

## Determinação da digestibilidade *in vitro* de gramíneas do gênero *Cynodon* com uso de diferentes metodologias

Geraldo Tadeu dos Santos\*, Marina Aparecida de Assis, Geane Dias Gonçalves, Elisa Cristina Modesto, Ulysses Cecato, Clóves Cabreira Jobim e Júlio César Damasceno

Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá-Paraná, Brazil.  
\*Author for correspondence. e-mail: gtsantos@uem.br

**RESUMO.** O objetivo deste trabalho foi avaliar as digestibilidades *in vitro* da MS e da MO de cultivares de *Cynodon* com o uso do sistema DAISY<sup>II</sup> da ANKOM<sup>®</sup> Technology Corporation em relação ao método tradicional proposto por Tilley e Terry (1963). Foram avaliados cinco cultivares: Tifton 44, Tifton 85, Coast-cross, Estrela Roxa e Porto Rico. O delineamento experimental foi em fatorial 2 x 5 (dois métodos e cinco cultivares). Foi observado que não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre as cultivares quando avaliadas pelo método tradicional. A metodologia DAISY<sup>II</sup> apresentou diferença entre as cultivares. Ao analisá-las separadamente, foram observadas variações entre as metodologias, para as digestibilidades *in vitro* da matéria seca e da matéria orgânica.

**Palavras-chave:** ANKOM<sup>®</sup>, DAISY<sup>II</sup>, matéria seca, matéria orgânica, Tilley e Terry.

**ABSTRACT. Determination of *in vitro* digestibility of *Cynodon* grasses through different methods.** The aim of this experiment was to evaluate *in vitro* dry matter and organic matter digestibility of *Cynodon* cultivars using ANKOM's DAISY system and the traditional method proposed by Tilley and Terry (1963). Five grasses were tested: tifton 44, tifton 85, coast-cross, *estrela-roxa* and *porto-rico*. The experiment was carried out in a completely randomized design ( $p > 0.05$ ) in a 2x5 (two methods and five cultivars) factorial scheme. No difference in digestibility ( $p > 0.05$ ) was observed between the cultivars when evaluated by Tilley and Terry's method but there were differences ( $p < 0.05$ ) when digestibility was evaluated by ANKOM's DAISY methodology. On the other hand, when cultivars were analyzed separately, variations between methodologies were observed in dry matter and organic matter digestibility *in vitro*.

**Key words:** ANKOM, DAISY, Tilley and Terry, dry matter, organic matter.

A estimativa da digestibilidade pelo método convencional, *in vivo*, é a medida que apresenta o maior grau de confiança, porém é oneroso e demorado, não permitindo a avaliação simultânea de grande número de alimentos, e exige grande quantidade de material (Pires *et al.*, 1979). Dessa forma, outros métodos têm sido desenvolvidos, como a técnica *in vitro*, desenvolvida por Tilley e Terry (1963), que simula a digestão no trato gástrico dos ruminantes, permitindo fazer estimativas de digestibilidade da matéria seca ou orgânica dos alimentos.

A estimativa da digestibilidade *in vitro* dos alimentos tem sido amplamente utilizada nas análises dos alimentos devido a sua alta correlação com a digestibilidade *in vivo* (Silva, 1990). A técnica desenvolvida por Tilley e Terry (1963) tem sido a

mais utilizada para a determinação da digestibilidade *in vitro*, porém não nos permite a incubação de amostras múltiplas em uma mesma unidade. Dessa forma, outros métodos e reagentes têm sido testados (Alexander e McGowan, 1966; Barnes, 1966; Alexander, 1967; Pires *et al.*, 1979), assim como a técnica de digestibilidade *in vitro* utilizando-se um fermentador artificial de rúmen denominado DAISY<sup>II</sup> da ANKOM<sup>®</sup> Technology Corporation (Holden, 1999 e Mabjeesh *et al.*, 2000). Esta técnica permitiria a determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), matéria orgânica (DIVMO) e da parede celular (DIVPC), de uma grande quantidade de amostras simultaneamente, em jarros de vidro, utilizando-se inóculo ruminal e saliva artificial, cujos resultados seriam comparáveis aos obtidos pelo método de Tilley e Terry (1963),

conforme relatado por Holden (1999). Todavia, na literatura são poucos os trabalhos que comparam as duas metodologias (Holden, 1999; Mabjeesh *et al.*, 2000). O emprego da técnica do rúmen artificial permite a estimativa da digestibilidade *in vitro* de uma grande quantidade de amostras simultaneamente, além de recuperar o resíduo final para a predição da digestibilidade *in vitro* da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e fibra em detergente neutro. Holden (1999) e Mabjeesh *et al.* (2000) relataram que o método “DAISY<sup>II</sup>” poderia ser usado para aumentar a eficiência laboratorial da digestibilidade *in vitro* e que forragens e grãos poderiam ser analisados juntos em um mesmo recipiente.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da matéria orgânica de cultivares de *Cynodon* com o uso do sistema DAISY<sup>II</sup> da ANKOM<sup>®</sup> Technology Corporation, em relação ao método tradicional proposto por Tilley e Terry (1963).

## Material e métodos

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) e nos Laboratórios de Análises de Alimentos e Nutrição Animal e de Metabolismo Animal e Digestibilidade *in vitro* do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

As amostras das cultivares de *Cynodon* (Tifton 44, Tifton 85, Coast-cross, Estrela Roxa e Porto Rico) foram colhidas de parcelas já estabelecidas de 5 x 3m (15m<sup>2</sup>), com corte manual a 10 cm do solo.

Após o corte as amostras foram colocadas em estufa de circulação forçada de ar (55° C) por 72 horas. O material foi moído em moinho provido de peneira com crivo de 1 mm e acondicionado em frascos de vidro, para posterior determinação da matéria seca (MS) e proteína bruta (PB), segundo as marchas analíticas descritas por Silva (1990). As análises de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram analisadas segundo a metodologia descrita por Van Soest *et al.* (1991) (Tabela 1). A DIVMS e a DIVMO foram obtidas segundo as técnicas (metodologia tradicional) descritas por Tilley e Terry (1963) e por Holden (1999), com o uso de rúmen artificial, desenvolvida pela ANKOM<sup>®</sup>.

Para a colheita do líquido ruminal foi utilizada uma vaca holandesa, múltipara, seca, com fistula ruminal, pesando aproximadamente 550 kg. A alimentação fornecida ao animal consistiu de uma ração em mistura completa (Tabela 2), contendo 27 kg de silagem de milho, 6 kg de ração concentrada e

minerais e 3,0 kg/dia de feno *de coast-cross*, de acordo com as exigências diárias (NRC, 1989). Adotou-se um período de 14 dias para adaptação do animal ao alimento e o fornecimento desta alimentação continuou durante o período experimental.

**Tabela 1.** Composição química das cultivares do gênero *Cynodon* com base na MS

Cultivares	MS %		
	PB	FDN	FDA
Tifton 44	13,37	69,85	36,95
Tifton 85	13,18	72,48	37,21
Coast-cross	12,36	71,90	37,14
Porto Rico	13,07	71,29	36,84
Estrela Roxa	12,99	69,39	36,11

**Tabela 2.** Composição química da dieta das vacas fistuladas (MS %)

Nutrientes (%)	Ração concentrada <sup>1</sup>	Silagem de milho	Feno de <i>Cynodon</i>
MS	89,0	27,6	89,0
MO	93,6	94,5	92,0
PB	26,1	06,1	10,0
FDA	06,6	40,4	32,0
FDN	05,7	65,5	70,0

<sup>1</sup> Ração concentrada contém: 27,47% de farelo de soja, 6,87% de farelo de canola, 3,85% de farinha de carne, 14,90% de farelo de trigo, 45,82% de milho moído, 1,00% de sal mineral

Para a determinação da DIVMS e da DIVMO pelos métodos de Tilley e Terry (1963), colocou-se 0,5 g de MS de cada alimento em cada tubo, em duplicatas, e estes tubos foram levados para a estufa a 39,0°C. Em seguida, acondicionaram-se 50 ml por tubo, de solução constituída à base de: 40 ml de solução tampão - saliva artificial de Mac Dougall (Mc Dougall, 1948) e 10 ml de líquido ruminal, mais 5 ml de solução de uréia (5,5 g de uréia em 100 ml de água destilada). Cada tubo foi saturado com CO<sub>2</sub> e imediatamente fechado com tampa de borracha provida de válvula de Busen. Estes tubos foram incubados por 48 h a 39°C, em meio anaeróbico. Após o período de 48h de digestão, em cada tubo foram adicionados 4 ml de solução de pepsina ácida, constituída de 1.000 ml de ácido clorídrico 3N, e 28 g de pepsina em pó (1:10.000) da marca sigma, retornando o tubo à estufa por mais 24 h, com agitação 3 vezes ao dia, para a finalização da segunda etapa da técnica de Tilley e Terry (1963). Transcorrido esse tempo, retiraram-se os tubos, os quais foram mantidos à temperatura de 10°C por 1 h; filtrou-se o material em cadinho sinterizado, previamente pesado, com água destilada, até a limpeza do filtrado. Os cadinhos permaneceram na estufa (105°C) para secagem, e por diferença de peso determinou-se a matéria seca. Para determinar a MO e resíduo foi efetuada a transferência para cadinhos de porcelana e estes foram levados à mufla.

Para a determinação da DIVMS e da DIVMO pela técnica de ANKOM®, as amostras foram moídas previamente, também a 1,0 mm de crivo, e pesou-se em duplicatas, aproximadamente 0,5 g de MS em sacos de filtro de náilon (F57 - ANKOM®), com dimensões de 6,0 x 6,0 cm e malhas de 30 µm, lacrados a quente e colocados em jarro, no DAISY<sup>II</sup>, sendo 25 sacos por jarro. Em cada jarro adicionou-se 1.332 ml de solução tampão A<sup>1</sup> e 268 ml de solução tampão B<sup>2</sup>, de maneira a se obter um pH final de 6,8 a 39°C, purgando-se CO<sub>2</sub> para manter o meio anaeróbico. Após 30 minutos foram adicionados 400 ml do líquido de rúmen filtrado, mantido em banho-maria a 39°C e purgado com CO<sub>2</sub>. O jarro permaneceu na incubadora por 48 h, mantendo-se aquecido a 39,0°C e em agitação constante. Completando-se a incubação foram adicionados a cada jarro 8 g de pepsina (1:10.000) e 40 ml de HCl 6N e os jarros mantidos aquecidos a 39°C por mais 24 h. Após isso, os jarros foram drenados e adicionou-se água destilada à temperatura da sala, para a lavagem dos sacos, por duas vezes consecutivas, tendo-se exercido ligeira pressão sobre os sacos para remover o gás neles contido e eles foram secados em estufa a 100°C por 24 h.

O delineamento experimental foi em fatorial 2 x 5 (dois métodos, Tilley e Terry - Tradicional e a DAISY<sup>II</sup> e cinco cultivares, Tifton 44, Tifton 85, Coast-cross, Estrela Roxa e Porto Rico), com três repetições.

O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ij} = \mu + M_i + C_j + MC_{ij} + e_{ij}$$

Y<sub>ij</sub> = Observação do método de comparação i e da cultivar j.

µ = Constante geral.

M<sub>i</sub> = Efeito do método i; i = 1, 2.

C<sub>j</sub> = Efeito da cultivar j; j = 1, 2, 3, 4, 5.

MC<sub>ij</sub> = Efeito da interação do método i com a cultivar j.

e<sub>ij</sub> = Erro aleatório associado a cada observação Y<sub>ij</sub>.

### Resultados e discussão

De acordo com as análises efetuadas, nas cinco cultivares não foram observadas diferenças (p>0,05) tanto para DIVMS quanto para a DIVMO utilizando-se a metodologia tradicional. Quando foi analisada a metodologia DAISY<sup>II</sup> observou-se maior (p<0,05) DIVMS e da DIVMO para a cultivar Tifton 44 e Estrela Roxa. No entanto, a Estrela Roxa apresentou-se de forma semelhante a Coast-cross e a

Tifton 85 (Tabela 3). Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Assis (1997), que verificou melhor DIVMS e DIVMO, utilizando a metodologia DAISY<sup>II</sup>, para as cultivares tifton 44 e estrela-roxa, sendo que as demais apresentaram digestibilidades inferiores.

**Tabela 3.** Médias da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da matéria orgânica (DIVMO) de cultivares de *Cynodon*, obtidos pelos métodos TILLEY e TERRY e DAISY<sup>II</sup>

Gramíneas	DIVMS (%)		DIVMO (%)	
	TT	DY	TT	DY
Tifton 44	64,92a	71,27a	66,70a	70,02a
Coast-cross	64,92a	66,74 bc	64,11a	65,49 bc
Estrela Roxa	62,53a	68,23ab	65,34a	66,59ab
Tifton 85	62,88a	66,01 bc	65,28a	64,68 bc
Porto Rico	62,47a	62,27 c	66,18a	61,45 c
Coefficiente de variação (%)	2,62	2,62	2,73	2,73

Médias seguidas de uma mesma letra na coluna não diferiram significativamente em nível de 5%, pelo teste Tukey

Conforme a Tabela 4, a DIVMS e da DIVMO apresentaram-se de forma semelhante (p>0,05) para a cultivar *coast-cross* entre as duas metodologias; todavia a cultivar porto-rico não diferiu quanto à DIVMS, e as cultivares estrela-roxa e tifton 85, quanto à DIVMO.

**Tabela 4.** Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da matéria orgânica (DIVMO), TILLEY e TERRY (TT) e a DAISY<sup>II</sup> (DY) dos cultivares do gênero *Cynodon*

Gramínea	Metodologia	DIVMS		DIVMO	
		(%)			
Tifton 44	TT	64,59b	66,70b		
	DY	71,27a	70,02a		
Tifton 85	TT	62,88b	65,28a		
	DY	66,01a	64,69a		
Coast-cross	TT	64,92a	64,11a		
	DY	66,74a	65,49a		
Estrela Roxa	TT	62,53b	66,59a		
	DY	68,23a	65,34a		
Porto Rico	TT	62,47a	66,18a		
	DY	62,27a	61,45b		
Coefficiente de Variação (%)		2,62	2,73		

Médias seguidas de uma mesma letra na coluna dentro de uma mesma cultivar não diferem significativamente em nível de 5%, pelo teste Tukey

A cultivar tifton 44 apresentou maiores (p<0,05) DIVMS e DIVMO, quando se utilizou o método DAISY<sup>II</sup> em relação ao Tilley e Terry (Tabela 4). Para as cultivares tifton 85 e estrela-roxa os maiores valores (p<0,05) foram obtidos apenas para a DIVMS; já, a porto-rico comportou-se de forma contrária, ou seja, o maior resultado (p<0,05) foi obtido para a DIVMO utilizando-se o método Tilley e Terry. Isto evidencia que o método utilizado pode determinar variabilidade para a DIVMO e DIVMS de um mesmo cultivar; no entanto Holden (1999), trabalhando com dez amostras de alimentos, sendo

<sup>1</sup> Solução tampão A (g/litro): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 10,0, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 0,5, NaCl - 0,5, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O - 0,1, Uréia - 0,5.

<sup>2</sup> Solução B: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - 15,0, Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O - 1,0.

estes tanto grãos quanto volumosos, não encontrou diferenças significativas entre as duas metodologias.

Masbjeesh *et al.* (2000) não encontraram diferenças entre o método Tilley e Terry e DAISY<sup>II</sup>, para a DIVMS, utilizando diferentes fontes de volumosos; porém ao trabalharem com fontes protéicas, como a alfafa, obtiveram maior DIVMS com o método DAISY<sup>II</sup> quando comparado com a metodologia tradicional. Ao analisarem o milho, sorgo e trigo observaram similaridade entre os métodos.

Diante dos resultados obtidos pode-se inferir que as diferenças encontradas com a utilização da metodologia DAISY<sup>II</sup> podem estar relacionadas com a porosidade dos sacos ou com a proporção da solução- tampão e inóculo ruminal. Segundo Grant e Mertens (1992), existem várias pesquisas que visam a diferentes diluições para a relação-tampão: inóculo, e esses têm por objetivo adequar o pH do inóculo.

Podemos concluir que o DAISY<sup>II</sup> é um sistema efetivo para determinar a DIVMS e DIVMO e fornece dados similares aos encontrados pelo sistema mais tradicional, em cuja metodologia se usam tubos individuais; no entanto, conforme o alimento testado, podem ocorrer variações nos resultados, necessitando-se de maiores investigações sobre o assunto.

### Referências bibliográficas

- Alexander, R.H. Estabelecimento de um sistema de digestibilidade *in vitro* en el laboratorio. In: Paladines, O.L. Metodos *in vitro* para determinar el valor nutritivo de leos farrajes. Montevideo, Centro de Investigacion y Enzenanza para la Zona Templada del IICA. p.101-152, 1967.
- Alexander, R.H.; McGowan, M. The routine determination of *in vitro* digestibility of organic matter in forages - an investigation on the problems associated with the continuous large-scale operation. *J. British Grassl. Soc.*, 21(2):140-147, 1966.
- Assis, M.A. *Digestibilidade in vitro, degradabilidade in situ e composição química de gramíneas do gênero Cynodon submetidas ou não a adubação nitrogenada*. Maringá, 1997. (Master's Thesis in Animal Production) - Universidade Estadual de Maringá.
- Barnes, R.F. The development and application of *in vitro* rumen fermentation techniques. In: PROCEEDINGS OF X INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 1966, Helsinki. 1966. p. 434-438.
- Grant, R.J.; Mertens, D.R. Development of buffer systems for pH control and evaluation of pH effects upon fiber digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, 75:1581-1587, 1992.
- Holden, L.A. Comparison of methods of *in vitro* matter digestibility for ten feeds. *J. Dairy Sci.*, 82(8):1791-1794, 1999.
- Mabjeesh, S.J.; Cohen, M., Ariell, A. *In vitro* methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: comparison of methods and inoculum source. *J. Dairy Sci.*, 83(10):2289-2294, 2000.
- Mc Dougall, E.I. Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.*, 43:99-109, 1948.
- National Research Council. *Nutrient requirements of Dairy Cattle*. Washington, DC: National Academy Press. Washington DC. 1989.
- Pires, M.B.G.; Freitas, E.A.G.; Trindade, D.S.; Quadros, A.T.F. Estabelecimento de um sistema de digestibilidade *in vitro* no Laboratório da Equipe de Pesquisa em Nutrição Animal da Secretaria da Agricultura. *Anuário Técnico do IPZFO*, 6:345-385, 1979.
- Silva, D. J. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 2.ed. Viçosa: UFV, 1990. 165p.
- Tilley, J.M.A.; Terry, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Brit. Grassl. Soc.*, 18(2):104-111, 1963.
- 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. *J. Dairy Sci.*, 74(10): 3583-3597, 1991.

Received on May 23, 2000.

Accepted on July 25, 2000.