

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA

MARIA BETÂNIA NIEHUES

FEZES BOVINA NA DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE
***IN VITRO* DA MATÉRIA SECA**

FLORIANÓPOLIS – SC

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA

MARIA BETÂNIA NIEHUES

FEZES BOVINA NA DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE
***IN VITRO* DA MATÉRIA SECA**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como exigência para obtenção do Diploma de Graduação em Zootecnia pela Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador (a): Prof. Dr. Ricardo Kazama

FLORIANÓPOLIS – SC

2016

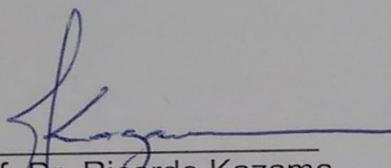
Maria Betânia Niehues

FEZES BOVINA NA DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE IN VITRO DA MATÉRIA SECA

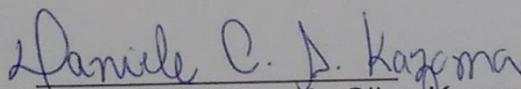
Esta Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso foi julgada aprovada e adequada para obtenção do grau de Zootecnista.

Florianópolis, 24 de junho de 2016.

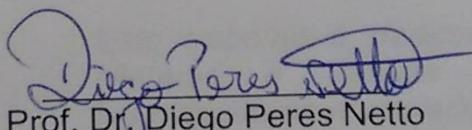
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Ricardo Kazama
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof.^a. Dr.^a. Daniele Cristina da Silva Kazama
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Diego Peres Netto
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Niehues, Maria Betânia
Fezes bovina na determinação da digestibilidade in vitro
da matéria seca / Maria Betânia Niehues ; orientador,
Ricardo Kazama - Florianópolis, SC, 2016.
40 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agrárias. Graduação em Zootecnia.

Inclui referências

1. Zootecnia. 2. Avaliação de alimentos. 3. Fermentador
ruminal. 4. Inóculo. 5. Líquido ruminal. I. Kazama, Ricardo.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Zootecnia. III. Título.

Este trabalho é dedicado aos meus pais Ivair Niehues e Vanuza dos Santos, grandes incentivadores e apoiadores de minha jornada de estudante e aos meus irmãos Ulysses, Diana e Amabili, pela amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida.

Agradeço aos meus avós paternos e maternos, Albino José Niehues (*in memoriam*) e Juraci Carolina Niehues, Maria do Carmo de Lima e Neri Figueiredo. Agradeço a todos pela família maravilhosa que me proporcionaram.

Agradeço aos meus pais Ivair Niehues e Vanuza dos Santos pela educação e valores repassados e por serem o maior referencial e exemplo da minha vida. Amo vocês acima de tudo.

Agradeço aos meus irmãos Ulysses, Diana e Amabili, que por mais difícil que fossem as circunstâncias, estiveram e estarão sempre ao meu lado, vocês são essenciais em minha vida.

Agradeço ao CNPq por ter possibilitado e financiado esta pesquisa.

Agradeço ao meu orientador Ricardo Kazama por ter me ajudado e me guiado ao longo deste trabalho.

Agradeço aos Professores Geraldo Tadeu dos Santos e Luciano Soares de Lima por terem me orientado e apoiado durante o período que estive na Universidade Estadual de Maringá.

Agradeço ao funcionário Célio do setor de Bovinocultura Leiteira da Fazenda Experimental de Iguatemi - UEM, pela atenção e auxílio na alimentação dos animais e também pelos ensinamentos durante o estágio no setor.

Agradeço aos colegas Mariane Abreu Silveira e Guilherme Koerich pelo auxílio nos experimentos realizados.

Agradeço aos meus amigos e colegas pelo companheirismo ao longo desses cinco anos, especialmente as minhas amigas Laraine, Camila e Cristiane. E também aos novos amigos de Maringá, especialmente a Regiane e a Adrieli, as quais tornaram essa etapa menos saudososa de casa.

Você pode dizer adeus a sua família e as seus amigos e afastar-se milhas e milhas e, ao mesmo tempo, carrega-los em seu coração, em sua mente, em seu estômago, pois você não apenas vive no mundo, mas o mundo vive em você. E faça da nostalgia, algo bom.

Frederick Buechner

Que teu coração deposite toda a sua confiança no Senhor! Não te firmes em tua própria sabedoria! Sejam quais forem os teus caminhos, pensa nele, e ele aplainará tuas sendas.

Provérbio 3 v. 5 e 6

RESUMO

A técnica de digestibilidade *in vitro* em ruminantes é uma alternativa ao método *in vivo*, uma vez que permite avaliar vários alimentos simultaneamente, porém faz-se necessário coletar líquido ruminal, que em geral, é obtido a partir de animais fistulados no rúmen. Desta forma, nos dias atuais, busca-se fontes alternativas de inóculo microbiano para realizar ensaios *in vitro*. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a substituição do inóculo ruminal pelo inóculo fecal na técnica de digestibilidade *in vitro* de alimentos volumosos e concentrados. Para tanto, foi realizado um ensaio, onde avaliou-se a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) utilizando diferentes diluições de fezes para solução tampão de: 300g/1000mL, 400g/1000mL e 500g/1000mL, utilizando a técnica descrita por Tilley e Terry (1963) adaptada para o Fermentador Ruminal DAISY^{II} - ANKOM[®]. Este trabalho foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). As gramíneas frescas e fenos apresentaram maiores teores de carboidratos fibrosos, o que refletiu em valores inferiores de DIVMS para o inóculo fecal, necessitando de correção de dados através de equações de regressão. Não houve diferença entre os inóculos utilizados para determinação da DIVMS de farelos e leguminosas. As diferentes diluições testadas não afetaram os valores de DIVMS dos alimentos. Diante disso, verificou-se grande potencial do inóculo fecal de bovinos em substituir o inóculo ruminal nos ensaios de DIVMS, e para isso, recomenda-se a diluição de 300 g de fezes por 1000 mL de solução tampão.

Palavras-chave: avaliação de alimentos, carboidratos fibrosos, fermentador ruminal, gramíneas, inóculo, líquido ruminal

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição químico-bromatológica da grama-estrela (<i>Cynodon dactylon</i>) e do suplemento fornecido aos animais doadores.	24
Tabela 2 - Composição químico-bromatológica dos alimentos avaliados.	26
Tabela 3 - Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS g/kg) dos alimentos incubados com diferentes fontes de inóculo: líquido ruminal (LR) e as diferentes diluições de fezes (FZ ₃₀₀ , FZ ₄₀₀ e FZ ₅₀₀).	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Cloreto de cálcio di-hidratado

CO_2 – Gás Carbônico

DIVFDN – Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro

DIVMS – Digestibilidade *in vitro* da matéria seca

EE – Extrato etéreo

FDA – Fibra em detergente ácido

FDN – Fibra em detergente neutro

FEI – Fazenda Experimental Iguatemi

FZ – Fezes

FZ₃₀₀ – 300g fezes /1000mL solução tampão

FZ₄₀₀ – 400g fezes /1000mL solução tampão

FZ₅₀₀ – 500g fezes /1000mL solução tampão

HCl – Ácido Clorídrico

KH_2PO_4 – Fosfato monopotássico

LR – Líquido ruminal

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Sulfato de Magnésio heptahidratado

MM – Matéria mineral

MS – Matéria seca

n – Número de dados

Na_2CO_3 – Carbonato de sódio

$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ – Sulfeto de Sódio nonahidratado

NaCl – Cloreto de Sódio

NC – Cidade de Carolina do Norte

NY – Cidade de Nova Iorque

PB – Proteína bruta

Pb – Preto e branco

pH – Potencial de hidrogênio

SAS – Sistema de Análises Estatísticas

UEM – Universidade Estadual de Maringá

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVO	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos.....	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	Característica digestivas dos animais ruminantes	15
3.2	Digestibilidade de alimentos	17
3.3	Técnica de digestibilidade <i>in vitro</i> utilizando fezes.....	18
3.4	Microbiota presente no rúmen e nas fezes	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Local	24
4.2	Animais doadores e dieta experimental	24
4.3	Alimentos	25
4.4	Análises laboratoriais	25
4.5	Ensaio	26
4.6	Técnica	27
4.7	Análises estatísticas	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, é o maior exportador de carne bovina, segundo maior produtor de carne e quarto maior produtor de leite (FAO, 2013; USDA, 2016). A nível global verifica-se uma rápida expansão da produção e consumo de produtos de origem animal, e espera-se que esse cenário continue progredindo. Sendo assim, para atender a crescente demanda por produtos de qualidade, o setor deverá fundamentar-se no uso mais eficiente dos insumos, visando minimizar seu impacto ambiental (FAO, 2014).

Diante disso, para que o setor agropecuário mantenha-se no mercado cada vez mais competitivo, ele deverá superar alguns desafios importantes, como o aumento da produtividade aliado a sustentabilidade ambiental e bem estar animal, além da qualidade e segurança alimentar (BRASIL, 2014). Nesse contexto, a alimentação é responsável por 70 a 80 % dos custos de produção (GOES, SILVA e SOUZA, 2013), tornando contínua a procura por alimentos mais eficientes e econômicos para uso na alimentação animal (SALMAN, 2010).

A determinação da composição químico-bromatológica é apenas um prelúdio para obter o valor nutritivo dos alimentos, porém insuficiente para avaliar a eficiência de utilização dos alimentos e sua transformação pelo animal em produtos como carne, leite e lã. De acordo com Mertens (2005), os sistemas de alimentação modernos precisam ser baseados nos mecanismos que regulam a resposta dos animais aos nutrientes, por meio de processos quantitativos da digestão e do metabolismo dos ruminantes, e para isso, são necessários dados biológicos adequados, obtidos através de métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro*.

Desta forma, o método *in vivo* de determinação da digestibilidade dos alimentos é o mais confiável, porém apresenta alguns inconvenientes, como o requerimento de grandes quantidades de alimentos, maior número de animais, número alto de repetições, controle rigoroso da quantidade ingerida e excretada e instalações adequadas (BERCHIELLI, VEGA-GARCÍA e OLIVEIRA, 2011), tornando-a onerosa e demorada. Além de, apresentar limitações quanto ao uso dos animais.

Diante disso, para reduzir o tempo dessa metodologia, foram validadas diversas técnicas, dentre elas encontram-se a *in vitro* e a *in situ*, as quais devem ser

capazes de simular o processo de digestão que ocorre nos ruminantes. No entanto, necessitam de animais fistulados no rúmen para obtenção de inóculo microbiano, despertando uma série de problemas práticos, como por exemplo, instalações cirúrgicas, cuidados constantes para evitar infecções e custos associados com a manutenção em longo prazo destes animais (MAURICIO et al., 2001; SILVA et al., 2003; MOULD et al., 2005).

Deste modo, devido às adequações das leis de bem-estar animal e campanhas contrárias à utilização de animais em experimentos, a metodologia *in vitro* vem sendo uma das técnicas mais utilizadas em ensaios de digestibilidade (GIVENS e GILL, 1998). No entanto, observa-se uma restrição cada vez maior ao uso de animais preparados cirurgicamente, e desta forma, dificulta o uso de técnicas invasivas (LUZ, 2013), tornando necessário desenvolver e aperfeiçoar metodologias *in vitro*, que sejam menos dependentes de animais fistulados e confiáveis para uso em pesquisas.

Nesse contexto, o uso de fezes como fonte alternativa ao líquido ruminal vem mostrando resultados promissores em ensaios de digestibilidade *in vitro* por meio da técnica descrita por Tilley e Terry em 1963 (AKHTER e HOSSAIN, 1998; AKHTER, 1999;; HOLDEN, 1999; ALCALDE et al., 2001) e também pela técnica de produção de gás *in vitro* (MAURICIO et al., 2001; CONE, VAN GELDER e BACHMANN, 2002; CHEN e ZHAO, 2004).

Contudo, apesar das pesquisas anteriores mostrarem o potencial do inóculo fecal como fonte de microrganismos na avaliação da digestibilidade *in vitro* dos alimentos em ruminantes, ainda existe algumas limitações quanto ao uso de fezes, entre as quais, segundo Omed, Lovett e Axford (2000), questiona-se qual seria a quantidade de fezes suficiente para produzir um inóculo mais ativo, no que diz respeito à concentração ótima de microrganismos para obter valores de digestibilidade.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o inóculo fecal de bovinos como alternativa ao inóculo ruminal para determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca de alimentos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a composição químico-bromatológica dos alimentos;
- Avaliar a matéria seca dos resíduos após a incubação na fermentadora artificial DAISY^{II};
- Avaliar três diferentes diluições (fezes:tampão) do inóculo fecal para determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca de diferentes alimentos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Característica digestivas dos animais ruminantes

Ao longo do processo evolutivo, os ruminantes desenvolveram características anatômicas e simbióticas que lhes permitiram aproveitar de forma eficiente carboidratos estruturais como fonte de energia e fixar compostos nitrogenados não-protéicos em células microbianas utilizadas como fonte de proteína (VALADARES FILHO e PINA, 2006). Essa capacidade em aproveitar tais nutrientes, deve-se às particularidades anatômicas do trato digestivo (pré-estômagos) dos ruminantes, onde observa-se uma relação simbiótica entre o hospedeiro e os microrganismos ruminais, que fermentam alimentos fibrosos, suprindo o animal com ácidos graxos de cadeia curta, resultantes da fermentação, e proteína microbiana (KOZLOSKI, 2011).

O estômago dos ruminantes origina-se embrionariamente do estômago simples, sendo dividido em quatro compartimentos: rúmen, retículo, omaso e abomaso. Esses quatro compartimentos tem importância primordial para a fisiologia digestiva e nutrição dos ruminantes e desta forma, é imprescindível conhecer a anatomia funcional de cada porção e suas inter-relações morfofisiológicas. Os três primeiros compartimentos são chamados de pré-estômagos, os quais são revestidos por epitélio mucoso não glandular, onde ocorre a fermentação microbiana anaeróbica do material vegetal e absorção dos produtos de fermentação, e por isso, sua estrutura anatômica é relacionada principalmente, com funções mecânicas. Enquanto o abomaso é o estômago químico ou “verdadeiro”, onde enzimas digestivas e suco gástrico são secretados (HOFMANN, 1988). Além disso, uma das especificidades dos ruminantes é o processo de ruminação, ou seja, regurgitação da ingesta do retículo-rúmen, permitindo a re-mastigação dos sólidos acompanhado de re-salivação e, em seguida, re-deglutição do bolo alimentar, para posterior fermentação microbiana (RUCKEBUSCH, 1988).

Segundo Furlan, Macari e Faria Filho (2011), o animal não possui controle direto sobre o metabolismo microbiano, porém, é capaz de manter condições que promovam o crescimento dos microrganismos ruminais, favorecendo assim, a fermentação. Essas condições incluem: a) manutenção da temperatura

relativamente constante, ao redor de 39°C, devido principalmente aos mecanismos homeostáticos do animal, e em parte pelo calor gerado durante a fermentação realizada pelos microorganismos; b) pH em torno de 5,5 a 7,0, devido à absorção contínua dos ácidos produzidos pela fermentação microbiana e que são neutralizados pela produção de grandes quantidades de saliva (60 a 180 L/dia no bovino com pH=8,1) que contém elevadas concentrações de bicarbonato, fosfato e potássio. Os protozoários e bactérias celulolíticas possuem um desenvolvimento ideal em pH igual ou superior a 6,2, enquanto que bactérias amilolíticas são ativas em condições mais ácidas (pH ao redor de 5,8); c) ausência de oxigênio, uma vez que este, entra no rúmen através da ingestão de água presente nos alimentos, ou por difusão através de vasos sanguíneos, sendo utilizado pelas bactérias anaeróbias facultativas e eliminado pela eructação, assim as concentrações de oxigênio no rúmen são sempre baixas, sendo fundamental para a digestão fermentativa, a qual ocorre em ambiente redutivo.

Diante disso, a composição da dieta e a frequência de alimentação dos animais induz alterações no pH ruminal, em relação principalmente, ao tipo e a quantidade de concentrado na ração, ocasionando desta forma, variações na secreção salivar e na fermentação ruminal, com o crescimento seletivo de certas espécies microbianas e conseqüentemente no tipo e quantidade de produtos da fermentação (MOURIÑO et al., 2001). Além disso, as características dos alimentos que compõem a dieta podem causar alterações na fisiologia ruminal, uma vez que, o tipo de alimento pode acometer a estrutura da comunidade microbiana, a taxa de passagem do alimento, a motilidade e a velocidade de absorção dos nutrientes (VAN CLEEF, 2009). Nesse caso, o maior teor de fibra geralmente está associado a uma baixa taxa de degradação ruminal e aumento no tempo de ruminação, diminuindo a taxa de passagem, a digestibilidade e o consumo de nutrientes (VAN SOEST, 1994).

Sendo assim, é fundamental levar em consideração as interações que ocorrem entre o animal e o processo digestivo, visando obter os menores gastos energéticos possíveis, requeridos para os ajustes fisiológicos, e conseqüentemente, obter um bom desempenho produtivo (FURLAN, MACARI e FARIA FILHO, 2011). Nesse contexto, a pesquisa em nutrição animal exerce papel fundamental na área de produção animal, já que utiliza metodologias por meio das quais é possível obter informações sobre os ingredientes utilizados na alimentação animal e avalia como a composição dos alimentos afetará o seu desempenho. Somado a isto, atualmente,

as pesquisas têm buscado relacionar os teores de nutrientes dos alimentos com seu aproveitamento digestivo e metabólico (BERCHIELLI, VEGA-GARCÍA e OLIVEIRA, 2011). De acordo com os mesmos autores, para que o sucesso na pesquisa seja alcançado, é imprescindível estabelecer metodologias apropriadas para obtenção de respostas.

3.2 Digestibilidade de alimentos

Dentre os fatores nutricionais que afetam o desempenho animal, os mais limitantes são: a composição químico-bromatológica dos ingredientes da ração, o consumo voluntário, a cinética de degradação e a digestibilidade dos nutrientes (SALMAN et al., 2010). Segundo Macedo Júnior (2007), a base para vários sistemas de formulação de dietas para ruminantes fundamenta-se no consumo e na digestibilidade, uma vez que, esses parâmetros possuem alta correlação com a ingestão de matéria seca e eficiência na absorção e aproveitamento dos nutrientes.

As análises químicas da composição bromatológica dos alimentos, podem fornecer informações importantes para o melhor entendimento dos fatores que limitam o desempenho animal. Entretanto, estas medidas não podem estimar diretamente o valor nutritivo dos alimentos (CHERNEY, 2000). De acordo com Oliveira (2014), para definir a qualidade nutricional da dieta, é imprescindível obter as medidas de digestibilidade dos alimentos, por meio da qual, determina-se o quanto de nutrientes serão efetivamente aproveitados pelo animal.

A digestibilidade aparente de um alimento pode ser considerada como a porcentagem do ingerido que não foi excretada nas fezes, não considerando os produtos metabólicos e resíduos endógenos do metabolismo animal (VAN SOEST, 1994). Para obter o valor de digestibilidade verdadeira, desconta-se a perda de material fecal metabólica, sendo este, sempre superior a digestibilidade aparente (BERCHIELLI, VEGA-GRACIA e OLIVEIRA, 2011).

O consumo voluntário dos ruminantes é empregado para indicar o limite máximo do apetite (THIAGO e GILL, 1990), sendo responsável por 70% da variação no potencial de produção animal, e os outros 30% restantes, são atribuídos a digestibilidade e eficiência de utilização dos alimentos (MERTENS, 1992). Portanto, estimativas dos parâmetros de digestibilidade de um alimento constitui um fator determinante para a disponibilidade de seus nutrientes aos animais, permitindo

formular dietas mais eficientes que atendam as exigências de manutenção e produção dos mesmos (DETMANN et al., 2006).

A estimativa dos coeficientes de digestibilidade de um alimento ou de seus respectivos componentes químicos consiste em um parâmetro estático do processo digestivo, entretanto, compreende um processo oneroso e demorado, especialmente quando realizado pelos métodos convencionais *in vivo* (DETMANN et al., 2006).

Atualmente, entre os métodos biológicos de fermentação utilizados como alternativa ao método *in vivo*, a metodologia descrita por Tilley e Terry (1963), adaptada ao fermentador DAISY^{II} (ANKOM[®]), é a mais eficiente para prever a digestibilidade *in vitro* dos alimentos destinados à nutrição de ruminantes (EARING et al., 2010). E ainda, para pesquisas que envolvem taxa e extensão da degradação dos alimentos, outra possibilidade é a técnica da produção de gás, a qual estima a digestibilidade do alimento por correlação entre a produção microbiana de gás e a matéria orgânica fermentada (BERCHIELLI, VEIGA-GRACIA e OLIVEIRA, 2011). Porém estas técnicas exigem o uso de líquido ruminal, como fonte de inóculo microbiano para a fermentação dos alimentos (HUGHES et al., 2011), obtido a partir de animais fistulados no rúmen (CUTRIGNELLI et al., 2005), ou ainda, através de fístula esofágica (MOULD et al., 2005), levantando uma série de considerações no que diz respeito ao bem-estar dos animais, as quais impulsionam a necessidade de pesquisas utilizando fontes alternativas ao líquido ruminal (MAURICIO et al., 2001; MOULD et al., 2005).

Vários pesquisadores mostram desvantagens de utilização do líquido ruminal como fonte de inóculo microbiano, obtido a partir de animais fistulados no rúmen (THEODOROU et al., 1994; MAURICIO et al., 2001; CHEN e ZHAO, 2004; ZICARELLI et al., 2011). Somado a isto, diversos estudos tem avaliado a possibilidade de utilizar o inóculo obtido a partir de fezes em substituição ao inóculo ruminal (OMED et al., 1998; MAURICIO et al., 2001; DHANOA et al., 2004; CUTRIGNELLI et al., 2005; e ZICARELLI et al., 2011).

3.3 Técnica de digestibilidade *in vitro* utilizando fezes

A utilização das fezes como fonte de inóculo microbiano eliminaria a necessidade de modificar cirurgicamente os animais (HUGHES et al., 2011). Nesse contexto, vários estudos revisados por Omed et al. (2000), demonstraram o uso

promissor de fezes proveniente de animais ruminantes como alternativa de inóculo para técnicas de digestibilidade *in vitro*. E ainda, diversos pesquisadores verificaram grande potencial no uso de inóculo fecal, avaliando a digestibilidade *in vitro* de diferentes tipos de alimentos utilizando fezes coletadas a partir de ovinos (ZICARELLI et al., 2011), bubalinos (CUTRIGNELLI et al., 2005), equinos (EARING et al., 2010) e bovinos (MAURICIO et al., 2001).

Zicarelli et al. (2011), estudando as características de fermentação *in vitro* de seis rações com diferentes proporções de forragem/concentrado, avaliando a substituição do líquido ruminal por inóculo fecal, provenientes de ovinos, obteve para ambos os inóculos (ruminal e fecal) que a degradabilidade da matéria orgânica, a produção cumulativa de gás e a taxa de fermentação máxima aumentaram à medida que elevou os teores de concentrado na dieta. A degradabilidade da matéria orgânica foi maior para o inóculo fecal que para o inóculo ruminal. A produção de gás e a taxa de fermentação máxima foram menores no inóculo fecal. Segundo os autores, a razão para esta tendência pode ser atribuída tanto à natureza diferente de microorganismos nas fezes em relação ao líquido ruminal e ao “estado de sobrevivência” de bactérias fecais com baixa atividade metabólica. E ainda, 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.

Cutrignelli et al. (2005), avaliando a utilização de fezes de búfalo como inóculo alternativo ao líquido ruminal, através da técnica da produção de gás *in vitro*, não encontraram diferença quanto ao tempo de colonização para ambos os inóculos e, ainda, a produção de gás total foi maior para o inóculo fecal. De acordo com os autores, o líquido ruminal foi coletado no momento do abate, a partir de animais em jejum por cerca de doze horas, explicando reduzida atividade dos microrganismos.

Earing et al. (2010), objetivou avaliar se a metodologia *in vitro* desenvolvida para o fermentador artificial DAISYII poderia produzir estimativas mais precisas para a digestibilidade *in vivo* de equinos para a digestibilidade *in vivo* de equinos para matéria seca e para fibra em detergente neutro quando utilizado inóculo fecais destes. Os autores relataram que as fezes de equinos são fontes adequadas para

obtenção de inóculo microbiano para determinação da digestibilidade *in vitro* de dietas de equinos. A dieta dos doadores de inóculo teve pouca influência sobre a digestibilidade da dieta, e por isso, as alterações nas populações microbianas que podem ter resultado devido a composição da dieta teve efeito mínimo sobre a digestão *in vitro*. No entanto, este estudo avaliou somente dietas com alto teor de volumoso.

Mauricio et al. (2001), comparando as fontes de inóculo microbiano ruminal e fecal pela técnica de produção de gás *in vitro*, obtidos a partir de vacas da raça Holandesa, concluíram que o material fecal tem potencial como inóculo alternativo ao líquido ruminal para a técnica de produção de gás *in vitro*. No entanto, o inóculo fecal apresentou maior tempo de colonização (*lag phase*), devido a menor atividade de microorganismos. De acordo com o autor, é necessário mais estudos com o inóculo fecal, para aplicabilidade viável de fezes como inóculo alternativo para a técnica de produção de gás *in vitro*.

3.4 Microbiota presente no rúmen e nas fezes

O rúmen é um ecossistema único, complexo e dinâmico colonizado por milhares de milhões de microorganismos diferentes, os quais formam uma comunidade complexa de organismos que interagem uns com os outros desempenhando um papel importante na digestão dos alimentos e no fornecimento de energia e proteínas ao animal hospedeiro (CHOUDHURY et al. 2012). Colonizam o interior do rúmen três tipos de microorganismos ativos: bactérias, protozoários e fungos, onde as bactérias constituem a maior parte da microbiota presente no rúmen, em média 10^{10} células/ml, desempenhando um papel particularmente importante na degradação biológica de fibra vegetal, por serem quantitativamente mais representativas e as mais ativas fermentadoras (KOIKE e KOBAYASHI, 2009; KOZLOSKI, 2011).

As principais espécies de bactérias celulolíticas são *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes* (DEHORITY, 2003). As bactérias ruminais variam muito em sua especificidade de substrato, sendo que a maioria utilizam monômeros que são gerados da hidrólise de polímeros do material vegetal, incluindo amido, pectina, celulose, hemicelulose e lípidos. Sendo que, as bactérias que hidrolisam polímeros também fermentam açúcares ou outros

compostos gerados pela hidrólise, como é o caso das bactérias “especialistas” como *Ruminobacter amylophilus* (amilolítica) e *Fibrobacter succinogenes* (celulolítica), as quais podem utilizar também seus produtos da degradação (STEWART, FLINT e BRYANT, 1997). Porém, segundo Van Gylswyk et al. (1992), as espécies de bactérias mais abundantes presentes no rúmen são as "generalistas" como é caso da *Prevotella ruminicola* e *Butyrivibrio fibrosolvens*, que degradam uma ampla variedade de polímeros, ou como a *Selenomonas ruminantium* que utilizam uma grande variedade de produtos finais.

Quando comparou-se isolados oriundos do rúmen e de material fecal, a viabilidade total e o número de espécies celulolíticas foi de 10 a 1000 vezes maior no conteúdo ruminal (LATHAM, SHARPE e SUTTON, 1971). Latham et al. (1971) ao substituir 80% do feno da dieta por milho e cevada, encontraram número de bactérias semelhante em dietas a base de volumoso e concentrado (2,95 a $5,13 \times 10^8$). No entanto, ao substituir o feno por cevada, o número de bactérias celulolíticas reduziu de 10^7 para 10^6 , já na troca para o milho reduziu para 10^3 .

Callaway et al. (2010), comparando amostras do fluido ruminal e fecal de bovinos alimentados com ração de confinamento antes da introdução de dieta de alto grão, encontraram uma ampla diversidade microbiana tanto no líquido ruminal quanto fecal, onde apresentaram 259 e 347 espécies de 74 e 86 gêneros, respectivamente. No rúmen, os autores encontraram a predominância de alguns gêneros como *Prevotella*, *Succinivibrio*, *Bacteroidales*, *Megasphaera*, *Butyrivibrio* e *Ruminobacter*, enquanto nas fezes predominaram *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bacteroidales*, *Acetivibrio*, *Prevotella* e *Ruminococcus*. Algumas espécies de bactérias foram encontradas exclusivamente nas amostras de líquido ruminal, como *Megasphaera*, *Butyrivibrio*, *Ruminobacter*, *Cytophaga*, *Roseburia*, e *Selenomonas*. Resultados semelhantes foram encontrados por El-Meadaway et al. (1998) para o líquido ruminal, o qual apresentou uma população bacteriana mais diversificada e maior quantidade de bactérias com predominância dos gêneros *Prevotella*, *Butyrivibrio* e *Selenomonas*. As fezes, por sua vez, apresentaram uma menor população bacteriana celulolítica, onde prevaleceu os gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*.

A população de protozoários no rúmen corresponde em 10^5 a 10^6 células/ml de líquido ruminal, sendo estritamente anaeróbicos e com predominância de protozoários ciliados. Estes por sua vez, possuem a capacidade de degradar e

fermentar uma grande variedade de substratos, ingerindo partículas de alimento e atacando os principais constituintes das plantas, como celulose, hemicelulose, pectina, amido, açúcares solúveis e lipídios. Os protozoários exercem um papel benéfico para o hospedeiro, através da ingestão de partículas de alimentos e armazenam polissacarídeos de reserva, os quais controlam o nível de substrato disponível, proporcionando desta forma, uma fermentação mais uniforme (YOKOYAMA e JOHNSON, 1993). Os protozoários não sobrevivem a passagem pelo abomaso, devido ao pH desta região ser ácido (HOBSON, 1971), e desta forma, as fezes não apresentam atividade de protozoários.

Os fungos presentes no rúmen correspondem até 8% da massa total, sendo que, uma de suas funções é iniciar a degradação dos polissacarídeos da parede celular, tornando-a mais acessível para as bactérias que digerem fibras (DAYYANI, KARKUDI e ZAKERIAN, 2013). Além disso, a maioria dos fungos fermentam amido e glicogênio, porém utilizam preferencialmente açúcares simples (GORDON e PHILLIPS, 1998). Avaliando a presença de fungos anaeróbicos na digesta do trato digestivo e nas fezes de bovinos, Davies et al. (1993) encontraram maior concentração no rúmen, com diminuição acentuada no abomaso até o intestino delgado, permanecendo inalterado ou com ligeiro aumento no intestino grosso e nas fezes. Sendo assim, as fezes apresentam atividade de fungos.

A segregação dos microrganismos ruminais em dois grandes grupos microbianos, ou seja, os que utilizam carboidratos estruturais e aqueles que utilizam carboidratos não estruturais, reflete diferenças quanto às fontes de energia e compostos nitrogenados utilizados, bem como a eficiência do crescimento microbiano, uma vez que, as bactérias que fermentam carboidratos estruturais necessitam de amônia para seu crescimento e, em condições limitantes de nitrogênio apresentam menor taxa de crescimento. Enquanto as bactérias que fermentam carboidratos não estruturais apresentam crescimento mais rápido e utilizam em média 66% de peptídeos e aminoácidos e 34% de amônia para o seu crescimento (RUSSELL et al., 1992).

Diante disso, ao comparar ambos os inóculos, ruminal e fecal, observa-se discrepância acentuada de microrganismos que fermentam carboidratos fibrosos e semelhança acentuada nas populações que fermentam carboidratos não-fibrosos, como o amido (MOULD et al., 2005). De acordo com Frey et al. (2010), durante o trânsito da digesta do rúmen até as fezes, ocorrem mudanças significativas na

comunidade microbiana quando o material passa de um segmento do trato gastrointestinal para outro. Nesse contexto, torna-se essencial avaliar o perfil microbiano dos inóculos ruminal e fecal, para fornecer características mais específicas dos inóculos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local

O experimento foi conduzido no setor de Bovinocultura de Leite da Fazenda Experimental de Iguatemi 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 experimento foi aprovado pelas Comissões de Ética em Experimentação animal da UEM e da UFSC.

O experimento foi desenvolvido durante o período de mobilidade estudantil, realizado no ano de 2014 nas dependências do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá.

4.2 Animais doadores e dieta experimental

As duas fontes de inóculo microbiano, líquido ruminal e fezes, foram obtidas de duas vacas não-lactantes (período seco) da raça Holandesa pb fistuladas no rúmen, com peso corporal (PC) médio de 654 kg. As vacas foram mantidas em piquetes com pastagem de grama-estrela (*Cynodon dactylon*) e suplementadas ao nível de 0,5% do PC com concentrado (Tabela 1), duas vezes ao dia, sendo uma pela manhã (08:00 h) e outra pela tarde (16:00 h), composta por 60 % de farelo de milho, 12% de farelo de soja, 25% de farelo de trigo e 3% de sal mineral Bovipasto[®]. Previamente ao início das coletas dos inóculos, as vacas passaram por um período de adaptação à dieta de 15 dias.

Tabela 1 - Composição químico-bromatológica da grama-estrela (*Cynodon dactylon*) e do suplemento fornecido aos animais doadores.

Alimento	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.

4.3 Alimentos

Para avaliar a eficiência dos inóculos foram utilizados nove tipos de alimentos: feno de *Coast-Cross* (*Cynodon dactylon*), feno de aveia preta (*Avena strigosa*), pastagem de *Brachiaria humidicola* cv. Llanero, pastagem de *Panicum maximum* cv. Mombaça, Amendoim Forrageiro (*Arachis pinto*), Soja Perene (*Neonotonia wightii*), farelo de milho (*Zea mays*), farelo de soja (*Glycine max*) e farelo de trigo (*Triticum spp.*).

As amostragens das forrageiras Llanero e Mombaça foram realizadas no momento em que estas apresentavam 95% de interceptação luminosa, pois segundo Santos (2012), corresponde ao ponto de maior produtividade e teor nutricional das pastagens.

4.4 Análises laboratoriais

Os alimentos amostrados foram submetidos à análise da composição químico-bromatológica (Tabela 2), onde as forragens frescas e as leguminosas foram pré-secas em estufa com circulação de ar forçado a 55°C, por 36 horas, ou até que as amostras apresentassem consistência quebradiça. Em seguida, todos os alimentos foram moídos em moinho do tipo faca (MARCONI®) provido de peneira com crivo de 1mm e acondicionados em recipientes devidamente fechados e identificados. Os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e matéria mineral (MM), foram determinados segundo preconizado por Silva e Queiroz (2002). Enquanto as análises de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas segundo Van Soest et al. (1991).

Tabela 2 - Composição químico-bromatológica dos alimentos avaliados.

Alimento	MS	g/kg MS				
	g/kg	MM	EE	PB	FDN	FDA
<i>Brachiaria humidicola</i>	218,9	55,6	16,2	90,9	742,2	410,4
<i>Panicum Mombaça</i>	240,5	63,5	8,8	112,9	745,9	390,5
<i>Coast cross</i> , 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
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
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.

4.5 Ensaio

O ensaio consistiu em quatro tratamentos, visando avaliar a eficiência de duas fontes de inóculo microbiano, líquido ruminal (LR) e fezes (FZ) em diferentes diluições, para determinar a DIVMS na Fermentadora Artificial DAISY^{II} (ANKOM[®]) dos alimentos supracitados, com o intuito de definir a diluição (fezes/tampão) de inóculo fecal, mais adequada para ser utilizada como alternativa ao inóculo ruminal na determinação da DIVMS dos alimentos.

O inóculo proveniente do líquido ruminal foi preparado conforme as recomendações da ANKOM, na proporção 1:5 (400mL de LR:1600mL de solução tampão). No entanto, os inóculos provindos das FZ foram preparados em três diferentes diluições, nas proporções de fezes para solução tampão de: 300g/1000mL, 400g/1000mL e 500g/1000mL. Totalizando assim, quatro tratamentos: LR, FZ₃₀₀, FZ₄₀₀ e FZ₅₀₀.

4.6 Técnica

A DIVMS dos alimentos foi determinada adotando-se a técnica descrita por Tilley & Terry (1963) adaptada para o Fermentador Artificial DAISY^{II}, desenvolvida pela empresa ANKOM® Technology Corporation, NY, USA, conforme descrita por HOLDEN (1999). Inicialmente procedeu-se a pré-lavagem dos sacos filtro F57 produzido pela AMKOM® em acetona por cinco minutos para remover um surfactante que inibe a digestão microbiana, sendo posteriormente distribuídos em um recipiente limpo e então, levados a estufa para secagem a 105°C por 16 horas. Em seguida, os sacos F57 foram acondicionados em um dessecador até atingirem o equilíbrio com a temperatura ambiente. Posteriormente, os sacos F57 foram pesados individualmente em balança analítica e registrados seus pesos, sendo a balança tarada, para então, adicionar as amostras. As amostras foram pesadas em duplicata contendo 0,25g de amostra em cada saco F57 e selados em alta temperatura com equipamento apropriado.

A solução tampão ou saliva artificial foi obtida através da mistura das soluções A e B em uma relação de 5:1. A solução A (g/L) composta por: 10,0g KH_2PO_4 ; 0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5g NaCl ; 0,1g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,5g uréia, e a solução B (g/100mL): 15,0g Na_2CO_3 ; 1,0 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, sendo a quantidade final de ambas as soluções ajustada para obter um pH final de 6,8 a 39°C, previamente as coletas.

Ao total foram realizadas três coletas, nas quais o líquido ruminal foi coletado no período da manhã, antes da suplementação dos animais, via fistula ruminal, com o auxílio de bomba a vácuo elétrica adaptada e kitassato pré-aquecido a 39°C e purgado com CO_2 antes e após a coleta. Foram coletados 2000 mL de líquido ruminal incluindo material sólido coletado manualmente, visando manter uma relação de 50% de material líquido e 50% de material sólido. O material coletado foi transferido para uma garrafa térmica pré-aquecida a 39°C e ambientada com CO_2 durante 30 segundos pré e posteriormente a colocação do material para manter a anaerobiose, sendo fechada hermeticamente.

As fezes foram coletadas logo após a coleta de líquido ruminal, diretamente do reto dos animais via apalpação retal, retirando aproximadamente 1,5kg de fezes de cada animal e acondicionadas em garrafa térmica, pré-aquecida a 39°C, purgando-se CO_2 antes e após a colocação do material nas garrafas, por

aproximadamente 30 segundos, sendo então, fechadas. Ao final das coletas, com as garrafas térmicas devidamente lacradas, estas foram transportadas ao laboratório.

Imediatamente após a coleta, no laboratório, procedeu-se o preparo individual dos inóculos, conforme o respectivo animal doador. Sendo assim, as fezes foram diluídas em solução tampão pré-aquecida a 39°C nas proporções de fezes para solução tampão de: 300g/1000mL, 400g/1000mL e 500g/1000mL. Em seguida, utilizando um liquidificador pré-aquecido e ambientado com CO₂ antes e após a colocação do material, por aproximadamente 30 segundos, homogenizou-se as diluições de fezes e o líquido ruminal em alta velocidade por 30 segundos, obtendo-se assim, os inóculos LR, FZ₃₀₀, FZ₄₀₀, FZ₅₀₀. Logo após, os inóculos foram filtrados individualmente em 4 camadas de gaze em recipiente pré-aquecido a 39°C, injetando continuamente CO₂, até serem obtidos 400mL de cada inóculo por jarro.

Em cada jarro da Fermentadora Artificial DAISY^{II}, foi adicionado 1600mL de solução tampão, 400mL de inóculo e 25 sacos F57 (24 sacos com as amostras + 1 saco vazio (“prova em branco”). Pré e posteriormente a adição destes componentes, foi inoculado CO₂ por cerca de 30 segundos, para imediatamente fechar os jarros com tampa provida de válvula de escape de gases. As amostras ficaram incubadas por 48 horas, mantendo-se a temperatura a 39°C.

Para concluir o segundo estágio da técnica, foi adicionado cerca de 30mL de HCl (6 Normalidade) e 8g de pepsina (1:10.000) diluída em 35mL de água destilada, em cada jarro, para simular a hidrólise ácido-pepsina que ocorre no abomaso, incubando-se por mais 24 horas à 39°C. Ao final desse período, o fluido dos jarros foi drenado e os saquinho filtrantes lavados no próprio jarro fermentador com água fria destilada, até que a coloração da água se mostrasse limpa. Em seguida, os sacos F57 contendo os resíduos foram colocados na estufa a 105°C por 24 horas para a secagem definitiva, sendo posteriormente retirados e colocados em dessecador para atingirem a temperatura ambiente. Logo após, 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:

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

4.7 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 as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, por meio do Sistema de Análises Estatísticas (SAS) desenvolvido pelo SAS Institute Inc., Cary, NC, USA (2002).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferentes fontes de inóculo proporcionaram diferentes valores ($P < 0,05$) de DIVMS das gramíneas frescas, *Brachiaria humidicola* e *Panicum Mombaça*, e das forragens conservadas, feno de *Coast cross* e aveia. Porém, não houve efeito ($P > 0,05$) dos diferentes inóculos nos valores de DIVMS dos farelos e leguminosas e, também não houve efeito entre as diferentes diluições de fezes.

Tabela 3 - Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS g/kg) dos alimentos incubados com diferentes fontes de inóculo: líquido ruminal (LR) e as diferentes diluições de fezes (FZ₃₀₀, FZ₄₀₀ e FZ₅₀₀).

Alimentos	DIVMS (g/Kg de MS)				n	P	Erro Padrão
	LR	FZ ₃₀₀	FZ ₄₀₀	FZ ₅₀₀			
<i>Brachiaria humidicola</i>	663,6 a	516,5 b	525,8 b	531,9 b	23	0,0013	10,71
<i>Panicum Mombaça</i>	658,8 a	536,6 b	558,6 b	542,6 b	23	0,0009	6,56
<i>Coast cross</i> , feno	434,0 a	306,2 bc	319,6 b	263,7 c	21	0,0004	5,69
Aveia, feno	560,4 a	393,0 bc	422,0 b	374,2 c	21	0,0001	3,72
Soja, farelo	951,2	914,2	922,1	893,1	24	0,1788	7,56
Milho, farelo	923,2	907,4	914,8	913,0	24	0,6327	1,85
Trigo, farelo	821,0	797,5	812,4	798,7	24	0,0985	1,21
Amendoim Forrageiro	669,8	635,0	639,8	651,3	22	0,3923	5,84
Soja perene	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 ($P > 0,05$).

Os coeficientes de DIVMS obtidos para os farelos de soja, milho e trigo foram semelhantes aos encontrados por Alcalde et al. (2001), onde os autores ao comparar o líquido ruminal com diferentes diluições de fezes bovina utilizando a técnica descrita por Tilley e Terry (1963), obtiveram, com o inóculo ruminal, valores de 98,78%, 95,79% e 80,19%, respectivamente. Além disso, os mesmos autores também não encontraram diferença de DIVMS dos farelos de soja, milho e trigo entre as diferentes fontes de inóculos. Silva et al. (2003) também não observaram efeito dos inóculos sobre a DIVMS da casca de soja e milho moído.

Em relação às leguminosas forrageiras, Duque et al. (2011) obtiveram valor inferior de DIVMS (55,7%) para o amendoim forrageiro (20 dias de crescimento –

52,2% FDN). Enquanto Cichoski et al. (2009) obtiveram valor superior de DIVMS (72,0%) do amendoim forrageiro com 39,12% de FDN. Devido à escassez de trabalhos com digestibilidade *in vitro* de forrageiras leguminosas, foram encontrados na literatura alguns estudos referentes ao feno de soja perene, o qual Ladeira et al. (2002), obtiveram valores de digestibilidade aparente da matéria seca de 44,3%.

O feno de Coast Cross apresentou valor de DIVMS com inóculo ruminal inferior aos encontrados por Silva et al. (2003) de 62,26% e por Alcalde et al. (2001), de 61,01%, utilizando a técnica *in vitro* proposto por Tilley e Terry (1963). No entanto, Palhano e Haddad (1992), avaliando a DIVMS para esta gramínea submetida ao corte em diferentes idades de crescimento (20 a 70 dias), obtiveram valores superiores na primeira semana de corte de 74,5%, apresentando redução com o avanço da maturidade da planta, resultando aos 70 dias de crescimento valor de 51,2% de DIVMS. Além disso, os mesmos autores observaram aumento nos teores de FDN e FDA da gramínea com o avanço da maturidade, com valores máximos aos 70 dias de crescimento, explicando desta forma, a redução nos coeficientes de DIVMS. Já o Feno de aveia analisado por Souza et al. (2015), com 68,71% de FDN, apresentou DIVMS superior de 61,43%. A variação observada nos coeficientes de DIVMS pode ser devido a diferentes épocas de colheita do material, a qual refletirá na composição químico-bromatológica do alimento, uma vez que, segundo Mizubuti et al. (2007), a qualidade do feno varia conforme as condições ambientais, época de colheita e técnica de processamento do material.

Duque et al. (2011), adotando a técnica descrita por Tilley e Terry (1963) utilizando líquido ruminal de bovino, registraram valores inferiores para a gramínea *Panicum Mombaça* (64% FDN), onde obtiveram um coeficiente de DIVMS de 55,8%. Já Alencar et al. (2009), encontraram para a mesma gramínea amostrada no outono/inverno (70,15% FDN), valor de 60,49%. Para a *Brachiaria humidicola* amostrada nas quatro estações do ano, Pereira et al. (1992), obteve valor de 41,4% de DIVMS.

Cabe evidenciar, que as diferentes diluições de inóculo fecal resultaram em coeficientes de digestibilidade semelhantes para as gramíneas frescas, porém, para os fenos a diluição FZ₅₀₀ resultou em médias inferiores as demais diluições.

A variação observada nos coeficientes de DIVMS podem ser devido às diferenças na composição químico-bromatológica destes alimentos (Tabela 2), onde observa-se que as gramíneas frescas e fenos apresentaram valores superiores de

fibra (FDN e FDA) e inferiores de PB, quando comparado aos farelos e leguminosas, o que possivelmente influenciou na taxa de DIVMS, sobretudo em razão da correlação negativa observada entre os teores de FDN e a digestibilidade (BRITO et al., 2003). Somado a isto, normalmente os teores de proteína bruta e fibra em detergente neutro possuem estreita correlação com a digestibilidade de forrageiras (ARAÚJO et al., 1998). De acordo com o NRC (2001), a fração FDN em geral, apresenta baixas taxas de digestão e, além disso, a composição da FDN (proporções de celulose, hemicelulose e lignina), afeta a digestibilidade desta fração.

Nesse contexto, percebe-se que o inóculo fecal nas diferentes diluições testadas não foram eficientes para os alimentos volumosos e principalmente para os conservados, visto que, são ricos em carboidratos fibrosos e pobres em carboidratos não fibrosos e proteína, supondo-se que o meio microbiano presente nas fezes gera fermentação, mas não com a mesma intensidade que o líquido ruminal. Segundo Forbes (1995), o grau de degradação da forragem, é em grande parte dependente da atividade microbiana presente no rúmen. Somado a isto, nas fezes observa-se o desenvolvimento de colônias bacterianas diferentes daquelas encontradas no rúmen, uma vez que, ao comparar com o líquido ruminal, o inóculo fecal apresenta uma diferença acentuada de microrganismos que fermentam carboidratos fibrosos e semelhança significativa das populações que fermentam carboidratos não-fibrosos, como o amido (MOULD et al., 2005) e ainda, observa-se uma diversidade maior de bactérias celulolíticas no líquido ruminal (EL-MEDAWAY et al., 1998), com ausência de protozoários nas fezes (HUNGATE, 1966).

Em estudos de degradabilidade pela técnica de produção de gás *in vitro*, essa questão se torna ainda mais evidente, onde observa-se um maior tempo de colonização (*lag phase*) quando utiliza-se inóculo provindo de fezes (ZICARELLI et al., 2011), e isso possivelmente se deve ao fato dos microrganismos fecais originados principalmente do ceco e cólon apresentarem atividade fermentativa menor que os microrganismos presentes no rúmen e por serem mais susceptíveis de entrar em estado de “animação suspensa” devido a baixa disponibilidade de substrato e as maiores concentrações de oxigênio, necessitando de um período mais longo para crescer e se dividir (MAURICIO et al., 2001). Não obstante, o uso de fezes como alternativa ao líquido ruminal na análise de DIVMS se mostra promissora, porém requer o uso de equações de ajustes para equacionar as diferenças observadas na DIVMS de forrageiras utilizando estes inóculos.

Para os alimentos com altos teores de carboidratos potencialmente digestíveis e proteína, como os farelos e as leguminosas, é possível substituir diretamente o inóculo ruminal pelo fecal, pois não foi observado efeito nas diferentes diluições de inóculo fecal. No entanto, no segundo estágio da metodologia se faz o uso da pepsina e do HCl, supondo que essa etapa promove o mascaramento das diferenças de digestibilidade total obtidas com os diferentes inóculos, simulando a digestão que ocorre no abomaso. De acordo com Santos e Pedroso (2011), a digestão da proteína que deixa o rúmen (proteína não degradável no rúmen e proteína microbiana) tem início com a ação da pepsina no abomaso. Sendo assim, recomenda-se repetir este trabalho com a inclusão da análise de digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN).

As diferentes diluições de fezes não diferiram para a DIVMS dos alimentos avaliados. Sendo assim, observa-se que ao aumentar a concentração de fezes, o mesmo não ocorre com os coeficientes de digestibilidade, ou seja, o desempenho fermentativo dos inóculos é indiferente ao aumento da concentração de material orgânico. Desta forma, a diluição de 300 g de fezes por 1000mL de solução tampão proporciona maior facilidade no preparo da solução, ao coletar menor quantidade de fezes e propiciar maior rapidez no preparo do inóculo, sobretudo durante a filtração da solução fezes/tampão em 4 camadas de gaze.

6 CONCLUSÃO

O inóculo fecal obtido a partir de fezes de bovinos pode ser utilizado como alternativa ao inóculo ruminal em análises de digestibilidade *in vitro* da matéria seca, e desta forma, recomenda-se a diluição de 300 g de fezes por 1000 mL de solução tampão. Para alimentos com altos teores de carboidratos não fibrosos pode-se realizar a substituição direta do inóculo ruminal pelo inóculo fecal, enquanto para alimentos com alto teor de fibra faz-se necessário desenvolver uma equação de correção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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.
- ARAÚJO, G. C. L. et al. Consumo e digestibilidade total dos nutrientes de dietas contendo diferentes níveis de volumoso, em bezerros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.2, p.345-354, 1998.
- BERCHIELLI, T. T.; VEGA-GRACÍA, A.; OLIVEIRA, S. G. Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudos de nutrição. In: BERCHIELI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. 2^a. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. Cap. 14, p. 415–436.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano mais pecuária/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. – Brasília : MAPA/ACS, 2014. 32 p.
- 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.
- CALLAWAY, T. R., et al. Evaluation of the bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed diets containing levels of dried distiller's grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). **Journal Animal Science**, 2010, p. 3977–3983.
- CHEN, X. J. .; ZHAO, G. Y. The suitability of a faecal suspension of sheep as inocula for the estimation of utilizable crude protein of feeds by *in vitro* incubation. **Archives of Animal Nutrition**, v. 58, p. 137 – 148, 2004.
- CHERNEY, D. J. R. Characterization of Forages by Chemical Analysis. In: GIVENS, D. I.; OWEN, E.; OMED, H. M.; AXFORD, R. F. E. **Forage Evaluation in Ruminant Nutrition**. CAB, Londres/UK., 2000, cap. 14, p. 281-300.
- CICHOSKI, E. et al. Diferentes tipos de sacos para análise da digestibilidade *in vitro* de forrageiras. **Archivos de zootecnia**, 58 (224). p.749-752, 2009.

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.

CHOUHDURY, P. K. et al. Harnessing the diversity of rumen microbes using molecular approaches. In: SIROHI, S. K. et al. **Livestock Green House Gases; emission and options for mitigation**. Satish Serial Publishing House, Delhi, Section-B, Chapter-6, 2012, p. 65-82.

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.

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

DAYYANI, N.; KARKUDI, K.; ZAKERIAN, A. Special rumen microbiology. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**. 2013, v. 1, p. 1397-1402.

DEHORITY B. A. Rumen Microbiology. Nottigham University Press, UK. 2003, 372p.

DETMANN, E. et al. Estimaco da digestibilidade dos carboidratos no-fibrosos em bovinos utilizando-se o conceito de entidade nutricional em condioes 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.

DUQUE, A. C. A. et al. Digestibilidade da matéria seca de alimentos volumosos e concentrados determinada por procedimentos "*in vitro*". **Revista Brasileira de Saúde e Produo Animal**, Salvador, v.12, n.3, p.680-690 jul/set, 2011.

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-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.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations/Statistics division. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QL/E>>. Acesso em: 20 abril de 2016.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Livestock and Animal Production**. Animal Production and Health, 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/animal_production.html>. Acesso em: 23 de maio de 2016.

FORBES, J. M. **Voluntary food intake and diet selection in farm animals**. Cabi, 1995, 532p.

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**. 2^a ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 1 – 25.

GIVENS, D. I; GILL, M. Current and future potential of alternative techniques. **British Society of Animal Science**. Lothian, v.22, p. 161-171, 1998.

GOES, R. H. T. B. DE; SILVA, L. H. X.; SOUZA, K. A. **Alimentos e Alimentação Animal**. Universidade Federal da Grande Dourados, 2013, 1^a edição, Editora UFGD, 80 p.

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

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

HOFMANN, R. R. Anatomy of the gastro-intestinal tract. In: CHURCH, D. C. **The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition**. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, Nova Jersey, 1988, cap. 2, p. 14-43.

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

HUGHES, M.P. et al. Exploring seasonal variations in sward characteristics and nutritive value of tropical pastures grazed by beef and dairy cattle on commercial farms in Jamaica. **Journal of Animal and Feed Research**. 2011, v. 2, n. 5, p. 405-417.

KOIKE, S. e KOBAYASHI, Y. Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and functions. **Asian-Aust J. Animal Science**, 2009, v. 22, n. 1, p. 131 - 138.

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

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.

LUZ, P. A. S. **Consumo e Digestibilidade de aveia preta em caprinos de corte recebendo quatro níveis de suplemento**. 2013. 64 f. Dissertação de mestrado em Zootecnia - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, Paraná, 2013.

MACEDO JÚNIOR, G. L.; ZANINE, A. M.; BORGES, I.; OLALQUIAGA PÉREZ, J. R. O. Qualidade da fibra para a dieta de ruminantes. *Ciência Animal*, Goiânia, v. 17, n. 1, p. 7-17, 2007.

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.

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

MERTENS, D. R. Rate and extent of digestion. In: DIJKSTRA, J.; FORBES, J. M.; FRANCE, J. (Ed.). **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. 2 ed. Cambridge: CABI Publishing, 2005. p. 13-48.

MIZUBUTI, I. Y. et al. Coast cross (*Cynodon dactylon* (L.) pers.) hay and pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) millsp) digestibility and nutrients average intake by sheep under two feeding systems/br Consumo médio e digestibilidade do feno de capim “Coast cross”(*Cynodon dactylon* (L.) pers.) e feijão guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) em carneiros submetidos a dois regimes alimentares. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 513-520, 2007.

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.

MOURIÑO, F.; AKKARAWONGSA, R.; WEIMER, P.J. Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.848-859, 2001.

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

OLIVEIRA, V. S. et al. Utilização da técnica de produção de gás *In Vitro* para estimar a digestibilidade dos alimentos. **Revista Científica de Medicina Veterinária**. Ano XII-Número 23, p. 1-11, 2014.

OMED, H. M. et al. A low tech *in-vitro* procedure using faecal liquor for the estimation of digestibility of forages Sciences. **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.

RUCKEBUSCH, Y. Motility of the gastro-intestinal tract. In: CHURCH, D. C. **The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition**. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, Nova Jersey, 1988, cap. 4, p. 64-107.

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.

SALMAN, et al. Metodologia para avaliação de alimentos para ruminantes. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2010. 21 p.

SANTOS, F.A.P.; PEDROSO, A.M. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Eds.). **Nutrição de ruminantes**. 2^a. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. cap. 9, p. 265-297.

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, 2012.

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.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de Alimentos** (métodos químicos e biológicos). 3.ed., Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 235 p. 2002.

SOUZA, L. C. et al. Composição química e degradabilidade ruminal de forragens e subprodutos agroindustriais na região oeste do Paraná. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 31, n. 1, p. 171-180, Jan./Feb. 2015.

STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; BRYANT, M. P. The rumen bacteria. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The Rumen Microbial Ecosystem**. 2^a. 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.

THIAGO, L. R. L.S.; GILL, M. Consumo voluntário: fatores relacionados com a degradação e passagem da forragem pelo rúmen. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC. 1990. 65p.

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.

USDA (United States Department of Agriculture). **Foreign Agriculture Service**. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>> . Acesso em maio de 2016.

VAN CLEEF, H. E.; PATIÑO, R. P.; ARNALDO NEIVA, P.; SERAFIM, R. S.; ANIBAL REGO, C.; GONÇALVES, J. Distúrbios metabólicos por manejo alimentar inadequado em ruminantes: novos conceitos. **Revista Colombiana de Ciência Animal**, ISSN 2027 - 4297, v. 1, n. 2, p. 319 - 341, 2009.

VALADARES FILHO, S. D. C.; PINA, D. DOS. Fermentação Ruminal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Eds.). **Nutrição de ruminantes**. 2^a. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. cap. 6, p. 161–189.

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. LOnon: 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.

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, 2011.

YOKOYAMA, M. T.; JOHNSON, K. A. Microbiology of the rumen ad intestine. In: CHURCH, D. C. **The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition**. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, Nova Jersey, 1988, cap. 7, p. 125-144.