacteria. In: **Microbiology**. Washington: A.S.M., 1982. p. 266–73.

COSTERTON, J. W.; IRVIN, R. T. .; CHENG, K.-J. The bacterial glycocalyx in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 35, p. 299 – 324, 1981.

CUTRIGNELLI, M. I. et al. Comparison of buffalo rumen liquor and buffalo faeces as inoculum for the in vitro gas production technique. **Italian Journal of Animal Science**, v. 4, n. Suppl. 2, p. 319–321, 2005.

CZERKAWSKI, J. W. Degradation of solid feeds in the rumen: spatial distribution of microbial activity and its

consequences. In: **Control of digestion and metabolism in ruminants**. New Jersey: Prentice Hall, 1986. p. 173–195.

DAVIES, D. R. et al. Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. **J. Gen. Microbiol**, v. 139, p. 1395–1400, 1993.

DETMANN, E. . et al. Estimação da digestibilidade dos carboidratos não-fibrosos em bovinos utilizando-se o conceito de entidade nutricional em condições brasileiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1479–1486, 2006.

DHANOVA, M. S. et al. Technical note: A proposed method to determine the extent of degradation of a feed in the rumen from the degradation profile obtained with the in vitro gas production technique using feces as the inoculum. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 733–746, 2004.

EARING, J. E. et al. Comparison of in vitro digestibility estimates using the DaisyII incubator with in vivo digestibility estimates in horses. **Journal of animal science**, v. 88, n. 12, p. 3954–63, dez. 2010.

EL SHAER, H. M.; OMED, H. M.; CHAMBERLAIN, A. Use of faecal organisms from sheep for the in vitro determination of digestibility. **The Journal of Agricultural Science Cambridge**, v. 109, p. 257–259, 1987.

EL-MEADAWAY, A. et al. Relative efficacy of inocula from rumen fluid or faecal solution for determining in vitro digestibility and gas production. **Can. J. Anim. Sci.**, v. 78, p. 673– 679, 1998.

FERNANDES, G. M. et al. Valor nutritivo do feno de amendoim forrageiro em diferentes idades de corte 1. **B. Indústria.anim.**, v. 68, n. 2, p. 133–138, 2011.

FERREIRA, J. Q. et al. Efeito dos níveis de amônia anidra e dos períodos pós-tratamento sobre a qualidade dos fenos de aveia contendo alta ou baixa umidade. **Rev. Soc. Bras. Zoot.**, v. 22, n. 1, p. 47–52, 1993.

FORSTER, L. A. et al. Apparent digestibility and nutrient balance in lambs fed different levels of flatpea hay. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 1719–1725, 1991.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D. E. Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Eds.). **Nutrição de ruminantes**. 1^a. ed. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 1 – 21.

GOERING, H. K. .; VAN SOEST, P. J. **Forage Fiber Analysis**. Washington: USDA Agriculture Handbook, 1970. v. 379p. 20

GONÇALVES, G. D. et al. Determinação do Consumo, Digestibilidade e Frações Protéicas e de Carboidratos do Feno de Tifton 85 em Diferentes Idades de Corte. **R. Bras. Zootec**, v. 32, n. 4, p. 804–813, 2003.

GORDON, G. L. R.; PHILLIPS, M. W. The role of anaerobic gut fungi in ruminants. **Nutrition Res. Rev.**, v. 11, p. 133–168, 1998.

HARRISON, J. H.; BLAUWIEKEL, R.; STOKES, M. R. Fermentation and utilization of grass silage. **Journal of dairy science**, v. 77, p. 3209–3235, 1994.

HOBSON, P. N. Rumen microorganisms. **Prog. Indust. Microbiol.**, v. 9, p. 42–77, 1971.

HOFMANN, R. R. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. **Oecologia**, v. 78, p. 443, 1989.

HOLDEN, L. A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of dairy science**, v. 82, n. 8, p. 1791–4, ago. 1999.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. New York: Academic Press, 1966. p. 533

KERN, D. L. et al. Ponies vs. steers: microbial and chemical characteristics of internal ingesta. **J. Anim. Sci.**, v. 38, p. 559–564, 1974.

KRAUSE, D. O. . et al. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology and genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. n.27, p. 663 – 693, 2003.

LADEIRA, M. M. et al. Avaliação do feno de *Arachis pintoi* utilizando o ensaio de digestibilidade in vivo. **R. Bras. Zootec.**, v. 31, n. 6, p. 2350–2356, 2002.

LATHAM, M. J.; SHARPE, M. E.; SUTTON, J. D. The microflora of the rumen of cows fed hay and high cereal rations and its relationship to the rumen fermentation. **J. Appl. Bact.**, v. 34, p. 425–434, 1971.

LEWIS, S.M., DEHORITY, V. B. A. Microbiology and ration digestibility in the hindgut of the ovine. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 50, p. 402–412, 1985.

MABJEESH, S. J.; COHEN, M.; ARIELI, A. In vitro methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: comparison of methods and inoculum source. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 10, p. 2289–94, out. 2000.

MACKIE, R. .; WHITE, B. A. . Gut environment and evolution of mutualistic fermentative digestion. In: **Gastrointestinal Microbiology**. 1. ed. New York: International Thompson Publishing, 1997. p. 13 – 38.

MANN, S. O.; ØRSKOV, E. R. The effect of rumen and post-rumen feeding of carbohydrates on the caecal microflora of sheep. **J. Appl. Bact.**, v. 36, p. 475–484, 1973.

MAURICIO, R. M. et al. Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an in vitro gas production technique for evaluating forages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 89, n. 1-2, p. 33–48, jan. 2001.

MCDONALD, P. . et al. **Animal Nutrition**. 5^a. ed. Harlow: Longman Scientific and Technical, 1995. p. 232–233

MENKE, K. H. . et al. Estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor

in vitro. **The Journal of Agricultural Science**, v. 93, p. 217 – 222, 1979.

MERTENS, D. R. **Fiber analysis and its use in ration formulation** Annual Pacific Northwest Animal Nutrition Conference. **Anais...**1989

MERTENS, D. R. **Análise da fibra e sua utilização na avaliação e formulação de rações**SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES. **Anais...**Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1992

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

MINSON, D. J. **Forage in Ruminant Nutrition**. London: Academic Press, 1990. p. 483

MIZUBUTI, I. Y. et al. Consumo Médio e Digestibilidade Aparente dos Nutrientes do Feno de Aveia (*Avena sativa* L .) e Ervilha (*Pisum sativum* L .) em Ovinos Submetidos a Dois Regimes Alimentares Oat Hay (*Avena sativa* L .) and Pea (*Pisum sativum* L .) Nutrients Digestibility a. **R. Bras. Zootec**, v. 31, n. n.2 - suplemento, p. 1042–1049, 2002.

MOULD, F. L. et al. In vitro microbial inoculum: A review of its function and properties. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, p. 31–50, set. 2005.

MULLER, M. **Avaliação da técnica de inóculo fecal para a determinação da digestibilidade “in vitro”**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

MUZZI, L. A. L.; MUZZI, R. A. L.; GABELLINI, E. L. A. Técnica de fistulação e canulação do rúmen em bovinos e ovinos. **Ciênc. agrotec.**, v. 33, n. Edição Especial, p. 2059–2064, 2009.

NOCEK, J. E.; RUSSELL, J. B. Protein and Energy as an Integrated System. Relationship of Ruminant Protein and Carbohydrate Availability to Microbial Synthesis and Milk

Production. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 8, p. 2070–2107, ago. 1988.

OLIVEIRA, F. C. L. DE et al. Produtividade e valor nutricional da silagem de híbridos de milho em diferentes alturas de colheita. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 4, p. 720–727, 2011.

OMED, H. M. et al. A low tech in-vitro procedure using faecal liquor for the estimation of digestibility of forages. **Proceedings of the British Society for Animal Sciences.**, p. 23–25, 1998.

OMED, H. M.; LOVETT, D. K.; AXFORD, R. F. E. Faeces as a source of microbial enzymes for estimating digestibility. In: **Forage evaluation in ruminant nutrition**. Wallingford: CAB International, 2000. p. 135–154.

PALHANO, A. L.; HADDAD, C. M. Exigências nutricionais e valor nutritivo de *Cynodon dactylon* (L.) Pers. cv. Coast-Cross n 1. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 1429 – 1438, 1992.

PEREIRA, J. M. et al. Teor de proteína bruta e digestibilidade “in vitro” da matéria seca da forragem disponível e da dieta selecionada por bovinos em pastagem de *Brachiaria humidicola*, em monocultivo ou consorciado com leguminosas, submetida a diferentes taxas de lotação. **Rev. Soc. Bras. Zoot.**, v. 21, n. 1, p. 104 – 117, 1992.

PEREIRA, O. G. et al. Consumo e digestibilidade dos nutrientes e desempenho de bovinos de corte recebendo dietas com diferentes níveis de uréia. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 552–562, 2008.

RASKIN, L. . et al. Molecular Ecology of Gastrointestinal Ecosystems. In: **Ecology and Physiology of Gastrointestinal Microbes**. New York: Chapman & Hall, 1997. p. 243 – 298.

RODRIGUES, P. H. M. et al. Valor Nutritivo da Silagem de Milho sob o Efeito da Inoculação de Bactérias Ácido-. **R. Bras. Zootec.**, v. 31, n. 6, p. 2380–2385, 2002.

RUSSELL, J. B.; SNIFFEN, C. J.; VAN SOEST, J. P. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 3, p. 763–782, 1983.

SANTOS, A. G. T.; VIEIRA, A. R. Alturas de pastejo recomendadas para as principais forrageiras considerando 95% de interceptação luminosa. **Cadernos de Pós-Graduação da FAZU**, v. 2, 2011.

SENGER, C. C. D. et al. Composição química e digestibilidade “ in vitro ” de silagens de milho com distintos teores de umidade e níveis de compactação. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1393–1399, 2005.

SHARPE, E. M.; LATHAM, M. J.; REITER, B. The immune response of the host animal to bacteria in the rumen and caecum. In: **Digestion and Metabolism in the Ruminant**. Sydney: The University of New England, 1975.

SILVA, K. T. DA et al. de fezes (equina ou bovina) em substituição ao líquido ruminal como fonte de inóculo para determinação da digestibilidade in vitro de alimentos para ruminantes-. **Acta Scientiarum**, v. 25, n. 2, p. 355–361, 2003.

SOBRINHO, F. D. S.; CARNEIRO, H. Produtividade e qualidade da forragem de Brachiaria na Região Norte Fluminense. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, n. 32, p. 7–20, 2009.

STEWART, C. S. .; FLINT, H. J. .; BRYANT, M. P. The rumen bacteria. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**. 2. ed. London: Blackie Academic, 1997. p. 10 – 72.

THEODOROU, M. K. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, n. 3-4, p. 185–197, ago. 1994.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A TWO-STAGE TECHNIQUE FOR THE IN VITRO DIGESTION OF FORAGE CROPS. **Grass and Forage Science**, v. 18, p. 104–111, 1963.

TUFARELLI, V. et al. Evaluation of chemical composition and In vitro digestibility of appennine pasture plants using yak (*Bos grunniens*) rumen fluid or faecal extract as inoculum source. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, p. 1587–1593, 2010.

VALADARES FILHO, S. D. C.; PINA, D. DOS. Fermentação Ruminal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Eds.). . **Nutrição de ruminantes**. 1^a. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p. 151–179.

VAN GYLSWYK, N. O. .; WEJDEMAR, K.; KULANDER, K. Comparative growth rates of various rumen bacteria in clarified rumen fluid from cows and sheep fed different diets. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 58, p. 99–105, 1992.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of ruminant**. 2^a. ed. London: Comstock Publishing Associates, 1994. p. 476

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583–3597, 1991.

WEST, J. W. et al. Intake, milk yield, and digestion by dairy cows fed diets with increasing fiber content from bermudagrass hay or silage. **Journal of dairy science**, v. 81, p. 1599–1607, 1998.

ZICARELLI, F. et al. In vitro fermentation characteristics of diets with different forage/concentrate ratios: comparison of rumen and faecal inocula. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 91, n. 7, p. 1213–21, maio 2011.

8 ANEXOS

ANEXO 1 – PARECER Nº29/2014



Universidade Estadual de Maringá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação



Parecer emitido após reunião realizada em:

3/4/2014

Parecer nº

029/2014

Pesquisador: Geraldo Tadeu dos Santos

Setor: DZO

Título:

Protocolo nº 016/2014

Inoculofecal de bovinos para determinação da digestibilidade in vitro e cinética da degradação ruminal pela técnica de produção de gases.

Entrada: 11/3/2014

Início: 15/6/2014

Término: 30/12/2014

Situação do Projeto: **Próxima Reunião**

Relatório Final:

ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação do relatório final.

Considerações e Parecer:

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEM), na sua reunião de 03/04/2014, APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo, na forma do artigo 10, inciso I, da Resolução UEM no 032/2006-CEP, vez que não se constatam óbices legais para o desenvolvimento dos procedimentos experimentais nos moldes propostos pelo(a) pesquisador(a).



Prof. Dr. Alexandre Ribas de Paulo,
Presidente do CEAE

Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP. Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:
I - aprovado;
II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;
III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;
IV - não aprovado

www.ppg.uem.br - e-mail: ceeaa@uem.br

8.1 ANEXO 2 - PARECER Nº157/2014

11/10/2014

notes.ufsc.br/aplic/ceua.msrf/486c5b9fe9931c868325702e0075533b/126e799f87c3188683257d1100662029?OpenDocument

Resultado de Solicitação de Protocolo**Protocolo**

PP00883

Título

INÓCULO FECAL DE BOVINOS PARA DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE IN VITRO E CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO RUMINAL PELA TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE GASES

Data de Entrada

06/05/2014

Resultado:

Aprovado

Data / Prazo

10/07/2014

Considerações

Ofício nº 157/CEUA/PROPESQ/2014

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Ricardo Kazama - Departamento de Zootecnia e Desenvolvimento Rural - CCA

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO "AD REFERENDUM", por dezessete meses, para a utilização de dois bovinos Holandeses.

- Procedência do animal: Fazenda Experimental de Iguatemi.

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)
Data 10/03/2016

Data 10/07/2014

Parecer(es):

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE