



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

**TÉCNICAS DE COLETA DE LÍQUIDO RUMINAL PARA
ANÁLISE DA DIGESTIBILIDADE *in vitro* DE
ALIMENTOS**

Paula Eduarda Penasso Correa

CAMPO GRANDE, MS
2025



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**TÉCNICAS DE COLETA DE LÍQUIDO RUMINAL PARA
ANÁLISE DA DIGESTIBILIDADE *in vitro* DE
ALIMENTOS**

RUMINAL LIQUID SAMPLING TECHNIQUES FOR *in vitro* DRY
MATTER DIGESTIBILITY ANALYSIS

Paula Eduarda Penasso Correa

Orientador: Profa. Dra. Camila Soares Cunha

Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal

CAMPO GRANDE, MS 2025



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO

Aos dezoito dias do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte e cinco, às oito horas, na Sala de Aula F da Pós-graduação FAMEZ, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Camila Soares Cunha (UFMS), Gercino Ferreira Virginio Júnior (UNESP) e Luis Carlos Vinhas Itavo (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **PAULA EDUARDA PENASSO CORRÊA**, CPF ***.402.461-**, Área de concentração em Produção Animal, do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**TÉCNICAS DE COLETA DE LÍQUIDO RUMINAL PARA ANÁLISE DA DIGESTIBILIDADE *in vitro* DE ALIMENTOS**" e orientação de Camila Soares Cunha. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	AVALIAÇÃO
Dra. Camila Soares Cunha (Interno)	APROVADA
Dr. Gercino Ferreira Virginio Júnior (Externo)	APROVADA
Dr. Luis Carlos Vinhas Itavo (Interno)	APROVADA

RESULTADO FINAL:

☒ Aprovação ☐ Aprovação com revisão ☐ Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Banca realizada de forma híbrida com avaliador externo por vídeo conferência.

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Gercino Ferreira Virginio Junior, Usuário Externo**, em 18/12/2025, às 17:25, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Camila Soares Cunha, Professora do Magistério Superior**, em 19/12/2025, às 15:35, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Luis Carlos Vinhas Itavo, Professor do Magisterio Superior**, em 12/01/2026, às 09:23, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Paula Eduarda Penasso Correa, Usuário Externo**, em 13/01/2026, às 16:46, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6144169** e o código CRC **B7101D9B**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

RESUMO

CORREA, P.E.P. Técnicas de coleta de líquido ruminal para análise da digestibilidade *in vitro* de alimentos. 2025. Dissertação - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2025.

A avaliação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) é amplamente utilizada na nutrição de ruminantes, sendo dependente da qualidade do inóculo ruminal empregado, contudo, a literatura ainda não é conclusiva quanto à possível influência da técnica de coleta sobre essa qualidade. Este estudo foi conduzido com o objetivo de comparar a DIVMS de diferentes volumosos utilizando líquido ruminal obtido por fistula ruminal e por sonda esofágica. O experimento foi conduzido na Fazenda Escola da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, utilizando quatro volumosos: silagem de capim-elefante BRS Capiçu, capim-elefante BRS Capiçu *in natura*, silagem de milho e capim Marandu. O líquido ruminal foi coletado de três bovinos Nelore fistulados, por ambas as vias, em duas rodadas experimentais com intervalo de uma semana. Após a coleta, o líquido foi filtrado, homogeneizado em um pool por técnica de coleta e encaminhado para o Laboratório de Nutrição Aplicada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FAMEZ/UFMS. A DIVMS foi avaliada pelo método de Tilley e Terry, adaptado ao sistema Marconi®, utilizando saquinhos de TNT. O período de incubação ruminal foi de 48 horas seguida de digestão ácida com pepsina por 24 horas. Os dados foram submetidos à análise estatística para comparação entre os métodos de coleta, sendo avaliados os valores médios de digestibilidade, bem como medidas de variabilidade (amplitude, desvio-padrão e coeficiente de variação). Os resultados indicaram que, embora diferenças de variabilidade tenham sido observadas entre as técnicas conforme o tipo de volumoso, não houve efeito significativo ($P>0,05$) da técnica de coleta sobre os valores médios de DIVMS. Conclui-se que as ambas as técnicas de coleta de líquido ruminal, por sonda esofágica ou por fistula ruminal, podem ser utilizadas em ensaios de digestibilidade *in vitro*, considerando suas limitações operacionais e a natureza do alimento avaliado.

Palavras-chave: Análise de alimentos; fistula; inóculo; ruminantes; sonda esofágica.

ABSTRACT

CORREA, P.E.P. Ruminant liquid sampling techniques for *in vitro* dry matter digestibility analysis. 2025. Dissertação - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2025.

In vitro dry matter digestibility (IVDMD) is widely used in ruminant nutrition and depends directly on the quality of the ruminal inoculum employed, however, the literature is still inconclusive regarding the possible influence of the collection technique on this quality. This study aimed to compare the IVDMD of different forages using ruminal fluid obtained via ruminal fistula and esophageal probe. The experiment was conducted at the Experimental Farm of the Federal University of Mato Grosso do Sul, using four forages: BRS Capiçu elephant grass silage, fresh BRS Capiçu elephant grass, corn silage, and Marandu grass. Ruminal fluid was collected from three fistulated Nellore cattle by both collection methods, in two experimental runs conducted at one-week interval. After collection, the ruminal fluid was filtered, homogenized into a pooled sample for each collection technique, and transported to the Applied Nutrition Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science (FAMEZ/UFMS). The IVDMD was determined using the Tilley and Terry method, adapted to the Marconi® system, with the use of nonwoven fabric bags. The ruminal incubation period was 48 hours, followed by acid digestion with pepsin for 24 hours. Data were subjected to statistical analysis to compare collection methods, evaluating mean digestibility values as well as measures of variability (range, standard deviation, and coefficient of variation). The results indicated that, although differences in variability were observed between techniques depending on forage type, there was no significant effect ($P > 0.05$) of the collection technique on mean IVDMD values. It is concluded that both ruminal fluid collection techniques, using an esophageal probe or a ruminal fistula, can be used in *in vitro* digestibility assays, considering their operational limitations and the characteristics of the evaluated feed.

Keywords: Esophageal probe; feed analysis; fistula; inoculum; ruminants.

Sumário

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	3
1. Avaliação da digestibilidade dos alimentos	3
2. Principais métodos para avaliação da digestibilidade dos alimentos	4
3. Principais técnicas para coleta do conteúdo ruminal	6
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
CAPÍTULO 2 - ARTIGO	14
INTRODUÇÃO	16
MATERIAL E MÉTODOS	17
Local do experimento	17
Alimentos utilizados e avaliação da matéria seca	17
Coleta do inóculo	18
Digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS)	20
Análise estatística	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CONSIDERAÇÕES FINAIS	28

INTRODUÇÃO

Avaliar a digestibilidade dos alimentos é uma etapa essencial na nutrição de ruminantes, pois essa característica influencia diretamente a disponibilidade de nutrientes e, conseqüentemente, o desempenho produtivo dos animais. Tornando-se, assim, fundamental para atender às exigências de manutenção e produção, otimizando o uso dos recursos alimentares (Detmann et al., 2006; Oliveira et al., 2014; Pessoa, 2016).

Dentre as metodologias presentes na literatura para a avaliação da digestibilidade dos alimentos, os ensaios *in vitro* têm se destacado pois simulam o ambiente digestivo dos ruminantes, oferecerem resultados confiáveis com menor custo, menor tempo de execução e sem a necessidade de grandes estruturas experimentais (Berchielli et al., 2006; Fernandes et al., 2017). Técnicas como a proposta por Tilley e Terry (1963) e os sistemas modernos como o fermentador DaisyII (Holden, 1999) têm sido amplamente utilizadas para estimar a digestibilidade de matéria seca (MS) e de frações fibrosas, como a fibra em detergente neutro (FDN) e a fibra em detergente ácido (FDA) para diferentes alimentos.

Para realização da avaliação da digestibilidade *in vitro* é necessária a coleta de líquido ruminal. Essa etapa é de grande importância visto que, a acurácia do método depende, em grande parte, da qualidade do inóculo ruminal utilizado, uma vez que este contém a microbiota responsável pela fermentação dos alimentos (Mould et al., 2005; Tassone et al., 2020).

Tradicionalmente, a coleta é realizada por meio de fistula, considerada o método padrão, por permitir um acesso direto e amostragem representativa do conteúdo ruminal. No entanto, essa prática exige a utilização de animais fistulados no rúmen, o que envolve procedimento cirúrgico invasivo. A realização deste tipo de cirurgia nos bovinos tem se tornado cada vez mais difícil, devido às preocupações relacionadas ao bem-estar animal (Arcuri et al., 2011; Henderson, 2021).

Diante disso, alternativas capazes de proporcionar resultados equivalentes têm sido testadas e utilizadas. Uma delas é a coleta do conteúdo ruminal via sonda esofágica, pela intubação do animal. Entretanto, há uma preocupação se esse tipo de coleta, apesar de ser menos invasivo, pode comprometer a representatividade das amostras em função da possível contaminação por saliva e da menor proporção de fração sólida do rúmen, uma vez que a aspiração ocorre predominantemente na região dorsal, onde a concentração de partículas em suspensão é reduzida (Wolt et al., 1976;

Harrison, 1995; Muizelaar et al., 2020; Hagey et al., 2022).

Logo, é fundamental compreender como o método de coleta do líquido ruminal pode influenciar os resultados obtidos em análises de digestibilidade *in vitro*. Alcalde et al. (2001) avaliaram concentrados energéticos, suplementos proteicos e volumosos secos, utilizando um único animal doador e inóculos provenientes da coleta de líquido ruminal via fístula ou sonda esofágica, além de fezes em diferentes diluições. Para os alimentos avaliados, os inóculos oriundos do líquido ruminal apresentaram os maiores coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), não havendo diferenças entre os métodos de coleta.

Por sua vez, Oliveira et al. (1993), ao compararem métodos de coleta, tipos de amostragem e tempo de adaptação do animal doador, observaram maiores valores de DIVMS quando utilizado o método de coleta via sonda esofágica, além de diferenças nos perfis fermentativos. Apesar de contribuírem para a compreensão dos efeitos do método de coleta do inóculo ruminal, esses estudos apresentam limitações quanto ao número de animais, reforçando a relevância do presente estudo ao ampliar essa abordagem.

Nesse contexto, a avaliação do uso do líquido ruminal obtido por sonda esofágica em ensaios de digestibilidade *in vitro* apresenta relevância científica e prática, por se tratar de um método menos invasivo, que amplia o acesso às análises, reduz a necessidade de procedimentos cirúrgicos e atende às exigências éticas atuais.

Assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (MS) obtida por meio da coleta de líquido ruminal via fístula ruminal e via sonda esofágica.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

1. Avaliação da digestibilidade dos alimentos

A eficiência dos sistemas de produção animal está diretamente ligada ao consumo de alimentos e ao seu aproveitamento por parte do animal (Pessoa, 2016). Dessa forma, torna-se essencial avaliar a composição química e digestibilidade dos alimentos, com objetivo de formular dietas balanceadas que promovam ao animal uma maior eficiência alimentar (Campos et al., 2010).

A composição nutricional de um alimento pode ser estimada por meio de análises químicas e bromatológicas; entretanto, a avaliação da digestibilidade é fundamental para estimar a fração dos nutrientes potencialmente disponíveis ao animal, contribuindo para uma melhor interpretação do seu valor nutritivo e do aproveitamento dos nutrientes ingeridos (Antônio et al., 1998).

Segundo Detmann et al. (2006), a digestibilidade corresponde à proporção do alimento que não é recuperada nas fezes, sendo considerada uma estimativa da fração aparentemente degradada durante a passagem pelo trato gastrointestinal, após a ação conjunta dos sistemas enzimáticos da microbiota ruminal e do próprio animal. Trata-se, portanto, de uma medida de digestibilidade aparente, a qual não desconta as perdas endógenas e microbianas, diferindo conceitualmente da digestibilidade verdadeira, que considera essas frações de origem não alimentar.

Alimentos com maior digestibilidade apresentam maior potencial de aproveitamento energético e proteico, o que pode refletir positivamente no desempenho produtivo dos ruminantes. No entanto, essa relação não é direta, uma vez que a utilização final dos nutrientes também é influenciada por fatores como taxa de passagem da digesta, fermentação ruminal, consumo voluntário e metabolismo pós-absortivo (NRC, 2001; Mertens, 2002).

Os volumosos, como capins, silagens e fenos, caracterizam-se pelo elevado teor de fibra e menor densidade energética, constituindo a base das dietas de ruminantes e desempenhando papel central na regulação do consumo e no funcionamento do rúmen (Van Soest, 1994). A digestibilidade desses alimentos expressa a proporção da matéria ingerida que é degradada ao longo do trato digestivo e é amplamente utilizada como parâmetro para a avaliação da qualidade nutricional das forragens (Mertens, 1994; Buxton, 1995).

Volumosos com maior digestibilidade tendem a apresentar menor acúmulo de fração fibrosa indigestível no rúmen, o que pode favorecer o consumo voluntário e o fluxo de nutrientes para o intestino. Em contraste, volumosos com elevada proporção de parede celular e maior teor de lignina apresentam menor digestibilidade e maior limitação ao consumo, o que compromete o aproveitamento dos nutrientes e a eficiência produtiva (Van Soest, 1994; Allen, 1996; Oba & Allen, 1999). Assim, a avaliação da digestibilidade dos volumosos é essencial para a classificação da qualidade das forragens e para subsidiar decisões relacionadas ao manejo alimentar e à formulação de dietas mais eficientes.

2. Principais métodos para avaliação da digestibilidade dos alimentos

Os métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro* são amplamente empregados na para estimar a digestibilidade dos alimentos, diferindo quanto ao princípio metodológico, nível de complexidade, custo, tempo experimental e grau de invasividade (Van Soest, 1994; Detmann et al., 2014).

O método *in vivo* é considerado o método de referência (padrão ouro) para a avaliação da digestibilidade. Apesar de sua elevada robustez experimental, esse método apresenta limitações práticas importantes, como alto custo, necessidade de infraestrutura específica, maior tempo de condução dos ensaios e rigorosos cuidados éticos, o que restringe sua aplicação rotineira, especialmente em avaliações de grande número de alimentos (Van Soest, 1994; NRC, 2001; Ferrari, 2003; Senger et al., 2007).

O método *in situ* baseia-se na incubação de amostras de alimento em bolsas porosas inseridas diretamente no rúmen de animais fistulados, permitindo estimar a degradabilidade ruminal dos nutrientes, e não a digestibilidade total do alimento. Por meio desse método, é possível caracterizar frações degradáveis e estimar a degradabilidade efetiva a partir de taxas de passagem previamente assumidas. Além de não representar a digestibilidade em todo o trato gastrointestinal, o método apresenta limitações, como variação entre laboratórios e perdas de partículas finas pelas porosidades dos sacos filtrantes, o que pode comprometer a comparabilidade dos resultados (Foster et al., 2023).

Os métodos *in vitro* consistem na simulação controlada do processo fermentativo ruminal em ambiente laboratorial, utilizando líquido ruminal como inóculo microbiano (Whiteman, 1980). Esses métodos são amplamente utilizados como

alternativa aos ensaios *in vivo*, por apresentarem menor custo, menor tempo experimental e reduzido uso de animais. Contudo, diferentemente dos métodos *in vivo*, as técnicas *in vitro* estimam principalmente a digestão ruminal do alimento, não contemplando integralmente os processos pós-ruminais de digestão e absorção, especialmente nas metodologias exclusivamente gravimétricas (Berchielli et al., 2006).

Entre as principais técnicas *in vitro*, destaca-se o método de Tilley e Terry (1963), posteriormente modificado por Goering e Van Soest (1970), que simula a digestão ruminal por meio da incubação do alimento com líquido ruminal tamponado, seguida por uma etapa de digestão enzimática em pepsina ácida, representando a digestão no abomaso. Esse método é amplamente reconhecido por sua simplicidade, baixo custo e boa correlação com resultados obtidos *in vivo* (Velásquez et al., 2010).

Avanços metodológicos permitiram o desenvolvimento de sistemas baseados no uso de sacos filtrantes (filter bags), como o fermentador ruminal DaisyII (Holden, 1999), que possibilita a incubação simultânea de múltiplas amostras sob condições padronizadas de temperatura e agitação. Esses sistemas aumentam a eficiência laboratorial, reduzem a variabilidade experimental e são amplamente empregados na avaliação da digestibilidade de forragens e concentrados (Holden, 1999; Mabjeesh et al., 2000; Alcalde et al., 2001; Silva et al., 2017). Entretanto, o elevado custo dos sacos filtrantes comerciais, como o modelo F57, tem estimulado a avaliação de materiais alternativos, como o tecido não tecido (TNT), com resultados promissores em estudos comparativos (Casali et al., 2009; Valente et al., 2011; Silva et al., 2017).

De modo geral, as estimativas de digestibilidade *in vitro* baseiam-se no desaparecimento gravimétrico do substrato após períodos definidos de incubação, sendo o tempo de 48 horas frequentemente adotado como padrão. No entanto, esse período pode variar em função da natureza do alimento, com tempos menores para alimentos ricos em carboidratos não fibrosos e tempos mais longos para volumosos fibrosos, refletindo diferenças na cinética de degradação ruminal (Ørskov & McDonald, 1979; Van Soest, 1994; López, 2005).

Tanto os métodos *in situ* quanto os métodos *in vitro* dependem da obtenção de líquido ruminal com atividade microbiana adequada, o que tradicionalmente envolve o uso de animais fistulados como doadores de inóculo. Embora o método *in vitro* não exija, necessariamente, a manutenção de animais fistulados no próprio experimento, a disponibilidade e a representatividade do líquido ruminal permanecem como fatores críticos para a confiabilidade das estimativas de digestibilidade (Detmann et al., 2005).

3. Principais técnicas para coleta do conteúdo ruminal

O rúmen é uma câmara fermentativa anaeróbia caracterizada por intensa atividade microbiana, com pH geralmente entre 5,5 e 7,0 e temperatura próxima a 38–40 °C, condições que favorecem a degradação dos alimentos ingeridos pelos ruminantes (Hungate, 1966). Trata-se de um ecossistema complexo e altamente diverso, composto principalmente por bactérias, fungos e protozoários, sendo as bactérias responsáveis por cerca de 60 a 90% da biomassa microbiana e desempenhando papel central nos processos fermentativos (Fonseca & Dias-Da-Silva, 2001; Kozloski, 2011). O conteúdo ruminal é estruturalmente heterogêneo, formado por fases sólida e líquida, agregados microbianos e variações espaciais entre compartimentos dorsal e ventral, além de variações temporais associadas à dieta e ao padrão de ingestão (Resille et al., 2009).

Em razão dessa complexidade, o acesso ao conteúdo ruminal é fundamental para estudos que envolvem fermentação, microbiota e degradabilidade dos nutrientes. As principais técnicas empregadas para esse fim são a fistula ruminal e a sonda esofágica, cujas aplicações apresentam vantagens e limitações que devem ser consideradas conforme o objetivo experimental.

A fistula ruminal é amplamente utilizada como método de referência em pesquisas com ruminantes, por permitir acesso direto ao rúmen e a coleta controlada de amostras das fases líquida e sólida, possibilitando amostragens em diferentes regiões do órgão (Thyfault et al., 1975; Grovum, 1989; Duffield et al., 2004). Essa característica favorece a obtenção de amostras mais representativas da heterogeneidade do ambiente ruminal. Entretanto, trata-se de um procedimento cirúrgico invasivo, cuja aplicação envolve custos elevados, limita o número de unidades experimentais e exige rigorosos cuidados com o bem-estar animal (Brasil, 2008; Henderson, 2021). Embora animais adequadamente manejados possam manter padrões fisiológicos próximos ao normal, a técnica não está isenta de riscos, como infecções locais e extravasamento de conteúdo ruminal (Grovum, 1989; Muzzi et al., 2009).

Como alternativa, a sonda esofágica consiste em um método minimamente invasivo e não cirúrgico, amplamente empregado em estudos que demandam coletas pontuais ou em grande número de animais, sobretudo para avaliações de parâmetros fermentativos, como pH, ácidos graxos voláteis (AGVs) e nitrogênio amoniacal (Lavezzo et al., 1988; Salles et al., 2003; Shen et al., 2012). O principal questionamento associado a essa técnica refere-se à representatividade das amostras, uma vez que a

aspiração ocorre predominantemente na região dorsal do rúmen, onde a concentração de partículas sólidas é menor, além da possibilidade de contaminação salivar.

A saliva, rica em bicarbonato e fosfato, exerce efeito tamponante que tende a elevar o pH das amostras, enquanto seus efeitos sobre AGVs e nitrogênio amoniacal são geralmente atribuídos ao efeito diluente, resultando, em alguns casos, em reduções moderadas dessas variáveis (Wohlt et al., 1976; Keesen et al., 2016; Jayasinghe & Ranathunga, 2018; Chen et al., 2021). Esses efeitos podem ser minimizados por meio de procedimentos padronizados, como o descarte dos primeiros volumes aspirados, a coleta de volumes moderados (100–300 mL) e a correta inserção da sonda até o saco ventral do rúmen (Garry, 2006; Döring et al., 2014; Hörmann et al., 2020).

Diversos estudos comparativos indicam que as diferenças entre os métodos de coleta dependem do parâmetro avaliado e do objetivo experimental. Oliveira et al. (1999) observaram que o método de coleta não alterou o número total de protozoários, embora o líquido obtido por fístula apresentasse maior proporção de protozoários holotríquios. Lavezzo et al. (1988) relataram que a fístula fornece valores mais próximos das condições absolutas do rúmen, enquanto a sonda esofágica é mais adequada para comparações entre tratamentos. Em ensaios de digestibilidade *in vitro*, Oliveira et al. (1993) e Alcalde et al. (2001) demonstraram que o líquido ruminal obtido por sonda pode fornecer resultados estáveis e reprodutíveis, sendo uma alternativa viável como fonte de inóculo, dependendo do alimento avaliado.

Dessa forma, a escolha entre fístula ruminal e sonda esofágica deve considerar o tipo de variável analisada, o nível de representatividade requerido e a viabilidade experimental. Ambas as técnicas desempenham papel relevante em estudos de digestibilidade *in vitro*, especialmente aqueles que dependem do uso de líquido ruminal como inóculo, justificando a necessidade de investigações que comparem seus efeitos sobre os resultados obtidos.

Quadro 1 - Comparação entre coleta de líquido ruminal via fístula e via sonda esofágica

Critério		Fístula Ruminal	Sonda Esofágica
Descrição da técnica		Abertura permanente na parede abdominal e da parede do rúmen, com inserção de uma cânula que conecta o ambiente ruminal ao meio externo.	Introdução de uma sonda flexível pela cavidade oral até o rúmen para retirada do conteúdo ruminal.
Invasividade		Procedimento invasivo, requer cirurgia realizada sob anestesia.	Minimamente invasiva, não requer procedimento cirúrgico.
Custos	/	Alto custo de implantação, menor número de animais	Baixo custo operacional, estudos com maior número de animais
Viabilidade			
Acesso ao rumen		Acesso direto e abrangente a diferentes regiões do rúmen.	Acesso restrito, geralmente à região cranial ventral do rumen.
Composição da amostra		Amostra mais representativa do conteúdo ruminal, incluindo frações líquida e sólida.	Principalmente fração líquida, com baixa representatividade da fração sólida.
Contaminação com saliva		Mínima ou inexistente, devido ao acesso direto	Alta probabilidade de contaminação com saliva
Interferência no pH		Valores de pH mais confiáveis e representativos.	pH elevado devido ao efeito tamponante da saliva.
Representatividade microbiológica		Maior precisão na avaliação da microbiota total do rúmen.	Pode subestimar grupos microbianos e alterar perfis.
Aplicação ética		Requer aprovação ética rigorosa, com justificativas e cuidados com o bem-estar animal.	Mais aceito em protocolos com restrição ética.
Utilização em estudos científicos		Método padrão para estudos de digestibilidade, fisiologia e microbiota.	Alternativa viável para estudos com menor invasividade.
Execução da coleta		Após instalação da cânula, qualquer pessoa pode realizar a coleta.	Requer operador treinado para introdução correta da sonda.

Fonte: Elaborado pela autora a partir de informações extraídas de Duffield et al. (2004); Laflin & Gnad (2008); Fernández et al. (2009); Shen et al. (2012); Paz et al. (2016); Henderson et al. (2021).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCALDE, C. R.; MACHADO, R. M.; SANTOS, G. T.; PICOLLI, R.; JOBIM, C. C. Digestibilidade in vitro de alimentos com inóculos de líquido de rúmen ou de fezes de bovinos. *Acta Scientiarum*, v. 23, n. 4, p. 917–921, 2001.
- ALLEN, M. S. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. *Journal of Animal Science*, v. 74, p. 3063–3075, 1996.
- ANTONIO, D. S.; GONÇALVES, M. B. F.; SANCHEZ, M. B.; BACKES, A. A.; SILVA, L. F. da. Modificações na técnica de digestibilidade in vitro para avaliar forragens de baixa qualidade. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 28, n. 4, 1998.
- ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (org.). *Nutrição de ruminantes*. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 115–148.
- BERCHIELLI, T. T.; GARCIA, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudo de nutrição. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (org.). *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p. 583.
- BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais. Brasília: Casa Civil, 2008.
- CAMPOS, P. R. S. S.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E.; CECOM, P. R.; LEÃO, M. I.; LUCCHI, B. B.; SOUZA, S. M.; PEREIRA, O. G. Consumo, digestibilidade e estimativa do valor energético de alguns volumosos por meio da composição química. *Revista Ceres*, v. 57, n. 1, p. 79–86, 2010.
- CASALI, A. O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PEREIRA, J. C.; HENRIQUES, L. T.; FREITAS, S. G.; PAULINO, M. F. Influence of incubation time and particle size on indigestible compounds contents in cattle feeds and feces obtained by in situ procedures. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, p. 335–342, 2009.

- DETMANN, E. et al. Estimação da digestibilidade do extrato etéreo em ruminantes a partir dos teores dietéticos: desenvolvimento de um modelo para condições brasileiras. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, n. 4, p. 1469–1478, 2006.
- DUFFIELD, T. et al. Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 1, p. 59–66, 2004.
- FERNANDES, A. R. A.; OLIVEIRA, I.; FLUCK, A. C.; OLLÉ, M. A.; TURMINA, R.; GEHLEN, J. C. Metodologias para estimar a digestibilidade de alimentos para ruminantes. *REDVET – Revista Electrónica de Veterinaria*, v. 18, n. 11, p. 1–15, 2017.
- FERRARI, R. Estimativa do efeito associativo de concentrado e volumoso, através da medida de digestibilidade in situ da matéria seca e da fibra em detergente neutro. 2003. 104 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. *Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications)*. Washington, D.C.: USDA, 1970. (Agricultural Handbook, n. 379).
- GROVUM, W. L. An improved rumen cannulation technique to minimize leakage. *Acta Veterinaria Scandinavica. Supplementum*, v. 86, p. 225–228, 1989.
- HAGEY, J. V.; LAABS, M.; MAGA, E. A.; DEPETERS, E. J. Rumen sampling methods influence observed bacterial communities. *PLoS ONE*, v. 17, e0258176, 2022.
- HARRISON, F. A. *Surgical techniques in experimental farm animals*. Oxford: Oxford University Press, 1995.
- HENDERSON, G. The rumen microbiome: Implications for animal health and production. *Annual Review of Animal Biosciences*, v. 9, p. 1–23, 2021.
- HOLDEN, L. A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of Dairy Science*, v. 82, n. 8, p. 1791–1794, 1999.
- KOZLOSKI, G. V. *Bioquímica dos ruminantes*. 3. ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2011. 214 p.

- LAVEZZO, O. E. N. M. et al. Influência de métodos de coleta de fluido ruminal sobre os parâmetros de fermentação em bovinos alimentados com diferentes fontes de proteína. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v. 17, p. 281–291, 1988.
- LÓPEZ, S. In vitro and in situ techniques for estimating digestibility. In: DIJKSTRA, J.; FORBES, J. M.; FRANCE, J. (org.). *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. 2. ed. Cambridge: CABI Publishing, 2005. p. 87–121.
- MABJEESH, S. J.; COHEN, M.; ARIELI, A. In vitro methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: comparison of methods and inoculum source. *Journal of Dairy Science*, v. 83, n. 10, p. 2289–2294, 2000.
- MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, v. 85, n. 6, p. 1217–1240, 2002.
- MOULD, F. L. et al. In vitro microbial inocula: a review of its function and properties. *Animal Feed Science and Technology*, v. 123–124, p. 31–50, 2005.
- MUIZELAAR, W. et al. Sampling of rumen fluid via oral stomach tubing. In: MESGARAN, S. D. et al. (eds.). *Methods in Cattle Physiology and Behaviour*. Cologne: PUBLISSO, 2020.
- MUZZI, L. A. L.; MUZZI, R. A. L.; GABELLINI, E. L. A. Técnica de fistulação e canulação do rúmen em bovinos e ovinos. *Ciência Agrotécnica*, v. 33, p. 2059–2064, 2009.
- NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7. ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2001. 381 p.
- OBA, M.; ALLEN, M. S. Effects of brown midrib 3 mutation in corn silage on dry matter intake and productivity of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 135–142, 1999.
- OLIVEIRA, M. D. S. et al. Efeito de métodos de coleta de fluido ruminal sobre a digestibilidade in vitro de alguns nutrientes de ração para bovinos. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v. 22, p. 794–800, 1993.

- OLIVEIRA, M. D. S. et al. Efeitos de métodos de coleta de fluido ruminal em bovinos sobre alguns parâmetros ruminais e microbiológicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, p. 867–871, 1999.
- ØRSKOV, E. R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, v. 92, n. 2, p. 499–503, 1979.
- PESSOA, M. F. M. Digestibilidade in vitro vs digestibilidade in vivo: aplicação a regimes alimentares de monogástricos. 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2016.
- RESILLEZ, A.; GONÇÁLEZ, M. Nota técnica: Modificação e/ou nova técnica cirúrgica de implantação de cânula ruminal. *Revista de Producción Animal*, v. 21, p. 177–179, 2009.
- SALLES, M. S. V. et al. Avaliação da colheita de líquido ruminal por fístula ou sonda esofágica em bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 4, p. 438–442, 2003.
- SENGER, C. C. D. et al. Comparação entre os métodos químico, in situ e in vitro para estimativa do valor nutritivo de silagens de milho. *Ciência Rural*, v. 37, n. 3, p. 835–840, 2007.
- SHEN, J. S. et al. Evaluation of rumen sampling techniques in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 95, n. 10, p. 5976–5986, 2012.
- SILVA, T. E. et al. Comparação de métodos in vitro para quantificação da digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro de forragens e concentrados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 69, n. 6, p. 1635–1644, 2017.
- TASSONE, S.; FORTINA, R.; PEIRETTI, P. G. In vitro techniques using DaisyII incubator for digestibility evaluation: a review. *Animals*, v. 10, 775, 2020.
- THYFAULT, H. A.; LEFFEL, E. C.; HUANG, M. D. Simplified method for producing permanent ruminal fistulae. *Journal of Dairy Science*, v. 58, n. 12, p. 1899–1901, 1975.

- 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, n. 2, p. 104–111, 1963.
- VAN SOEST, P. J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.
- VELÁSQUEZ, P. A. T. 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.
- WHITEMAN, P. C. *Tropical pasture science*. New York: Oxford University Press, 1980. 392 p.
- WOHLT, J. E.; CLARK, J. H.; BLAISDELL, F. S. Effect of sampling, time, and method of concentration of ammonia nitrogen in rumen fluid. *Journal of Dairy Science*, v. 59, p. 459–464, 1976

CAPÍTULO 2 - ARTIGO

Técnicas de coleta de líquido ruminal para análise da digestibilidade *in vitro* de alimentos.

Paula Eduarda Penasso Correa¹, Camila Soares Cunha¹

¹Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campo Grande, MS, Brasil.

RESUMO: A avaliação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) é amplamente utilizada na nutrição de ruminantes, sendo dependente da qualidade do inóculo ruminal empregado, contudo, a literatura ainda não é conclusiva quanto à possível influência da técnica de coleta sobre essa qualidade. Este estudo foi conduzido com o objetivo de comparar a DIVMS de diferentes volumosos utilizando líquido ruminal obtido por fistula ruminal e por sonda esofágica. O experimento foi conduzido na Fazenda Escola da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, utilizando quatro volumosos: silagem de capim-elefante BRS Capiáçu, capim-elefante BRS Capiáçu *in natura*, silagem de milho e capim Marandu. O líquido ruminal foi coletado de três bovinos Nelore fistulados, por ambas as vias, em duas rodadas experimentais com intervalo de uma semana. Após a coleta, o líquido foi filtrado, homogeneizado em um pool por técnica de coleta e encaminhado para o Laboratório de Nutrição Aplicada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FAMEZ/UFMS. A DIVMS foi avaliada pelo método de Tilley e Terry, adaptado ao sistema Marconi®, utilizando saquinhos de TNT. O período de incubação ruminal foi de 48 horas seguida de digestão ácida com pepsina por 24 horas. Os dados foram submetidos à análise estatística para comparação entre os métodos de coleta, sendo avaliados os valores médios de digestibilidade, bem como medidas de variabilidade (amplitude, desvio-padrão e coeficiente de variação). Os resultados indicaram que, embora diferenças de variabilidade tenham sido observadas entre as técnicas conforme o tipo de volumoso, não houve efeito significativo ($P>0,05$) da técnica de coleta sobre os valores médios de DIVMS. Conclui-se que ambas as técnicas de coleta de líquido ruminal, por sonda esofágica ou por fistula ruminal, podem ser utilizadas em ensaios de digestibilidade *in vitro*, considerando suas limitações operacionais e a natureza do alimento avaliado.

Palavras-chave: Análise de alimentos; fistula; inóculo; ruminantes; sonda esofágica.

ABSTRACT: *In vitro* dry matter digestibility (IVDMD) is widely used in ruminant nutrition and depends directly on the quality of the ruminal inoculum employed, however, the literature is still inconclusive regarding the possible influence of the collection technique on this quality. This study aimed to compare the IVDMD of different forages using ruminal fluid obtained via ruminal fistula and esophageal probe. The experiment was conducted at the Experimental Farm of the Federal University of Mato Grosso do Sul, using four forages: BRS Capiaçú elephant grass silage, fresh BRS Capiaçú elephant grass, corn silage, and Marandu grass. Ruminal fluid was collected from three fistulated Nellore cattle by both collection methods, in two experimental runs conducted at one-week interval. After collection, the ruminal fluid was filtered, homogenized into a pooled sample for each collection technique, and transported to the Applied Nutrition Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science (FAMEZ/UFMS). The IVDMD was determined using the Tilley and Terry method, adapted to the Marconi® system, with the use of nonwoven fabric bags. The ruminal incubation period was 48 hours, followed by acid digestion with pepsin for 24 hours. Data were subjected to statistical analysis to compare collection methods, evaluating mean digestibility values as well as measures of variability (range, standard deviation, and coefficient of variation). The results indicated that, although differences in variability were observed between techniques depending on forage type, there was no significant effect ($P > 0.05$) of the collection technique on mean IVDMD values. It is concluded that both ruminal fluid collection techniques, using an esophageal probe or a ruminal fistula, can be used in *in vitro* digestibility assays, considering their operational limitations and the characteristics of the evaluated feed.

Keywords: Esophageal probe; feed analysis; fistula; inoculum; ruminants.

INTRODUÇÃO

Dentre as metodologias disponíveis para estimação da digestibilidade, as avaliações *in vitro* têm ampla aplicação por possibilitar estimativas confiáveis, com menor custo, menor tempo de execução e reduzida demanda por estruturas experimentais, sendo empregada tanto em técnicas clássicas, como a de Tilley e Terry (1963), quanto em sistemas mais recentes, como o fermentador DaisyII (Holden, 1999; Berchielli et al., 2006).

O líquido ruminal necessário para as análises pode ser obtido principalmente via fístula ruminal ou sonda esofágica. A fístula ruminal é considerada o método de referência por permitir acesso direto ao rúmen e a coleta de amostras mais representativas, incluindo as fases líquida e sólida (Arcuri et al., 2011). Contudo, para obter um animal dotado de fístula é necessário um procedimento cirúrgico invasivo, sujeito a restrições éticas e a crescentes preocupações relacionadas ao bem-estar animal (Henderson, 2021).

Como alternativa, a coleta por sonda esofágica constitui um método menos invasivo e de mais fácil aplicação, especialmente em estudos com maior número de animais. No entanto, essa técnica pode resultar em amostras com menor representatividade da fração sólida do rúmen e está sujeita à contaminação salivar, fatores que podem alterar características do inóculo e influenciar potencialmente a atividade microbiana durante a incubação *in vitro* (Wolt et al., 1976; Harrison, 1995).

A literatura é escassa quanto a evidências que demonstrem se o líquido ruminal obtido por diferentes métodos de coleta pode refletir de forma variável nos resultados de digestibilidade *in vitro*, em função, entre outros fatores, das características do alimento avaliado. Embora alguns estudos tenham comparado os métodos de coleta de líquido ruminal em avaliações de digestibilidade *in vitro* (Oliveira et al., 1993; Alcalde et al., 2001), os resultados ainda são limitados e, em alguns casos, divergentes, especialmente quando considerados diferentes tipos de alimentos. Alimentos com maior proporção de carboidratos não fibrosos, por exemplo, podem responder de forma distinta quando comparados a volumosos fibrosos (Mertens, 1994; Buxton, 1995).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo comparar a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de diferentes alimentos volumosos utilizando líquido ruminal obtido por fístula ruminal e por sonda esofágica. A hipótese testada é a de que os diferentes métodos de coleta do líquido ruminal não promovem alterações significativas nas estimativas de DIVMS, independentemente do alimento avaliado.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento

As coletas de líquido ruminal foram conduzidas na Fazenda Escola da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), localizada no município de Terenos – MS. As avaliações laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Nutrição Aplicada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ/UFMS), em Campo Grande – MS.

Alimentos utilizados e avaliação da matéria seca

Neste experimento, foram utilizadas amostras de silagem de capim-elefante BRS Capiáçu (*Pennisetum purpureum*), capim-elefante BRS Capiáçu (*Pennisetum purpureum* cv BRS Capiáçu) e capim Marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) obtidas na Fazenda Escola da UFMS e silagem de milho de origem comercial. Todas as amostras foram coletadas previamente ao experimento pois foram originalmente utilizadas em pesquisas prévias.

O capim-elefante BRS Capiáçu utilizado para a confecção da silagem e para a amostra de capim *in natura* foi oriunda de uma capineira da Fazenda Escola da UFMS, sendo as plantas colhidas com aproximadamente 110 dias de idade entre outubro de 2022 e abril de 2023. O material foi colhido mecanicamente, picado com tamanho médio de partícula de 2mm. Amostras foram tomadas em diferentes momentos durante a picagem, sendo confeccionada uma amostra composta. Desta, uma subamostra foi destinada à pré-desidratação parcial, para obtenção da amostra de capim *in natura* e outra subamostra foi ensilada em tubos de PVC com 10 cm de diâmetro e 40 cm de comprimento, sem adição de qualquer aditivo. O material adicionado ao silo foi compactado manualmente, atingindo uma densidade de 800 kg de MN/m³. O silo foi vedado e mantido em local coberto e à temperatura ambiente por 150 dias. Após esse

período, o silo foi aberto e amostras foram coletadas em diferentes pontos, garantindo a representatividade.

A silagem de milho foi adquirida na região de Campo Grande – MS, proveniente de silos do tipo “bola”, produzida no ano de 2023. Por se tratar de material comercial, não foi possível caracterizar o híbrido, estágio de colheita ou teor de matéria seca no momento da ensilagem.

Por fim, o capim Marandu foi coletado de uma área manejada em pastejo rotativo da Fazenda Escola da UFMS, sendo a amostragem realizada com base no estrato pastejável (15 cm), sendo a altura de entrada de 30 cm e a altura de saída de 15cm. A amostragem foi realizada em maio de 2024.

Em cada pesquisa nas quais as amostras foram utilizadas, foi realizada a pesagem, o, acondicionamento em sacos de papel de peso conhecido e a pré-desidratação das amostras em estufa a 55 °C por 72 horas. Posteriormente, as amostras foram moídas em moinho tipo Wiley em peneira com crivos de 1 mm. Por fim, os materiais foram encaminhados ao laboratório onde foram estimados os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN) e matéria mineral (MM), seguindo os métodos descritos em Detmann et al. (2021) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química dos alimentos submetidos à avaliação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca utilizando líquido ruminal obtido por fístula ou por sonda esofágica

Alimento	MS ¹	PB ²	EE ²	FDN ²	MM ²
Silagem de capim-elefante BRS Capiçu	21,21	6,54	1,540	72,25	1,55
Capim-elefante BRS Capiçu	22,25	9,40	1,53	72,66	9,33
Silagem de milho	36,20	6,38	2,08	51,62	5,09
Capim Marandu	30,46	5,65	1,24	71,86	6,99

¹ Porcentagem da matéria natural. ²Porcentagem da matéria seca.

Coleta do inóculo

As técnicas de coleta por sonda esofágica e via fístula ruminal constituíram os tratamentos do experimento. O inóculo ruminal foi coletado de três bovinos machos não

castrados, da raça Nelore, com peso médio de 450 kg, todos portadores de cânula ruminal permanente. Os animais eram clinicamente saudáveis, mantidos em sistema de confinamento, com calendário sanitário atualizado, incluindo vacinação e vermifugação, não apresentando alterações clínicas ou comportamentais nos dias que antecederam as coletas. Os mesmos animais foram utilizados para ambas as formas de coleta – via fístula ruminal e via sonda esofágica.

Cerca de 15 dias antes das coletas, os animais foram adaptados a uma dieta composta por silagem de milho e concentrado formulado com fubá de milho, farelo de soja, caroço de algodão e premix mineral. Os animais foram mantidos em confinamento, com acesso ad libitum à água.

As coletas de líquido ruminal foram realizadas em duas semanas consecutivas, no mês de novembro de 2025, caracterizando duas rodadas experimentais independentes no tempo, com intervalo de uma semana entre elas. Em cada rodada, o líquido ruminal foi coletado dos três animais por ambas as vias (sonda esofágica e fístula ruminal). Para a coleta, os animais foram imobilizados em tronco de contenção, sendo realizada primeiramente a coleta via sonda esofágica e, em seguida, a coleta via fístula ruminal no mesmo animal.

Após a coleta, o conteúdo ruminal foi imediatamente filtrado em gaze, e posteriormente armazenado em garrafas térmicas previamente aquecidas com água fervente, garantindo a manutenção da temperatura e viabilidade microbiana durante o transporte até o laboratório. O líquido ruminal obtido de cada um dos três animais foi coletado separadamente por cada via e, em seguida, as amostras referentes a cada método de coleta foram reunidas e homogeneizadas, originando um pool de líquido ruminal obtido via fístula e um obtido via sonda. Padronização que permitiu utilizar um inóculo representativo e uniforme dentro de cada técnica de coleta. Essa estratégia caracterizou a utilização de uma amostra composta por método de coleta em cada rodada experimental.

Em cada rodada, os pools de líquido ruminal obtidos por cada via de coleta foram preparados imediatamente após a coleta e utilizados como inóculo no ensaio de DIVMS, não havendo armazenamento prolongado do material. Essa padronização permitiu utilizar um inóculo representativo e uniforme dentro de cada técnica de coleta.

Digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS)

A digestibilidade *in vitro* da matéria seca foi avaliada segundo a técnica descrita por Tilley e Terry (1963), adaptada para o sistema de rúmen artificial Marconi®, modelo MA443, conforme procedimentos de Holden (1999). Esse método foi escolhido por permitir a comparação controlada entre diferentes fontes de inóculo ruminal, minimizando variações operacionais e estruturais do ensaio. O experimento foi conduzido em duas rodadas com intervalo de uma semana entre elas. Cada rodada correspondeu a uma repetição experimental no tempo, utilizando novos pools de inóculo obtidos por ambas as vias de coleta. Em cada rodada foram utilizadas duas máquinas incubadoras, totalizando oito jarros de incubação por rodada.

A cada rodada, em cada máquina foram alocados dois jarros contendo inóculo obtido via fistula e dois jarros contendo inóculo obtido via sonda, organizados da seguinte forma: sonda e fistula na primeira fileira e fistula e sonda, na segunda. Essa disposição visou minimizar possíveis efeitos de posição dentro do equipamento sobre o processo fermentativo.

Para cada jarro foram adicionados 30 saquinhos de TNT selados termicamente, sendo 24 contendo amostras e 6 brancos. Os saquinhos com amostras foram distribuídos igualmente entre os quatro volumosos, totalizando seis por alimento. Considerando as duas rodadas experimentais, cada alimento foi avaliado em um total de 48 saquinhos (6 saquinhos $\times$ 4 jarros $\times$ 2 rodadas), caracterizando as repetições técnicas dentro de cada método de coleta. Os saquinhos foram considerados as unidades experimentais.

Em cada jarro de incubação, foram adicionados a solução tampão de Kansas, 1570 mL da solução A, composta por KH_2PO_4 (fosfato monopotássico), MgSO_4 (sulfato de magnésio), NaCl (cloreto de sódio), ureia e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cloreto de cálcio di-hidratado), e 28 mL da solução B, constituída por carbonato de sódio (Na_2CO_3) e sulfeto de sódio nonahidratado ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), juntamente com os saquinhos. Os jarros foram colocados na incubadora até atingirem temperatura de 39 °C. Em seguida, foram adicionados 400 mL do líquido ruminal correspondente à cada via de coleta no jarro correspondente, e imediatamente plugada a entrada de CO_2 por 30 segundos para obtenção de ambiente anaeróbio. Os jarros permaneceram incubados por 48 horas a 39 °C. O líquido ruminal utilizado em cada jarro correspondeu ao pool preparado para cada

método de coleta e rodada experimental, não havendo replicação independente do inóculo dentro da mesma rodada.

Após esse período, foi preparada a solução para a segunda etapa, dissolvendo-se 8 g de pepsina em 40 mL de HCl 6N, que foi adicionada a cada jarro, após as 48 horas. Os potes permaneceram incubados por mais 24 horas a 39 °C. Após a digestão, os saquinhos foram retirados e lavados abundantemente até que a água se tornasse clara. Em seguida, foram secos em estufa a 55 °C por 24 horas, depois em estufa a 105 °C por mais 24 horas, e finalmente acondicionados em dessecador para pesagem. A perda de massa após as duas fases do método corresponde ao material digerido, interpretado como a fração desaparecida no rúmen *in vitro*. A unidade experimental considerada para fins de análise estatística foi o saquinho com amostras, com o alimento e o método de coleta do inóculo como fatores fixos, e a rodada experimental considerada como efeito aleatório.

Análise estatística

O alimento e o método de coleta do inóculo ruminal (fístula ruminal ou sonda esofágica) foram considerados fatores fixos, bem como a interação entre esses fatores. A unidade experimental foi considerada como sendo cada saquinho avaliado. Os resultados foram submetidos a uma análise de variância pelo teste F e, havendo significância ($P < 0,05$), as médias foram contrastadas via teste Tukey, sendo consideradas significativas as diferenças cujo $P < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o procedimento GLIMMIX do pacote estatístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estatística descritiva

Para a silagem de capim-elefante BRS Capiçu, o método por sonda apresentou maior amplitude (42,37; Tabela 2) e maior coeficiente de variação (CV; 21,72%) quando comparado à fístula, que teve amplitude de 37,02 e CV de 17,87%. Isso indica que, para este volumoso, a sonda resultou em maior dispersão dos valores e menor consistência entre repetições.

Tabela 2. Estatística descritiva da digestibilidade in vitro da matéria volumosos estudados em função da coleta de inóculo

Coleta	Volumoso	Mín ¹	Máx ²	Amp ³	DP ⁴	Var ⁵	CV (%) ⁶
Sonda	Silagem de capim BRS Capiapu	20,69	63,07	42,37	9,015	81,27	21,72
	Capim-elefante BRS Capiapu	41,34	69,69	28,35	6,115	37,39	10,24
	Silagem de milho	53,45	75,07	21,62	5,070	25,71	7,35
	Capim Marandu	55,80	69,64	13,84	1,151	17,24	6,76
Fístula	Silagem de capim BRS Capiapu	21,77	58,80	37,02	7,781	60,54	17,87
	Capim-elefante BRS Capiapu	53,52	70,53	17,01	3,681	13,55	5,94
	Silagem de milho	52,81	90,56	37,75	7,938	63,03	11,34
	Capim Marandu	42,84	73,83	31,0	6,631	43,97	10,57

¹Mínimo; ²Máximo; ³Amplitude; ⁴Desvio-padrão; ⁵Variância; ⁶Coefficiente de variação.

Para o capim-elefante BRS Capiapu observou-se padrão semelhante ao da silagem, com maior variabilidade para o método por sonda (amplitude = 28,35; CV = 10,24%) em comparação à fistula (amplitude = 17,01; CV = 5,94%). Assim, o inóculo obtido pela fistula apresentou estimativas mais homogêneas.

Comportamento oposto foi observado para a silagem de milho: a fistula apresentou maior amplitude (37,75) e maior CV (11,34%), enquanto a sonda apresentou menor amplitude (21,62) e CV (7,35%). Dessa forma, para este volumoso específico, a menor variabilidade ocorreu no método de coleta por sonda.

Resultados semelhantes aos da silagem de milho foram observados no capim Marandu, com maior variabilidade na fistula (amplitude = 31,0; CV = 10,57%) e menor variabilidade na sonda (amplitude = 13,84; CV = 6,76%).

A análise da variabilidade entre os métodos indica que o comportamento não é uniforme entre os volumosos, sendo influenciado tanto pelo tipo de alimento quanto pelas características microbiológicas e físicas do inóculo obtido, o que reforça a necessidade de avaliação separadamente de cada volumoso.

De modo geral, observou-se maior variabilidade dos resultados quando o líquido ruminal foi obtido por meio de sonda esofágica. Essa maior variabilidade pode estar associada a características intrínsecas ao método de coleta, independentemente do alimento avaliado, uma vez que a sonda tende a recuperar uma fração do conteúdo

ruminal com menor proporção de partículas sólidas e maior influência de saliva, o que pode alterar o pH do meio e diluir a população microbiana funcional (Duffield et al., 2004; Larsen et al., 2020; Muizelaar et al., 2020).

Além disso, o rúmen apresenta diferenças marcantes entre regiões. A porção dorsocraniana, mais próxima da entrada esofágica, contém maior proporção de saliva, o que afeta pH, composição de ácidos graxos voláteis e composição microbiana (Duffield et al., 2004; Henderson et al., 2013; Larsen et al., 2020; Muizellar et al., 2020). Como a sonda acessa prioritariamente essa região, parte da variabilidade associada ao método pode ser atribuída a essas diferenças anatômicas e fisiológicas. Dessa forma, a variabilidade observada resulta da interação entre fatores metodológicos e biológicos, incluindo a heterogeneidade do ambiente ruminal, o local de amostragem, a distribuição da microbiota e a proporção entre as fases sólida e líquida do inóculo, afetando os resultados obtidos de maneira aleatória.

Digestibilidade in vitro da matéria seca

A Tabela 3 apresenta as médias da DIVMS obtidas pelos dois métodos de coleta, bem como os respectivos erros-padrão da média (EPM) e valores de P. Os valores médios de DIVMS encontrados estão condizentes com a literatura, observando-se maior DIVMS para a silagem de milho e menores digestibilidades para os capins. Supreendentemente, houve expressiva diferença entre os valores de digestibilidade obtidos para a silagem de capim-elefante BRS Capiçu e o capim-elefante BRS Capiçu. Tal discrepância pode ser explicada pela perda de qualidade do material durante o processo de ensilagem, resultado em menores teores de nutrientes digestíveis e, portanto, menor digestibilidade. Os teores de PB encontrados na avaliação da composição química dos alimentos podem ajudar a corroborar esse fato, sendo que foram encontrados valores de PB de 6,54% para a silagem de capim-elefante BRS Capiçu e 9,40% para o capim-elefante BRS Capiçu (Tabela 1).

De maneira geral, não houve efeito do tipo de coleta sobre os valores médios de DIVMS para todos os volumosos estudados. As médias obtidas foram semelhantes entre sonda, variando de 41,50%, para a silagem de capim-elefante BRS Capiçu a 68,96% para a silagem de milho, e fistula, que variou de 43,54% para a silagem de capim-elefante BRS Capiçu a 69,98% para a silagem de milho.

Tabela 3. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca dos volumosos estudados em função da coleta de inóculo (sonda ou fístula)

Volumoso	Coleta de inóculo ruminal		EPM	P-valor
	Sonda	Fístula		
Silagem de capim BRS Capiáçu	41,50	43,54	8,489	0,2792
Capim-elefante BRS Capiáçu	59,70	61,97	4,980	0,0545
Silagem de milho	68,96	69,98	6,546	0,4967
Capim Marandu	61,38	62,72	5,470	0,2779

A ausência de diferenças significativas entre os alimentos indica que, apesar das diferenças na variabilidade (Tabela 3), a digestibilidade média não foi influenciada pelo método de coleta do inóculo. Os resultados obtidos no presente estudo encontram apoio nos resultados de Paz et al. (2016), que mostram que, quando corretamente padronizados, os métodos por sonda e fístula produzem inóculos com composição microbiana amplamente comparável. Esses autores observaram que a composição global da microbiota ruminal não é significativamente afetada pelo método de amostragem (fístula ou sonda esofágica), desde que as amostras sejam representativas do conteúdo ruminal. Dessa forma, a ausência de diferenças nas médias de DIVMS observada no presente estudo sugere que a microbiota responsável pela fermentação ruminal foi suficientemente preservada em ambos os métodos de coleta.

Apesar do rigor metodológico adotado, algumas limitações operacionais estiveram presentes durante a condução do experimento e devem ser consideradas na interpretação dos resultados. Durante algumas coletas, observou-se maior dificuldade na obtenção do líquido ruminal via sonda esofágica, em função de obstruções da sonda. Esse fato ocasionou aumento no tempo de coleta e pode ter contribuído para maior estresse e agitação dos animais, além de potencialmente aumentar a exposição do inóculo a variações ambientais durante o procedimento. Pode ter ocorrido ligeira redução da temperatura do inóculo, no entanto, logo após sua obtenção, o inóculo foi transferido para garrafas térmicas previamente aquecidas, o que permitiu a rápida recuperação da temperatura e a preservação da viabilidade microbiana, não sendo observados efeitos negativos sobre os valores finais de DIVMS. Em contraste, a coleta por fístula ruminal mostrou-se mais prática, rápida e eficiente, permitindo a retirada do líquido com menor tempo de manipulação e maior facilidade operacional.

A utilização dos mesmos animais para todas as coletas contribuiu para a padronização experimental. Entretanto, reconhece-se que o rúmen de animais fistulados pode apresentar funcionamento ligeiramente distinto daquele de animais não fistulados, possivelmente em decorrência de mudanças fisiológicas associadas à presença da fístula, como a eventual entrada de pequenas quantidades de oxigênio no rúmen, mesmo quando adequadamente vedada. Essas condições podem influenciar, em certa medida, a dinâmica microbiana ruminal.

A susceptibilidade a limitações durante a execução das técnicas de coleta reforça que, embora a DIVMS não tenha sido influenciada pela via de coleta do inóculo, aspectos operacionais e ambientais devem ser considerados na escolha do método de coleta, especialmente em estudos experimentais que envolvam repetição de coletas e padronização rigorosa do inóculo ruminal.

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que os métodos de coleta do inóculo ruminal por fístula ruminal e por sonda esofágica são equivalentes para a avaliação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca de volumosos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCALDE, C. R.; et al. Avaliação de métodos de coleta de líquido ruminal para ensaios de digestibilidade *in vitro*. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 30, n. 3, p. 905–912, 2001.
- ARCURI, P. B.; et al. Coleta de líquido ruminal e suas implicações na avaliação da fermentação ruminal. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 40, p. 123–134, 2011.
- BERCHIELLI, T. T.; GARCIA, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudo de nutrição. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (org.). *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p. 583.

- BUXTON, D. R. Quality-related characteristics of forages as influenced by plant environment and agronomic factors. *Animal Feed Science and Technology*, v. 59, p. 37–49, 1995.
- DUFFIELD, T.; et al. Impact of rumen sampling location and method on ruminal pH and fermentation parameters. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 59–66, 2004.
- HARRISON, J. H. Rumen sampling techniques and effects on rumen fermentation parameters. *Journal of Dairy Science*, v. 78, p. 284–291, 1995.
- HENDERSON, G.; et al. Rumen microbial community composition varies with sampling technique. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, p. 5424–5432, 2013.
- HENDERSON, B. Ethical considerations in rumen fistulation of cattle. *Animal*, v. 15, n. 4, p. 100–108, 2021.
- HOLDEN, L. A. Comparison of methods of *in vitro* dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 1791–1794, 1999.
- LARSEN, M.; et al. Sampling technique affects rumen microbiota and fermentation characteristics. *Animal Feed Science and Technology*, v. 261, 114388, 2020.
- MERTENS, D. R. Regulation of forage intake. In: FAHEY JR., G. C. (Ed.). *Forage quality, evaluation, and utilization*. Madison: ASA, CSSA, SSSA, 1994. p. 450–493.
- MUIZELAAR, W.; et al. Rumen fluid sampling via stomach tube: effects on fermentation parameters and microbial composition. *Journal of Dairy Science*, v. 103, p. 255–268, 2020.
- OLIVEIRA, M. D. S.; et al. Comparação entre métodos de coleta de líquido ruminal para estudos *in vitro*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 22, n. 3, p. 404–412, 1993.
- PAZ, H. A.; et al. Rumen bacterial community composition in Holstein cows is unaffected by sampling method. *Journal of Dairy Science*, v. 99, p. 563–577, 2016.

- 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.
- WOLT, J. E.; et al. Effects of saliva contamination on rumen fluid samples collected by stomach tube. Journal of Animal Science, v. 42, p. 147–152, 1976.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o método de coleta do inóculo ruminal, seja por fístula ruminal ou por sonda esofágica, não influenciou os valores médios da digestibilidade *in vitro* da matéria seca dos volumosos avaliados, corroborando a hipótese inicialmente proposta. Independentemente do método de coleta, as estimativas de digestibilidade permaneceram dentro de faixas condizentes com a literatura, indicando que ambos os procedimentos, quando adequadamente padronizados, são capazes de fornecer inóculos funcionalmente comparáveis para ensaios de digestibilidade *in vitro*.

As limitações operacionais observadas durante o experimento, especialmente aquelas relacionadas à coleta por sonda esofágica, como maior tempo de coleta, maior exigência de mão de obra qualificada e influência das condições climáticas durante uma das rodadas, não comprometeram os resultados finais de digestibilidade. Dessa forma, conclui-se que ambos os métodos de coleta podem ser utilizados em ensaios de digestibilidade *in vitro* da matéria seca, desde que haja rigor metodológico e controle das condições de coleta e incubação. Contudo, a escolha do método deve considerar aspectos éticos e operacionais.