

Digestibilidade *in vitro* de alimentos com inóculos de líquido de rúmen ou de fezes de bovinos

Claudete Regina Alcalde¹, Roberto Mezzadre Machado², Geraldo Tadeu dos Santos^{1*}, Rogério Picolli² e Clóves Cabrera Jobim¹

¹Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Campus Universitário, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. ²Zootecnista. *Autor for correspondence.

RESUMO. O presente experimento foi desenvolvido na Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá e no Laboratório de Digestibilidade *in vitro* e Metabolismo Animal do Departamento de Zootecnia (UEM) Estado do Paraná, com a finalidade de comparar o líquido de rúmen em dois tipos de colheita (via fistula ruminal ou sonda esofágica) com as fezes de bovino em duas diluições, ou seja, 200/200 (tampão/fezes) ou 100/300, como inóculos para a determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) pela metodologia do fermentador ruminal (DAISY^{II}/ANKOM[®]) do farelo de trigo, milho moído, farelo de soja, farelo de canola, feno de *Coast-cross* e feno de Tifton 85. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (inóculos) e três repetições. Os diferentes tipos de inóculos não influenciaram ($P>0,05$) nas digestibilidades da matéria seca (DIVMS) do farelo de trigo e do milho. Entretanto, as digestibilidades do farelo de soja e do feno de *Coast-cross* com o inóculo fezes 200/200 foram menores ($P<0,05$) que para os demais alimentos. Para o farelo de canola e o feno de Tifton 85, as digestibilidades da matéria seca com os inóculos de rúmen (fistula e sonda) foram maiores ($P<0,05$). O uso de fezes de bovinos como fonte de inóculo na diluição 100/300 para avaliar a DIVMS foi eficiente, exceto para o farelo de canola e feno de Tifton 85.

Palavras-chave: DIVMS, inóculo, filtro de náilon, fermentador DAISY^{II}/ANKON[®].

ABSTRACT. *In vitro* digestibility of foodstuffs with inoculum of bovine feces or ruminal fluid. The present experiment was developed to compare ruminal fluid collected by ruminal cannula or esophageal probe and bovine feces in two dilutions, 200/200 (buffer/feces) or 100/300, as inoculum source, for the determination of *in vitro* (DAISY^{II}/ANKOM[®]) digestibility of wheat meal, ground corn, soybean and canola meal, and *Coast-cross* and Tifton 85 hay, with three replications. Different inoculum did not influence ($p>0.05$) *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) of wheat meal and ground corn. However, the digestibility of soybean meal and *Coast-cross* hay with inoculum of feces dilution 200/200 was lower ($p<0.05$) than that of the other food. In the case of canola meal and Tifton 85 hay, the IVDMD with inoculum from ruminal cannula and esophageal probe was better ($p<0.05$) than the others. Except for canola meal and Tifton 85 hay, the bovine feces as an inoculum source (100/300) was efficient to evaluate IVDMD.

Key words: IVDMD, inoculum, nylon bags, DAISY^{II}/ANKON[®].

As vantagens da utilização da técnica *in vitro* para determinação da digestibilidade dos alimentos estão na sua rapidez, na uniformidade físico-química do local de fermentação e na conveniência de se manter poucos animais fistulados.

A técnica da digestão *in vitro* tem sido largamente utilizada na análise dos mais variados tipos de alimentos fornecidos aos ruminantes. Esse fato se observa em razão da prática na determinação dos resultados, uma vez que grande parte do processo é desenvolvida em laboratório. Essa técnica procura

simular as condições naturais da digestão. Portanto, torna-se imprescindível que cada etapa da operação seja representativa, o mais fiel possível, do processo digestivo para que os resultados sejam confiáveis (Oliveira *et al.*, 1993).

A busca para melhorar a eficiência no laboratório conduziu ao desenvolvimento do aparelho que simula a fermentação ruminal DAISY^{II}/ANKON[®], o qual permite incubação de diferentes alimentos em filtros de náilon no mesmo recipiente, sendo considerado o material que desaparece como

digestível (Mabjeesh *et al.*, 2000). Holden (1999) afirma que o aparelho DAYSY^{II} pode ser utilizado para avaliações *in vitro* de forragens e grãos.

A colheita de líquido ruminal via esôfago dispensa a fistula ruminal, mas depende da eficiência em se introduzir a sonda no animal. Já no caso da fistula com colheita manual ocorre a possibilidade de obtenção de fluido ruminal mais homogêneo (Lavezzo *et al.*, 1988).

Outro fato crescente, diz respeito às fontes alternativas de inóculo usando fezes como fonte viável de microrganismo para a técnica *in vitro*. Os métodos *in vitro*, segundo Malafaia (1997), podem apresentar falhas, por não utilizar adequadamente o inóculo, os tampões, ou os equipamentos que garantam as condições de pH, anaerobiose, biomassa microbiana e nutrientes essenciais para a mesma.

Maurício *et al.* (1998) utilizaram líquido ruminal e fezes de vacas em lactação para comparar a produção total de gás e o perfil de fermentação de dois substratos (gramínea e palha de trigo), demonstrando que a produção total de gás foi semelhante entre os dois tipos de inóculos. Entretanto, o perfil de fermentação com fezes apresentou diferenças quanto ao período de incubação *lag time*.

Bueno *et al.* (1999) avaliaram o líquido ruminal e fezes de bovinos e de ovinos como fontes de inóculos para a técnica *in vitro* de produção de gases, que vem se destacando como muito promissora na avaliação de alimentos para ruminantes. Os autores demonstraram que os ovinos podem ser utilizados como doadores de inóculo para a técnica *in vitro* e observaram semelhanças nas digestibilidades do feno de alfafa, do feno de braquiária (28 dias) e da palha de trigo utilizando os inóculos de líquido ruminal e fezes de bovinos e de ovinos.

Porém, estes métodos necessitam ou da existência de animais fistulados para o fornecimento de líquido de rúmen ou de enzimas relativamente caras, aliados a uma visão ecológica. Deste modo, pensou-se em fontes alternativas de inóculo que dispense a presença de animais fistulados no rebanho e na redução do custo da técnica.

O objetivo do presente trabalho foi de avaliar inóculos de líquido ruminal em dois tipos de colheita e de fezes de bovinos em duas diluições para utilização na determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca de alguns alimentos utilizados nas rações de bovinos.

Material e métodos

Os tratamentos consistiram de diferentes procedimentos para obtenção de líquido de rúmen

(via fistula ruminal ou sonda esofágica) e fezes de bovino (diluição 200/200 tampão/fezes ou 100/300), como inóculo, para determinar a digestibilidade *in vitro* no fermentador ruminal DAISY^{II} (ANKOM[®] Technology Corp., Fairport, NY) do farelo de trigo, milho moído, farelo de soja, farelo de canola, feno de *Coast-cross* e feno de *Tifton 85*. O delineamento foi inteiramente ao acaso, com quatro tratamentos, e as repetições realizadas em três períodos.

Os inóculos foram obtidos de uma vaca (Holandesa), com peso vivo de 513 kg provida de fistula ruminal, alojada em baia individual. A ração concentrada (30,0% de farelo de soja; 66,6% de milho moído; 2,0% de sal mineral; 1,0% de sal comum e 0,4% de premix vitamínico) foi fornecida em quantidade de 1 kg pela manhã (8:00) e 1 kg à tarde, e os alimentos volumosos foram os fenos de *Tifton 85* e de *Coast-cross*, fornecidos à base de 5 kg de cada. O animal foi adaptado à ração durante 14 dias antes das três colheitas.

O líquido de rúmen foi colhido antes da alimentação matinal via fistula ou sonda esofágica, utilizando-se bomba a vácuo e um kitassato, com capacidade para 2000 mL, mantido sempre em banho-maria a 39°C. O CO₂ foi inoculado por cerca de 30 segundos antes e após a adição do líquido ruminal, juntamente com o material na fase sólida.

Para o inóculo proveniente da fistula ruminal, foi mantida uma proporção de 50% de material da fase sólida e 50% de material líquido. Cerca de 400 mL de cada inóculo foi colhido para cada jarro. Para a retirada do inóculo via sonda esofágica, introduziu-se no saco ventral do rúmen uma mangueira de 2 cm de diâmetro por 2 m de comprimento, com a ponta lacrada e as laterais furadas para facilitar a sucção do líquido ruminal através da bomba de vácuo.

Quanto às fezes, foi feita a colheita diretamente no reto, obtendo-se cerca de um quilo para as diluições em solução tampão (saliva artificial) de 1:1 e 1:3. Logo após a colheita, as fezes foram colocadas em sacos plásticos, inoculados com CO₂ e acondicionadas em caixa de isopor para o transporte.

Os preparos dos inóculos foram feitos de acordo com Tilley e Terry (1963), modificado conforme Santos *et al.* (1997). Para determinação da digestibilidade *in vitro* foi utilizada a metodologia do fermentador ruminal DAISY^{II}, descrita segundo Holden (1999).

A solução tampão foi preparada em recipientes pré-aquecidos (39°C). A solução A (g/litro) composta por: 10,0 g KH₂PO₄; 0,5 g MgSO₄·7H₂O; 0,5 g NaCl; 0,1 g CaCl₂·2H₂O e 0,5 g uréia, e a solução B (g/100mL): 15,0 g Na₂CO₃; 1,0 g

$\text{Na}_2\text{S}_9\text{H}_2\text{O}$. As soluções foram misturadas adicionando-se cerca de 266 mL de solução B para 1330 mL de solução A (relação 1:5), a um pH final de 6,8 e temperatura de 39 °C. Adicionaram-se cerca de 1600 mL de mistura combinada de A/B para cada jarro do fermentador ruminal DAISY^{II},

Os alimentos foram moídos em moinho de faca provido de peneira, com crivos de 2 mm e pesados em triplicada, contendo 0,25 g de amostra por filtro de náilon F57 da ANKOM[®], com porosidade de 57 micra e selados a quente. Em seguida, os filtros foram acondicionados nos jarros do fermentador ruminal que continham inóculos (400 mL) obtidos de diferentes formas, 1600 mL de solução tampão e 18 filtros de náilon, sendo então incubados por 48 horas e temperatura de 39°C.

O método de incubação em dois estágios foi realizado pela adição de cerca de 40 mL de HCl a 6 N e 8 g de pepsina (Sigma EC 3.4.23.1) em cada jarro, mantendo-se a 39°C por mais 24 horas. A pepsina foi previamente dissolvida em 34 mL de H_2O , destilada a 35°C durante cinco minutos em agitador, mantendo-se o pH da solução entre 2,0 a 3,5 (Holden, 1999).

Ao término deste período, os jarros foram drenados e os sacos de náilon foram lavados no próprio jarro, cinco a seis vezes com água destilada, e o gás contido nos sacos foi removido com delicada pressão das mãos sobre os mesmos e colocados em estufa a 105 °C por 12 horas para secagem.

Os filtros de náilon foram pesados com os resíduos para se determinar a matéria seca (MS) e o coeficiente de digestibilidade *in vitro* da MS, tendo sido calculados pela diferença do alimento incubado e pelo resíduo, após a incubação, através da fórmula:

$$\text{DIVMS} = ((\text{MS do alimento incubado} - \text{MS do resíduo}) / \text{MS do alimento incubado}) \times 100$$

Os alimentos foram analisados para obtenção dos teores da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), conforme as metodologias descritas por Silva (1990).

Resultados e discussão

Os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) dos alimentos, expressos em porcentagem da matéria seca, estão apresentados na Tabela 1. Os alimentos foram agrupados como alimentos energéticos (farelo de trigo e milho moído), suplementos protéicos (farelos de soja e de

canola) e volumosos secos (fenos de *Coast-cross* e de Tifton 85).

Tabela 1. Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) dos alimentos, expressos em porcentagem na matéria seca

Alimentos	MS (%)	PB (%)	FDN (%)	FDA (%)
Farelo de trigo	88,57	17,57	44,41	12,78
Milho moído	88,46	9,20	7,35	3,17
Farelo de soja	89,38	52,28	22,07	10,24
Farelo de canola	89,58	44,02	32,10	22,32
Feno de <i>Coast-cross</i>	90,59	11,36	80,54	41,49
Feno de Tifton 85	91,11	6,74	83,58	43,99

Os coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), obtidos com inóculos oriundos da colheita de líquido de rúmen (via fistula ou sonda esofágica) ou fezes (diluções de 200/200 tampão/fezes ou 100/300), encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de alimentos em diferentes inóculos

Alimentos	Líquido de rúmen		Fezes		
	Fístula de rúmen	Sonda esofágica	200/200	100/300	Médias CV
Farelo de trigo	80,19 a	80,10 a	78,31 a	77,75 a	79,09 2,99
Milho moído	95,79 a	95,44 a	95,71 a	90,01 a	94,24 2,51
Farelo de soja	98,78 ab	99,15 a	95,09 c	96,49 bc	97,38 2,43
Farelo de canola	83,55 a	83,69 a	82,06 b	81,19 b	82,62 2,86
Feno de <i>Coast-cross</i>	61,01 ab	62,92 a	51,90 c	57,98 b	58,47 4,04
Feno de Tifton 85	59,89 a	59,33 a	48,87 b	51,61 b	54,93 4,30

Letras minúsculas iguais nas linhas não diferem entre si ($P>0,05$) pelo teste Tukey; CV = coeficiente de variação

Os quatro tipos de inóculos não influenciaram ($P>0,05$) nas DIVMS do farelo de trigo e do milho moído, apresentando as médias de 79,09% e 94,24% de digestibilidade da matéria seca, respectivamente. Considerando, então, que o inóculo de fezes apresenta a mesma eficiência de fermentação para os alimentos mencionados, comparado aos inóculos de líquido de rúmen. Mabjeesh *et al.* (2000) registraram valores médios de 63,4% e 85,9% de DIVMS utilizando o aparelho DAISY^{II} para o farelo de trigo e milho moído, podendo observar que composição em FDN de 47,5% e 11,5%, respectivos aos alimentos, encontra-se maior, o que possivelmente diferencia do resultado encontrado neste trabalho.

Holden (1999), avaliando milho moído com a composição de 7,44% em PB, 6,47% em FDN e 2,80% em FDA, encontrou o valor de 88,21% de digestibilidade da matéria seca.

No entanto, o inóculo de líquido de rúmen via sonda esofágica apresentou maior ($P<0,05$) digestibilidade da matéria seca para o farelo de soja, e o inóculo de fezes 200/200 foi a menor resposta. Os dois tipos de inóculos de líquido de rúmen apresentaram maior ($P<0,05$) DIVMS (83,62%)

para o farelo de canola, comparado aos inóculos de fezes (81,62%). Mabeesh *et al.* (2000), nas avaliações da DIVMS (DAISY^{II}) do farelo de soja e farelo de canola, obtiveram os resultados de 76,3% e 75,0%, respectivos aos alimentos, podendo observar valores menores aos encontrados neste trabalho, que pode ser explicado pela diferente composição química destes subprodutos ou mesmo pela padronização da metodologia.

O uso do inóculo de fezes 200/200 apresentou menor ($P < 0,05$) digestibilidade da matéria seca (51,90%) para o feno de *Coast-cross*, comparado ao inóculo de líquido de rúmen via sonda esofágica (62,92%).

Os resultados médios de digestibilidade obtidos para o feno *Coast-cross* (58,47%) e o feno Tifton 85 (54,93%) estão próximos daqueles encontrados por Assis *et al.* (1998), que, ao analisarem a composição química e digestibilidade *in vitro* de gramíneas do gênero *Cynodon* submetidas ou não a adubação nitrogenada, encontraram valores para a DIVMS de 61,54% para o *Coast-cross* e de 63,36% para o Tifton 85. As diferenças observadas podem ser devidas a diferenças na época de colheita do material.

Para os alimentos em avaliação, os inóculos colhidos via fístula de rúmen ou sonda esofágica apresentaram os maiores coeficientes de digestibilidade, não diferindo entre os mesmos. Embora Lavezzo *et al.* (1988), utilizando o método convencional de Tilley e Terry (1963), sugeriram que o método de colheita via fístula ruminal reflete melhor os valores reais dos parâmetros de fermentação, comparado ao método via sonda esofágica. No entanto, Oliveira *et al.* (1993), comparando métodos de coleta, tipos de amostragens e tempo de adaptação do animal doador sobre a digestibilidade *in vitro*, observaram que o método de coleta via sonda esofágica proporcionou valores maiores na DIVMS.

Os inóculos de fezes não foram eficientes para o farelo de soja, farelo de canola e os fenos, supondo-se que o meio microbiano provindo das fezes gera fermentação, mas não com a mesma qualidade do que o líquido ruminal. Isso se deve provavelmente ao desenvolvimento de colônias de bactérias diferentes daquelas encontradas no rúmen.

Para os alimentos com teores de fibra em detergente ácido (FDA) mais elevados, como o farelo de canola e os fenos de *Coast-cross* e de *Tifton*, notaram-se menores digestibilidades, podendo ser explicada pela possível menor presença de colônias de bactérias celulolíticas nos inóculos de fezes. Segundo Malafaia (1997), os métodos *in vitro* podem

resultar em falhas, principalmente no manuseio e manutenção do meio para gerar um bom resultado.

No entanto, Bueno *et al.* (1999), utilizando a técnica de produção de gases, não detectaram diferenças na digestibilidade *in vitro* dos fenos de alfafa e braquiária e da palha de trigo, comparando inóculos provindos do rúmen e de fezes, tanto de bovinos quanto de ovinos. Müller (2000) concluiu em seu trabalho que o uso de fezes de bovinos como inóculo possui potencial para ser utilizada em rotina laboratorial para estimar a digestibilidade *in vitro* da matéria seca e matéria orgânica de volumosos.

O uso de fezes de bovinos como fonte de inóculo na diluição 100/300 para avaliar a DIVMS foi eficiente, exceto para o farelo de canola e feno de Tifton 85.

Referências

- ASSIS, M.A. *et al.* Composição química e digestibilidade *in vitro* de gramíneas do gênero *Cynodon* submetidas ou não a adubação nitrogenada. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu. *Anais...* Botucatu: SBZ, 1998, p. 348.
- BUENO, I.C.S. *et al.* Uso de líquido ruminal e fezes de bovinos e ovinos como fonte de inóculo para a técnica *in vitro* de produção de gás. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36, 1999, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: SBZ, 1999, p. 122.
- HOLDEN, L.A. Comparison of methods of *in vitro* dry matter digestibility for tem feeds. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v. 82, p. 171794, 1999.
- LAVEZZO, O.E.N.M. *et al.* Influência de métodos de coleta de fluido ruminal sobre os parâmetros de fermentação em bovinos alimentados com diferentes fontes de proteína. *Rev. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 17, n. 3, p. 281-291, 1988.
- MALAFIA, P.A.M. *Taxas de digestão das frações protéicas e de carboidratos de alimentos por técnicas in situ, in vitro e de produção de gases.* 1997. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.
- MAURÍCIO, R.M. *et al.* Uso de líquido do rúmen e fezes como fonte de inóculo para a técnica *in vitro* de produção de gás. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu. *Anais...* Botucatu: SBZ, 1998, p. 314-316.
- MABJEESH, S.J. *In vitro* methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: Comparison of methods and inoculum source. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v. 83, p. 2289-2294, 2000.
- MÜLLER, M. *Avaliação da técnica de inóculo fecal para a determinação da digestibilidade in vitro.* 2000. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.
- OLIVEIRA, M.D.S. *et al.* Efeito de métodos de coleta de fluido ruminal sobre a digestibilidade *in vitro* de alguns

nutrientes de ração para bovinos. *Rev. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 22, n. 5, p. 794-800, 1993.

SANTOS, G.T. *et al.* Chemical composition and *in situ* degradability of leucaena (*Leucaena leucocephala*) and desmodium (*Desmodium ovalifolium*) submitted at two conservation forms. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v. 80, n. 1, p. 221, 1997.

SILVA, D. J. *Análise de alimentos. métodos químicos e biológicos*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1990.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Brit. Grassl. Soc.*, Cambridge, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.

Received on May 31, 2000.

Accepted on July 19, 2001.