

LARISSA FROTA CAMACHO

**ESTUDOS DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE IN
VITRO DE ALIMENTOS PARA RUMINANTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Camacho, Larissa Frota, 1987-
C172e Estudo de métodos para avaliação da digestibilidade *in vitro*
2017 de alimentos para ruminantes / Larissa Frota Camacho. – Viçosa,
MG, 2017.
ix, 42f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Edenio Detmann.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Ruminantes - Alimentação e rações. 2. Digestão -
Ruminantes. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Zootecnia.
II. Título.

CDD 22 ed. 636.2085

LARISSA FROTA CAMACHO

**ESTUDOS DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE *IN*
VITRO DE ALIMENTOS PARA RUMINANTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

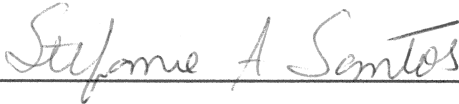
APROVADA: 23 de fevereiro de 2017.



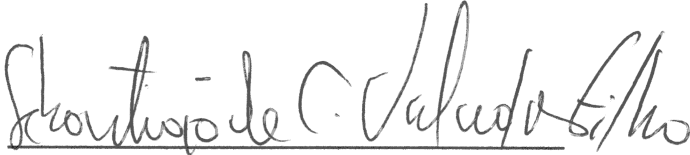
Marcio de Souza Duarte



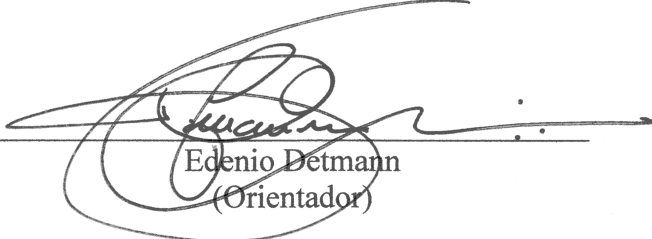
Polyana Pizzi Rotta Costa e Silva
(Coorientadora)



Stefanie Alvarenga Santos



Sebastião de Campos Valadares Filho
(Coorientador)



Edenio Detmann
(Orientador)

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existência. Não se pode deixar de ficar admirado quando se contempla os mistérios da eternidade, da vida, da maravilhosa estrutura da realidade. Basta que se busque compreender um pouco desse mistério a cada dia. Nunca perca a curiosidade... Não pare de se maravilhar.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus, a Quem tudo confio e que em um momento inesperado me permitiu conhecer a Zootecnia e me apaixonar.

Aos meus pais Maurício e Angélica, pelo apoio emocional e por acreditarem nos meus sonhos, me ajudando a torná-los realidade.

Ao meu irmão Maurício, que mesmo longe me ajudou a enfrentar meus medos e correr atrás dos meus objetivos.

Ao meu namorado Arthur, que me incentivou a crescer profissionalmente, dividindo as conquistas e os momentos de tensão.

Aos amigos Tadeu, Malber, William, Amanda, Cris, Giselle, João, Marcinha, Erick e Luiz Fernando, que se tornaram minha família em Viçosa. Em especial Tadeu e Malber, que desde o início me acompanharam, me ajudando com as atividades do curso de forma extrovertida e paciente.

À querida amiga Érica, parte da família que Viçosa me proporcionou, parceira de estudos, de corridas na reta e de boas conversas.

Ao Professor Edenio Detmann, por toda paciência e empenho em orientar e servir de exemplo para às “jovens mentes ansiosas”.

Aos professores do Departamento de Zootecnia, por todos os ensinamentos. Em especial, aos Professores Sebastião, Polyana e Marcinho por aceitarem participar desta banca.

À Professora Stefanie Alvarenga Santos, por aceitar participar da minha banca.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia, pela ajuda prestada.

Ao CNPq, INCT-Ciência Animal e FAPEMIG, pelo financiamento do projeto.

BIOGRAFIA

LARISSA FROTA CAMACHO, filha de Maurício Bastos Camacho e Maria Angélica Frota Camacho, nasceu em Manaus, AM, em 27 de julho de 1987.

Em 2011 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal do Ceará, colando grau em julho de 2015.

Em 2015 ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 23 de fevereiro de 2017.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
 CAPÍTULO 1 – Digestibilidade in vitro de forragens e concentrados utilizando diferentes soluções tampão com adição ou não de ureia	
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUÇÃO.....	6
MATERIAL E MÉTODOS.....	7
RESULTADOS.....	14
DISCUSSÃO.....	18
CONCLUSÕES.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
 CAPÍTULO 2 – Efeitos associativos entre alimentos sobre a digestibilidade in vitro da matéria seca e da fibra em detergente neutro obtida por intermédio de fermentadora artificial	
RESUMO.....	26
ABSTRACT.....	27
INTRODUÇÃO.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
RESULTADOS.....	33
DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

RESUMO

CAMACHO, Larissa Frota, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Estudos de métodos para avaliação da digestibilidade in vitro de alimentos para ruminantes.** Orientador: Edenio Detmann. Coorientadores: Polyana Pizzi Rotta Costa e Silva e Sebastião de Campos Valadares Filho.

Essa dissertação foi elaborada com base em dois experimentos. No primeiro experimento objetivou-se comparar as digestibilidades in vitro da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) com uso de duas soluções tampão (Kansas e McDougall) adicionadas ou não de ureia. Para as estimativas das digestibilidades, 25 forragens e 25 concentrados foram avaliados utilizando-se a fermentadora artificial TE-150 e filter bags de tecido não-tecido (100 g/m²). Para avaliação da capacidade de tamponamento, pH e concentração de nitrogênio amoniacal (NH₃) das combinações das soluções tampão e a adição ou não de ureia foram utilizadas amostras de feno de Tifton 85 e fubá de milho avaliadas em sete tempos de incubação. Interação entre tampão e uso de ureia foi observada para as DIVMS e DIVFDN de forragens (P<0,04), com valores superiores com uso do tampão de McDougall adicionado de ureia (P<0,05). Nas amostras de concentrado, não foram observadas interações (P>0,10), porém valores superiores foram observados com uso do tampão de McDougall (P<0,01). Em geral, as repetibilidades foram melhores com uso do tampão de McDougall, enquanto a adição de ureia reduziu o desvio-padrão entre amostras. Observou-se interação entre tampão e ureia para os valores de pH e concentração de nitrogênio amoniacal, com valores inferiores de pH com uso do tampão de Kansas (P<0,01) para forragem e concentrado, e elevação dos valores ao adicionar ureia (P<0,01); enquanto a concentração de NH₃ foi superior com adição de ureia para ambos os tampões (P<0,02) para forragem e concentrado. Conclui-se que o uso da solução tampão de McDougall propicia condições de meio mais adequadas ao crescimento e que a utilização de ureia tende a reduzir o poder discriminatório entre amostras. No segundo experimento objetivou-se estudar os efeitos associativos entre forragens e entre forragem e concentrados sobre a DIVMS e a DIVFDN. O estudo foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, foram avaliados os efeitos associativos entre cana-de-açúcar, silagem de milho e feno de Tifton 85 em duas condições de incubação (isolada ou em conjunto). Na segunda etapa, foram avaliados os efeitos associativos da cana-de-açúcar incubada em conjunto com farelo de soja e/ou milho sobre as estimativas de

digestibilidade da cana-de-açúcar. As digestibilidades *in vitro* foram avaliadas por intermédio de fermentadora artificial TE-150 e filter bags de tecido não-tecido, com uso da solução tampão de McDougall. Na primeira etapa, observou-se efeito associativo ($P < 0,05$) entre forragem e condição de incubação, com valores de DIVMS e DIVFDN superiores para cana-de-açúcar e inferiores para silagem de milho quando as amostras foram incubadas em conjunto. Não foi observado efeito associativo evidente ($P > 0,57$) sobre as estimativas de digestibilidade para as amostras de feno de Tifton 85 nas diferentes condições de incubação. Na segunda etapa, observou-se efeito associativo ($P < 0,05$) entre forragem e condição de incubação, com redução das estimativas de digestibilidade quando a cana-de-açúcar foi incubada com milho. Nas condições de incubação da cana-de-açúcar com farelo de soja ou farelo de soja e milho, não foram observadas variações ($P > 0,05$) na DIVMS e DIVFDN. Conclui-se que a incubação de alimentos de forma conjunta, utilizando-se fermentadoras artificiais, implica na ocorrência de efeitos associativos, podendo alterar as estimativas de digestibilidade *in vitro* dos alimentos.

ABSTRACT

CAMACHO, Larissa Frota, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017.
Studies on methods for evaluating the in vitro digestibility of feeds for ruminants.
Adviser: Edenio Detmann. Co-Advisers: Polyana Pizzi Rotta Costa e Silva and
Sebastião de Campos Valadares Filho.

This dissertation was based on two experiments. In the first experiment the aim was to compare the in vitro digestibility of dry matter (DMI_{VD}) and neutral detergent fiber (NDFI_{VD}) using two buffer solutions (Kansas and McDougall) with or without addition of urea. For the digestibility estimates, 25 forages and 25 concentrates were evaluated using the artificial fermenter TE-150 and non-woven filter bags (100 g / m²). Samples of Tifton 85 hay and ground corn were evaluated in seven incubation times to evaluate the buffering capacity, pH and ammoniacal nitrogen concentration of the combinations of the buffer solutions and the addition or not of urea. Interaction between buffer and urea was observed for DMI_{VD} and NDFI_{VD} of forages ($P < 0.04$), with greater values using McDougall's buffer with urea ($P < 0.05$). For the concentrate samples, no interactions were observed ($P > 0.10$), but greater values were observed using McDougall's buffer ($P < 0.01$). Generally, repeatability was improved using McDougall's buffer, while the urea addition decrease the standard deviation among samples. Interaction between buffer and urea was observed for pH and ammoniacal nitrogen concentration, where lower values of pH were observed using Kansas buffer ($P < 0.01$) for forage and concentrate and increased values when urea was added ($P < 0.01$); whereas NH₃ concentration was greater with urea addition ($P < 0.02$) for both forage and concentrate. In summary, it is concluded that the McDougall's buffer allows a better medium for microbial growth. Urea addition tends to decrease the power of discrimination among samples. In the second experiment the aim was to study the associative effects among forages and between forage and concentrates on the DMI_{VD} and NDFI_{VD}. The study was divided into two steps. In the first step, associative effects among sugarcane, corn silage and Tifton 85 hay under two incubation conditions (isolated or together) were evaluated. In the second step, associative effects of sugarcane incubated together with soybean meal and, or ground corn on the sugarcane digestibility were evaluated. These evaluations were performed using an artificial fermenter TE-150, non-woven textile filter bags, and McDougall buffer solution. In the first step, associative effect between sugarcane and corn silage was observed ($P < 0.05$) on both DMI_{VD} and NDFI_{VD}, where digestibilities of sugarcane and corn silage were

increased and decreased, respectively, when incubated together. The samples of Tifton 85 hay did not present differences ($P>0.05$) on DMIVD and NDFIVD when evaluated isolated or together. In the second step, associative effects between forage and concentrates were detected ($P<0.05$). Sugarcane digestibility was depressed ($P<0.05$) by incubation with ground corn, but it was not affected when incubated with soybean meal or soybean meal and ground corn. Therefore, it is concluded that there are associative effects feeds when in vitro digestibility is evaluated using artificial fermenters.

INTRODUÇÃO GERAL

A técnica de digestibilidade *in vitro* tem sido utilizada para avaliação de alimentos para ruminantes por apresentar resultados de forma rápida, menos onerosa, menos invasiva e que apresentam forte correlação com os resultados de digestibilidade obtidos *in vivo* (Velásquez et al., 2010).

O método mais amplamente utilizado para avaliação de digestibilidade *in vitro* foi proposto por Tilley e Terry (1963) para avaliação de forragens. Porém, Silva et al. (2017) demonstraram a semelhança no poder discriminatório entre amostras ao testar o uso de fermentadoras artificiais e filter bags quando comparados ao método de Tilley e Terry (1963). Do ponto de vista prático, a utilização destes equipamentos é vantajosa devido à sua maior capacidade operacional e menor custo (Adesogan, 2002).

Para realização de ensaios de digestibilidade *in vitro*, há necessidade do uso de soluções tampão com objetivo de reproduzir a composição química da saliva dos modelos *in vivo*, objetivando-se controlar o pH do meio de fermentação. Deseja-se que a solução tampão apresente pH próximo a 6,8 (Tilley e Terry, 1963; Alexander e McGowan, 1966). Recomenda-se para o método proposto por Tilley e Terry (1963) a utilização da solução tampão de McDougall (1948), a qual se baseia na composição química da saliva de ovinos. No entanto, outras soluções tampão, como a solução de Kansas, têm sido recomendadas. Particularmente, a solução tampão de Kansas baseia-se na mistura de diferentes compostos químicos de forma a obter solução base para a incubação com a faixa de pH desejada (Marten e Barnes, 1980; Silva e Queiroz, 2002). Contudo, as soluções tampão mencionadas anteriormente apresentam composições diferentes, podendo apresentar capacidade tamponante diferente, o que poderia causar diferenças nos resultados obtidos pela técnica de digestibilidade *in vitro*.

Por outro lado, a adição de ureia nas soluções tampão fornece nitrogênio para os microrganismos presentes no inóculo, o que reduziria a influência da dieta do animal doador no inóculo (Marten e Barnes, 1980). Contudo, tem sido questionado se a utilização de ureia poderia reduzir o poder discriminatório entre amostras avaliadas *in vitro*, principalmente por favorecer a utilização microbiana de alimentos de menor qualidade.

Adicionalmente, a vantagem da alta capacidade operacional com o uso de fermentadoras artificiais, permitindo a avaliação de diversas amostras simultaneamente (Lopes et al., 2010), pode provocar a ocorrência de efeito associativo entre alimentos incubados no mesmo jarro de fermentação devido às diferenças químicas entre as amostras, influenciando na população microbiana e, conseqüentemente, alterando as estimativas da digestibilidade dos alimentos (Wilman e Adesogan, 2000; Adesogan, 2005; Mould et al., 2005).

As estimativas de digestibilidade *in vitro* podem ser enquadradas em dois principais objetivos: predição da digestibilidade *in vivo* e avaliação comparativa entre alimentos (Silva et al., 2017). Neste sentido, a ocorrência de efeitos associativos entre alimentos incubados em conjunto poderia afetar ambos os objetivos, por viesar as estimativas de digestibilidade e alterar o ranqueamento de alimentos quanto às características de digestibilidade. Contudo, estudos conduzidos para avaliação da ocorrência de efeitos associativos entre alimentos em sistemas *in vitro* são escassos em condições tropicais.

Portanto, objetivou-se com essa dissertação:

1. Avaliar o efeito do uso das soluções tampão de Kansas e McDougall, adicionadas ou não de ureia, sobre as estimativas de digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro de forragens e concentrados; e

2. Avaliar os efeitos associativos entre forragens e entre forragem e concentrados sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro utilizando-se fermentadora artificial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADESOGAN, A.T. What are feeds worth? A critical evaluation of selected nutritive values methods. In: ANNUAL FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 13, 2002, Gainesville. Proceedings... Gainesville: University of Florida, 2002. p.33-47.
- ADESOGAN, A.T. Effect of bag type on the apparent digestibility of feeds in ANKOM Daisy^{II} incubators. *Animal Feed Science and Technology*, v.119, p.333-344, 2005.
- ALEXANDER, R.H.; MCGOWAN, M. The routine determination of in vitro digestibility of organic matter in forages – an investigation of the problems associated with continuous large-scale operation. *Grass and Forage Science*, v.21, p.140-147, 1966.
- LOPES, F.C.F.; DORNELAS, R.A.C.; PORTUGAL, J.A.B. et al. Digestibilidade da matéria seca de silagens de milho e de suplementos concentrados determinada por procedimentos in vitro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, p.1167-1173, 2010.
- MARTEN, G.C.; BARNES, R.F. Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzyme systems. In: PIGDEN, W.J.; BALCH, C.C.; GRAHAM, M. (Eds.) *Standardization of analytical methodology for feeds*. Ottawa: IDRC, 1980. p.61-71.
- McDOUGALL, E.I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal*, v.43, p.99-109, 1948.
- MOULD, F.L.; KLIEM, K.E.; MORGAN, R. et al. In vitro microbial inoculums: a review of its function and properties. *Animal Feed Science and Technology*, v.123-124, p.31-50, 2005.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos*. 3 ed. Viçosa: Editora UFV, 2002. 235p.
- SILVA, T.E.; DETMANN, E.; CAMACHO, L.F. et al. Comparação de métodos in vitro para a quantificação da digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro de forragens e concentrados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2017 (no prelo).

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. Journal of the British Grassland Society, v.18, p.104-111, 1963.

VELÁSQUEZ, P.A.T.; BERCHIELLI, T.T.; REIS, R.A. et al. Composição química, fracionamento de carboidratos e proteínas e digestibilidade in vitro de forrageiras tropicais em diferentes idades de corte. Revista Brasileira de Zootecnia, v.39, p.1206-1213, 2010.

WILMAN, D.; ADESOGAN, A. A comparison of filter bags methods with conventional tube methods of determining the in vitro digestibility of forages. Animal Feed Science and Technology, v.84, p.33-47, 2000.

CAPÍTULO 1

Digestibilidade in vitro de forragens e concentrados utilizando diferentes soluções tampão com adição ou não de ureia

[In vitro digestibility of forages and concentrates using different buffer solutions with or without urea addition]

RESUMO - Objetivou-se comparar as digestibilidades in vitro da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) com uso de duas soluções tampão (Kansas e McDougall) adicionadas ou não de ureia. O estudo foi dividido em dois experimentos. No primeiro experimento, 25 forragens e 25 concentrados foram avaliados utilizando-se a fermentadora artificial TE-150 e filter bags de tecido não-tecido (100 g/m²). No segundo experimento, feno de Tifton 85 e fubá de milho foram utilizados para avaliar o pH e a concentração de nitrogênio amoniacal (NH₃) das combinações das soluções tampão com a adição ou não de ureia em sete tempos de incubação. Interação entre tampão e uso de ureia foi observada para as DIVMS e DIVFDN de forragens (P<0,04), com valores superiores com uso do tampão de McDougall adicionado de ureia (P<0,05). Nas amostras de concentrado, não foram observadas interações (P>0,10), porém valores superiores foram observados com uso do tampão de McDougall (P<0,01). Em geral, as repetibilidades foram melhores com uso do tampão de McDougall, enquanto a adição de ureia reduziu o desvio-padrão entre amostras. No segundo experimento observou-se interação entre tampão e ureia para os valores de pH e concentração de nitrogênio amoniacal, em que verificou-se valores inferiores de pH com uso do tampão de Kansas (P<0,01) para forragem e concentrado, com elevação dos valores ao adicionar ureia (P<0,01); enquanto a concentração de NH₃ foi superior com adição de ureia para ambos os tampões (P<0,02) para forragem e concentrado. Conclui-se que o uso da solução tampão de McDougall propicia condições de meio mais adequadas ao crescimento microbiano e que a utilização de ureia tende a reduzir o poder discriminatório entre amostras.

Palavras-chave: amônia, digestão ruminal, meio de incubação, pH

ABSTRACT - The aim of this study was to compare the in vitro digestibility of dry matter (DMI_{VD}) and neutral detergent fiber (NDFI_{VD}) using two buffer solutions (Kansas and McDougall) with or without addition of urea. The study was divided into two experiments. In the first experiment, 25 forages and 25 concentrates were evaluated using the artificial fermenter TE-150 and non-woven textile filter bags (100 g/m²). In the second experiment, samples of Tifton 85 hay and ground corn were used to evaluate pH and ammoniacal nitrogen (NH₃) concentration for both buffer solutions with or without urea in seven incubation times. Interaction between buffer and urea was observed for DMI_{VD} and NDFI_{VD} of forages ($P < 0.04$), with greater values using McDougall's buffer with urea ($P < 0.05$). For the concentrate samples, no interactions were observed ($P > 0.10$), but greater values were observed using McDougall's buffer ($P < 0.01$). Generally, repeatability was improved using McDougall's buffer, whereas urea addition decreased the standard deviation among samples. In the second experiment, interaction between buffer and urea was observed for pH values and NH₃ concentration, where lower values of pH were observed using Kansas buffer ($P < 0.01$) for forage and concentrate, with increased values when urea was added ($P < 0.01$); whereas NH₃ concentration was greater with urea addition ($P < 0.02$) for both forage and concentrate. In summary, it is concluded that the McDougall's buffer allows a better medium for microbial growth. Urea addition tends to decrease the power of discrimination among samples.

Keywords: ammonia, incubation medium, pH, rumen digestion

INTRODUÇÃO

A técnica de digestibilidade in vitro tem sido utilizada com objetivo de estimar a digestibilidade in vivo dos alimentos (Menke and Steingass, 1988), bem como avaliá-los comparativamente (Silva et al., 2017). Contudo, a utilização de ensaios de digestibilidade in vitro requer o uso de soluções tampão para manutenção do pH do meio de fermentação, além de fornecer nutrientes como microminerais que estimulam o crescimento dos microrganismos ruminais (Mould et al., 2005a).

Atualmente, diversas soluções tampão estão disponíveis com diferentes composições químicas (McDougall, 1948; Menke e Steingass, 1988; Silva e Queiroz,

2002). Entretanto, a diferença na composição química dessas soluções pode implicar em alterações na longevidade de ação do tampão (Herod et al., 1978), bem como alterar a taxa de fermentação dos substratos (Mould et al., 2005a).

A solução tampão de McDougall (1948), a qual se baseia na composição química da saliva de ovinos, é composta principalmente por bicarbonato de sódio. Por outro lado, a utilização dessa solução tampão requer o borbulhamento de CO₂ na adequação do pH, onerando os custos da técnica in vitro. Outras soluções tampão, como a solução de Kansas, têm sido recomendadas com a proposta de reduzir os custos e facilitar seu manuseio no laboratório. Particularmente, a solução tampão de Kansas se baseia no uso de fosfato de potássio como tampão base e adequação do pH através da mistura de duas soluções de forma a obter a faixa de pH desejada (Marten e Barnes, 1980; Silva e Queiroz, 2002).

Entretanto, as soluções tampão mencionadas anteriormente apresentam composições químicas diferentes, que podem interferir na confiabilidade do seu uso para obtenção da digestibilidade in vitro dos alimentos.

Por outro lado, a adição de ureia nas soluções tampão fornece nitrogênio para os microrganismos presentes no inóculo, o que reduziria a influência da dieta do animal doador no inóculo (Marten e Barnes, 1980). Contudo, tem sido questionado se a utilização de ureia poderia reduzir o poder discriminatório entre amostras avaliadas in vitro, principalmente por favorecer a utilização de alimentos de menor qualidade pelos microrganismos.

Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito do uso das soluções tampão de Kansas e McDougall, adicionadas ou não de ureia, sobre as estimativas de digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) de forragens e concentrados, bem como a influência da adição de ureia ao meio de fermentação sobre o poder discriminatório entre amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

O presente estudo foi dividido em dois experimentos. No primeiro experimento, avaliaram-se as estimativas de DIVMS e DIVFDN de forragens e concentrados considerando-se as combinações de duas soluções tampão (Kansas e McDougall) e a adição ou não de ureia ao meio de fermentação. No segundo experimento, avaliou-se a capacidade de tamponamento das soluções tampão testadas combinadas ou não com ureia frente a amostras com características químicas distintas (forragem e concentrado, ricos em fibra e amido, respectivamente).

No primeiro experimento, foram utilizadas 25 amostras de forragens in natura [*Panicum maximum* cv. Mombaça, *Saccharum* sp. (n = 4), *Brachiaria* sp. (n = 10), *Cajanus cajan*, *Calopogonium mucunoides*, *Leucaena leucocephala* e *Neonotonia wightii*], feno [*Cynodon* sp. (n = 3), *Stylosanthes guianensis* cv. Campo Grande e *Medicago sativa*] e silagem (*Arachis pintoi*) e 25 amostras de concentrados [casca de soja (n = 2), milho grão (n = 5), glutenose de milho, polpa cítrica, farelo de arroz, farelo de girassol, farelo de soja (n = 2), farelo de trigo, sorgo grão (n = 2) e misturas concentradas comerciais (n = 9)]. As amostras de forragens com alto teor de umidade foram secas em estufa com ventilação forçada (55°C) e, em conjunto com as demais, foram processadas em moinho de facas com peneira de porosidade de 1 mm. Posteriormente, todas as amostras foram analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS; método INCT-CA G-003/1), proteína bruta (PB; método INCT-CA N-001/1) e fibra insolúvel em detergente neutro (FDN; método INCT-CA F-002/1), conforme métodos preconizados por Detmann et al. (2012; Tab. 1).

Tabela 1. Estatísticas descritivas para os teores de proteína bruta e fibra em detergente neutro das forragens e concentrados utilizados nos ensaios de digestibilidade in vitro

Amostras	Estatísticas			
	Mínimo	Máximo	Média	Desvio-padrão
Proteína bruta (g/kg de matéria seca)				
Forragens	20,8	201,2	70,2	40,5
Concentrados	48,7	590,3	173,1	131,9
Fibra em detergente neutro (g/kg de matéria seca)				
Forragens	247,0	710,0	583,2	114,1
Concentrados	103,0	626,0	231,6	113,0

Os tratamentos foram compostos pela combinação de duas soluções tampão (Kansas e McDougall), com a adição ou não de ureia, segundo esquema fatorial 2×2 .

Todos os ensaios de digestibilidade *in vitro* foram realizados por intermédio de fermentadora artificial TE-150 (Tecnal Equipamentos Científicos, Piracicaba, SP, Brasil), utilizando-se filter bags confeccionados com tecido não-tecido (100 g/m^2) nas dimensões $4 \times 4,5 \text{ cm}$, lavados e pesados conforme procedimentos sugeridos por Detmann et al. (2012).

O período experimental teve duração de 12 dias, divididos em seis baterias de 48 horas de incubação, nas quais nas três primeiras foram avaliadas as forragens e nas três últimas os concentrados.

A solução tampão de McDougall (1948) foi composta por NaHCO_3 (9,80 g/L), Na_2HPO_4 anidro (3,71 g/L), KCl (0,57 g/L), NaCl (0,47 g/L), MgSO_4 heptaidratado (0,12 g/L) e CaCl_2 diidratado (0,05 g/L). A solução foi preparada 24 horas antes do início de cada bateria de incubação e mantida em sala climatizada (39°C). Ajustou-se o pH das soluções via borbulhamento com CO_2 , até atingir-se o valor de pH de 6,8. No tratamento com adição de ureia, foram adicionados 5,0 mL de solução padrão de ureia (5,5 g/100 mL) para cada 300 mL de solução tampão, antes do ajuste do pH da solução (Silva e Queiroz, 2002).

Por outro lado, a solução tampão de Kansas (Marten e Barnes, 1980; Silva e Queiroz, 2002) foi composta pela mistura de duas soluções, denominadas A e B. A solução A foi composta por KH_2PO_4 anidro (10,0 g/L), MgSO_4 heptaidratado (0,5 g/L), NaCl (0,5 g/L) e CaCl_2 diidratado (0,1 g/L); enquanto a solução B foi composta por Na_2CO_3 (15,0 g/L) e Na_2S nonaidratado (1,0 g/L); ambas preparadas 24 horas antes do início de cada bateria de incubação e acondicionadas em sala climatizada (39°C). Para o tratamento da solução de Kansas com adição de ureia foram adicionados 0,5 g/L de ureia na solução A (Silva e Queiroz, 2002). O pH do tratamento contendo a solução tampão de Kansas adicionada de ureia foi ajustado pela mistura das soluções A e B na proporção aproximada de 5:1. Contudo, o tratamento sem adição de ureia teve seu pH ajustado pela mistura das soluções (A e B) na proporção aproximada de 7,7:1.

O inóculo ruminal foi obtido de uma novilha fistulada no rúmen. A dieta do animal doador foi composta por cana-de-açúcar e concentrado comercial com 22% de PB, sendo a relação volumoso:concentrado de 80:20 com base na MS. O animal teve acesso irrestrito à

água e mistura mineral (90 g/kg de fósforo) e foi adaptado à dieta padrão por 14 dias anteriormente ao início das coletas (Machado et al., 2016). Os procedimentos de fistulação e manejo do animal doador foram conduzidos com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP, protocolo 061/2016).

A digesta ruminal (líquido e sólido) foi coletada em vários pontos da interface líquido-sólido do ambiente ruminal imediatamente antes do início de cada bateria de incubação. Logo após a retirada, a digesta foi transferida para o interior de garrafas térmicas pré-aquecidas à temperatura de 39°C. Posteriormente, a digesta ruminal foi processada em liquidificador, o qual foi mantido em sala climatizada (39°C), para homogeneizar a fase líquida e sólida da digesta por 30 segundos. Em seguida, o material homogeneizado foi filtrado em quatro camadas de gaze em frascos erlenmeyer de 2 L, também mantidos em sala climatizada. Todo o processo de obtenção, transporte, homogeneização e filtragem do inóculo foram realizados cerca de 20 minutos antes do início das incubações.

Em cada bateria de análise, para cada alimento testado, quatro alíquotas de aproximadamente 500 mg de amostra seca ao ar foram pesadas, as quais foram acondicionadas nos filter bags. Após as amostras serem pesadas, os filter bags foram imediatamente selados a quente.

As replicatas de cada amostra foram inseridas nos jarros da fermentadora, perfazendo o total de quatro jarros. Cada jarro recebeu 25 filter bags contendo as amostras e um filter bag vazio representando o branco.

Em seguida, 400 mL de inóculo ruminal e 1600 mL de solução tampão relativa a cada tratamento (relação 1:4 inóculo e solução tampão) foram adicionados em cada jarro. O espaço livre dos jarros foi imediatamente saturado com CO₂, sendo esses fechados e acondicionados no interior da fermentadora, previamente aquecida a 39°C.

Após 48 horas de incubação, os filter bags foram retirados da fermentadora e imediatamente lavados com água destilada quente (temperatura superior a 90°C), exercendo-se leve pressão manual para retirada dos gases nesses contidos. Após a lavagem, todos os filter bags foram secos (55°C/24 horas seguido de 105°C/16 horas) e pesados, obtendo-se o resíduo aparentemente não digerido da MS.

Para a avaliação da DIVFDN, os filter bags foram acondicionados em coletores universais autoclaváveis (120 mL), sendo adicionados 80 mL de solução de detergente neutro e 250 µL de α-amilase termoestável (Termamyl 2X, Novozymes). Os coletores contendo os filter bags foram autoclavados (105°C/1 hora) segundo método descrito por Detmann et al. (2012; INCT-CA F-002/1). Posteriormente, os mesmos foram lavados com água destilada quente (temperatura superior a 90°C) até a completa remoção do detergente e acetona. Após a lavagem, os filter bags foram secos (55°C/24 horas seguido de 105°C/16 horas) e pesados para obtenção do resíduo não digerido de FDN.

A DIVMS e a DIVFDN (D, g/kg) foram obtidas pela equação:

$$D = \frac{M - (R - B)}{M} \times 1000 \quad (1);$$

em que: M = massa de MS ou FDN incubada (g); R = resíduo não digerido de MS ou FDN (g); B = resíduo de MS ou FDN obtido nos filter bags “branco” (g).

Foram realizadas análises de variância para os valores de DIVMS e DIVFDN separadamente para forragens e concentrados por intermédio do procedimento MIXED do SAS 9.4, conforme o modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + A_i + B_j + T_k + U_l + TU_{kl} + \varepsilon_{ijklm} \quad (2);$$

em que: Y_{ijklm} = valor observado na alíquota m da amostra i, na bateria j, utilizando o tampão k, com adição ou não de ureia l; μ = constante geral; A_i = efeito da amostra i (aleatório); B_j = efeito da bateria de análise j (aleatório); T_k = efeito do tampão k (fixo); U_l = efeito da adição ou não de ureia (fixo); TU_{kl} = efeito da interação do tampão e da adição de ureia (fixo); e ε_{ijklm} = erro aleatório, não observável, pressuposto NID (0; σ^2).

Após a realização da análise de variância, procedeu-se à avaliação do comportamento dos resíduos. Os valores observados que apresentaram distância de verossimilhança restrita superior a 1,0 foram considerados outliers, sendo posteriormente retirados do banco de dados. Após a retirada, nova análise de variância foi realizada.

Posteriormente, um segundo conjunto de análises de variância foi realizado, separadamente para forragens e concentrados, para mensuração da variação específica de cada tratamento, conforme o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + \varepsilon_{ijk} \quad (3);$$

em que: Y_{ijk} = valor observado na alíquota k da amostra i, na bateria j; μ = constante geral; A_i = efeito da amostra i (aleatório); B_j = efeito da bateria de análise j (aleatório); e ε_{ijk} = erro aleatório, não observável, pressuposto NID (0; σ^2).

As estimativas da variância residual ($\hat{\sigma}_\varepsilon^2$) e da variância entre amostras ($\hat{\sigma}_a^2$) foram obtidas pelo método da máxima verossimilhança restrita.

A repetibilidade padronizada em função da média foi calculada como:

$$r = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_\varepsilon^2}}{\bar{Y}} \times 100 \quad (4);$$

em que: r = repetibilidade padronizada em função da média (%); $\hat{\sigma}_\varepsilon^2$ = variância residual; e $\bar{Y}$ = valor médio de digestibilidade.

O desvio-padrão entre amostras foi também padronizado em função da média, o qual indica o poder de discriminação entre amostras em cada tratamento. O mesmo foi calculado como:

$$v = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_a^2}}{\bar{Y}} \times 100 \quad (5);$$

em que: v = desvio-padrão entre amostras padronizada em função da média (%); $\hat{\sigma}_a^2$ = variância entre amostras; e $\bar{Y}$ = valor médio de digestibilidade.

No segundo experimento foram utilizadas duas amostras de alimentos: feno de Tifton 85 e fubá de milho; sendo ambas retiradas do grupo de amostras utilizado no primeiro experimento.

O pH e a concentração de nitrogênio amoniacal (NH_3) foram medidos em sete tempos de incubação (0, 3, 6, 12, 18, 24 e 48 horas). A digestibilidade in vitro foi realizada segundo método proposto por Tilley e Terry (1963), excetuando-se o fato de utilizar frascos vedados e a retirada de gases com auxílio de agulhas ao invés de tubos de ensaio com válvulas de Bunsen. Optou-se em utilizar frascos individuais para tornar possível a retirada parcial (nos tempos de incubação testados) dos frascos contendo as amostras.

Três alíquotas de aproximadamente 250 mg de amostra foram pesadas para cada tratamento em cada tempo de incubação, para os dois grupos de amostra, e acondicionadas em frascos tipo “penicilina” (50 mL), perfazendo o total de 168 frascos.

Posteriormente, 10 mL de inóculo ruminal e 40 mL de solução tampão relativo a cada tratamento foram adicionados, sendo os frascos saturados com CO₂ e vedados com tampas de borracha e lacres de alumínio. Os frascos foram acondicionados em mesa agitadora orbital (40 rpm) em sala climatizada (39°C). O gás produzido nos frascos foi retirado com uma agulha a cada três horas nas primeiras 12 horas e a cada seis horas nas 36 horas restantes.

A cada tempo de incubação, três frascos de cada alimento (feno de Tifton 85 e fubá de milho) para cada tratamento foram retirados da mesa agitadora, totalizando 24 frascos. O conteúdo de cada frasco foi filtrado por camada tripla de gaze em tubos Falcon, sendo o pH aferido com auxílio de potenciômetro digital. Após aferição do pH, 1,0 mL de solução de H₂SO₄ (500 mL/L) foi adicionado em cada tubo e estes foram refrigerados (4°C) para posterior análise da concentração de NH₃ por intermédio de reação colorimétrica catalisada por indofenol (método INCT-CA N-006/1; Detmann et al., 2012).

Foram realizadas análises de variância para os valores de pH e concentração de NH₃ separadamente para forragem e concentrado por intermédio do procedimento MIXED do SAS 9.4, conforme o modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + U_j + TU_{ij} + t_k + tT_{ki} + tU_{kj} + tTU_{kij} + \varepsilon_{ijkl} \quad (6);$$

em que: Y_{ijkl} = valor observado na alíquota l do tampão i, com adição ou não da ureia j, no tempo k; μ = constante geral; T_i = efeito do tampão i (fixo); U_j = efeito da adição ou não de ureia j (fixo); t_k = efeito do tempo k (fixo); TU_{ij} , tT_{ki} , tU_{kj} e tTU_{kij} = interações entre os efeitos principais (fixos); e ε_{ijkl} = erro aleatório, não observável, pressuposto NID (0; σ^2).

Para o caso de interações significativas, os desmembramentos foram realizados por intermédio da opção SLICE do procedimento MIXED do SAS 9.4. Para todos os procedimentos estatísticos utilizou-se $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Não foram observadas variações entre as baterias de análises ($P>0,05$) para nenhuma variável avaliada neste estudo.

Observou-se interação entre solução tampão e uso de ureia para a DIVMS e DIVFDN em amostras de forragens ($P<0,04$; Tab. 2). O desdobramento deste efeito para a DIVMS indicou que, na ausência de ureia, ambos os tampões propiciaram DIVMS similares ($P>0,05$). Contudo, na presença de ureia a DIVMS foi superior ($P<0,05$) para o tampão de McDougall. Isto indicou que a adição de ureia ampliou a DIVMS quando associada ao tampão de McDougall ($P<0,05$), o que não ocorreu com o uso do tampão de Kansas ($P>0,05$). Com relação à DIVFDN das amostras de forragem, o desdobramento da interação indicou que tanto na ausência como na presença de ureia, a digestibilidade foi superior ($P<0,05$) com a utilização do tampão de McDougall. Similarmente à DIVMS, a adição de ureia somente ampliou a DIVFDN ($P<0,05$) com a utilização da solução de McDougall.

Tabela 2. Médias de mínimos quadrados ($\pm$ erro padrão da média) e níveis descritivos de probabilidade em função dos diferentes efeitos avaliados (Valor P) dos valores de digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS, g/kg) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN, g/kg) para amostras de forragens e concentrados

Tratamento	Forragens		Concentrados	
	DIVMS	DIVFDN	DIVMS	DIVFDN
Kansas sem ureia	580,1 $\pm$ 22,11	343,9 $\pm$ 26,84	762,9 $\pm$ 28,83	516,3 $\pm$ 50,76
Kansas com ureia	576,5 $\pm$ 22,11	349,6 $\pm$ 26,84	793,4 $\pm$ 28,84	566,7 $\pm$ 50,71
McDougall sem ureia	586,0 $\pm$ 22,13	395,3 $\pm$ 26,83	834,5 $\pm$ 28,83	692,1 $\pm$ 50,74
McDougall com ureia	627,1 $\pm$ 22,13	430,7 $\pm$ 26,86	845,4 $\pm$ 28,83	723,6 $\pm$ 50,77
Comparações	Valor P			
Tampão (T)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Ureia (U)	<0,001	0,004	0,008	0,003
T $\times$ U	<0,001	0,037	0,109	0,493

Para as amostras de concentrado, não se observou interação de solução tampão e uso de ureia ($P>0,10$; Tab. 2) para a DIVMS e DIVFDN. Para ambas variáveis, maiores valores foram observados para o uso do tampão de McDougall em relação ao tampão de

Kansas ($P<0,01$). Em geral, a adição de ureia ampliou ($P<0,01$) as estimativas de digestibilidade.

De forma geral, as repetibilidades foram melhores com a utilização do tampão de McDougall em relação ao tampão de Kansas (Fig. 1). Por outro lado, com exceção da DIVMS de concentrados, o uso de tampão de McDougall associado à ureia melhorou as repetibilidades.

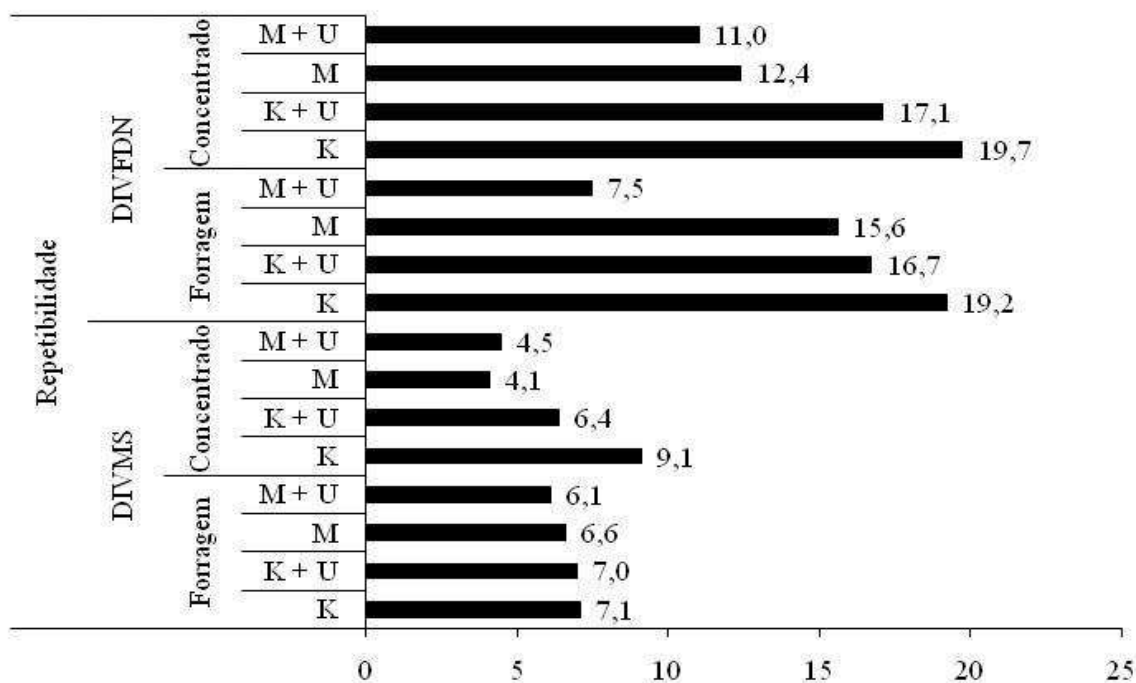


Figura 1. Repetibilidades padronizadas das DIVMS e DIVFDN em função dos tratamentos (K = Kansas, K+U = Kansas com ureia, M = McDougall, M+U = McDougall com ureia) para amostras de forragens e concentrados.

Em geral, não foi verificada influência dos tampões sobre o desvio-padrão entre amostras (Fig. 2), com exceção da DIVFDN de concentrados, na qual o uso do tampão de Kansas ampliou esta característica em relação ao uso do tampão de McDougall. Por outro lado, com exceção da DIVMS de concentrados com a solução da Kansas, a adição de ureia reduziu o desvio-padrão entre amostras com relação à DIVMS e DIVFDN.

A avaliação ao longo do tempo de incubação indicou que todas as combinações entre tampões e adição ou não de ureia propiciaram variação ($P<0,05$) no pH do meio. No

entanto, os valores obtidos com o tampão de Kansas apresentaram valores médios inferiores e queda no pH mais proeminente ao longo do tempo em relação ao uso do tampão de McDougall, o que ampliou a diferença entre tampões nos tempos finais do período de incubação (Fig. 3).

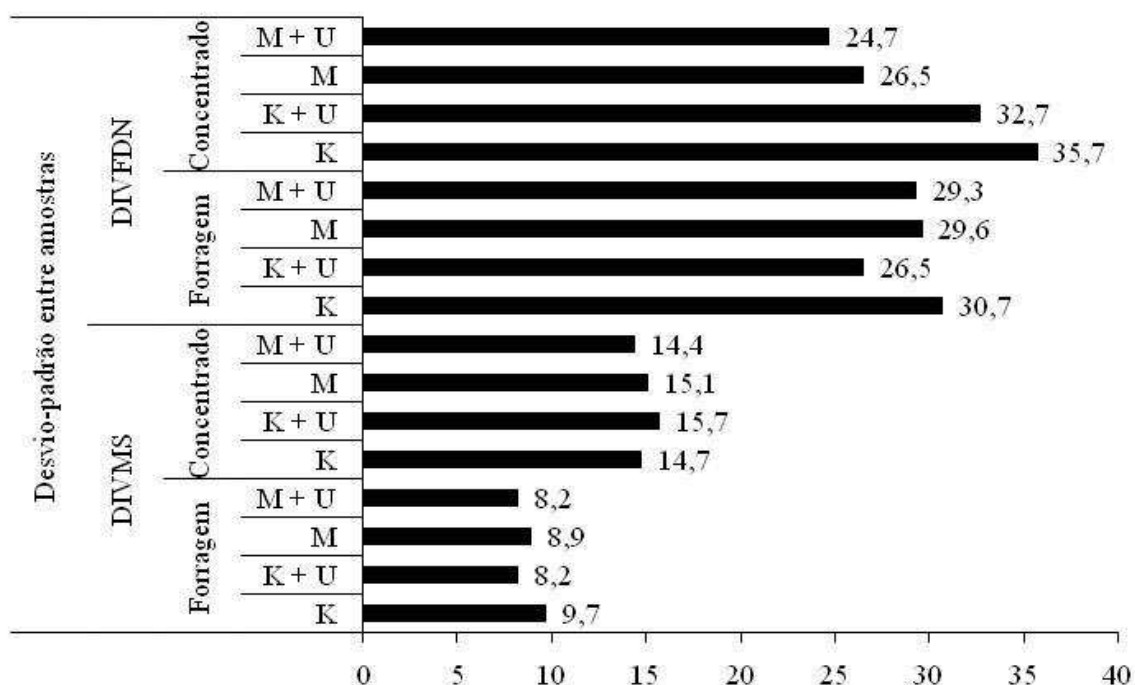
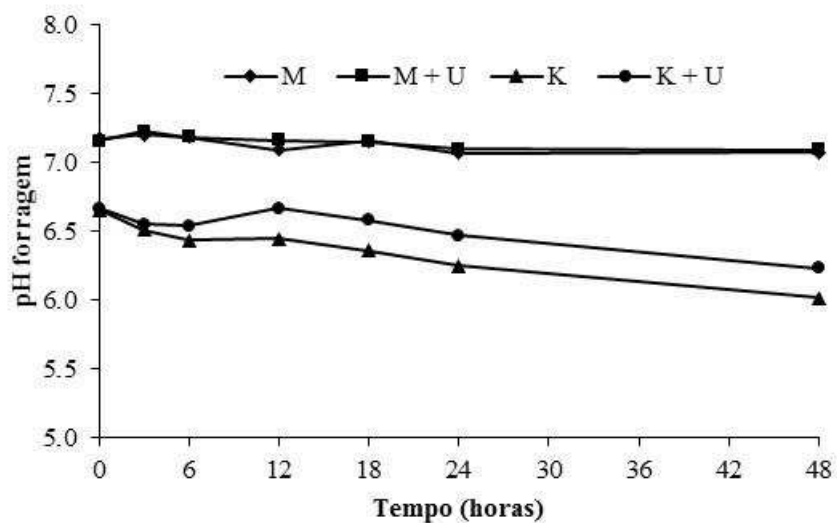


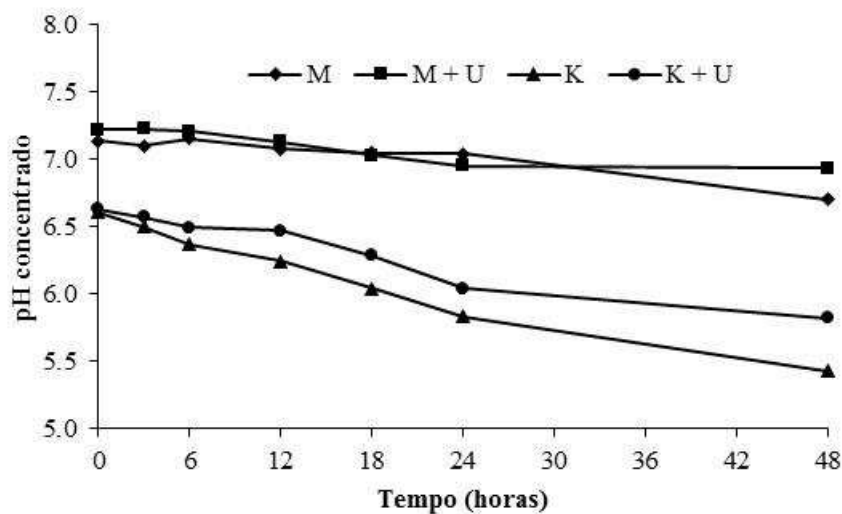
Figura 2. Desvios-padrão padronizados entre amostras das DIVMS e DIVFDN em função dos tratamentos (K = Kansas, K+U = Kansas com ureia, M = McDougall, M+U = McDougall com ureia) para amostras de forragens e concentrados.

Na avaliação da capacidade de tamponamento (pH) e concentração de amônia (NH_3) observou-se interação tripla de tempo, solução tampão e adição de ureia para as amostras de forragem e de concentrado ($P < 0,05$)

O desdobramento parcial da interação tripla em relação à solução tampão e adição de ureia sobre o pH (Tab. 3) indicou que, em média, tanto para forragem como para concentrado, os valores de pH foram inferiores com o uso do tampão de Kansas ($P < 0,01$). Com exceção do uso do tampão de McDougall com a amostra de forragem ($P > 0,21$), a adição de ureia causou elevação do pH do meio ($P < 0,01$).



(a)



(b)

Figura 3. Valores de pH no meio de incubação para amostras de forragem (a) e concentrado (b) em função dos tempos de incubação (K = Kansas, K+U = Kansas com ureia, M = McDougall, M+U = McDougall com ureia).

O desdobramento parcial da interação tripla em relação à solução tampão e adição de ureia sobre a concentração de NH_3 (Tab. 4) indicou que a adição de ureia ampliou as concentrações no meio ($P < 0,02$) para forragem e concentrado. Na ausência de ureia, não se

verificou diferença entre tampões ($P>0,23$). Contudo, observou-se acúmulo proeminente de NH_3 no meio com a adição de ureia sobre o tampão de Kansas.

A avaliação ao longo do tempo de incubação indicou que variações na concentração de NH_3 ocorreram com a adição de ureia ao meio para ambas as amostras ($P<0,01$). No entanto, reiterou-se o acúmulo proeminente de NH_3 no meio quando ureia foi adicionada ao tampão de Kansas (Fig. 4).

Tabela 3. Desdobramento parcial do efeito de interação entre soluções tampão e ureia ($\pm$ erro padrão da média) para o pH na incubação de amostras de forragem e concentrado

Tampão			
Item	Kansas	McDougall	Valor P
Forragem			
Sem ureia	6,38±0,010	7,13±0,010	<0,001
Com ureia	6,53±0,010	7,15±0,010	<0,001
Valor P	<0,001	0,218	
Concentrado			
Sem ureia	6,15±0,016	7,04±0,016	<0,001
Com ureia	6,33±0,016	7,10±0,016	<0,001
Valor P	<0,001	0,007	

DISCUSSÃO

A interação entre solução tampão e uso de ureia sobre a DIVMS e DIVFDN em forragens reforça a interferência das condições do meio de fermentação sobre a digestibilidade dos alimentos (Mould et al., 2005b; Detmann et al., 2008). Entre os fatores que afetam o meio de fermentação e o crescimento microbiano responsável pela degradação dos alimentos, a composição nutricional da dieta/alimento e a disponibilidade de nutrientes contribuem de forma significativa (Mould et al., 2005a). Desta forma, forragens possuem menor concentração de nutrientes de rápida disponibilidade para os microrganismos em comparação aos concentrados, o que parece justificar a observação de diferenças mais proeminentes e da interação entre o tampão e o uso de ureia sobre a digestibilidade de forragens.

A despeito das diferenças nos comportamentos das variáveis estudadas, de forma geral, percebeu-se que o uso da solução de Kansas propiciou menores estimativas de digestibilidade em relação ao tampão de McDougall (Tab. 2), o que sugere o estabelecimento de meio menos propício ao crescimento microbiano. O efeito de interação sobre a DIVFDN de forragens sugere que os efeitos negativos do tampão de Kansas seriam mais proeminentes sobre a ação dos microrganismos fibrolíticos. Interação similar não foi observada sobre concentrados devido à sua menor concentração de compostos fibrosos insolúveis.

Tabela 4. Desdobramento parcial do efeito de interação entre soluções tampão e ureia ($\pm$ erro padrão) para concentração de NH_3 (mg/dL) no meio de incubação para amostras de forragem e concentrado

Forragem e Concentrado			
Item	Tampão		Valor P
	Kansas	McDougall	
Forragem			
Sem ureia	5,44±0,316	4,91±0,316	0,239
Com ureia	28,32±0,316	6,11±0,327	<0,001
Valor P	<0,001	0,011	
Concentrado			
Sem ureia	3,24±0,653	2,88±0,653	0,684
Com ureia	24,51±0,611	5,74±0,611	<0,001
Valor P	<0,001	0,002	

De forma inicial, os efeitos negativos do tampão de Kansas podem ser associados à sua menor capacidade de tamponamento em relação ao tampão de McDougall (Tab. 3). Embora os valores médios de pH tenham se situado acima dos limites para a manutenção da atividade fibrolítica (6,0; Hoover, 1986), o uso da solução tampão de Kansas propiciou quedas acentuadas no pH do meio, produzindo valores próximos ou inferiores a 6,0 nos tempos finais de incubação (Fig. 2), o que pode ser reflexo de sua composição química. Segundo avaliações de Herod et al. (1978), tampões baseados em fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), como a solução tampão de Kansas, possuem menor capacidade de sustentação do pH do meio de incubação em faixas adequadas ao crescimento microbiano quando comparado a tampões baseados em bicarbonato de sódio (NaHCO_3), como a

solução de McDougall, o que corrobora os resultados aqui obtidos. Embora a ureia tenha apresentado efeito auxiliar no tamponamento, ampliando o pH do meio, possivelmente pela formação de bicarbonato de amônia a partir do CO_2 liberado na fermentação, este efeito adicional não foi suficiente para evitar as quedas acentuadas no pH ao longo do tempo de incubação com o uso do tampão de Kansas.

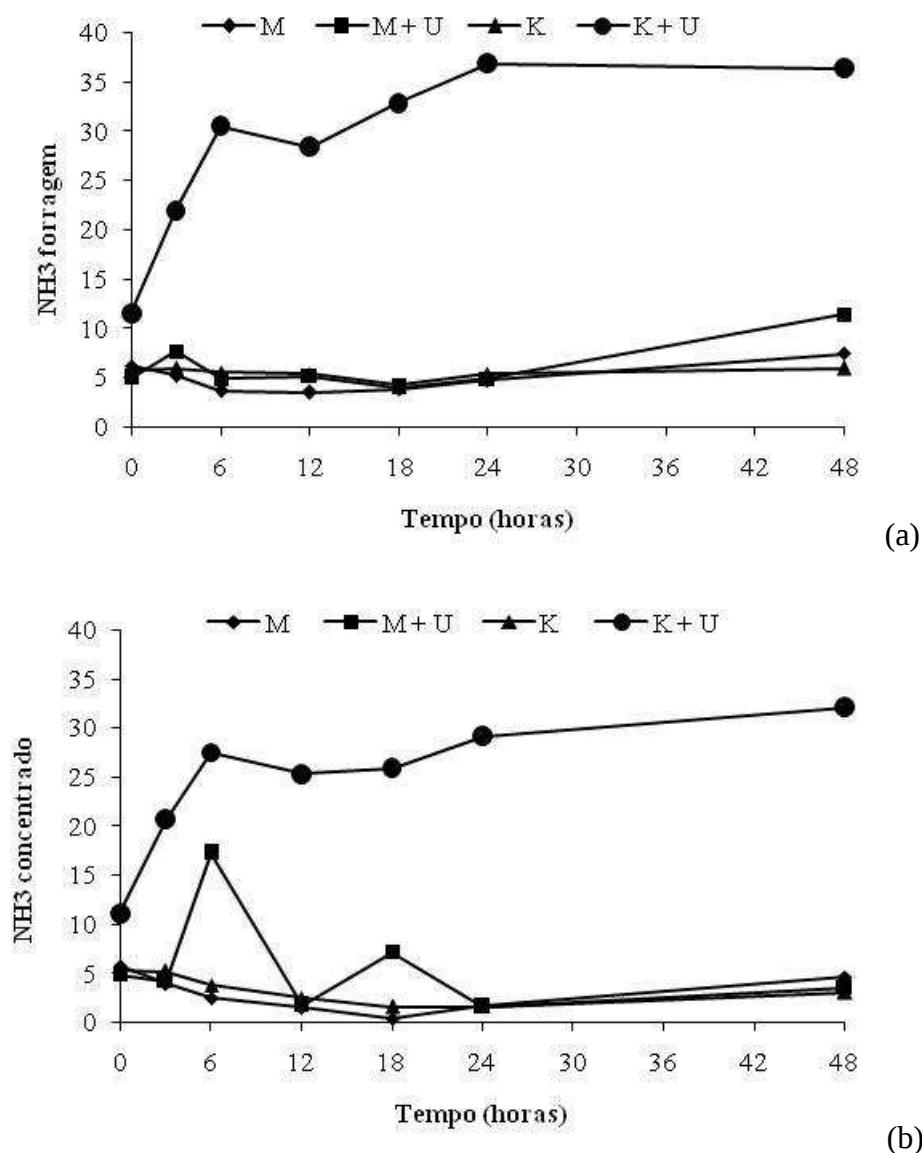


Figura 4. Concentração de nitrogênio amoniacal (NH_3 , mg/dL) no meio de incubação para amostras de forragem (a) e concentrado (b) em função dos tempos de incubação (K = Kansas, K+U = Kansas com ureia, M = McDougall, M+U = McDougall com ureia).

Uma das diferenças básicas na produção dos tampões aqui avaliados consiste do borbulhamento com dióxido de carbono, utilizado no tampão de McDougall, mas não no tampão de Kansas. O uso de borbulhamento com dióxido de carbono é comum na produção de soluções tampão (McDougall, 1948; Pittman e Bryant, 1964; Menke e Steingass, 1988). Nestes casos, o dióxido de carbono atua na adequação do pH da solução (McDougall, 1948; Van Soest e Robertson, 1985) e na retirada do oxigênio dissolvido (Bryant, 1972), o qual poderia elevar o potencial redox do meio (Van Soest, 1994) e comprometer o crescimento microbiano. Pragmaticamente, microrganismos ruminais não poderiam crescer em condições livres de dióxido de carbono, pois este é necessário para reações de carboxilação na síntese de aminoácidos (Van Soest e Robertson, 1985). Logo, a não utilização de dióxido de carbono no preparo da solução de Kansas pode constituir uma limitação inerente a este tampão.

Por outro lado, a presença de sulfeto de sódio, um forte agente redutor, na solução de Kansas poderia constituir um elemento negativo ao crescimento de algumas espécies microbianas anaeróbicas. Algumas razões para isto incluem a formação de alguns intermediários tóxicos (compostos sulfurados) e a precipitação de íons metálicos (Fukushima et al., 2003).

Evidência de menor crescimento microbiano com o uso da solução de Kansas é também observada pelo acúmulo de amônia no meio com a adição de ureia (Fig. 3), o que não ocorreu com a utilização do tampão de McDougall. Por se tratar de sistema fechado, o acúmulo de amônia indica que a hidrólise de ureia ocorreu; contudo, houve limitação na assimilação de nitrogênio pelos microrganismos, reflexo de menor crescimento sobre o substrato. Adicionalmente, a proporção de amônia na forma ionizada seria ampliada pelo pH reduzido observado com o uso da solução de Kansas, sendo esta forma incorporada pelas bactérias mais lentamente em comparação à sua forma não ionizada (Geron et al., 2015).

De forma geral, com exceção da DIVMS com o uso da solução de Kansas, a ureia promoveu aumento da digestibilidade, com efeitos claros sobre a DIVFDN (Tab. 2). Este comportamento reflete diretamente melhor adequação do meio em termos de

disponibilidade de nitrogênio, principalmente pela liberação de amônia (Tab. 4), fonte preferencial de compostos nitrogenados para o crescimento de microrganismos fibrolíticos (Russell, 2002), implicando maior degradação da fração fibrosa e crescimento microbiano (Costa et al., 2009; Detmann et al., 2009).

A adição de compostos nitrogenados ao meio de fermentação *in vitro* tem sido sugerida por diversos autores (e.g., Pittman e Bryant, 1964; Silva e Queiroz, 2002). Contudo, Tilley e Terry (1963) afirmaram que o inóculo ruminal seria suficiente para o fornecimento de compostos nitrogenados para os microrganismos. De forma lógica, entende-se que a dieta do animal doador do inóculo não deverá apresentar deficiências quanto a concentração proteica.

Contudo, questiona-se a adição de ureia (i.e., compostos nitrogenados) durante os procedimentos de incubação *in vitro* devido à possível redução do poder discriminatório entre as amostras avaliadas, principalmente por causar maior favorecimento à utilização microbiana de alimentos de menor qualidade.

Esta suposição foi investigada por intermédio da avaliação das variâncias residual (repetibilidade) e entre amostras (poder discriminatório). De acordo com os resultados expressos na Fig. 1, a ureia causou decréscimo em ambas.

Em primeira instância, a redução causada sobre a variância residual (incremento na repetibilidade) parece constituir efeito positivo da ureia sobre os procedimentos laboratoriais. Isto indica que pequenas variações aleatórias entre repetições que comprometiam de alguma forma a digestão foram amenizadas, tornando as avaliações mais precisas. Contudo, a redução da variação não foi observada somente entre repetições, mas também entre amostras avaliadas. Este aspecto constitui elemento negativo, principalmente quando os sistemas *in vitro* são utilizados visando à diferenciação entre alimentos no tocante à sua qualidade. Este comportamento possivelmente ocorreu pelo fato da ureia favorecer com maior intensidade a digestão de amostras de menor qualidade, aproximando os valores de digestibilidade daqueles observados com amostras de melhor qualidade. Isto indica redução do poder de discriminação entre amostras e atribui aspecto negativo à adição de ureia ao meio. Assim, técnicas *in vitro* aplicadas com o objetivo de se discriminar

alimentos quanto à qualidade deveriam ser conduzidas sem a adição de ureia para que se preserve o poder discriminatório do processo.

CONCLUSÕES

Sistemas de avaliação de digestibilidade in vitro devem se basear na utilização do tampão de McDougall, recomendado por fornecer meios mais propícios ao crescimento microbiano. Nestes casos, a solução tampão de Kansas não é recomendada. A adição de ureia modifica as condições de fermentação do meio, reduzindo o poder discriminatório entre amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRYANT, M.P. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.25, p.1324-1328, 1972.
- COSTA, V.A.C.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Degradação in vitro da fibra em detergente neutro de forragem tropical de alta qualidade em função da suplementação com proteína e/ou carboidratos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, p.1803-1811, 2009.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Avaliação nutricional de alimentos ou dietas? Uma abordagem conceitual. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 6, 2008, Viçosa. Anais... Viçosa: DZO-UFV, 2008. p.21-52.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; MANTOVANI, H.C. et al. Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis-Menten kinetics. *Livestock Science*, v.126, p.136-146, 2009.
- DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Métodos para análise de alimentos. Suprema: Visconde do Rio Branco, 2012. 214p.
- FUKUSHIMA, R.S.; WEIMER, P.J.; KUNTZ, D.A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic clostridium species. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34, p.22-26, 2003.

GERON, L.J.V.; COSTA, F.G.; SANTOS, R.H.E. et al. Balanço de nitrogênio em cordeiros alimentados com rações contendo diferentes teores de concentrado. *Semina Ciências Agrárias*, v.36, p.1609-1622, 2015.

HEROD, E.L.; BECHTLE, R.M.; BARTLEY, E.E. et al. Buffering ability of several compounds in vitro and the effect of a selected buffer combination on ruminal acid production in vivo. *Journal of Dairy Science*, v.61, p.1114-1122, 1978.

HOOVER, W.H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *Journal of Dairy Science*, v.69, p.2755-2766, 1986.

MACHADO, M.G.; DETMANN, E.; MANTOVANI, H.C. et al. Evaluation of the length of adaptation period for changeover and crossover nutritional experiments with cattle fed tropical forage-based diets. *Animal Feed Science and Technology*, v.222, p.133-148, 2016.

MARTEN, G.C.; BARNES, R.F. Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzyme systems. In: PIGDEN, W.J.; BALCH, C.C.; GRAHAM, M. (Eds.) *Standardization of analytical methodology for feeds*. Ottawa, IDRC, 1980. p.61-71.

McDOUGALL, E.I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal*, v.43, p.99-109, 1948.

MENKE, K.H.; STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, v.28, p.7-55, 1988.

MOULD, F.L.; MORGAN, R.; KLIEM, K.E. et al. A review and simplification of the in vitro incubation medium. *Animal Feed Science and Technology*, v.123-124, p.155-172, 2005a.

MOULD, F.L.; KLIEM, K.E.; MORGAN, R. et al. In vitro microbial inoculums: a review of its function and properties. *Animal Feed Science and Technology*, v.123-124, p.31-50, 2005b.

PITTMAN, K.A.; BRYANT, M.P. Peptides and other nitrogen sources for growth of *Bacteroides ruminicola*. *Journal of Bacteriology*, v.88, p.401-410, 1964.

RUSSELL, J.B. *Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition*. Ithaca: James B. Russell, 2002. 119p.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos. 3 ed. Viçosa: Editora UFV, 2002. 235p.

SILVA, T.E.; DETMANN, E.; CAMACHO, L.F. et al. Comparação de métodos in vitro para a quantificação da digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro de forragens e concentrados. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2017. (no prelo).

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. Journal of the British Grassland Society, v.18, p.104-111, 1963.

VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. 2^a ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B. Analysis of forages and fibrous foods. Ithaca: Cornell University, 1985. 202p.

CAPÍTULO 2

Efeitos associativos entre alimentos sobre a digestibilidade in vitro da matéria seca e da fibra em detergente neutro obtida por intermédio de fermentadora artificial

[Associative effects among feeds and their effects on the in vitro digestibility of dry matter and neutral detergent fiber using artificial fermenter]

RESUMO - Objetivou-se estudar os efeitos associativos entre forragens e entre forragem e concentrados sobre a digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN). O estudo foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, foram avaliados os efeitos associativos entre cana-de-açúcar, silagem de milho e feno de Tifton 85 em duas condições de incubação (isolada ou em conjunto). Na segunda etapa, foram avaliados os efeitos associativos da cana-de-açúcar incubada em conjunto com farelo de soja e/ou milho sobre as estimativas de digestibilidade da cana-de-açúcar. As digestibilidades in vitro foram avaliadas por intermédio de fermentadora artificial TE-150 e filter bags de tecido não-tecido, com uso da solução tampão de McDougall. Na primeira etapa, observou-se efeito associativo ($P < 0,05$) entre forragem e condição de incubação (isolada ou em conjunto), com valores de DIVMS e DIVFDN superiores para cana-de-açúcar e inferiores para silagem de milho quando as amostras foram incubadas em conjunto. Não foi observado efeito associativo evidente ($P > 0,57$) sobre as estimativas de digestibilidade para as amostras de feno de Tifton 85 nas diferentes condições de incubação. Na segunda etapa, observou-se efeito associativo ($P < 0,05$) entre forragem e condição de incubação, com redução das estimativas de digestibilidade quando a cana-de-açúcar foi incubada com milho. Nas condições de incubação da cana-de-açúcar com farelo de soja ou farelo de soja e milho, não foram observadas variações ($P > 0,05$) na DIVMS e DIVFDN. Conclui-se que a incubação de alimentos de forma conjunta, utilizando-se fermentadoras artificiais, implica na ocorrência de efeitos associativos, podendo alterar as estimativas de digestibilidade in vitro dos alimentos.

Palavras-chave: análise de alimentos, digestão ruminal, sistemas in vitro

ABSTRACT - The aim of this study was to verify the associative effects among forages and between forage and concentrates on the in vitro digestibility of dry matter (DMI_{VD}) and neutral detergent fiber (NDFI_{VD}). The study was divided into two steps. In the first step, associative effects among sugarcane, corn silage and Tifton 85 hay under two incubation conditions (isolated or together) were evaluated. In the second step, associative effects between sugarcane and soybean meal and, or ground corn were evaluated. These evaluations were performed using an artificial fermenter TE-150, non-woven textile filter bags, and McDougall buffer solution. In the first step, associative effect between sugarcane and corn silage was observed ($P < 0.05$) on both DMI_{VD} and NDFI_{VD}, where digestibilities of sugarcane and corn silage were increased and decreased, respectively, when incubated together. The samples of Tifton 85 hay did not present differences ($P > 0.57$) on DMI_{VD} and NDFI_{VD} when evaluated isolated or together with the other forages. In the second step, associative effects between forage and concentrates were detected ($P < 0.05$). Sugarcane digestibility was depressed ($P < 0.05$) by incubation with ground corn, but it was not affected when incubated with soybean meal or soybean meal and ground corn. Therefore, it is concluded that there are associative effects feeds when in vitro digestibility is evaluated using artificial fermenters.

Keywords: feed analysis, in vitro systems, ruminal digestion

INTRODUÇÃO

O método para obtenção da digestibilidade in vitro dos alimentos sugerido por Tilley e Terry (1963) está baseado na incubação de amostras de forragens em tubos contendo inóculo ruminal e solução tampão. Entretanto, o uso de fermentadoras artificiais tem ganhado espaço na análise de alimentos por ser simples, rápido, de baixo custo e com alta capacidade operacional (Adesogan, 2002).

A vantagem da alta capacidade operacional com o uso de fermentadoras baseia-se na possibilidade de avaliação de diversas amostras simultaneamente (Lopes et al., 2010). Contudo, a avaliação conjunta de alimentos com características químicas distintas poderia

provocar a ocorrência de efeito associativo entre alimentos incubados no mesmo jarro de fermentação, influenciando na população microbiana e, conseqüentemente, alterando as estimativas da digestibilidade dos alimentos (Wilman e Adesogan, 2000; Adesogan, 2005; Mould et al., 2005).

As estimativas de digestibilidade *in vitro* podem ser enquadradas em dois principais objetivos: predição da digestibilidade *in vivo* e avaliação comparativa entre alimentos (Silva et al., 2017). Neste sentido, a ocorrência de efeitos associativos entre alimentos incubados em conjunto poderia afetar ambos os objetivos, por viesar as estimativas de digestibilidade e alterar o ranqueamento de alimentos quanto às características de digestibilidade. Contudo, estudos conduzidos para avaliação da ocorrência de efeitos associativos entre alimentos em sistemas *in vitro* são escassos em condições tropicais.

Portanto, objetivou-se estudar a ocorrência de efeitos associativos entre forragens e entre forragem e concentrados sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) utilizando-se fermentadora artificial.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

O presente estudo foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, avaliou-se a ocorrência de efeito associativo entre forragens com diferentes características. Na segunda etapa avaliou-se a ocorrência de efeito associativo entre forragem e concentrados proteicos e/ou energéticos.

Para realização da primeira etapa, três amostras de forragens foram utilizadas: cana-de-açúcar, silagem de milho e feno de Tifton 85. Na segunda etapa, amostras de cana-de-açúcar, farelo de soja e fubá de milho foram utilizadas.

As amostras de cana-de-açúcar e silagem de milho foram secas em estufa com ventilação forçada (55°C). Posteriormente, todas as amostras foram processadas em moinho de facas com peneira de porosidade de 1 mm e, em sequência, analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS; método INCT-CA G-003/1), proteína bruta (PB; método

INCT-CA N-001/1) e fibra insolúvel em detergente neutro (FDN; método INCT-CA F-002/1), conforme métodos preconizados por Detmann et al. (2012).

Tabela 1. Estatísticas descritivas para os teores de proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN) dos alimentos utilizados nos ensaios de digestibilidade in vitro

Alimentos	PB	FDN
	g/kg de matéria seca	
Cana-de-açúcar	30,2	585,9
Silagem de milho	79,3	561,7
Feno de Tifton 85	75,9	797,4
Farelo de soja	514,6	232,5
Fubá de milho	84,0	197,7

Na primeira etapa avaliou-se a DIVMS e a DIVFDN das forragens incubadas de forma isolada ou em conjunto. Na segunda etapa, avaliou-se a DIVMS e a DIVFDN de amostra de cana-de-açúcar incubada de forma isolada ou em conjunto com farelo de soja e/ou fubá de milho.

O período experimental teve duração de oito dias, em que cada etapa de incubação foi conduzida durante quatro dias consecutivos, ou seja, duas baterias de 48 horas para cada etapa. Cada bateria de incubação continha quatro jarros de fermentação, e cada jarro recebeu 30 filter bags contendo 500 mg de amostra seca ao ar, distribuídos igualmente pelo número de alimentos contidos em cada jarro, e dois filter bags vazios representando o branco.

As condições de incubação foram distribuídas da seguinte forma: um jarro de fermentação para cada forragem avaliada e outro contendo as três forragens, totalizando quatro jarros na primeira etapa. Para a segunda etapa também foram distribuídos quatro jarros de fermentação: um contendo apenas cana-de-açúcar; outro com cana-de-açúcar e farelo de soja; outro com cana-de-açúcar e milho; e outro contendo cana-de-açúcar, farelo de soja e milho, simultaneamente.

A solução tampão utilizada foi a de McDougall (1948) sem adição de ureia para evitar o favorecimento à utilização microbiana de alimentos de menor qualidade. Esta solução foi preparada 24 horas antes do início de cada bateria de incubação e acondicionada

em sala climatizada (39°C). O ajuste do pH da solução tampão foi realizado via borbulhamento de CO₂ até atingir-se o valor de pH de 6,8.

O inóculo ruminal foi obtido de uma novilha fistulada no rúmen. A dieta do animal doador foi composta por cana-de-açúcar e concentrado comercial com 22% de PB, sendo a relação de volumoso:concentrado de 80:20 com base na MS. O animal teve acesso irrestrito à água e mistura mineral (90 g/kg de fósforo) e foi adaptado à dieta padrão por 14 dias antes do início das coletas (Machado et al., 2016). Os procedimentos de fistulação e manejo do animal doador foram conduzidos com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP, protocolo 061/2016).

A digesta ruminal (líquido e sólido) foi coletada em vários pontos da interface líquido-sólido do ambiente ruminal imediatamente antes do início de cada bateria de incubação. Logo após a coleta, a digesta foi transferida para o interior de garrafas térmicas pré-aquecidas à temperatura de 39°C. Posteriormente, a digesta ruminal foi acondicionada em liquidificador, o qual foi mantido em sala climatizada (39°C), para homogeneizar as fases líquida e sólida por 30 segundos. Em seguida, o material foi filtrado em quatro camadas de gaze em frascos erlenmeyer de 2 L, também mantidos em sala climatizada. Todo processo de obtenção, transporte, homogeneização e filtragem do inóculo foi realizado cerca de 20 minutos antes do início das incubações.

Os ensaios de digestibilidade in vitro foram realizados por intermédio de fermentadora artificial TE-150 (Tecnal Equipamentos Científicos, Piracicaba, SP, Brasil) e filter bags confeccionados com tecido não-tecido (100 g/m²) nas dimensões de 4 × 4,5 cm, selados a quente, lavados e pesados para quantificação da tara, conforme descrito por Detmann et al. (2012).

Após o acondicionamento dos filter bags nos jarros de fermentação, foram adicionados 400 mL de inóculo ruminal e 1600 mL de solução tampão (relação 1:4 inóculo e solução tampão). O espaço livre dos jarros foi saturado com CO₂, sendo, os jarros fechados e acondicionados no interior da fermentadora artificial previamente aquecida a 39°C.

Os filter bags foram mantidos por 48 horas na fermentadora artificial. Após esse período, foram retirados e imediatamente lavados com água destilada quente (temperatura

superior a 90°C), exercendo-se leve pressão manual para retirada dos gases nesses contidos. Em seguida, os filter bags foram secos (55°C/24 horas seguido de 105°C/16 horas) e pesados, obtendo-se o resíduo aparentemente não digerido da MS.

Para avaliação da DIVFDN, os filter bags foram acondicionados em coletores universais autoclaváveis (120 mL), sendo adicionados 80 mL de solução de detergente neutro e 500 µL de α-amilase termoestável (Termamyl 2X, Novozymes). Os coletores contendo os filter bags foram autoclavados (105°C/1 hora) segundo método descrito por Detmann et al. (2012; INCT-CA F002/1). Posteriormente, os mesmos foram lavados com água destilada quente (temperatura superior a 90°C) até a completa remoção do detergente, e acetona. Após a lavagem, os filter bags foram secos (55°C/24 horas seguido de 105°C/16 horas) e pesados para obtenção do resíduo não digerido da FDN.

A DIVMS e a DIVFDN (D, g/kg) foram obtidas pela equação:

$$D = \frac{M - (R - B)}{M} \times 1000 \quad (1);$$

em que: M = massa de MS ou FDN incubada (g); R = resíduo não digerido de MS ou FDN (g); B = resíduo de MS ou FDN obtido nos filter bags “branco” (g).

Avaliações dos valores de pH e concentração de nitrogênio amoniacal (NH₃) da mistura inóculo ruminal e solução tampão foram realizadas no início e ao final do período de incubação em cada jarro dentro de cada bateria. As alíquotas foram filtradas em camada tripla de gaze e acondicionadas em tubos Falcon. Em seguida, os valores de pH foram aferidos com auxílio de potenciômetro digital. Adicionou-se 1 mL de solução de H₂SO₄ (500 mL/L) em cada tubo, sendo estes refrigerados (4°C) para posterior análise de NH₃ por intermédio de reação colorimétrica catalisada por indofenol, conforme sugerido por Detmann et al. (2012; método INCT-CA N-006/1).

Para a etapa de avaliação da ocorrência de efeitos associativos entre forragens, os valores de DIVMS e DIVFDN foram interpretados por intermédio de análise de variância utilizando-se o procedimento MIXED do SAS 9.4, conforme o modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + F_i + C_j + FC_{ij} + B_k + \varepsilon_{ijkl} \quad (2);$$

em que: Y_{ijkl} = valor observado na alíquota l da forragem i , na condição de incubação j , na bateria k ; μ = constante geral; F_i = efeito da forragem i (fixo); C_j = efeito da condição de incubação j (isolada ou em conjunto; fixo); FC_{ij} = efeito de interação de forragem e condição de incubação (fixo); B_k = efeito da bateria de análise k (aleatório); e ε_{ijkl} = erro aleatório, não observável, pressuposto NID ($0; \sigma^2$).

Para o caso da etapa de avaliação da ocorrência de efeitos associativos entre forragem e concentrados, os valores da DIVMS e da DIVFDN da forragem foram avaliados por análise de variância segundo o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + B_k + \varepsilon_{ijk} \quad (3);$$

em que: Y_{ijk} = valor observado na alíquota k , na condição de incubação i , na bateria j ; μ = constante geral; C_i = efeito da condição de incubação i (isolada, com milho, com farelo de soja ou com milho e farelo de soja; fixo); B_j = efeito da bateria de análise j (aleatório); e ε_{ijk} = erro aleatório, não observável, pressuposto NID ($0; \sigma^2$).

Após a realização das análises de variância, procedeu-se à avaliação do comportamento dos resíduos. Os valores observados que apresentaram distância de verossimilhança restrita superior a 1,0 foram considerados outliers, sendo posteriormente retirados do banco de dados. Logo em seguida, novas análises de variância foram realizadas.

Para o caso da ocorrência de interações significativas no modelo (2), os desdobramentos foram realizados por intermédio da opção SLICE do procedimento MIXED. Para o caso de ocorrência de efeitos significativos de condições de incubação no modelo (3), as comparações entre condições foram realizadas por intermédio do teste de Bonferroni. Adotou-se $\alpha = 0,05$.

Após a realização das análises de variância dos modelos completos (Equações 2 e 3), um segundo conjunto de análises de variância foi realizado, em separado para cada etapa de avaliação e condição de incubação, para mensuração da variação residual específica de cada alimento/condição de incubação, conforme o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + B_i + \varepsilon_{ij} \quad (4);$$

em que: Y_{ij} = valor observado na alíquota j , na bateria i ; μ = constante geral; B_i = efeito da bateria de análise i (aleatório); ε_{ij} = erro aleatório, não observável, pressuposto NID (0; σ^2).

As estimativas de variância residual ($\hat{\sigma}_\varepsilon^2$) foram obtidas pelo método da máxima verossimilhança restrita.

A repetibilidade padronizada em função da média foi calculada como:

$$r = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_\varepsilon^2}}{\bar{Y}} \times 100 \quad (5);$$

em que: r = repetibilidade padronizada em função da média (%); $\hat{\sigma}_\varepsilon^2$ = variância residual; e $\bar{Y}$ = valor médio de digestibilidade.

Os valores iniciais e finais de pH e concentração de NH_3 foram expressos descritivamente.

RESULTADOS

Não foram observadas variações entre as baterias de análises ($P > 0,05$) para nenhuma variável avaliada neste estudo.

Na avaliação da ocorrência do efeito associativo entre forragens, observou-se interação entre forragem e condição de incubação ($P < 0,05$) para DIVMS e DIVFDN (Tab. 2). O estudo deste efeito permitiu evidenciar que os valores de DIVMS e DIVFDN da cana-de-açúcar apresentaram-se superiores ($P < 0,02$) quando as amostras foram incubadas em conjunto com as demais forragens, ao passo que para a silagem de milho foi verificada redução da digestibilidade ($P < 0,01$) quando esta foi incubada em conjunto com as demais forragens. A digestibilidade do feno de Tifton 85 não foi afetada ($P > 0,57$) pelas condições de incubação.

Na avaliação da ocorrência de efeito associativo entre forragem e concentrados verificou-se que tanto a DIVMS como a DIVFDN da cana-de-açúcar não foram alteradas ($P > 0,05$) com a incubação conjunta com farelo de soja ou com farelo de soja e milho simultaneamente (Tab.3). Contudo, a incubação com milho reduziu ($P < 0,05$) as estimativas de digestibilidade da forragem.

Em geral, na avaliação da ocorrência do efeito associativo entre forragens, as repetibilidades da DIVMS e DIVFDN foram melhoradas quando a cana-de-açúcar e silagem de milho foram avaliadas em conjunto (Fig. 1). Contudo, os valores de digestibilidade do feno de Tifton 85 apresentaram melhor repetibilidade quando avaliados de forma isolada (Fig. 1)

Tabela 2. Médias de mínimos quadrados ($\pm$ erro padrão da média) e níveis descritivos de probabilidade dos valores de digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS, g/kg) e fibra em detergente neutro (DIVFDN, g/kg) para as amostras de forragens em função da condição de incubação

Condição de incubação			
Forragens	Condição de incubação ¹		Valor P
	Isolado	Conjunto	
DIVMS			
Cana-de-açúcar	574,1±20,20	599,8±21,29	0,007
Silagem de milho	665,5±20,21	624,7±21,29	<0,001
Feno de Tifton 85	551,8±20,25	556,8±21,29	0,599
DIVFDN			
Cana-de-açúcar	347,1±21,37	376,7±23,09	0,019
Silagem de milho	502,6±21,34	441,8±23,09	<0,001
Feno de Tifton 85	508,2±21,42	501,2±23,09	0,577

¹ Isolado: forragens incubadas separadamente; Conjunto: forragens incubadas em conjunto.

Na avaliação da ocorrência de efeito associativo entre forragem e concentrados, as repetibilidades para as estimativas da DIVMS da forragem apresentaram-se semelhantes (Fig. 2). Contudo, houve influência sobre as repetibilidades para a DIVFDN, observando-se melhoria desta característica quando a cana-de-açúcar foi avaliada em conjunto com o farelo de soja e maior variação aleatória (menor repetibilidade) quando avaliada em conjunto com milho, associado ou não ao farelo de soja (Fig. 2).

Os valores de pH inicial e final na avaliação do efeito associativo entre forragens apresentaram-se semelhantes (Tab. 4). Em termos de concentrações finais de NH₃ verificou-se que o valor médio obtido com a incubação conjunta foi inferior a todos os valores obtidos com incubações das forragens isoladamente.

Na avaliação da ocorrência de efeito associativo entre forragem e concentrados, verificou-se pH final mais elevado com a incubação da cana-de-açúcar em conjunto com farelo de soja (Tab. 4). Para as concentrações finais de NH₃, foram observados maiores

valores finais com a adição de farelo de soja ao ambiente de incubação. A alta concentração final de NH_3 verificada com a incubação da cana-de-açúcar com farelo de soja parece constituir a possível causa do maior pH final observado para esta condição de incubação (Tab. 4).

Tabela 3. Médias de mínimos quadrados ($\pm$ erro padrão da média) e níveis descritivos de probabilidade dos valores de digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) e fibra em detergente neutro (DIVFDN) para a amostra de cana-de-açúcar incubada de forma isolada ou em conjunto com concentrados

Condição de incubação	DIVMS ¹	DIVFDN ¹
Cana + Farelo de soja + Milho	659,8 $\pm$ 21,63 ^a	422,2 $\pm$ 31,49 ^a
Cana + Farelo de soja	651,4 $\pm$ 21,23 ^a	418,1 $\pm$ 31,01 ^a
Cana + Milho	614,8 $\pm$ 21,23 ^b	370,3 $\pm$ 31,07 ^b
Cana-de-açúcar	641,4 $\pm$ 20,99 ^a	407,0 $\pm$ 30,62 ^a

¹ Médias na coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Efeitos associativos ocorrem quando a digestibilidade aparente de uma mistura de alimentos mostra-se diferente da soma ponderada das digestibilidades dos alimentos avaliados individualmente (Huhtanen, 1991). Neste sentido, entende-se que as avaliações conduzidas neste trabalho evidenciam a ocorrência de efeitos associativos entre forragens e entre forragem e concentrados sobre a digestibilidade da MS e da FDN.

Em consonância com os resultados aqui obtidos, diversos pesquisadores têm apontado diferenças em características de digestibilidade de alimentos incubados em separado e em conjunto em sistemas in vitro, tanto com alimentos produzidos em condições temperadas (Moss et al., 1992; Wilman e Adesogan, 2000) como em condições tropicais (Lopes et al., 2010; Ramin et al., 2016).

Segundo Detmann et al. (2008), a digestibilidade ruminal efetiva de um alimento é resultante de seu potencial de digestão (característica intrínseca ao próprio alimento) e do meio (ambiente ruminal). Por meio entende-se todos os fatores que afetam a atividade dos sistemas enzimáticos microbianos. Embora parte do meio seja definida pelo animal, parte é influenciada pelo próprio alimento, pois este é fornecedor de substratos para o crescimento microbiano. No caso de misturas de alimentos, grande parte das condições de meio será

determinada pela interação mútua entre os componentes dos diferentes alimentos (Detmann et al., 2008). Para o caso de sistemas in vitro fechados com um único animal doador, como utilizado neste estudo, as características de meio entre as diferentes condições de incubação seriam em quase totalidade afetadas pelos alimentos em si.

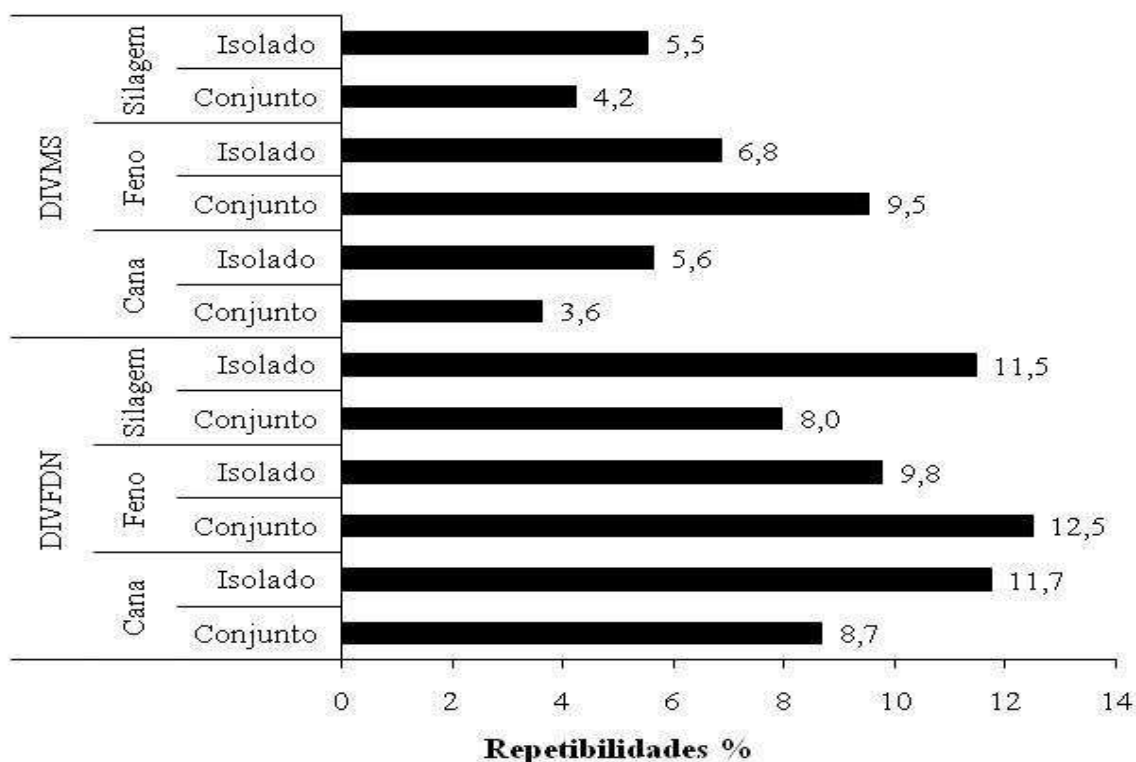


Figura 1. Repetibilidades padronizadas das DIVMS e DIVFDN em função das condições de incubação na avaliação do efeito de interação entre forragens (Isolado: forragens incubadas separadamente; Conjunto: forragens avaliadas em conjunto).

As causas para ocorrência do efeito associativo entre alimentos são plurais, podendo se manifestar de forma positiva ou negativa (Huhtanen, 1991). Evidência de efeito interativo positivo foi verificada sobre a DIVMS e a DIVFDN da cana-de-açúcar, as quais foram elevadas pela incubação em conjunto com as demais forragens. A cana-de-açúcar constitui forragem com baixo teor de compostos nitrogenados. Assim, sob restrição de substratos nitrogenados para o crescimento microbiano, ocorrem limitações quanto à degradação microbiana da fibra (Detmann et al., 2009) e consequente redução da

digestibilidade. Ao ser incubada em conjunto com forragens de maior concentração proteica, propiciou-se maior disponibilidade de nitrogênio para o crescimento microbiano, com consequente ampliação da DIVMS e da DIVFDN da cana-de-açúcar.

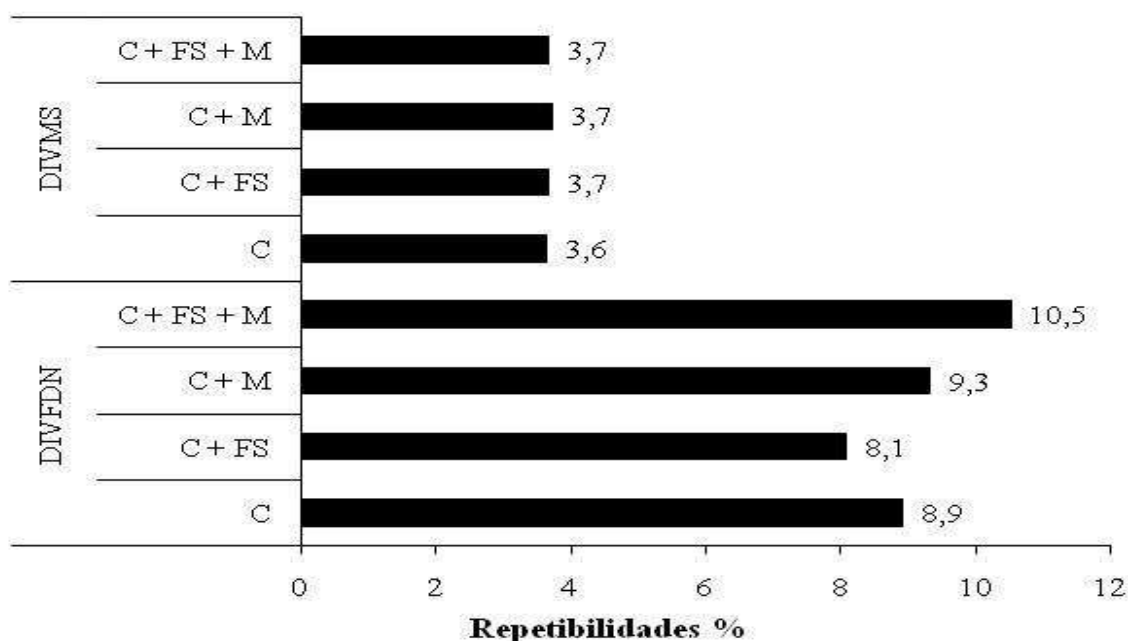


Figura 2. Repetibilidades padronizadas das DIVMS e DIVFDN em função das condições de incubação na avaliação do efeito de interação entre forragem e concentrados (C + FS + M: cana-de-açúcar, farelo de soja e milho; C + M: cana-de-açúcar e milho; C + FS: cana-de-açúcar e farelo de soja; C: cana-de-açúcar).

Por outro lado, os resultados aqui obtidos indicam que os efeitos associativos podem se manifestar de forma positiva e negativa simultaneamente. Apesar da melhoria da digestibilidade da cana-de-açúcar, a incubação em conjunto reduziu a DIVMS e a DIVFDN da silagem de milho. Neste caso específico, a incubação conjunta ampliou a diversidade de fontes de carboidratos no meio. Nestas condições, algumas espécies microbianas podem alterar a fonte prioritária de carboidrato para crescimento (Russell e Baldwin, 1978), reduzindo a degradação de algumas fontes de carboidratos que antes seriam consideradas como fonte primária para crescimento. Por outro lado, a adição de carboidratos de rápida fermentação pode favorecer o crescimento de determinados grupos microbianos com maior capacidade competitiva por substratos no meio (Carvalho et al., 2011). Indicativo de maior

competição com a incubação conjunta das forragens foi verificada pela menor concentração final de NH_3 nestas condições. Ambas as afirmações podem estar relacionadas ao alto teor de sacarose na cana-de-açúcar, o que parece ter afetado negativamente a utilização microbiana da silagem de milho. Segundo Huhtanen (1991), a depressão da digestibilidade da fibra tende a ser maior em forragens de melhor qualidade.

Tabela 4. Valores médios iniciais e finais para pH e concentração de NH_3 para as diferentes condições de incubação

Condição de incubação	pH inicial	pH final	NH_3 inicial (mg/dL)	NH_3 final (mg/dL)
Forragens				
Cana-de-açúcar	7,01	6,76	0,47	5,73
Silagem de milho	6,99	6,77	0,62	6,27
Feno de Tifton	7,00	6,72	0,29	4,03
Cana + Silagem + Feno	6,99	6,70	0,66	3,72
Forragem + Concentrados				
Cana-de-açúcar	6,90	6,63	2,17	3,69
Cana + Farelo de soja	6,92	6,86	2,04	13,59
Cana + Milho	6,93	6,61	2,54	4,05
Cana + Farelo de soja + Milho	6,91	6,69	1,90	8,12

Adicionalmente, forragens que sofreram efeito associativo evidente (silagem de milho e cana-de-açúcar) passaram a apresentar menor variabilidade entre repetições, indicando, a despeito da alteração na digestibilidade, maior homogeneidade na ação microbiana sobre as amostras com a incubação conjunta. No entanto, embora a digestibilidade do feno de Tifton 85 não tenha apresentado efeitos interativos evidentes, verificou-se redução na repetibilidade, ou seja, maior variabilidade entre replicatas no tocante à ação microbiana quando incubada em conjunto. Isto indica que o efeito associativo parece afetar de forma diferenciada os alimentos, podendo causar efeitos de natureza diversa, incluindo a perda de precisão em alguns casos. De forma lógica, entende-se que, sendo o meio de incubação determinado pelas características dos alimentos avaliados (Detmann et al., 2008), o efeito interativo poderá se manifestar de forma diferente dependendo da combinação de alimentos.

Deve ser ressaltado que o efeito associativo aqui avaliado é característico de fermentadoras artificiais, cuja incubação de amostras ocorre em ambiente coletivo. Assim, tais efeitos não seriam característicos do método proposto por Tilley e Terry (1963), no qual as amostras são incubadas em frascos individuais. Segundo Wilman e Adesogan (2000), este efeito seria atribuído ao escape de material solúvel das amostras, o que influenciaria a população microbiana no meio coletivo de incubação.

Efeitos associativos negativos foram também verificados com a incubação conjunta de cana-de-açúcar e milho. A inibição da digestão da cana-de-açúcar pela presença do milho caracteriza a ocorrência do “efeito carboidrato”, o qual é caracterizado pela redução da atividade fibrolítica com a adição de carboidratos não fibrosos de rápida fermentação, principalmente amido. Sua causa parece envolver a competição por nutrientes essenciais entre grupos de espécies microbianas, resultando em maior proliferação dos microrganismos que degradam amido (Mould et al., 1983; Costa et al., 2009; Carvalho et al., 2011). A redução ou minimização do efeito carboidrato é conseguida com o fornecimento de compostos nitrogenados em quantidade e com perfil adequado ao processo fermentativo ruminal (Costa et al., 2009), o que justifica a não observação de redução na digestibilidade da cana-de-açúcar quando farelo de soja foi adicionado ao meio, mesmo com a presença de milho.

As estimativas de digestibilidade *in vitro* podem ser enquadradas em dois principais objetivos: predição da digestibilidade *in vivo* e avaliação comparativa entre alimentos (Silva et al., 2017). Para o caso da predição de digestibilidade, a ocorrência dos efeitos associativos observada neste estudo alerta que estimativas mais verossímeis *in vitro* com o uso de fermentadoras artificiais poderiam ser obtidas com a incubação conjunta de todos os alimentos componentes da dieta em proporções similares ao que seria utilizado *in vivo*. Neste sentido, estudos envolvendo avaliações simultâneas *in vivo* e *in vitro* são sugeridos.

Por outro lado, a influência mútua entre as forragens aqui avaliadas indica que o processo de discriminação entre amostras no tocante à digestibilidade pode ser comprometido com a incubação em conjunto. Contudo, mais estudos, com maior número de alimentos, são sugeridos para melhor compreensão deste efeito.

CONCLUSÕES

A incubação de diferentes alimentos de forma conjunta com o uso de fermentadoras artificiais implica na ocorrência de efeitos associativos, o que pode alterar as estimativas de digestibilidade da matéria seca e dos compostos fibrosos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADESOGAN, A.T. What are feeds worth? A critical evaluation of selected nutritive values methods. In: ANNUAL FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 13, 2002, Gainesville. *Proceedings...* Gainesville: University of Florida, 2002. p.33-47.
- ADESOGAN, A.T. Effect of bag type on the apparent digestibility of feeds in ANKOM Daisy^{II} incubators. *Animal Feed Science and Technology*, v.119, p.333-344, 2005.
- CARVALHO, I.P.C.; DETMANN, E.; MANTOVANI, H.C. et al. Growth and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from rumen fluid according to energy or nitrogen source. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.40, p.1260-1265, 2011.
- COSTA, V.A.C.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Degradação in vitro da fibra em detergente neutro de forragem tropical de alta qualidade em função da suplementação com proteína e/ou carboidratos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, p.1803-1811, 2009.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Avaliação nutricional de alimentos ou dietas? Uma abordagem conceitual. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 6, 2008, Viçosa. *Anais...* Viçosa: DZO-UFV, 2008. p.21-52.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; MANTOVANI, H.C. et al. Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis-Menten kinetics. *Livestock Science*, v.126, p.136-146, 2009.
- DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Métodos para análise de alimentos. *Suprema: Visconde do Rio Branco*, 2012. 214p.
- HUHTANEN, P. Associative effects of feeds in ruminants. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*, v.5, p.37-57, 1991.

LOPES, F.C.F.; DORNELAS, R.A.C.; PORTUGAL, J.A.B. et al. Digestibilidade da matéria seca de silagens de milho e de suplementos concentrados determinada por procedimentos in vitro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, p.1167-1173, 2010.

MACHADO, M.G.; DETMANN, E.; MANTOVANI, H.C. et al. Evaluation of the length of adaptation period for changeover and crossover nutritional experiments with cattle fed tropical forage-based diets. *Animal Feed Science and Technology*, v.222, p.133-148, 2016.

McDOUGALL, E.I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal*, v.43, p.99-109, 1948.

MOSS, A.R.; GIVENS, D.I.; PHIPPS, R.H. Digestibility and energy value of combinations of forage mixture. *Animal Feed Science and Technology*, v.39, p.151-172, 1992.

MOULD, F.L.; ØRSKOV, E.R.; MANNS, O. Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. *Animal Feed Science and Technology*, v.10, p.15-30, 1983.

MOULD, F.L.; KLIEM, K.E.; MORGAN, R. et al. In vitro microbial inoculums: a review of its function and properties. *Animal Feed Science and Technology*, v.123-124, p.31-50, 2005.

RAMIN, M.; VAGA, M.; CABEZAS-GARCIA, E.H. et al. Comparison of methane production from individual feeds and total diets – an in vitro evaluation. *Agraarteadus Journal of Agricultural Science*, v.27, p.42-47, 2016.

RUSSELL, J.B.; BALDWIN, R.L. Substrate preferences in rumen bacteria: evidence of catabolite regulatory mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, v.36, p.319-329, 1978.

SILVA, T.E.; DETMANN, E.; CAMACHO, L.F. et al. Comparação de métodos in vitro para a quantificação da digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro de forragens e concentrados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2017. (no prelo).

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society*, v.18, p.104-111, 1963.

WILMAN, D.; ADESOGAN, A. A comparison of filter bags method with conventional tube methods of determining the in vitro digestibility of forages. *Animal Feed Science and Technology*, v.84, p.33-47, 2000.