

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Ensaio de fermentação *in vitro* com aplicação de inóculo fecal equino**

**Bruna Caroline Franzan**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ENSAIO DE FERMENTAÇÃO *IN VITRO* COM APLICAÇÃO DE  
INÓCULO FECAL EQUINO**

**BRUNA CAROLINE FRANZAN**

*Sob a orientação do Professor*  
**Vinicius Pimentel Silva**

*e co-orientação do professor*  
**Fernando Queiroz de Almeida**

Dissertação submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**  
no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,  
área de concentração em Produção Animal.

Seropédica, RJ  
Julho de 2016

636.089601

F637e

T

Franzan, Bruna Caroline, 1991-

Ensaio de fermentação *in vitro* com aplicação de inóculo fecal equino / Bruna Caroline Franzan - 2016.

51 f.: il.

Orientador: Vinicius Pimentel Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Zootecnia.

Bibliografia: f. 29-34.

1. Microbiologia veterinária - Teses. 2. Equino - Fezes - Teses. 3. Fezes - Teses. 4. Fezes - Microbiologia - Teses. 5. Fermentação - Teses. 6. Excrementos de animais - Teses. 7. Gases - Teses. I. Silva, Vinicius Pimentel, 1981-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**Bruna Caroline Frazan**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de Concentração em Produção Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/07/2016



Vinicius Pimentel Silva Dr. UFRRJ  
(Orientador)



Maria Izabel Vieira de Almeida Dr. UFES



Irene da Silva Coelho Dr. UFRRJ

## DEDICATÓRIA

À Família 302

Ao meu companheiro Jack

“Nós, gatos, já nascemos pobres  
Porém, já nascemos livres”  
Por: Enriquez, Bardotti e Chico Buarque

À memória de Roberta Franca Guimarães

"Eu continuo aqui  
Meu trabalho e meus amigos  
E me lembro de você  
Dias assim, dias de chuva, dia de sol  
E o que sinto não sei dizer..."

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Lúcia, pelo amor e carinho de mãe, mas também por todo apoio durante anos que me dediquei à minha formação profissional. Por entender que a distância, as vezes, pode ser um mal necessário para o crescimento e evolução. Obrigada mãe por ser meu porto seguro.

Agradeço à UFRRJ, por ser meu lar por sete anos durante essa caminhada rumo ao meu sonho.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, por tornar possível a minha titulação.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro concedido durante dois anos em que estive me dedicando ao Mestrado.

Às Palatina, Fiona e Coelha, éguas de extremo valor experimental e emocional, me ensinaram muito, me fizeram aprender que adulto tem que gostar do trabalho que tem para sair bem feito. Éguas que me deram muito trabalho e ensinamentos, que sabiam da minha vida pessoal, que eram minhas psicólogas. Éguas que nas minhas mãos se foram mostrando o caminho para ser uma pessoa e pesquisadora melhor. A vocês, pessoas de quatro patas, meu muito obrigada.

Aos professores André Marques e Cristiane Cardoso, por serem tão bons no que fazem que cativam os discentes, que mostram caminhos e que viajam pelo bem do aluno. Em vocês achei inspiração no meu terceiro período para chegar onde estou, muito obrigada.

Obrigada aos técnicos Felipe e Marquinhos (Laboratório de bromatologia/IZ) por aguentarem todas as minhas dúvidas e ajudarem a resolver meus problemas de metodologia. Obrigada também aos técnicos Edilene, Roberto e Evandro, assim como a professora Rosa Luchese, pelos ensinamentos em microbiologia e pelo material concedido.

Agradeço aos funcionários do Setor de Garanhões, Jorginho, João, Vitor e Júnior, pela ajuda no manejo dos animais utilizados no experimento. E também a Fazenda Universitaria por ceder os animais que foram utilizados no experimento.

Ao Jarvis Colin por me socorrer no inglês.

À professora Elisa Modesto pelo incentivo passado durante as minhas duas apresentações de seminário, e também pelo empréstimo do transdutor de pressão, sem ele não haveria experimento.

À Equipe EQUILAB-LADEq tenho muito que agradecer, desde o Professor Coordenador da equipe até os IC's voluntários, que na escala dos urubus são os que sofrem mais... Claro que aqui vale lembrar os nomes de pessoas dessa equipe que muito me marcaram. De forma cronológica, agradeço ao Marcos Barreto Pereira, que mesmo sem muito tempo de convivência, me mostrou qualidades que um bom profissional deve ter, como companheirismo. Agradeço à Fernanda Taran, pelos momentos de desabafo. Agradeço à Fernanda Godoi, pela bicicleta (fator importante para conclusão do meu mestrado) e por todo ensinamento dentro e fora da sala de aula, em experimento. Mesmo que sem muita paciência, foi fundamental para meu desenvolvimento. Agradeço à Luana Avila, pelos bons e maus momentos em experimento, que me fez ver o limite do querer e da pesquisa. Aos meus estagiários/IC's que foram fundamentais para realização e conclusão do meu projeto de dissertação Talita, Tati, Gi, Conrado e Carol. Porém quero agradecer uma, duas, três, inúmeras vezes, o quanto for possível à Tati e a Gi por serem meus braços direito e esquerdo na execução do projeto, por serem companheiras da cerveja anti-estresse pós ensaio, por lembrarem de mim quando meu corpo já não reagia aos estímulos de ir trabalhar, por fazerem um trabalho bem feito, por serem profissionais e amigas comigo.

De forma mais especial, quero agradecer ao Prof. Dr. Fernando Queiroz de Almeida, pelo apoio financeiro, pela co-orientação e orientação, por gastar tempo comigo, por investir no meu trabalho e, por ter passado ensinamentos de trabalho em equipe que levarei para o resto da vida.

Ao Professor Orientador Vinicius Pimentel por ter acreditado na menina de menor CR presente no dia da seleção de IC, pela paciência, ensinamentos profissionais e acadêmicos, pela liberdade de ser orientada. Agradeço de coração a oportunidade de crescimento que me deu a quatro anos atrás, que dura até hoje e, que possivelmente seguirá para o futuro.

Agradeço ao meu querido e amado filho Jack. Meu pepetico, petrin, por ter mantido minha sobriedade em momentos de angústia, por ter me feito acordar de madrugada com medo pelos seus incríveis presentes, por brincar comigo e me fazer rir da sua carência.

À Alessandra de Sant'Anna Araújo pelo companheirismo e amizade dedicados a mim durante essa incrível e difícil jornada que é o Mestrado, por aguentar meus momentos de tensão, por ser compreensiva.

Aos meus amigos de graduação Vanessa, Livia, Gil e Guilherme por me fazerem querida no meio dessa selva chamada Seropédica.

A minha família 302, por me dar uma família, um aconchego, um calor humano. Principalmente, Pam, Camila, Cintia, Thaís e Roberta. Agradeço por fazerem parte da minha vida.

E por último e não menos importante, agradeço à Thérèsse Camille que me apoiou na reta final do meu trabalho, que me deu bons motivos para gargalhar e gargalhou comigo. Muito obrigada pelo amor e carinho.

## **BIOGRAFIA**

Bruna Caroline Franzan, filha de Moacir Franzan e Lúcia de Fátima Aguiar, nasceu no dia 13 de junho de 1991, na cidade de São Paulo. Ingressou na Escola Agrotécnica Federal de Muzambinho em 2006, formando-se em Técnico em Agropecuária no ano de 2008.

Iniciou sua graduação no Curso de Zootecnia da UFRRJ, em 2009, onde desenvolveu diversas atividades acadêmicas tendo sido Primeira Tesoureira do Diretório Acadêmico de Zootecnia, Monitora de Bioquímica e bolsista de Iniciação Científica, sob orientação do Prof. Vinicius Pimentel Silva. Graduou-se em Zootecnia no ano de 2014. Ainda em 2014 ingressou no Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na UFRRJ, sob orientação do Prof. Vinicius Pimentel Silva, obtendo o título de Mestrado em Zootecnia no ano de 2016.



## RESUMO

FRANZAN, Bruna Caroline. **Ensaio de fermentação *in vitro* com aplicação de inóculo fecal equino**. 2016. 51p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Este trabalho teve como objetivo utilizar as fezes de equinos como fonte de inóculo em ensaios de fermentação *in vitro* com alimentos volumosos. Utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso em arranjo fatorial 2x2. O primeiro fator foi o tempo de hidratação do substrato: 0 e 12 horas; e o segundo fator foi a diluição das fezes com solução nutritiva na relação (peso:peso): 1:1 e 1:3. Para as variáveis produção cumulativa de gases e degradação dos nutrientes o delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso em esquema de parcelas subdivididas, com o efeito tempo de incubação na subparcela. Três garanhões foram utilizados como doadores de fezes. Após 28 dias de adaptação à dieta e ao manejo, as fezes foram coletadas diretamente no reto dos animais. Após a coleta, as fezes foram misturadas com a solução nutritiva na relação (peso:peso): 1:1 e 1:3 e mantidas em banho maria a 39°C constantemente borrifadas com CO<sub>2</sub>. Após uma hora, o material foi filtrado e adicionou-se 10 mL de inóculo em frascos previamente preparados. Nos frascos de fermentação colocou-se 1 g do feno de Coastcross e, 90 mL de solução nutritiva adicionada no momento da inoculação ou 12 horas antes da inoculação. Avaliou-se a contagem bacteriológica 24 h após a inoculação, a degradação da matéria seca (DMS), matéria orgânica (DMO) e da fibra em detergente neutro (DFDN) nos tempos de 24, 48 e 72 h, o teor de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), pH e a produção cumulativa de gases até 72 h, a qual foi ajustada pelo modelo de regressão não linear unicompartmental. Os resultados foram submetidos à ANOVA 5% de significância, e as médias comparadas pelo teste SNK à 5%. Não houve efeito significativo dos fatores hidratação e diluição na DMO, DFDN, N-NH<sub>3</sub> e na concentração de *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, bactérias celulolíticas e bactérias anaeróbias totais. Houve efeito da diluição no pH final e efeito da hidratação na DMS. Houve interação entre o tempo de incubação e o tempo de hidratação do substrato na produção cumulativa de gases, com valores apresentando diferença significativa a partir de oito horas pós incubação. Não houve ajuste adequado ao modelo proposto, pois o parâmetro L não foi significativo. A hidratação do feno de Coastcross disponibilizou nutrientes solúveis para o desenvolvimento inicial dos microrganismos, reduzindo o período de fase lag de 2,32 para 0,24 h. Conclui-se que a hidratação do substrato volumoso desidratado é uma estratégia que aumenta o volume de gases provenientes da fermentação do substrato e a degradação da matéria seca, além disso, reduz o período de fase lag.

**Palavras-chave:** gases, microrganismos, volumoso.

## ABSTRACT

FRANZAN, Bruna Caroline. **In vitro fermentation assays with the application of equine faecal inoculum.** 2016. 51p. Dissertation (Master Science in Animal Science). Animal Science Institute. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

This study aimed to evaluate the feces of horses as an inoculum source to apply to in vitro fermentation tests when roughage is used as the substrate. The design was completely randomized in a 2x2 factorial arrangement. The first factor is hydration time of the substrate: 0 and 12 hours; and the second factor evaluated was the feces dilution with nutritive solution (weight: weight): 1:1 and 1:3. The variables cumulative gas production and degradation of nutrients the design was completely randomized in split plots, with the effect of incubation time as subplots. Three stallions were used as feces donors. After 28 days of adaptation to the diet and management, the feces were collected directly from the rectum of animals. After collection, the feces had been mixed with the nutritive solution in the ratio (weight:weight): 1:1 and 1:3 and kept in a water bath at 39 ° C constantly sprayed with CO<sub>2</sub>. After one hour, the material was filtered and 10 ml of inoculum had been added to previously prepared bottles. The fermentation bottles were prepared as follows: put 1 g of Coastcross hay and 90 ml of nutritive solution was added at the moment of inoculation or 12 hours before inoculation procedure. The variables bacteria count after 24 h of inoculation, the dry matter degradation (DMD), the organic matter degradation (OMD) and the neutral detergent fiber degradation (NDFD) at 24, 48 and 72 h of fermentation, as well the ammonia nitrogen content (NH<sub>3</sub>-N), pH and the cumulative gases production over 72 h had been evaluated. The nonlinear regression model adjusted the cumulative gases production. The results were submitted to ANOVA 5%, and the averages compared by SNK test at 5%. There was no significant effect of hydration and dilution factors in OMD, NDFD, NH<sub>3</sub>-N and the concentration of *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., cellulolytic bacteria and total anaerobic bacteria. The significant dilution effect in the pH was observed and the significant hydration effect in DMD. The interaction between incubation time and the hydration time of the substrate was detected over the cumulative gases production, with values significantly different starting at eight hours of incubation until the end of process. There was no proper fit to the proposed model, since the L parameter was not significant. The soluble nutrients of the Coastcross hay became available due to the hydration process, therefore, has used for the initial development of the microorganisms reducing the lag phase period of 2.32 (without hydration) to 0.24 h. In conclusion, the hydration of the dehydrated substrate is a strategy that increases the fermentation substrate extension and degradation of dry matter. Moreover, lag phase time was reduced.

**Keywords:** gas, microorganisms, roughage

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Composição bromatológica do concentrado e do feno de Coastcross na matéria seca .....	10
<b>Tabela 2.</b>	Degradação da matéria orgânica (%) do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 24, 48 e 72 horas de fermentação (n=60) .....	16
<b>Tabela 3.</b>	Degradação da fibra em detergente neutro (%) do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas de hidratação antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 24, 48 e 72 horas de fermentação (n=60) ..	17
<b>Tabela 4.</b>	Degradação da matéria seca (%) do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 24, 48 e 72 horas de fermentação (n=60) .....	17
<b>Tabela 5.</b>	Valores médios de produção de gases (mL/g MS) até 72 horas de fermentação do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação .....	19
<b>Tabela 6.</b>	Coefficiente de determinação (R <sup>2</sup> ) e parâmetros do modelo: volume de gases produzidos (V), taxa de fermentação (k) e fase lag (L) ajustados para o feno de Coastcross hidratados no tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 72 horas de fermentação .....	22
<b>Tabela 7.</b>	Período de fase lag (h) da fermentação do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação .....	23
<b>Tabela 8.</b>	Valores de pH na fermentação do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 72 horas de fermentação (n=20) .....	24
<b>Tabela 9.</b>	Nitrogênio amoniacal (mg/dL) na fermentação do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 72 horas de fermentação (n=20) .....	24
<b>Tabela 10.</b>	Contagem de <i>Lactobacillus spp.</i> (UFC/mL) do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 24 horas de fermentação (n=20) .....	25
<b>Tabela 11.</b>	Contagem de <i>Streptococcus spp.</i> (UFC/mL) do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 24 horas de fermentação (n=20) .....	25

<b>Tabela 12.</b>	Contagem de bactérias celulolíticas do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 24 horas de fermentação (n=20) .....	26
<b>Tabela 13.</b>	Contagem de anaeróbios totais do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 24 horas de fermentação (n=20) .....	26

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Frasco de fermentação com substrato hidratado imediatamente antes da inoculação .....	11
<b>Figura 2.</b>	Diluição seriada para anaerobios totais com diferentes cores após incubação .....	13
<b>Figura 3.</b>	Degradação parcial de papel filtro de celulose após 14 dias de incubação com resíduo da fermentação .....	14
<b>Figura 4.</b>	(a) <i>Lactobacillus spp.</i> em meio MRS,; (b) <i>Streptococcus spp.</i> , em meio Azida Bile Esculina .....	14
<b>Figura 5.</b>	Curva de produção cumulativa de gases do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 72 horas de fermentação .....	20
<b>Figura 6.</b>	Curva de produção cumulativa de gases do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação .....	21

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b>	Quantidade de substrato, tamanho médio das partículas e preparo do inóculo fecal em diferentes estudos com equinos .....	03
<b>Quadro 2.</b>	Análise de variância dos resultados da produção cumulativa de gases e da degradação de nutrientes .....	15

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AGV – Ácido graxo voláteis  
AOAC – Association of Official Analytical Chemistry  
Cel – Celulose  
CH<sub>4</sub> – Metano  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono  
CV – Coeficiente de variação  
D – Diluição  
EB – Energia Bruta  
EE – Extrato Etéreo  
DFDN – Degradação da Fibra em Detergente Neutro  
DMO – Degradação da Matéria Orgânica  
DMS – Degradação de Matéria Seca  
FDA – Resíduo insolúvel e detergente ácido  
FDN – Fibra insolúvel em detergente neutro  
FDNom – Fibra em detergente neutro corrigida para matéria orgânica  
g/Kg – Grama por Kilograma  
H – Hidratação  
Hem – Hemiceluloses  
H0 – Sem hidratação  
H12 – Hidratação por 12 horas  
H0D1 – Substrato sem hidratação inoculado com fezes diluídas 1:1 (peso:peso)  
H0D3 – Substrato sem hidratação inoculado com fezes diluídas 1:3 (peso:peso)  
H12D1 – Substrato hidratado por 12 horas inoculado com fezes diluídas 1:1 (peso:peso)  
H12D3 – Substrato hidratado por 12 horas inoculado com fezes diluídas 1:3 (peso:peso)  
h<sup>-1</sup> – Por hora  
k – Taxa (passagem ou fermentação)  
KOH – Hidróxido de Potássio  
L – Tempo de Latência  
Lig – Lignina  
M – Molar  
mL/g – Mililitro por grama  
MM – Matéria mineral  
MO – Matéria Orgânica  
MS – Matéria Seca  
N – Nitrogênio  
N-NH<sub>3</sub> – Nitrogênio amoniacal  
NS – Não significativo  
p valor – Valor de significância  
PB – Proteína Bruta  
R<sup>2</sup> – Coeficiente de determinação  
SAEG – Sistema de Análises estatísticas e genéticas  
SNK – Student Newman Keuls  
t – Tempo  
TMR – Tempo Médio de Retenção  
UFC – Unidade formadora de colônia  
UFC/mL – Unidade formadora de colônia por mililitro  
% - Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	02
2.1 A Técnica de Produção de Gases <i>in vitro</i> com Equinos .....	02
2.2 Características do Ambiente Fermentativo <i>In Vivo</i> e <i>In Vitro</i> do Trato Digestório dos Equinos .....	04
2.3 A Fase Lag .....	05
2.4 Características Bacteriológicas do Inóculo Fecal .....	07
2.4.1 Atividade fermentativa do inóculo fecal .....	08
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	10
3.1 Local .....	10
3.2 Animais e Dieta .....	10
3.3 Análises Bromatológicas .....	10
3.4 Desenho Experimental .....	11
3.5 Fermentação <i>in vitro</i> .....	11
3.6 Procedimentos de Avaliação da Degradação dos Nutrientes .....	12
3.7 Análise de pH .....	12
3.8 Análise de Nitrogênio Amoniacal .....	12
3.9 Contagem Bacteriológica .....	13
3.10 Análises Estatística .....	14
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	16
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	28
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	29
<b>7 ANEXO</b> .....	35
A – Protocolo da Comissão de Ética no Uso Animal.....	35
B – Relatórios de Saída do Programa SAEG .....	38



# 1 INTRODUÇÃO

Inicialmente desenvolvida para estudos de fermentação em ruminantes (RYMER et al., 2005), a técnica de produção de gases *in vitro* tem sido considerada uma importante ferramenta em estudos de nutrição de equinos, no que se refere à avaliação da cinética de degradação de alimentos, à capacidade fermentativa de inóculos, e os efeitos da dieta e do uso de aditivos sobre a microbiota intestinal em alternativa aos estudos *in vivo* (MURRAY et al., 2006ab, 2009; SILVA et al., 2010ab; SANTOS et al., 2012; LAHO et al., 2013; ELGHANDOUR et al., 2014).

As fezes são utilizadas nos ensaios de fermentação como alternativa ao inóculo proveniente do ceco e cólon. Porém, estudos indicam que as fezes possuem menor capacidade fermentativa quando comparadas a outras fontes de inóculos equinos, e resultam em um maior período de fase lag (MURRAY et al., 2014). Adicionalmente, as diferentes técnicas usadas no preparo do inóculo fecal em diferentes estudos podem gerar diferenças nos resultados, dificultando as comparações.

A modelagem matemática dos resultados pode oferecer uma abordagem alternativa complementar aos estudos de fermentação *in vitro* (MOULD et al., 2005). Porém, os modelos propostos provenientes da nutrição de ruminantes podem não se ajustar a fermentação *in vitro* que tem como inóculo as fezes equinas, pois as estimativas dos parâmetros dos modelos, tais como a taxa de fermentação ( $k$ ) e volume total de gases ( $V_f$ ) sofrem influência do período de fase lag.

Atualmente, não existe padronização da técnica de produção de gases nos estudos de fermentação com equinos que utilizem fezes como inóculo. Além disso, há carência na literatura de estudos que considerem o ambiente fermentativo *in vitro*, onde sejam mensurados os parâmetros e produtos da fermentação e sua influência na população microbiana. Desse modo, é proposto um estudo que leve em consideração o preparo do inóculo e o tipo de substrato utilizado, objetivando a padronização da técnica de produção de gases *in vitro* para estudos de fermentação em equinos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A fermentação que ocorre no ceco e cólon dos equinos é fundamental para obtenção de energia. Os ensaios *in vitro* são uma forma prática para estudar esse evento biológico. Nestes casos, existe a necessidade de uma amostra representativa de microrganismos provenientes do local onde ocorre a fermentação. A obtenção do inóculo oriundo da câmara fermentativa tem sido feita através de animais fistulados ou da eutanásia do animal. Uma fonte alternativa de inóculo para ensaios de fermentação com equinos é a utilização das fezes frescas (MURRAY et al., 2014).

Nos últimos anos o interesse no bem-estar dos animais utilizados em pesquisas e ensino cresceu no Brasil. A realização de qualquer ensaio que utilize animais vertebrados vivos depende da autorização prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais da instituição vinculada a pesquisa e deve se adequar as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), de acordo com a Lei Federal 11.794 de 2008.

O bem-estar pode ser definido como o estado do indivíduo em relação às suas tentativas de adaptar-se ao seu ambiente. Doenças, traumatismo, fome, estimulação benéfica, interações sociais, condições de alojamento, manejo, transporte, impossibilidade de exercitar, procedimentos laboratoriais, entre outros fatores, tem efeito sobre o bem-estar animal.

Segundo Broom e Molento (2004) valores éticos não provê uma base científica do bem-estar animal, desse modo, a avaliação do bem-estar animal deve ser realizada de forma completamente separada de considerações éticas. Entretanto, os resultados apresentados em uma pesquisa podem ser levados em consideração para tomada de decisões éticas.

De acordo com as normas do CONCEA, cabe aos pesquisadores a análise crítica da real necessidade do uso de animais em situações experimentais, a percepção do custo/benefício da pesquisa, do valor intrínseco dos resultados pretendidos, assim como o uso alternativo de técnicas que reproduzam o mesmo resultado (CAMPOS et al., 2016).

### 2.1 A Técnica de Produção de Gases *in vitro* com Equinos

A técnica de produção de gases *in vitro* foi desenvolvida inicialmente para prever a degradação dos alimentos para ruminantes. Ao longo dos anos, a técnica foi aprimorada e adaptada conforme foram identificadas as fontes de variação do perfil de produção de gases (RYMER et al., 2005).

As técnicas de fermentação *in vitro* possuem vantagens em relação aos estudos *in vivo*. Podendo destacar as condições padronizadas de fermentação, o tempo de fermentação definidos, a capacidade de mensuração dos produtos finais e o menor custo (SUNVOULD et al., 1995).

Segundo Coles et al. (2005), a técnica *in vitro* tem que ser passível de reprodução em vários laboratórios, permitindo que os resultados sejam comparados. Se não for possível, existe pouca possibilidade de que a técnica possa ser usada como um método padrão em uma escala global.

As principais fontes de variação no perfil de produção de gases são a agitação do meio, o equipamento utilizado para mensurar a produção de gás, a pressão do recipiente de fermentação, a capacidade tampão do meio, a amostra (peso e tamanho de partícula) e seu preparo, e por último o inóculo (RYMER et al., 2005).

É bem relatado na literatura como a composição bromatológica do substrato utilizado em ensaios de fermentação tem influência na produção total de gases (MURRAY et al., 2006b, ELGHANDOUR et al., 2014), mas outros fatores inerentes ao substrato como o tamanho da

amostra, o tamanho de partícula e a forma que se apresenta o substrato podem influenciar os parâmetros da fermentação (Quadro 1).

O aumento da quantidade de substrato resulta em um aumento linear do volume total de gases, mas a taxa de produção de gases não é afetada (THEODOROU et al., 1994). O tamanho da amostra usada pode variar entre estudos. Amostras de menor peso podem levar a erros experimentais na pesagem de amostras heterogêneas. No entanto, amostras de maior peso podem exceder a capacidade tampão do meio nutritivo utilizado, além disso, podem aumentar a pressão acumulada afetando o desenvolvimento microbiano (RYMER et al., 2005).

O tamanho de partícula de substratos facilmente degradáveis não afeta as estimativas da taxa de produção de gases. No entanto, com alimentos fibrosos, a taxa de produção de gases aumenta à medida que diminui o tamanho de partícula (LOWMAN et al., 2002). Esse fato pode ser consequência da maior área de superfície, como resultado da moagem, permitindo maior acesso dos microrganismos.

**Quadro 1.** Quantidade de substrato, tamanho médio das partículas e preparo do inóculo fecal em diferentes estudos com equinos

Amostra (mg)	Partícula (mm)	Preparo do inóculo	Referência
1000	1	1:2 fezes congeladas:solução nutritiva (peso:peso) homogeneizadas por 20 segundos	Murray et al. (2009)
450	Não descrito	1:3 fezes:solução nutritiva (peso:volume) homogeneizadas por 1 h a 39°C. O tempo de transporte de 1h entre a coleta e o laboratório.	Desrousseaux et al. (2012)
1000	Não descrito	1:1 fezes:solução nutritiva (peso:peso)	Murray et al. (2006b)
600	1	1:1 fezes:solução nutritiva (peso:peso)	Murray et al. (2014)
1000	1	1:4 fezes:solução nutritiva (peso:peso)	Elghandour et al. (2014)

Segundo Lowman et al. (2002), o perfil de produção de gases do azevém *in natura* e seco ao forno (60°C) difere, sugerindo que a secagem da amostra altera ou danifica a estrutura do substrato de tal forma que a ligação microbiana se torna mais fácil, facilitando assim a fermentação, isto é, resultando num aumento da produção de gases. Porém, isso não ocorre em substratos volumosos naturalmente secos, que é o caso de fenos (RYMER et al., 2005).

A hidratação das amostras com meio nutritivo antes da inoculação causa o aumento no volume de gases produzidos e induz o aparecimento de uma segunda fase da produção de gases (RYMER et al., 1999). A hidratação prévia do substrato de 6 horas causou redução no tempo para produção da metade do volume total de gases, e aumento na taxa de produção de gases. No entanto, houve pouca diferença na produção de gases quando o tempo de hidratação aumentou de 6 para 48 h, sugerindo um tempo mínimo de seis horas de hidratação (RYMER et al., 1999).

O aumento da proporção de inóculo no meio de incubação aumenta o volume de gases produzidos, bem como a sua taxa de produção e, por sua vez, diminui o período da fase Lag (PELL e SCHOFIELD, 1993). No entanto, é necessário somente o mínimo de atividade microbiana, para que o inóculo não seja limitante na produção de gases e que de preferência seja mensurado antes da inoculação (RYMER et al., 2005).

Nagadi et al. (2000) consideraram que a atividade microbiana mínima de 94 mg de MS bacteriana/mL, o que corresponde a absorvância de 0,111 (quando diluído 50 vezes) ou um

volume de gás do “branco” de 15,5 mL (quando volume total de incubação foi de 30 mL). Porém, essa recomendação foi desenvolvida com líquido ruminal e não há recomendações para inóculo equino, especialmente fezes.

## 2.2 Características do Ambiente Fermentativo *In Vivo* e *In Vitro* do Trato Digestório dos Equinos

O ambiente fermentativo criado pela técnica de produção de gases *in vitro* se assemelha ao que ocorre *in vivo*. Assim, é necessário que o meio tenha aporte de nutrientes, seja tamponado, anaeróbio, que possua microrganismos representativos ao encontrado na câmara fermentativa (inóculo) e que o conjunto substrato/inóculo/meio nutritivo seja mantido a 39°C (MOULD et al., 2005).

Os nutrientes dos alimentos não digeridos no intestino delgado (15% de amido, de 5% a 10% de extrato etéreo, 10% a 70% de proteínas, 85% a 95% de carboidratos da parede celular) são fermentados por uma população microbiana do intestino grosso, que resulta na produção de ácidos graxos voláteis (AGV), metano, gás hidrogênio, dióxido de carbono, amônia (NH<sub>3</sub>), massa microbiana e calor (SANTOS et al., 2011).

Algumas bactérias podem usar proteínas como fonte de energia na ausência de carboidratos fermentescíveis, resultando na formação de NH<sub>3</sub>, aminas e amidas. No entanto, as bactérias podem utilizar NH<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio para o seu crescimento, desde que existam esqueletos de carbono suficientes e energia (BAUER et al., 2004; COLES et al., 2005; SANTOS et al., 2011).

O nitrogênio disponível para a microbiota é fornecido por proteínas dietéticas que chegam ao intestino grosso, pela reciclagem de ureia e pela proteína endógena da descamação celular ou de secreção no lúmen (SANTOS et al., 2011).

Em estudo para determinar a preferência por fontes proteica ou não proteica e a exigência de nitrogênio dos microrganismos presentes no ceco, Santos et al. (2012) utilizaram níveis crescentes de duas fontes de nitrogênio, caseína e ureia. Observaram que a fermentação com caseína como fonte exclusiva de nitrogênio (N) foi caracterizada por menor concentração total de AGV, nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), produção total de gases e maior rendimento de proteína microbiana, concluindo que há um possível mecanismo de compensação da população microbiana para um ambiente onde o N protéico é limitante, promovendo assim, a produção de AGV em detrimento da síntese de proteína microbiana.

Os AGV produzidos no intestino grosso através da fermentação contribuem com 60% a 70% da energia absorvida pelos equinos (NRC, 2007). A proporção da concentração dos AGV varia de acordo com o substrato e a atividade fermentativa presente no intestino grosso. Grimm et al. (2016) estudando os parâmetros fecais dependentes da dieta observaram que o pH e o conteúdo de água das fezes decrescem com o aumento da proporção de alimento concentrado na dieta, e que não há diferença na concentração dos AGV totais. Entretanto, a proporção entre acetato, propionato e butirato é alterada. A dieta contendo somente alimento volumoso apresentou maior proporção de acetato (71%) e menores proporções de propionato (19,8%) e butirato (5,1%), comparada a dieta com relação volumoso:concentrado de 55:45, que apresentou menor teor de acetato (68%) e maiores teores de propionato (22,2%) e butirato (6,2%).

Os AGV são rapidamente absorvidos através do epitélio do cólon, evitando que o conteúdo do local se torne ácido (MCBURNEY e VAN SOEST, 1991). Em sistemas *in vitro*, a natureza ácida dos AGV produzidos durante a fermentação faz com que o pH reduza rapidamente, pois não há mecanismos de remoção desses produtos. Para que isso não aconteça, deve haver a inclusão de um tampão no sistema de fermentação (COLES et al., 2005).

Murray et al. (2009) observaram diferentes valores do pH final em ensaio de fermentação *in vitro*, utilizando como inóculo as fezes de animais saudáveis e de animais predispostos a laminite com valores de 6,89 e 6,50, respectivamente. Entretanto, não observaram diferenças significativas na concentração de AGV totais. Desrousseaux et al. (2012) não observaram efeito nos valores de pH, mas observaram diferenças nas concentrações acetato, butirato e propionato nos diferentes tempos de coleta estudados. Ambos os autores não explicaram as diferenças dos resultados de pH e concentração de AGV, desse modo, mais estudos são necessários para entender o metabolismo do ecossistema fermentativo de equinos.

O substrato fermentado em ensaios *in vitro* é outro fator que influencia o pH final do resíduo de fermentação. Substratos volumosos resultam em pH mais elevado do que substratos concentrados, como grãos de cereais (DESROUSSEAU et al., 2012).

Garber et al. (2016) avaliaram o efeito da capacidade tampão da alfafa na fermentação *in vitro* de amido e inulina (frutanas) utilizando fezes de equinos como fonte de inóculo. Os autores observaram o valor de pH de 6,1 quando o amido foi a única fonte de substrato. Entretanto, após 45 e 50 horas de incubação, o ensaio com 400 mg de alfafa apresentou pH de 6,7. No ensaio que utilizou a inulina como única fonte de substrato observou-se pH de 5,1, enquanto a substituição da inulina por 400 mg de alfafa manteve valores de pH entre 6,7 e 7,5. Os autores concluíram que a substituição de inulina ou amido por 40% de alfafa manteve os valores de pH com níveis fisiológicos semelhantes aos observados *in vivo* no intestino grosso de equinos. O valor de pH está relacionado com a manutenção da população microbiana e, conseqüentemente, a manutenção da saúde do trato gastrointestinal (ARGENZIO, 1990).

Em uma revisão, Rymer et al. (2005) relatam que a quantidade de substrato não afeta a taxa de produção de gases, desde que haja capacidade de tamponamento suficiente no meio. Em estudos *in vitro* são utilizadas soluções nutritivas contendo tampões para que a fermentação não seja inibida pelo acúmulo dos produtos finais do metabolismo microbiano.

Zeyner et al. (2004) descreveram a capacidade tampão das fezes como um indicador da atividade microbiana no intestino grosso. Os autores estudaram a influência do consumo de volumoso e a sequência de alimentação sobre esse fator e verificaram que há variação da capacidade tampão das fezes entre animais, entre a sequência de alimentação e com aumento do consumo de feno. Os animais que consumiam maior proporção de feno, e quando o feno era ofertado antes do alimento concentrado apresentavam maior capacidade tampão.

A extensão da fermentação pode ser medida através da concentração de produtos finais, como a concentração de AGV ou de produção de gases, mas também pela degradação do substrato, através da degradação da matéria seca, matéria orgânica e, até mesmo, a degradação da fração fibrosa (COLES et al., 2005).

Silva et al. (2010) utilizaram a técnica de degradação *in situ* cecal, para avaliar a degradação de matéria seca e da fibra em detergente neutro de sete alimentos volumosos, entre eles, o feno de Coastcross (*Cynodon spp.* cv Coastcross). A degradação da matéria seca (DMS) do feno de Coastcross foi de 47,1% após 48 horas de incubação, e a fibra em detergente neutro potencialmente degradável de 34,3%, foi inferior em comparação com os outros volumosos avaliados. Os autores sugeriram que a composição do volumoso teve efeito sobre a degradação cecal da MS. Além disso, a deposição de lignina que ocorre em gramíneas poderia ter influenciado a degradação da fibra em detergente neutro (DFDN).

### 2.3 A Fase Lag

Os perfis de degradação obtidos a partir de estudos *in vitro*, em geral exibem um padrão de forma sigmoide. Este padrão é caracterizado por um período sem fermentação suave (fase lag) seguido por um crescimento exponencial que desacelera e atinge uma fase assintótica (VIEIRA et al., 2008a).

Na fase lag, a população microbiana multiplica-se e coloniza o substrato para formar o biofilme. O biofilme atua na digestão de componentes alimentares insolúveis, pois é um processo de superfície, e a sua formação se dá pela produção e secreção de glicosiltransferases, enzimas responsáveis pela síntese de exopolissacarídeo a partir de sacarose (GROOT et al., 1996; VIEIRA et al., 2008a; JANS et al., 2015). Além disso, a sua formação parece ser dependente de restrições físicas do material fibroso e da solubilização de agentes inibidores do crescimento microbiano. Por sua vez, a solubilização depende de hidratação das partículas fibrosas. A hidratação das partículas também parece ser um passo limitante porque as enzimas atuam em ambientes aquosos (VIEIRA et al., 2008a).

Para a obtenção de inóculo cecal ou do cólon são necessários animais cirurgicamente modificados ou eutanasiados. Nesse sentido, tem aumentado o número de pesquisas utilizando as fezes equinas como alternativa de fonte de inóculo (DESROUSSEAU et al., 2012; MURRAY et al., 2012; 2014). No entanto, há estudos que demonstram que a utilização das fezes como inóculo são menos eficientes, pois resultam em maior fase lag do que inóculos provenientes do ceco e cólon (MURRAY et al., 2014).

Uma explicação plausível para o maior período de fase lag é erro metodológico aplicado nos estudos, que poderia estar envolvido com o preparo do inóculo ou da amostra (BUENO et al., 2005; MOULD et al., 2005). Na maioria dos estudos, a metodologia utilizada para incubação foi uma modificação da técnica descrita por Theodorou et al. (1994). Porém, os autores desenvolveram a técnica utilizando líquido ruminal como fonte de inóculo. Nos estudos de fermentação com equinos que utilizam inóculo fecal, as fezes são diluídas com o meio de cultura, em diferentes proporções (MURRAY et al., 2014; ELGHANDOUR et al., 2014).

Em seus estudos, Murray et al. (2006a) observaram períodos de fase lag curtos, entretanto, o substrato utilizado foi polpa de beterraba *in natura* que é rica em carboidratos rapidamente fermentescíveis, dessa forma, por possuir nutrientes disponíveis, os microrganismos se desenvolveram mais rapidamente, caracterizando a influência da composição bromatológica do substrato sobre o período de fase lag. Elghandour et al. (2014) verificaram em forrageiras de clima tropical, com maiores teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), um período maior de fase lag.

O período de fase lag pode ser influenciado por vários fatores, entre eles a espécie doadora de inóculo (SUNVOLD et al., 1995), concentração de microrganismos (RYMER et al., 2005), atividade fermentativa dos microrganismos (MURRAY et al., 2006b), tipo de substrato fermentado, assim como sua composição bromatológica (MURRAY et al., 2006a; ELGHANDOUR et al., 2014), a dieta do animal doador (MURRAY 2006b) e a local de origem inóculo (MURRAY et al., 2014).

Sunvold et al. (1995), comparando a capacidade fermentativa do inóculo fecal de várias espécies animais (cães, gatos, equinos, humanos e suínos) em sistema de fermentação *in vitro*, demonstraram que a degradação de matéria orgânica e a produção de ácidos graxos voláteis (AGV) foram menores quando incubados com fezes equinas após 6, 12 e 24 h. No entanto, após 48 h de incubação, a produção de AGV e a degradação de matéria orgânica, entre fezes equinas e de outras espécies tenderam a se igualar, sugerindo assim, que a comunidade microbiana fecal dos equinos tem um período de fase lag maior em comparação com outras espécies animais avaliadas no estudo.

Elghandour et al. (2014) avaliaram nove diferentes fontes de fibra e observaram que o conteúdo de FDN e FDA do substrato influenciou o perfil de produção de gases, assim como a fase lag, que apresentou valores entre 1,32 e 2,73 h. Como estratégia para aumentar a eficiência fermentativa da parede celular do substrato e, conseqüentemente, diminuir o período de fase lag, os autores suplementaram o meio nutritivo com *Saccharomyces cerevisiae*, aumentando a concentração de microrganismos incubados.

Para avaliar o efeito da dieta na capacidade fermentativa *in vitro* do inóculo fecal equino, Murray et al. (2006b) incubaram dois tipos de substratos (um rico em amido e o outro, um substrato fibroso), com o inóculo fecal distintos provenientes de dois grupos de animais alimentados com as duas dietas, de alto e baixo teor de amido e não observaram diferença no período de fase lag do substrato fibroso, independente da fonte de inóculo. Entretanto, observaram maior período de fase lag no substrato rico em amido incubado com inóculo de animais alimentados com uma dieta com baixo teor de amido, sugerindo assim, que para a fermentação de substratos ricos em carboidratos hidrolisáveis há necessidade de um período de adaptação dos microrganismos à dieta. Adicionalmente, o mesmo estudo, os autores utilizaram o inóculo proveniente de oito animais e demonstraram que há diferenças no tempo de início do processo de fermentação entre animais alimentados com a mesma dieta, sugerindo a importância da utilização de um número maior de unidades experimentais doadoras de inóculos.

## 2.4 Características Bacteriológicas do Inóculo Fecal

O intestino equino possui em sua microbiota protozoários, bactérias, fungos, arqueas, vírus e apresenta características favoráveis à atividade microbiana: pH próximo do neutro, ambiente anaeróbio, temperatura média de 39°C, agitação e fornecimento constante de substrato. Por isso, é considerado um local de intensa atividade microbiana, em especial a degradação e fermentação de carboidratos estruturais em produtos usados diretamente pelo hospedeiro para as suas necessidades energéticas de manutenção e produção (BOURGETEAU e JULLIAND, 2012).

As bactérias podem ser classificadas de acordo com seu metabolismo. As bactérias avaliadas no ceco e cólon equino são classificadas como proteolíticas, amilolíticas, glicolíticas, celulolíticas, hemicelulolíticas, pectinolíticas e utilizadoras de lactato, demonstrando grande diversidade no intestino grosso de equinos (JULLIAND e GRIMM, 2016). Nos diferentes segmentos anatômicos do intestino grosso dos equinos há diferenças quanto à população microbiana e, conseqüentemente, na capacidade fermentativa (JULLIAND et al., 2001).

Segundo Santos et al. (2011) o crescimento microbiano no ambiente fermentativo ceco e cólon é dependente de fonte de energia e nitrogênio. Desse modo, há evidências de que as fezes contenham menor número de microrganismos viáveis visto que há falta de nutrientes para o seu desenvolvimento. Um argumento desfavorável às técnicas de fermentação *in vitro* que propõem a utilização das fezes como fonte de inóculo é a de que a microbiota fecal pode não ser aquela encontrada em outras áreas do trato digestivo (SUNVOLD et al., 1995). Julliard e Grimm (2016) relataram que a população bacteriana fecal deve ser utilizada para estimar apenas a composição bacteriana do cólon dorsal e cólon menor devido a sua similaridade.

Bourgeteau e Julliard (2012) demonstraram diferenças entre as concentrações de diferentes grupos de bactérias nos segmentos do intestino grosso (ceco e cólon) e nas fezes. No ceco e no cólon, a concentração total de bactérias (aeróbicas e anaeróbicas) foi estimada entre  $10^7$  e  $10^9$  UFC/mL, e a concentração de bactérias anaeróbicas totais encontra-se dentro da mesma faixa de valores (BOURGETEAU e JULLIAND, 2012). Em equinos alimentados com dietas ricas em concentrado, há aumento na concentração de bactérias anaeróbicas totais, particularmente devido ao aumento dos microrganismos amilolíticos (De FOMBELLE et al., 2001; JULLIAND et al., 2001).

A concentração de *Lactobacillus ssp.* observada nas fezes difere das concentrações observadas no conteúdo do ceco e cólon. As fezes apresentam amplitude de valor entre  $10^5$  a  $10^9$  UFC/g, enquanto que no ceco e cólon os valores estão entre  $10^5$ - $10^7$  e  $10^5$ - $10^8$  UFC/g, respectivamente. A concentração de *Streptococcus ssp.* observados nas fezes de  $10^5$ - $10^8$  UFC/g diferem dos valores observados nos conteúdos do ceco e do cólon com valores entre  $10^5$ - $10^7$  e  $10^4$ - $10^7$  UFC/g, respectivamente (BOURGETEAU e JULLIAND, 2012).

As bactérias dos gêneros *Streptococcus* e *Lactobacillus* são as principais utilizadoras de amido e ambas apresentam desenvolvimento estimulados por carboidratos rapidamente fermentescíveis em pH baixo. O aumento destas populações amilolíticas está associada com a acumulo de lactato, o principal produto final da sua fermentação (DROGOUL et al., 2001; JULLIAND et al., 2001).

As bactérias celulolíticas apresentam valores observados nas fezes entre  $10^4$ - $10^5$  UFC/g. No conteúdo do ceco e cólon apresentam valores de  $10^4$ - $10^7$  e  $10^4$ - $10^8$  UFC/g, respectivamente (BOURGETEAU e JULLIAND, 2012). De Fombelle et al., (2003) relatam que esses valores encontrados nas fezes são dependentes da dieta e similares ao observado no ceco ou cólon. Esse grupo de bactérias tem a capacidade de degradar a fibra vegetal (BARUC et al., 1983) e foram classificados com referência à sua contribuição específica: fibrolítica, celulolítica, xilanolítica, dextrinolítica, amilolítica e glicolítica. No segmento do intestino grosso, pode-se dividir a população microbiana em duas fases: a fase líquida, colonizada por bactérias e zoósporos; e a fase sólida, constituída pelas bactérias aderidas às partículas. Nos conteúdos do ceco e do cólon, as bactérias ligadas às partículas são responsáveis, principalmente, pelas polissacaridasas envolvidas na degradação da fibra (JOUANY et al., 2009). O aumento da relação volumoso:concentrado é geralmente benéfico para a *pool* de bactérias associadas às partículas. Entretanto, o aumento da proporção de concentrado aumenta a quantidade de bactérias da fase líquida, que tem predominância de bactérias amilolíticas (SANTOS et al., 2011).

Existem vários fatores que podem afetar a diversidade do ecossistema microbiano do intestino grosso de equinos, como o tipo genético, individual, idade, período do ano, o estresse do transporte, exercício físico de longa duração, o regime alimentar (composição e frequência da dieta) e doenças digestivas. Porém, a microbiota fecal equina é estável ao longo do tempo para o mesmo indivíduo consumindo uma dieta fixa (SADET-BOURGETEAU et al., 2012).

Estudos relatam que uma dieta rica em amido acarreta no aumento da concentração de estreptococos no ceco e no cólon, e na concentração de lactobacilos no ceco, cólon e fezes (FOMBELLE et al., 2001; JULLIAND et al., 2001). Além disso, o aumento da proporção de concentrado na dieta pode induzir um aumento da concentração de bactérias utilizadoras de lactato e uma redução na concentração de bactérias celulolíticas no ceco e cólon (JULLIAND et al., 2001; MEDINA et al., 2002).

Portanto, na realização de estudos *in vitro* Santos et al. (2012) sugeriram a inclusão de análises de caracterização microbiana, a fim de evidenciar as eventuais mudanças nas bactérias ao longo do processo fermentativo que ocorre em ambiente controlado.

#### **2.4.1 Atividade fermentativa do inóculo fecal**

O inóculo é a principal fonte de variação dos perfis de produção de gases (MOULD et al., 2005), e a atividade fermentativa do inóculo pode sofrer alterações devido a vários fatores como o tempo de amostragem, armazenamento, animal doador e sua dieta, à sua concentração, à sua preparação, entre outros (RYMER et al., 2005; DESROUSSEAU et al., 2012).

As fezes podem ser utilizadas como fonte de inóculo em ensaios de fermentação, mas para isso, é necessário que os microrganismos presentes mantenham sua capacidade de fermentar o substrato. Na tentativa de elucidar os fatores que afetam a capacidade fermentativa, pesquisadores direcionaram seus esforços em novas pesquisas.

Sunvold et al. (1995) sugeriram que o modo de preparo do inóculo tende a recuperar principalmente as bactérias associadas à fração líquida das fezes, que apresenta baixa concentração de bactérias celulolíticas.

A diferença da capacidade fermentativa do inóculo entre indivíduos é relatada por Murray et al. (2006b). Murray et al. (2009) supuseram que uma das possíveis causas da laminite



em equinos seria consequência da menor capacidade fermentativa da microbiota. Os autores investigaram a capacidade fermentativa comparando os inóculos fecais obtidos a partir de equinos clinicamente normais e de animais predispostos a laminite, no entanto, não observaram diferença entre os inóculos dos dois grupos de animais. Porém, nesse estudo utilizaram fezes congeladas a -20°C como alternativa a fezes frescas.

Murray et al. (2012), estudaram o efeito do congelamento das fezes na capacidade fermentativa do inóculo e concluíram que a atividade fermentativa de fezes congeladas de equinos é dependente do tempo de armazenamento e da natureza do substrato utilizado nas incubações *in vitro*. Segundo Hervas et al. (2005), as bactérias gram-negativas fibrolíticas são mais susceptíveis aos danos causados pela congelamento e descongelamento (formação de partículas de gelo e ruptura das membranas celulares microbianas), comprometendo a capacidade de fermentação de substratos fibrosos.

O efeito do período de coleta do inóculo fecal foi estudado por Desrousseaux et al. (2012), com equinos alimentados com concentrado três vezes ao dia 7, 12 e 17 horas. A análise foi feita a partir de quatro períodos de coleta de fezes ao longo do dia (7, 9, 14 e 17 horas). As maiores produções de gases foram observadas com os inóculos coletados às 9 e às 17 horas, com valores de 267,8 e 256,8 mL/g de matéria orgânica (MO), respectivamente. Enquanto os inóculos coletados imediatamente antes da primeira refeição e duas horas após a segunda refeição foram observados valores de 245,8 e 247,9 mL/g MO, respectivamente. Além disso, os autores observaram que há influência do tempo de coleta na fermentação de diferentes alimentos. Nos frascos contendo cevada, aveia e alfafa como substrato, a maior produção de gases foi observada no momento descrito como imediatamente antes e duas horas após a primeira refeição, enquanto para palha de trigo e feno de capim nativo, a produção de gases foi maior com o inóculo coletado imediatamente antes a terceira refeição. Tal fato foi explicado pela variação diurna dos microrganismos ocasionada pela passagem de nutrientes provenientes do concentrado oferecido na primeira refeição. Além disso, os equinos doadores de inóculo passaram cinco horas, entre a segunda e a terceira refeição comendo apenas alimento volumoso, esse período poderia ter permitido a adaptação do ecossistema bacteriana do trato gastrointestinal dos animais, de tal maneira que a atividade microbiana foi mais voltada para fermentação fibrolítica.

Laho et al. (2013) avaliaram a capacidade fermentativa do inóculo fecal de diferentes espécies do gênero *Equus*: Cavalos Przewalski (*Equus ferus przewalskii*), burro selvagem da Ásia - kulan (*Equus hemionus hemionus*), e zebra Chapman (*Equus quagga chapmani*), utilizando como substratos a celulose, cevada, palha de trigo, feno de capim e aveia, e não observaram diferenças no perfil de produção de gases entre as espécies, concluindo que as espécies possuem atividade fermentativa do inóculo fecal semelhantes. Entretanto, os animais não consumiram a mesma dieta. As três espécies consumiam cenouras e feno de forrageira nativa, enquanto, cavalos Przewalski e burros selvagens tinham silagem de milho disponível *ad libitum*.

Murray et al. (2014), comparando a capacidade fermentativa do inóculo fecal equino com inóculos provenientes de diferentes partes do trato gastrointestinal observaram que houve interação entre os substratos utilizados (capim seco e polpa de beterraba) e os inóculos. No entanto, o padrão de fermentação das amostras incubadas com as fezes foi semelhante às amostras incubadas com fluido cecal e, inferior aos incubados com fluido do cólon, sugerindo assim, que a diferença se deve ao número e à variedade de microrganismos presentes nas fezes e na digesta do ceco e cólon.

O objetivo do presente estudo é padronizar a técnica de produção de gases *in vitro* para estudos de fermentação em equinos, criando uma estratégia que melhore os parâmetros de fermentação do substrato volumoso desidratado, através da diluição do inóculo e da hidratação do substrato.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local

O ensaio foi realizado no Laboratório de Pesquisas em Saúde Equina (EQUILAB) do Instituto de Veterinária e no Laboratório de Bromatologia do Instituto de Zootecnia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. Este trabalho foi conduzido de acordo com as normas éticas e aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal/Zootecnia – CEUA da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro com o número: 2015/002590.

#### 3.2 Animais e Dieta

Foram utilizados três garanhões hípidos da raça Mangalarga Machador, com peso corporal médio de 400 Kg. Os animais foram previamente vermifugados com ivermectina (Eqvalan Golden®, Merial). Os animais foram mantidos em baias individuais de alvenaria, providas de comedouro e bebedouro e exercitados três vezes por semana durante 30 minutos.

A dieta dos animais foi composta de feno de Coastcross (*Cynodon spp.* cv Coastcross) e concentrado farelado (Tabela 1), sal mineral comercial (Essencefós®, Presence<sup>1</sup>) e água *ad libitum*. O concentrado farelado foi fornecido fracionado em duas vezes ao dia, às 07:00 e 16:00 horas. O alimento volumoso foi disponibilizado em redes tipo porta feno. O consumo médio de matéria seca foi de 26 g MS kg<sup>-1</sup> de peso vivo na proporção de 66:34 (volumoso:concentrado). O consumo supriu as necessidades da categoria garanhões segundo o NRC (2007).

O feno de Coastcross utilizado na alimentação dos animais foi o mesmo utilizado como substrato nas fermentações *in vitro* subsequentes, durante todo o período experimental. Iniciou-se a coleta de fezes (inóculo) após 28 dias de adaptação à dieta e ao manejo.

**Tabela 1.** Composição bromatológica do concentrado e do feno de Coastcross na matéria seca

Alimento	MS <sup>1</sup>	MM <sup>1</sup>	EE <sup>1</sup>	PB <sup>1</sup>	FDNom <sup>1</sup>	FDA <sup>1</sup>	Cel <sup>1</sup>	Hem <sup>1</sup>	Lig <sup>1</sup>	EB <sup>2</sup>
Concentrado	88,5	10,9	4,7	23,1	14,7	7,3	5,0	0,2	2,1	4,1
Feno de Coastcross	88,8	8,4	2,5	13,9	67,5	35,9	28,3	2,3	5,3	4,4

<sup>1</sup> %; <sup>2</sup> Mcal/kg; MS = matéria seca; PB = proteína bruta; FDNom = fibra em detergente neutro corrigida para matéria orgânica; FDA = fibra em detergente ácido; Cel = celulose; Hem = hemiceluloses; Lig = lignina; EE = extrato etéreo; MM = matéria mineral; EB = energia bruta.

#### 3.3 Análises Bromatológicas

As amostras do feno de Coastcross e do concentrado farelado foram moídas em moinho de facas tipo *willey* com peneira de 1 mm (SILVA et al., 2009). Em seguida, foram procedidas as análises de matéria seca (MS) (AOAC, 1995), proteína bruta (PB) (AOAC, 1995), extrato etéreo (EE) (SILVA e QUEIROZ, 2006), energia bruta (EB) (SILVA e QUEIROZ, 2006),

<sup>1</sup> Níveis de garantia: Cálcio (máx) 150g; Fósforo (mín) 70g; Enxofre 10g; Magnésio 10g; Sódio 150g; Ferro 2500mg; Cobre 820mg; Zinco 2620mg; Manganês 2.124,00mg; Lisina 10,00mg; Iodo 20,00mg; Selênio 12,50mg; Cobalto 20,00mg; Beta Glucanas 3.300mg; Cromo 6,00mg; Vitamina A 60.000,00 UI/kg; Vitamina D3 12.000,00 UI/kg; Vitamina E 450,00 UI/kg; Mananoligossacarídeo 2.100 mg; Tiamina – Vitamina B1 50,00 mg; Riboflavina – Vitamina B2 80,00mg; Niacina - Vitamina B3 240,00mg; Ácido Pantotênico – Vitamina B5 100,00mg; Piridoxina – Vitamina B6 HCL 20,00mg; Vitamina B9 25,30mg; Vitamina B12 240,00mg; Vitamina H – Biotina 14,00mg; Flúor (Max) 700,00mg.

cinzas (MM) (AOAC, 1995), FDN (VAN SOEST et al., 1991), lignina pelo método de ácido sulfúrico 72% (Lig<sub>(sa)</sub>) (AOAC, 1995), posterior à sequência de extração por detergente ácido (VAN SOEST et al., 1991).

### 3.4 Desenho Experimental

Utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2x2 para as variáveis pH, N-NH<sub>3</sub>, e contagem bacteriológica. Sendo o primeiro fator o tempo de hidratação do substrato de 0 ou 12 horas, e o segundo fator a diluição das fezes com solução nutritiva para o preparo do inóculo na relação peso:peso de 1:1 ou 1:3. Para as variáveis de produção cumulativa de gases e de degradação dos nutrientes o delineamento foi inteiramente ao acaso em esquema de parcelas subdivididas, sendo as subparcelas os tempos de incubação e suas interações. O ensaio foi repetido cinco vezes no tempo.

### 3.5 Fermentação *in vitro*

Os frascos de fermentação de 160 mL foram preparados da seguinte maneira: colocou-se dentro dos frascos 1 g do feno de Coastcross moído a 2 mm, 90 mL de solução nutritiva (THEODOROU et al., 1994) adicionada no momento da inoculação (H0) e 12 horas antes (H12), de acordo com o fator de estudo (Hidratação). Os frascos preparados 12 horas antes da inoculação foram mantidos a 4°C para evitar fermentação prévia e foram aquecidos em banho-maria a 39°C durante 2 horas antes da inoculação para atingir a temperatura de 39°C (Figura 1). Para cada tratamento foram incubadas 14 réplicas.

As amostras de fezes foram coletadas simultaneamente da ampola retal dos três animais, semanalmente, as 9:00 horas, duas horas após a primeira refeição. As fezes foram mantidas em garrafas térmicas pré-aquecidas e fechadas até o processamento no laboratório. O tempo transcorrido entre a coleta das fezes e o início do preparo do inóculo no laboratório foi de aproximadamente 20 minutos.



**Figura 1.** Frasco de fermentação com substrato hidratado imediatamente antes da inoculação. (Fonte: Acervo pessoal)

As amostras de fezes colhidas dos três doadores foram homogeneizadas e divididas em duas frações: a primeira fração foi diluída com solução nutritiva na proporção de 1:1 (D1), e a

segunda fração diluída com solução de nutritiva na proporção de peso de 1:3 (D3), de acordo com o fator de estudo (Diluição), homogeneizadas por um minuto em liquidificador e mantidas em banho maria a 39°C e constantemente borrifadas com CO<sub>2</sub> (DESROUSSEAU et al., 2012).

Após uma hora, o inóculo foi filtrado em tecido de náilon de 45µm para remoção das partículas e 10 mL do filtrado foi inserido nos frascos de fermentação previamente preparados.

No início da contagem do tempo de fermentação, inseriu-se uma agulha em cada frasco para retirada da pressão inicial dos frascos. Após a inoculação, os frascos foram mantidos em banho maria a 39 °C e a produção de gases foi mensurada através de um transdutor de pressão (LOGGER AG100, Datalogger Universal) no intervalo de 1 a 72 horas (MURRAY et al., 2014). As leituras foram efetuadas nos tempos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12,14, 16, 18, 21, 24, 27, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 e 72 h, totalizando 23 observações. Após cada leitura, o volume dos gases acumulados foi liberado e os frascos homogeneizados manualmente. Entre as leituras os frascos foram agitados mecanicamente pelo banho maria. A pressão, em psi (libra por polegada quadrada), foi convertida para volume por grama de MS por meio da equação:  $y = -0,07+3,79x+0,077x^2$  (MARTINS, 2012), específica para as condições de experimentação de produção de gases realizadas no EQUILAB.

A produção cumulativa de gases foi ajustada ao modelo de regressão não linear proposto por Schofield et al. (1994), gerando as estimativas dos parâmetros do modelo:

$$V(t) = \frac{V_f}{1 + e^{(2 - 4 \times k(T-L))}}$$

em que:

V(t) = volume total de gases (mL)

V<sub>f</sub> = volume máximo de gases (mL)

k = taxa de fermentação (h<sup>-1</sup>)

L = período de fase lag (h)

T = Tempo de fermentação (h)

### 3.6 Procedimentos de Avaliação da Degradação dos Nutrientes

A degradação da matéria seca (DMS), matéria orgânica (DMO) e da fibra em detergente neutro (DFDN) foram obtidas com o resíduo do interior dos frascos após 24, 48 e 72 horas de incubação. Após o término do tempo indicado para cada frasco, eles foram retirados do banho maria e refrigerados a 4°C com o intuito de cessar a fermentação e, logo após, foram filtrados em cadinhos porosos de 1 mm e os resíduos analisados para MS, MO. Para análise de FDN, o resíduo da fermentação foi filtrado em tecido de náilon acoplado a um funil Büchner. Posteriormente, o tecido de náilon foi lavado com 100 mL de detergente neutro e o resíduo recuperado em um Copo Berzelius. O copo foi levado a chapa digestora de fibra por uma hora.

A degradação de MS, MO e FDN foi determinada pela diferença de peso do componente presente no substrato antes e após a fermentação.

### 3.7 Análise de pH

Após o final de cada ensaio de fermentação após 72 horas de incubação foi avaliado o pH da solução residual de dois frascos por tratamento, com aparelho pHmetro previamente calibrado.

### 3.8 Análise de Nitrogênio Amoniacal

Os resíduos de cada frasco foram homogeneizados, centrifugados a 10000 rpm durante 10 min em centrífuga refrigerada a 4°C. Após centrifugação, 5 mL do sobrenadante foi pipetado e submetido a destilação e titulação, segundo o método microKjeldahl (CHERDTHONG e WANAPAT, 2013). Em 5 mL da solução pipetada foram adicionados 25 mL de KOH 2M (FENNER, 1965; SOUZA et al., 2013). A concentração de N-NH<sub>3</sub> foi estimada através da seguinte fórmula:

$$\text{N-NH}_3 \text{ (mg /dL)} = \frac{V \times N \times 14 \times 100}{A}$$

em que:

N-NH<sub>3</sub> = a concentração de nitrogênio amoniacal (mg/dL);

V = volume de ácido sulfúrico (mL);

N = normalidade do ácido sulfúrico utilizado para titular a amostra;

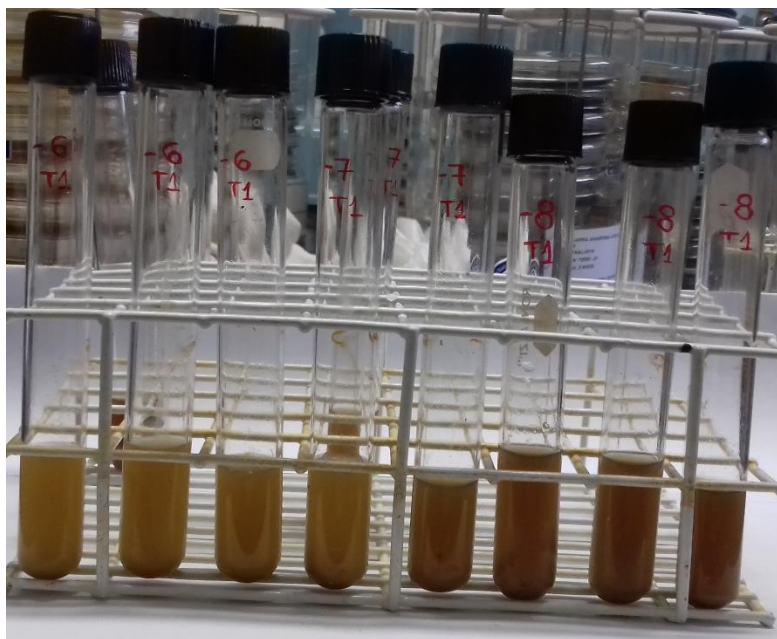
14 = o peso atômico do nitrogênio;

A = volume da alíquota (mL).

### 3.9 Contagem Bacteriana

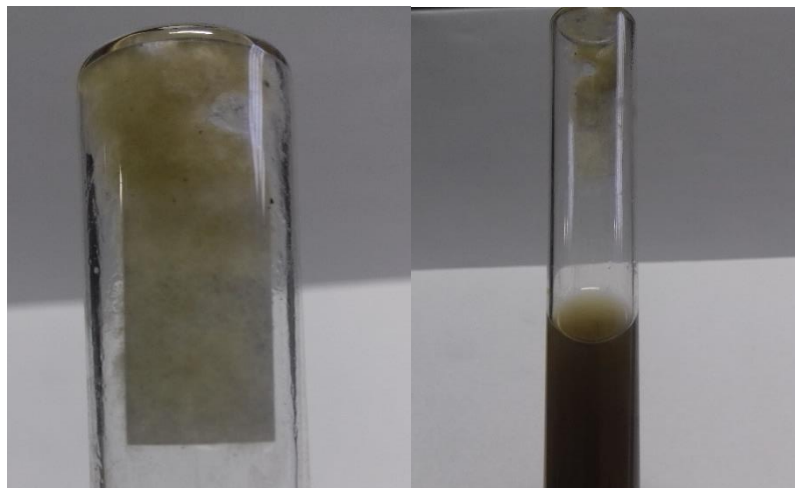
O perfil de microrganismos foi analisado após 24 horas de incubação e descritos como Anaeróbios totais, bactérias celulolíticas, *Streptococcus spp.* e *Lactobacillus spp.*

As concentrações de bactérias anaeróbias totais viáveis foram determinadas com um meio ágar completo modificado (LEEDLE e HESPELL, 1980) após 48 horas de incubação a 39°C, com três tubos de ensaio com tampa (réplicas) nas diluições 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-8</sup>. Em cada tubo de ensaio foram adicionados 4 mL do meio de cultura, com o pH ajustado a 7,3, sob CO<sub>2</sub>. Foram contabilizados tubos positivo para anaeróbios totais aqueles que apresentavam cor mais clara que o tubo “branco” que continha somente meio de cultura estéril (Figura 2).



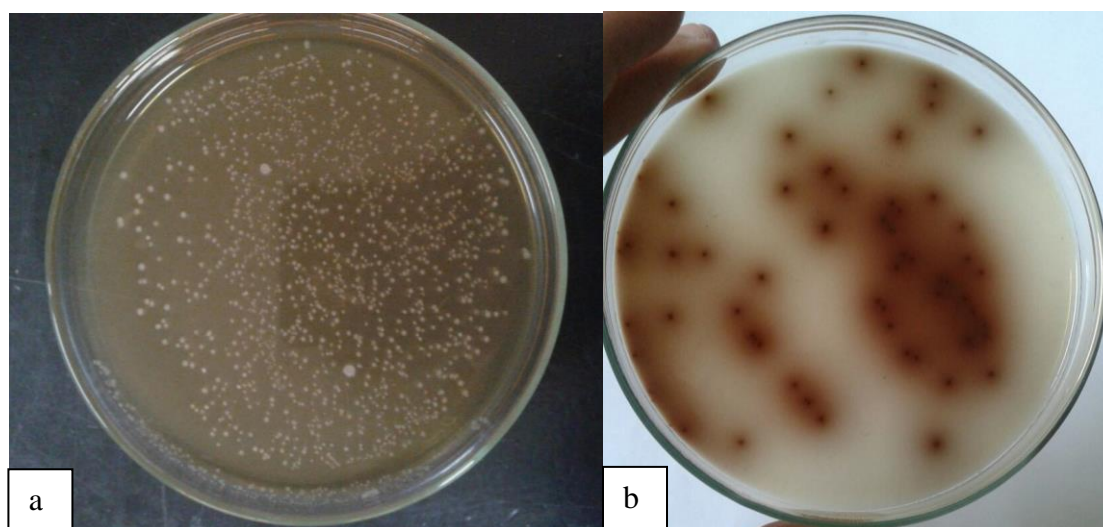
**Figura 2.** Diluição seriada para anaeróbios totais com diferentes cores após incubação. (Fonte: Acervo pessoal)

As concentrações de bactérias celulolíticas foram determinadas com um meio de cultura líquido (HALLIWELL e BRYANT, 1963) modificado (BARUC et al., 1983; JULLIAND et al., 1999), após 15 dias de incubação a 39°C, em três tubos de ensaio incubados nas diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ . Os tubos de ensaio foram preenchidos com papel filtro de celulose Whatman nº1 de tamanho 8x1cm e, em seguida, adicionado 8 mL do meio de cultura, com pH ajustado a 7,3, sob  $CO_2$ . Para bactérias celulolíticas, foram contabilizados tubos positivos somente aqueles que obtiveram degradação total da tira de celulose após o período de incubação (Figura 3). As concentrações de anaeróbios totais e bactérias celulolíticas foram determinadas com o número mais provável de três tubos.



**Figura 3.** Degradação parcial de papel filtro de celulose após 14 dias de incubação com resíduo da fermentação. (Fonte: Acervo pessoal)

A concentração de *Lactobacillus spp.* e *Streptococcus spp.* foi determinada através de contagem de unidades formadoras de colônia em placas de Petri preparadas com meio ágar MRS *Lactobacillus* base (200019, Biolog, Itália) e ágar Azide Bile Esculina (06105-500g, Sigma-Aldrich, Buchs, Suíça), respectivamente, nas diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ , após 48 horas de incubação a 39°C em jarros de anaerobiose (Figura 4).



**Figura 4** (a) *Lactobacillus spp.* em meio MRS.; (b) *Streptococcus spp.*, em meio Azida Bile Esculina. (Fonte: Arquivo pessoal)

### 3.10 Análises Estatísticas

O volume médio da produção de gases, a degradação da MS, MO e FDN, o pH, as concentrações de N-NH<sub>3</sub> e a contagem bacteriológica foram avaliados quanto à homocedasticidade das variâncias e normalidade, quando atendidas as premissas da ANOVA foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5% de probabilidade. Transformações logarítmicas foram realizadas na contagem microbiana para análise estatística.

Os valores médios da produção de gases foram comparados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade (Quadro 2). Os valores da degradação da MS, MO, FDN, pH, N-NH<sub>3</sub> e a contagem microbiana foram comparados pelo teste de Student Newman Keuls, a 5% de probabilidade.

A produção cumulativa de gases foi ajustada ao modelo de regressão não linear (Schofield et al., 1994) através do procedimento Gauss-Newton do programa SAEG (UFV, 2000) determinando os parâmetros do modelo. As análises foram procedidas com o programa SAEG (UFV, 2000).

**Quadro 2.** Análise de variância dos resultados da produção cumulativa de gases e da degradação de nutrientes

Fontes de variação	Graus de liberdade
Hidratação	1
Diluição	1
Hidratação x diluição	1
ERRO (A)	16
Tempo	22
Tempo x hidratação	22
Tempo x diluição	22
Tempo x Diluição x Hidratação	22
ERRO (B)	352

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeito significativo da hidratação das amostras e da diluição do inóculo ( $P>0,05$ ) na degradação da matéria orgânica (DMO). Porém, houve uma tendência de que o fator hidratação ( $P=0,0722$ ) aumente a DMO. O valor médio observado da DMO do feno de Coastcross sem hidratação foi 31,3%, semelhante ao observado por Sunvold et al. (1995) de 29,4%. O fator de hidratação de 12 horas (H12) apresentou valor médio de 34,52%, que foi superior numericamente ao observado no fator sem hidratação (H0). Além disso, os valores foram crescentes em função do tempo (Tabela 2).

A DMO no tempo de 24 horas após a inoculação apresentou 56,7% da degradação total em 72 horas, ou seja, mais da metade foi degradada nas primeiras 24 horas, concluindo-se que os microrganismos têm maior potencial de degradação da matéria orgânica nesse período. Segundo Coles et al., (2005), o objetivo de um estudo *in vitro* é ser representativo aos acontecimentos *in vivo*. Por esta razão, as condições fisiológicas simuladas, tais como pH, temperatura e tempo de incubação devem ser adequadas à espécie em questão. Desse modo, é possível sugerir que o tempo de incubação em ensaios de fermentação com equinos não ultrapasse 48 horas, período próximo ao tempo médio de retenção (TMR) encontrado em estudos *in vivo*. Drogoul et al. (2001) observaram valores próximos a 40 h de TMR. Enquanto que Silva et al. (2014) relatou em seu estudo 36,8 h de TMR da fase sólida da digesta.

Além disso, Sunvold et al. (1995) verificaram que após 48 h de incubação, a produção de AGV e a DMO das fezes equinas se igualaram às de outras espécies avaliadas no seu estudo, sugerindo uma compensação até esse momento.

**Tabela 2.** Degradação da matéria orgânica (%) do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 24, 48 e 72 horas de fermentação (n=60)

Tempo de degradação (h)	Hidratação (0 h)		Hidratação (12 h)		Média
	Diluição 1:1	Diluição 1:3	Diluição 1:1	Diluição 1:3	
24	21,5	22,0	25,6	25,8	23,7 <sup>c</sup>
48	32,6	31,0	35,3	33,8	33,2 <sup>b</sup>
72	40,8	40,0	45,1	41,6	41,8 <sup>a</sup>
Média	31,7	31,0	35,3	33,7	

CV% 7,61; H=0,0722; D=ns; H\*D=ns; T=0,000; T\*H= ns; T\*D=0,2697; T\*D\*H= ns; Médias na coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls à 5%.

Não houve efeito significativo da hidratação das amostras e da diluição do inóculo da degradação da fibra em detergente neutro (DFDN), mas houve efeito do tempo (Tabela 3), onde 24, 48 e 72 horas apresentaram valores médios de degradação crescentes ao longo do tempo. Não houve alteração na DFDN com a diluição do inóculo, e conseqüentemente, com a diluição dos microrganismos presentes nele. Diferente da DMO, a DFDN em 24 horas representou 39,30% do total de degradação. Em equinos, a extensão do aproveitamento da fibra é determinada pelo tempo disponível para a digestão da fibra em associação com a taxa de fermentação microbiana (DROGOUL et al., 2001). No presente estudo, o tempo disponível para fermentação foi igual para ambos os tratamentos 24, 48 e 72 horas e o tempo de hidratação de 12 horas não resultou em aumento da DFDN.

De Fombelle et al. (2001) relataram que a mudança abrupta de dietas com feno para dietas contendo grãos (70:30 relação volumoso:concentrado) aumentou a concentração de



bactérias anaeróbias totais mas não alterou a concentração de bactérias celulolíticas, porém, após 29 horas a concentração das mesmas diminuiu numericamente, caracterizando que as bactérias celulolíticas levam maior tempo para concluir seu desenvolvimento. No presente estudo, esse grupo de bactérias pode ter levado um maior tempo para degradar o substrato independente do tempo que o mesmo está hidratado. A fração fibrosa é composta por hemiceluloses, celulose e lignina, assim há necessidade de bactérias com diferentes atividades metabólicas para digerir essa fração (VAN SOEST, 1991; JULLIAND e GRIMM, 2016).

**Tabela 3.** Degradação da fibra em detergente neutro (%) do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas de hidratação antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 24, 48 e 72 horas de fermentação (n=60)

Tempo de Degradação (h)	Hidratação (0 h)		Hidratação (12 h)		Média
	Diluição	Diluição	Diluição	Diluição	
	1:1	1:3	1:1	1:3	
24	12,16	11,87	16,77	17,44	14,56 <sup>c</sup>
48	27,51	23,27	30,94	26,86	27,15 <sup>b</sup>
72	36,96	36,20	40,95	34,05	37,04 <sup>a</sup>
Média	25,54	23,78	29,55	26,12	

CV % 17,58; H=0,2934; D=ns; H\*D=ns; T=0,000; T\*H= 0,2668; T\*D=0,3653; T\*D\*H= ns; Médias na coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls à 5%.

Silva et al. (2010b) observaram um valor de 34,3% de degradação cecal do FDN do feno de Coastcross após 48 h de incubação, que é superior aos valores observados no presente estudo no mesmo tempo de incubação. Como a degradação é dependente da taxa de fermentação microbiana, conseqüentemente, da atividade fermentativa, há indícios que a dinâmica de passagem da digesta com constante fornecimento de nutrientes e remoção dos produtos finais do metabolismo microbiano desempenham um importante papel na degradação da fibra, sendo um limitante das técnicas *in vitro*.

Não houve interação entre os fatores diluição e hidratação na degradação da matéria seca (DMS) (Tabela 4), mas houve efeito simples significativo do tempo de hidratação do substrato e o tempo de degradação para esta variável. A DMS no tempo 24 horas após inoculação representou 62,5% da degradação total, caracterizando o potencial dos microrganismos de fermentar e degradar a matéria seca.

**Tabela 4.** Degradação da matéria seca (%) do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 24, 48 e 72 horas de fermentação (n=60)

Tempo de degradação (h)	Hidratação (0 h)	Hidratação (12 h)	Média
24	26,7	30,2	28,5 <sup>c</sup>
48	36,0	38,9	37,4 <sup>b</sup>
72	44,2	46,9	45,6 <sup>a</sup>
Média	35,6 <sup>B</sup>	38,7 <sup>A</sup>	

CV % 5,94; H=0,0265; D=ns; H\*D=ns; T=0,000; T\*H=ns; T\*D=0,2817; T\*D\*H= ns; Médias na coluna seguidas de letras minúsculas diferem entre si (P<0,05) e, médias nas linhas seguidas de diferentes letras maiúsculas diferem entre si (P<0,05) pelo teste Student Newman Keuls à 5%.

Murray et al. (2006b) observaram que a DMS do feno de gramínea nativa foi maior quando inoculada com fezes de animais alimentados com dieta contendo alto teor de amido de

2,2 g de amido/Kg de PV/refeição, indicando, portanto, que a população microbiana estava adaptada para fermentar o substrato feno à uma taxa maior do que a população presente no inóculo de animais alimentados com uma dieta de alto teor de fibra. Porém, a população microbiana não foi quantificada para justificar o aumento da degradação, bem como, caracterizar qual fração do substrato foi degradado. No presente estudo, foi observado um efeito significativo do tempo de hidratação do substrato sobre a DMS. Entretanto, esse efeito não foi observado na DFDN. Isso sugere que outros nutrientes como carboidratos solúveis, extrato etéreo e proteínas podem ser degradados, não necessariamente a fração fibra do substrato avaliado. Desse modo, sugere-se a realização da degradação da fração fibrosa e não somente a degradação da matéria seca e/ou matéria orgânica ao avaliar substratos fibrosos em ensaios de fermentação *in vitro*.

Houve interação entre o fator hidratação e o tempo de incubação na produção cumulativa de gases. A produção de gases se manteve igual até 6 horas de incubação. A partir de 8 horas de incubação, a hidratação de 12 horas proporcionou maior produção de gases com valor médio de 23,7 mL/g MS, enquanto foi observado valor médio de 15,1mL/g MS no fator 0 horas de hidratação (Tabela 5).

O volume cumulativo de gases a 72 horas do feno de Coastcross submetido a 12 horas de hidratação foi superior ao feno que não foi hidratado, com valores médios de 83,1 e 69,2 mL/g MS, respectivamente. Segundo Theodorou et al. (1994), a produção de gases tem correlação positiva com degradação de MS. A produção de gases segue o padrão de degradação de MS. Os resultados de produção de gases foram consistentes com os resultados de degradação, seguindo o mesmo padrão. A DMS do feno de Coastcross hidratado por 12 horas apresentou valor médio superior de 38,7% comparado a 35,6% do feno de Coastcross sem hidratação.

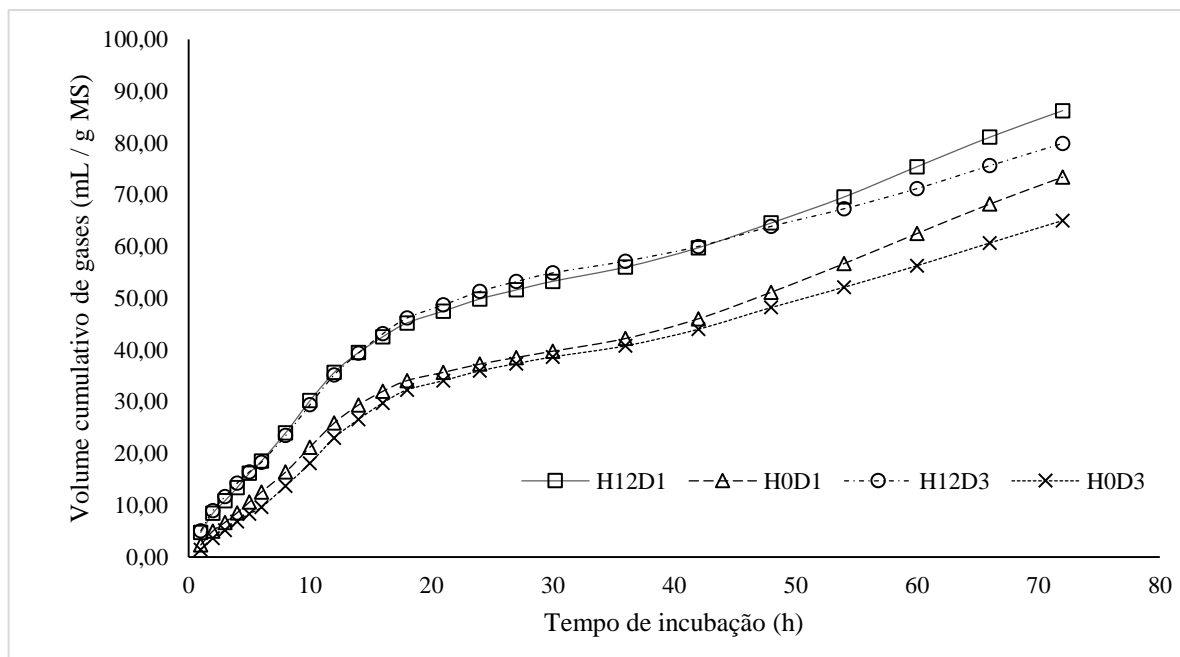
Além disso, a hidratação prévia por 12 horas proporcionou maior extensão da fermentação, uma vez que, os valores da produção cumulativa de gases foram crescentes até 72 horas. De forma contrária, a produção cumulativa de gases provenientes do substrato hidratado no tempo zero se estabilizou após 54 horas de incubação, pois não houve diferença significativa entre os tempos 54, 60, 66 e 72 horas.

**Tabela 5.** Valores médios de produção de gases (mL/g MS) até 72 horas de fermentação do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação

Hidratação (horas)	Tempo de incubação (horas)																						
	1	2	3	4	5	6	8	10	12	14	16	18	21	24	27	30	36	42	48	54	60	66	72
0	1,9	4,3	5,9	7,7	9,5	11,1	15,1	19,7	24,4	28	31	33,2	34,8	36,6	37,9	39,2	41,5	45	49,7	54,4	59,4	64,4	69,2
	Aa	Aa	Ab	Ac	Ac	Ad	Ae	Ae	Ae	Af	Af	Af	Af	Ag	Ag	Ah	Ai	Aj	Aj	Ak	Ak	Ak	Ak
12	4,9	8,7	11,3	13,8	16,3	18,4	23,7	29,8	35,4	39,5	42,8	45,7	48,1	50,6	52,4	54,1	56,6	59,9	64,2	68,4	73,3	78,4	83,1
	Aa	Aa	Ab	Ac	Ac	Ad	Bd	Be	Be	Be	Bf	Bf	Bg	Bg	Bh	Bi	Bj	Bk	Bk	Bk	Bl	Bl	Bm

CV % 12,85; H=0,0016; D=ns; H\*D=ns; T=0,0000; T\*H=0,0000; T\*D=0,3681; T\*D\*H= ns; Médias na coluna seguidas de diferentes letras maiúsculas diferem entre si (p<0,05) e, médias nas linhas seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si (p<0,05) pelo teste de Scott-Knott.

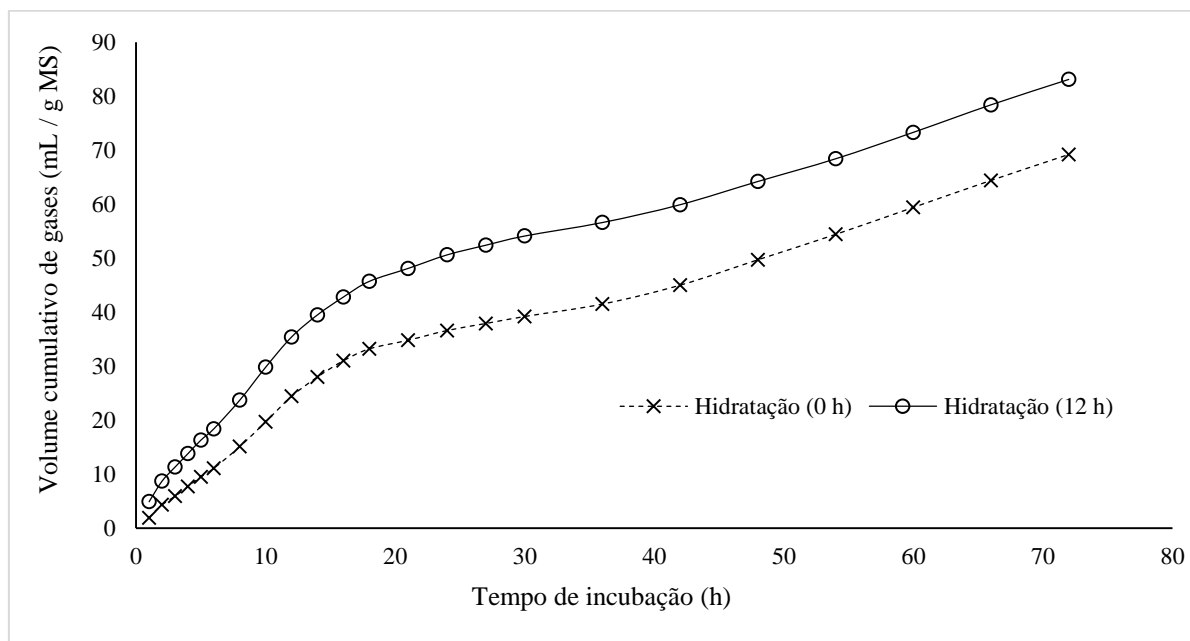
As curvas de produção de gases permitem a análise da cinética de fermentação dos substratos que serão comparados em diferentes fases da fermentação. Observa-se que o substrato hidratado por 12 horas e inoculado com fezes diluídas com solução nutritiva na proporção peso:peso de 1:1 (H12D1) e 1:3 (H12D3), obtiveram maior produção de gases desde o início da curva (Figura 5). Adicionalmente, os substratos incubados com fezes diluídas com solução nutritiva na proporção peso:peso de 1:3 hidratados por 12 horas (H12D3) e hidratados no momento da inoculação (H0D3), apresentaram menor produção de gases próxima a 48 horas.



**Figura 5.** Curva de produção cumulativa de gases do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 72 horas de fermentação. H12D1 – substrato hidratado por 12 horas inoculado com fezes equinas diluídas com solução nutritiva na proporção peso:peso 1:1; H0D1 – substrato hidratado no momento da incubação inoculado com fezes diluídas com solução nutritiva na proporção peso:peso 1:1; H12D3 - substrato hidratado por 12 horas inoculado com fezes equinas diluídas com solução nutritiva na proporção peso:peso 1:3; H0D3 - substrato hidratado no momento da incubação inoculado com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso 1:3.

O presente trabalho baseou-se na hipótese de que houve menor teor de nutrientes e microrganismos presentes no inóculo de maior diluição (fezes diluídas com solução nutritiva na proporção peso:peso de 1:3), o que poderia levar a redução na taxa de renovação dos microrganismos, após 48 horas de incubação. Cone et al. (1997) estudaram a fermentação de substratos purificados, como a glicose, e relataram que houve uma segunda fase da fermentação desse substrato após 45 horas, e que a renovação dos microrganismos foi responsável por essa segunda fase. Para afirmar tal fato, os autores constataram que a proteína microbiana foi mais elevada após 5 a 10 horas de incubação, coincidindo com o momento em que glicose foi totalmente fermentada, e diminuiu após uma incubação prolongada formando  $\text{NH}_3$ , sugerindo *turnover* microbiano, que é a renovação da população microbiana, pelo desenvolvimento de novas células utilizando células mortas como fonte de nutrientes. Os autores concluíram que o perfil de produção de gases era caracterizado pela fermentação da fração solúvel e da fração insolúvel, bem como pelo *turnover* da população microbiana.

Rymer et al. (1999) relataram o aumento na produção de gases devido à hidratação por 6 horas do substrato fibroso. O mesmo ocorreu no presente estudo, onde houve uma diferença significativa entre o feno hidratado nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação. As curvas de produção cumulativa de gases do feno de Coastcross submetido a 0 e 12 horas de hidratação pode ser visto na Figura 6.



**Figura 6.** Curva de produção cumulativa de gases do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação.

Murray et al. (2014) observaram que o uso de fezes como inóculo apresentaram padrão de fermentação similar ao líquido cecal, mas não do conteúdo do cólon. De forma contrária, Jullian e Grimm (2016) relataram que a população bacteriana fecal foi similar à encontrada no cólon dorsal e cólon menor. Ambos estudos dão suporte para concluir que a produção de gases é mais dependente da capacidade dos microrganismos do inóculo de fermentar determinado substrato do que a concentração de microrganismos (UFC/mL ou g). No presente estudo, onde foi utilizado o mesmo inóculo diluído em proporções diferentes, é possível sugerir que a produção de gases foi mais influenciada pela característica física do substrato do que pela concentração dos microrganismos provenientes das fezes presentes na fermentação.

Os modelos matemáticos unicompartimentais utilizados para descrever a cinética de fermentação de alimentos podem ser analisados de forma bicompartimental, uma vez que, o substrato seja composto por dois componentes, uma fração solúvel de rápida fermentação e outra fração insolúvel, mas potencialmente fermentescível que apresenta menor taxa de fermentação (SCHOFIELD et al., 1994; CONE et al., 1997). No presente estudo, o substrato utilizado foi um alimento volumoso desidratado caracterizado por pequena fração solúvel de rápida fermentação (Tabela 6).

A rápida fermentação de nutrientes solúveis do feno de Coastcross hidratado por 12 horas acarretou em uma fase lag não detectável pelo modelo matemático, não havendo, portanto, uniformidade de ajuste do parâmetro L ( $P > 0,05$ ), exceto para o tratamento HOD3 da repetição 1 e 3, e 4, e HOD1 da repetição 4.

Os perfis de degradação obtidos a partir de estudos *in vitro*, em geral exibem um padrão de forma sigmoide. Este padrão é caracterizado por um período de fase lag seguido por um crescimento exponencial que desacelera e atinge uma fase assintótica (VIEIRA et al., 2008a).

Como o perfil da fermentação do feno de Coastcross apresentou uma fase lag não detectável pelo modelo de curva sigmoide, é proposto que para estudos onde utilizem substrato volumoso hidratado seja utilizado para ajuste dos resultados um modelo de curva exponencial.

**Tabela 6.** Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e parâmetros do modelo: volume de gases produzidos (V), taxa de fermentação (k) e fase lag (L) ajustados para o feno de Coastcross hidratados no tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 72 horas de fermentação

Tratamentos	$R^2$	V (mL)	(P<0,05)	k ( $h^{-1}$ )	(P<0,05)	L (h)	(P<0,05)
-----Repetição 1-----							
H12D1	0,971	83,54	0,00	0,027	0,00	0,00028	0,5
H0D1	0,974	71,47	0,00	0,015	0,00	0,00041	0,5
H12D3	0,970	84,16	0,00	0,026	0,00	0,00104	0,5
H0D3	0,972	65,31	0,00	0,019	0,00	7,31697	0.0003
-----Repetição 2-----							
H12D1	0,865	62,35	0,00	0,040	0,00	0,00010	0,5
H0D1	0,870	60,03	0,00	0,024	0,00	0,00024	0,5
H12D3	0,927	63,30	0,00	0,052	0,00	0,00025	0.4891
H0D3	0,929	48,30	0,00	0,043	0,00	0,00043	0.4957
-----Repetição 3-----							
H12D1	0,917	80,75	0,00	0,036	0,00	0,00025	0.4905
H0D1	0,917	60,96	0,00	0,038	0,00	2,17715	0.1714
H12D3	0,944	74,86	0,00	0,042	0,00	0,00031	0.4923
H0D3	0,956	52,13	0,00	0,048	0,00	2,78908	0.0262
-----Repetição 4-----							
H12D1	0,953	68,26	0,00	0,020	0,00	2,40636	0.1537
H0D1	0,963	61,69	0,00	0,019	0,00	5,60411	0.0062
H12D3	0,926	56,93	0,00	0,022	0,00	0,00058	0.5000
H0D3	0,968	58,38	0,0000	0,019	0,0000	5,33196	0.0051
-----Repetição 5-----							
H12D1	0,920	59,60	0,0000	0,031	0,0000	0,00022	0,5
H0D1	0,932	67,36	0,0000	0,024	0,0000	0,00022	0,5
H12D3	0,965	50,13	0,0000	0,037	0,0000	0,00025	0,5
H0D3	0,946	61,69	0,0000	0,025	0,0000	0,00025	0,5

Os modelos matemáticos são ferramentas necessárias para descrever e interpretar a cinética de produção de gases *in vitro*. Wang et al. (2011) citaram diversos fatores que afetariam o ajuste de modelos matemáticos oriundos de dados da fermentação *in vitro*, entre eles, o pequeno número de pontos de leitura e os curtos períodos de incubação. Muitos modelos descritos predizem um volume de gases positivo no tempo zero ( $t = 0$ ), ou seja, não considera o período de fase lag. Quando o período de fase lag encontrado nos ensaios se estende, dificulta a utilização dos modelos para descrever a fermentação, pois após a modelagem os valores das estimativas podem não ser significativos biologicamente (WANG et al., 2011). Murray et al. (2006a) demonstraram que em suas amostras que obtiveram menores períodos de fase lag, apresentaram também menores valores  $T_{50}$  e  $T_{95}$ , tempo necessário para que 50 e 95% da fração degradável leva para desaparecer, respectivamente.

Mesmo não havendo ajuste do modelo para o parâmetro L na maioria das repetições, os parâmetros obtidos após a modelagem foram submetidos à análise da variância. Não houve diferença significativa dos fatores diluição do inóculo e tempo hidratação do feno de Coastcross

sobre volume final e a taxa de fermentação. Porém, houve efeito da hidratação no período de fase lag encontrada através do modelo (Tabela 7).

**Tabela 7.** Período de fase lag (h) da fermentação do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação

Hidratação	Fase lag (horas)	Hidratação	Diluição	Hid x Dil
0	2,32 <sup>a</sup>	0,0418	NS	0,3005
12	0,24 <sup>b</sup>			
Média	1,28			

Os equinos apresentam atividade fermentativa, principalmente, no intestino grosso e, assim, os microrganismos não são submetidos a digestão enzimática antes da defecação. A característica física das fezes, mantendo um ambiente anaeróbio, onde os microrganismos podem permanecer viáveis durante várias horas após a excreção aumenta a probabilidade de obter uma concentração representativa de microrganismos viáveis (MURRAY et al., 2014). Além disso, evita a utilização de animais cirurgicamente modificados ou eutanasiados para coleta de inóculo, e pode ser colhida de quaisquer animais a qualquer momento. Murray et al. (2014) compararam a atividade fermentativa do inóculo fecal com os inóculos provenientes do ceco, cólon dorsal e ventral. As fezes apresentaram produção de gases semelhantes ao observado para inóculo cecal em todos os substratos estudados, com valores inferiores obtidos a partir dos frascos incubados com líquido do cólon, sugerindo ser uma alternativa adequada ao líquido cecal, mas menos eficazes que o líquido do cólon. Porém, o ensaio foi baseado em inóculos provenientes de apenas um animal, o que limita a discussão dos resultados.

Murray et al. (2006b) sugeriram a utilização de um número maior de animais doadores de inóculo, pois existe diferença na fase lag e na atividade fermentativa entre os animais. No presente estudo, o inóculo foi obtido a partir da homogeneização das fezes de três animais doadores, se tornando mais representativo.

No estudo de Murray et al. (2006b) foi constatado que a dieta não influenciou no período de fase lag da fermentação do substrato fibroso. Porém, os autores sugerem que ao fazer a avaliação *in vitro* de um determinado tipo de alimento, o inóculo obtido a partir do animal doador deve conter uma população microbiana representativa daquela que se encontra presente no intestino grosso de um cavalo alimentado com o tipo de alimento sob investigação. No presente estudo, o substrato utilizado na fermentação *in vitro* foi o feno de Coastcross, sendo, portanto, o mesmo alimento volumoso que os animais consumiram.

Além de aumentar a volume de gases produzidos, a hidratação do substrato com solução nutritiva reduziu o período de fase lag (RYMER et al., 1999). Os autores observaram em seu estudo que houve a redução da fase lag quando o substrato foi hidratado por um período 6 horas, mas não houve diferença significativa entre 6 e 48 h de hidratação com solução nutritiva. Esse fato foi relacionado ao tempo necessário para que a fração solúvel do substrato fosse disponibilizada no meio, a qual não sofre alteração ao longo do tempo, pois é uma característica química do substrato. Esse efeito foi observado no presente estudo, entretanto, utilizou-se 12 horas de hidratação para facilitar a rotina de incubação no laboratório.

Após a incubação, os componentes solúveis são fermentáveis rapidamente, posteriormente ocorre uma mudança gradual para a fermentação das partes insolúveis, que necessitam ser hidratadas e colonizadas pelos microrganismos (GROOT et al., 1996). O desenvolvimento inicial dos microrganismos e a sua adesão as partes insolúveis são dependentes de tempo. A hidratação prévia do feno de Coastcross disponibilizou nutrientes para o desenvolvimento inicial dos microrganismos acelerando o processo de fermentação.

Foi relatado em outros estudos que a composição bromatológica do substrato tem influência na fase lag. Murray et al. (2006b) observaram valores de fase lag superior em frascos contendo substratos fibrosos com valores de 1,64 a 2,51 h, enquanto que em frascos contendo amido como substrato observaram valores de 0,82 a 1,78 h.

O presente estudo seguiu um cronograma de alimentação dos animais e coleta de fezes para evitar variações entre as repetições. O período entre coleta das fezes e o término do preparo do inóculo foi de aproximadamente vinte minutos em todas as repetições. As fezes foram transportadas em garrafas térmicas previamente aquecidas mantendo a temperatura de 39°C. Entretanto, pequenas mudanças na logística de inoculação podem levar a grandes variações na fase lag (coeficiente de variação alto), é o que foi observado na repetição 4.

Além disso, pode ter havido mudanças da atividade fermentativa, as quais não é possível detectar antes da inoculação por falta de uma metodologia adequada para fezes equinas (RYMER et al., 2005).

Não houve interação da hidratação do substrato e diluição do inóculo no pH ao final da fermentação, mas houve efeito da diluição (Tabela 8), o resíduo de fermentação do substrato inoculado com fezes diluídas com solução nutritiva na proporção peso:peso 1:1 apresentou valor médio de pH de 6,54, enquanto o resíduo inoculado com fezes diluídas com solução nutritiva 1:3 apresentou pH de 6,64. Rymer et al. (1999) não observaram diferença no pH final após 48 horas de incubação independente do tempo de hidratação.

**Tabela 8.** Valores de pH na fermentação do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 72 horas de fermentação (n=20)

Diluição	Hidratação			Hidratação	(P<0,05)	
	0	12	$\bar{X}$		Diluição	Hid x Dil
1:1	6,55	6,53	6,54 <sup>B</sup>	NS	0,0090	NS
1:3	6,65	6,62	6,64 <sup>A</sup>			
$\bar{X}$	6,60	6,57				

CV % 1,05; Médias na coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste F à 5%. NS – não significativo.

A redução do pH em estudos *in vitro* é um indicativo do acúmulo de produtos finais da fermentação, como os AGV e lactato (de FOMBELLE et al., 2001; COLES et al., 2005) ou da saturação de agentes tampões no meio. Na maior diluição (1:3) houve maior proporção de agentes tampões provenientes da solução nutritiva em relação total de microrganismos incubados, conseqüentemente aos produtos de fermentação, desse modo, o tampão foi mais efetivo deixando a solução menos ácida de pH 6,64 quando comparada a diluição de 1:1 com valor de 6,54. As variáveis AGV's e lactato não foram mensuradas no presente estudo para melhor elucidar a variação entre a diferença de pH com base no metabolismo microbiano. Porém o pH não foi um limitante da fermentação, pois ficou dentro da amplitude de pH considerado normal para manutenção da fermentação e da saúde do animal, que está entre 7,2 a 6,2 (CLARKE et al., 1990).

O pH final foi a única variável estudada que foi influenciada pela diluição do inóculo. Desse modo, pode-se concluir que a diluição não é fator limitante para comparação entre estudos utilizando fezes como fonte de inóculo em ensaios de fermentação *in vitro* que utilizem a técnica de produção cumulativa de gases.

Não houve efeito significativo da hidratação do substrato e diluição do inóculo no conteúdo de nitrogênio amoniacal ao final da fermentação (Tabela 9).



**Tabela 9.** Nitrogênio amoniacal (mg/dL) na fermentação do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 72 horas de fermentação (n=20)

Diluição	Hidratação			Hidratação	(P<0,05)	
	0	12	Média		Diluição	Hid x Dil
1:1	2,13	2,90	2,51	NS	0,2586	NS
1:3	2,27	2,70	2,48			
Média	2,20	2,80				

CV 45,77 %

Pouco se sabe sobre a nutrição e metabolismo das bactérias presentes no intestino grosso de equinos (SANTOS et al., 2011). Em um estudo realizado para esclarecer a exigência e a utilização de diferentes fontes de nitrogênio pela microbiota cecal de equinos, Santos et al. (2012) observaram que o aumento linear da quantidade de nitrogênio do meio de fermentação não aumentou a massa microbiana, pois superou a capacidade de síntese dos microrganismos, consequentemente, observou-se acúmulo de NH<sub>3</sub>. Nos frascos de fermentação que foi utilizado uréia como fonte de N, houve maior produção de AGV e menor quantificação de proteína microbiana, os autores sugeriram que a população microbiana presente no ceco usa como estratégia metabólica a utilização de N não protéico para gerar AGV em detrimento do crescimento da população. Porém não foi realizada a quantificação e identificação dos grupos que se beneficiariam dessa fonte de nitrogênio.

Segundo Cone et al. (1997), a concentração de NH<sub>3</sub> em ensaios de fermentação *in vitro* é inversamente proporcional à concentração de proteína microbiana. No presente estudo, os valores observados após 72 horas foram relativamente baixos, comparados à recomendação de Maczulak et al. (1995) de 8,5 mg/100mL para maximização da síntese microbiana no ceco dos equinos.

A contagem bacteriana foi realizada após 24 horas de incubação, para evitar *turnover* de microrganismos relatado por Cone et al. (1997). Porém, no presente estudo a contagem foi realizada após a fase de crescimento exponencial. Assim, é sugerido que a população seja quantificada enquanto ela está em fase de crescimento exponencial, identificada na curva de produção de gases aproximadamente 10 horas após a incubação.

Não houve diferença significativa da hidratação do feno de Coastcross e da diluição do inóculo sobre a contagem de *Lactobacillus spp.* após 24 horas (Tabela 10). Os valores observados no presente estudo apresentaram o mesmo fator de diluição observado por Julliand et al. (2001) e de Fombelle et al. (2001) no cólon de animais alimentados com uma dieta composta por 50% feno e 50% cevada de  $3,79 \times 10^8$ .

**Tabela 10.** Contagem de *Lactobacillus spp.* (UFC/mL) do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 24 horas de fermentação (n=20)

Diluição	Hidratação			Hidratação	(P<0,05)	
	0	12	Média		Diluição	Hid x dil
1:1	$1,55 \times 10^8$	$1,80 \times 10^8$	$1,68 \times 10^8$	NS	NS	NS
1:3	$1,58 \times 10^8$	$1,11 \times 10^8$	$1,35 \times 10^8$			
Média	$1,57 \times 10^8$	$1,49 \times 10^8$				

CV 3,10 %

A dieta influencia a concentração de *Lactobacillus spp.* presentes no cólon e, conseqüentemente, nas fezes. Julliand et al. (2001) observaram valor significativamente menor de  $4,29 \times 10^6$  no cólon de animais consumindo dieta composta apenas de feno, e  $4,27 \times 10^7$  em animais consumindo dieta 70% feno e 30% cevada.

Não houve diferença significativa na contagem de *Streptococcus spp.* provenientes do resíduo de fermentação do feno de Coastcross (Tabela 11). Porém, houve uma tendência numérica onde a diluição do inóculo 1:1 apresentou menor valor de  $6,9 \times 10^7$  UFC/mL de resíduo, quando comparado à diluição 1:3, que apresentou valor médio de  $1,1 \times 10^8$ .

**Tabela 11.** Contagem de *Streptococcus spp.* (UFC/mL) do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 24 horas de fermentação (n=20)

Diluição	Hidratação			(P<0,05)		
	0	12	Média	Hidratação	Diluição	Hid x dil
1:1	$9,11 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$	$6,86 \times 10^7$	0,2229	0,1527	NS
1:3	$1,16 \times 10^8$	$1,06 \times 10^8$	$1,11 \times 10^8$			
Média	$1,03 \times 10^8$	$7,58 \times 10^7$				

CV % 3,71

O gênero *Streptococcus spp.* está relacionado ao metabolismo de carboidratos rapidamente fermentescíveis (JULLIAND et al., 2001), a falta desses nutrientes ocasionada pela maior concentração de microrganismos do inóculo diluído 1:1 pode ter inibido o crescimento desses microrganismos. Os valores observados no presente estudo são similares ao observados por Julliand et al. (2001) no cólon de animais alimentados com 50% feno e 50% cevada, de  $4,38 \times 10^7$  UFC/mL. Em uma dieta 70% de feno e 30% de cevada, que é mais próxima à fornecida no presente estudo, na proporção de 66:34 (volumoso:concentrado), os autores observaram valores  $6,96 \times 10^6$  UFC/mL de conteúdo do cólon.

Apesar do aumento de microrganismos desse gênero estar associado ao desenvolvimento de laminite pela capacidade de produção de aminas vasoativas, eles possuem alta atividade proteolítica e de degradação de carboidratos de origem vegetal que permite um acesso rápido a estas fontes de nutrientes sem depender de outros microrganismos (JANS et al., 2015). Dessa forma, esse grupo deve obter um papel importante no início da fermentação de carboidratos fibrosos.

Não houve diferença significativa do número mais provável de bactérias celulolíticas após 24 horas de fermentação (Tabela 12).

**Tabela 12.** Contagem de bactérias celulolíticas do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 24 horas de fermentação (n=20)

Diluição	Hidratação			(P<0,05)		
	0	12	$\bar{X}$	Hidratação	Diluição	Hid x dil
1:1	$1,33 \times 10^4$	$1,41 \times 10^4$	$1,37 \times 10^4$	NS	NS	NS
1:3	$1,25 \times 10^4$	$2,54 \times 10^4$	$1,90 \times 10^4$			
$\bar{X}$	$1,29 \times 10^4$	$1,97 \times 10^4$				

CV % 16,46

Segundo Bueno et al. (2005) há maior concentração das bactérias celulolíticas aderidas a partículas da fase sólida do inóculo e, com aumento da fase sólida do inóculo na incubação

reduziu-se o período fase lag dos substratos mais fibrosos. No presente estudo, as fezes foram mantidas durante uma hora em banho maria a 39°C constantemente agitadas e borrifadas com CO<sub>2</sub>, juntamente com a solução nutritiva. Assim, espera-se reduzir o efeito da baixa concentração de bactérias celulolíticas na fração líquida do inóculo, devido à mudança do protocolo de incubação.

Os valores das concentrações de bactérias celulolíticas observados no presente estudo são de mesmo fator de diluição observado por Julliand et al. (2001) no ceco e cólon de equinos que consumiram diferentes proporções de cevada com valor de 6x10<sup>4</sup>. A concentração de bactérias celulolíticas está correlacionada à eficiência de utilização de fibra (Drogoul et al., 2001). Julliand et al. (2001) constataram que a inclusão de cevada reduziu a concentração de bactérias celulolíticas, e Drogoul et al. (2001) constataram que essa redução da concentração desse grupo de bactérias influenciou negativamente a digestão da fibra.

Não houve diferença significativa da hidratação do substrato e da diluição do inóculo sobre a contagem de microrganismos anaeróbios totais da fermentação após 24 horas (Tabela 13).

**Tabela 13.** Contagem de anaeróbios totais do feno de Coastcross hidratados nos tempos zero e 12 horas antes da inoculação com fezes diluídas com solução nutritiva em proporção peso:peso de 1:1 e 1:3 após 24 horas de fermentação (n=20)

Diluição	Hidratação			Hidratação	(P<0,05)	
	0	12	Média		Diluição	Hid x dil
1:1	6,82x10 <sup>6</sup>	4,96x10 <sup>6</sup>	5,89x10 <sup>6</sup>	NS	0,3019	NS
1:3	2,89x10 <sup>6</sup>	3,25x10 <sup>6</sup>	3,07x10 <sup>6</sup>			
Média	4,86x10 <sup>6</sup>	4,1x10 <sup>6</sup>				

CV 5,07%

Ao comparar os valores observados das concentrações de microrganismos nas diferentes diluições do inóculo pode sugerir que os microrganismos do inóculo de menor diluição (1:1) se desenvolveram de forma mais lenta até 24 horas, pois sugere-se que foi incubado um número maior de microrganismos nos frascos referentes à essa diluição devido a menor diluição. De forma contrária, os microrganismos do inóculo de maior diluição se desenvolveram rapidamente. Fato que pode ser explicado devido a maior quantidade de nutrientes disponível para o seu desenvolvimento (SANTOS et al., 2011).

A falta de conhecimento da quantidade de nutrientes solúveis do inóculo, assim como a concentração dos microrganismos estudados nas fezes e do inóculo antes da incubação, limitou a discussão sobre o desenvolvimento desses grupos de microrganismos e seu metabolismo. Entretanto, a técnica de produção de gases aliada com a identificação e quantificação dos grupos de microrganismos, assim como, os seus produtos finais do metabolismo microbiano (AGV's, NH<sub>3</sub> e lactato) pode ser uma ferramenta importante para estudos de exigências nutricionais da microbiota e os fatores que afetam seu desenvolvimento, consequentemente, melhorando a avaliação das exigências nutricionais dos equinos.

## 5 CONCLUSÕES

O pH final foi a única variável estudada que foi influenciada pela diluição do inóculo. Desse modo, pode-se concluir que a diluição não é fator limitante para comparação entre estudos utilizando fezes como fonte de inóculo em ensaios de fermentação *in vitro* que utilizem a técnica de produção cumulativa de gases. Assim, a maior diluição pode ser utilizada como estratégia em estudos onde há pouca quantidade de fezes para preparo do inóculo.

A contagem microbiológica deve ser realizada na fase exponencial da produção de gases, afim de caracterizar a população microbiana predominante, conseqüentemente, por qual substrato ocorrerá preferência de degradação.

A hidratação do substrato disponibiliza nutrientes solúveis para o desenvolvimento inicial dos microrganismos reduzindo a fase lag. Além disso, a hidratação do substrato volumoso desidratado é uma estratégia que aumenta a extensão de fermentação do substrato e a degradação da matéria seca.

Em ensaios *in vitro* que utilizam o substrato volumoso para fermentação e fezes equinas como inóculo, desde que haja hidratação do substrato, o período de fase lag pode ser desconsiderada para melhor ajuste do modelo aos dados.

## 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Arlington: AOAC International, 1995, 1025p.

BAUER, E.; WILLIAMS, B. A.; BOSCH, M. W.; VOIGT, C.; MOSENTHIN, R.; VERSTEGEN, M. W. Differences in microbial activity of digesta from three sections of the porcine large intestine according to *in vitro* fermentation of carbohydrate-rich substrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 15, p. 2097-2104, 2004.

BARUC, C.J.; DAWSON, K.A.; BAKER, J.P. The characterization of nitrogen metabolism of equine caecal bacteria. In: Equine Nutrition and Physiology Symposium, 8, 1983. **Proceedings...** Kentucky, USA, p. 151-156, 1983.

BOURGETEAU, S. S.; JULLIAND, V. La diversité de l'écosystème microbien du tractus digestif équin. **INRA Productions Animales**. v. 25, n. 5, p. 407-418, 2012.

BROOM, D. M.; MOLENTO, C. F. M. Bem-estar animal: conceito e questões relacionadas–revisão (animal welfare: concept and related issues–review). **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2004.

BUENO, I. C.; CABRAL FILHO, S. L.; GOBBO, S. P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M.; ABDALLA, A. L. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123, p. 95-105, 2005.

CAMPOS, A. D. S.; DIAZ, B. L.; RIVERA, E. A. B.; GRANJEIRO, J. M.; BRAGA, L. M. G. D. M.; FRAJBLAT, M.; STEPHANO, M. A. Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: introdução geral. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2016.

CHERBUY, C. Gut microbiota and host health: from infancy to adulthood. In: **European Workshop on Equine Nutrition**, 8, 2016. *Proceedings...* AgroSup Dijon, France, p. 14-17.

CHERDTHONG, A.; WANAPAT, M. Manipulation of *in vitro* ruminal fermentation and digestibility by dried rumen digesta. **Livestock Science**. v. 153, p. 94-100, 2013.

CLARKE, L. L.; ROBERTS, M. C.; ARGENZIO, R. A. Feeding and digestive problems in horses. Physiologic responses to a concentrated meal. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 6, n. 2, p. 433-450, 1990.

COLES, L. T.; MOUGHAN, P. J.; DARRAGH, A. J. *In vitro* digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123, p. 421-444, 2005.

CONE, J. W.; VAN GELDER, A. H.; VISSCHER, G. J.; OUDSHOORN, L. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. **Animal Feed Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 113-128, 1996.

CONE, J. W.; VAN GELDER, A. H.; DRIEHUIS, F. Description of gas production profiles with a three-phasic model. **Animal Feed Science and Technology**, v. 66, n. 1, p. 31-45, 1997.

DE FOMBELLE, A.; JULLIAND, V.; DROGOUL, C.; JACOTOT, E. Feeding and microbial disorders in horses: 1-Effects of an abrupt incorporation of two levels of barley in a hay diet on

- microbial profile and activities. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 9, p. 439-445, 2001.
- DE FOMBELLE, A.; VARLOUD, M.; GOACHER, A. G.; JACOTOT, E.; PHILIPPEAU, C.; DROGOUL, C.; JULLIAND, V. Characterization of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses given two distinct diets. **Animal Science**, v. 77, n. 2, p. 293-304, 2003.
- DESROUSSEAUX, G.; SANTOS, A.S.; PELLIKAAN, W.F.; VAN DER POEL, A.F.B.; CONE, J.W.; GUEDES, C.M.V.; FERREIRA, L.M.M.; RODRIGUES, M.A.M. Effect of collection time on the fermentative activity of microbes in equine faeces. **Animal Feed Science and Technology**, v. 178, p. 183– 189, 2012.
- DROGOUL, C.; DE FOMBELLE, A.; JULLIAND, V. Feeding and microbial disorders in horses: 2: Effect of three hay: grain ratios on digesta passage rate and digestibility in ponies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 10, p. 487-491, 2001.
- ELGHANDOUR, M. M. Y.; CHAGOYÁN, J.C.V.; SALEM, A.Z.M.; KHOLIF, A.E.; CASTAÑEDA, J.S.M.; CAMACHO, L.M.; BUENDÍA, G. *In vitro* fermentative capacity of equine fecal inocula of 9 fibrous forages in the presence of different doses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 619–625, 2014.
- FAUBLADIER, C.; CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; VEIGA L.; JULLIAND, V. Effect of transportation on fecal bacterial communities and fermentative activities in horses: Impact of *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 supplementation. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 1736-1744, 2013.
- FENNER, H. Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam distillation. **Journal of Dairy Science**, v. 48, n. 2, p. 249-251, 1965.
- FRASER, D.; WEARY, D. M.; PAJOR, E. A.; MILLIGAN, B. N. A scientific conception of animal welfare that reflects ethical concerns. **Animal welfare**, v. 6, p. 187-205, 1997.
- GARBER, A.; HASTIE, P.M.; HENDEL, I. MURRAY, J.M.D. Effect of alfafa on *in vitro* fermentation of starch or inulin. In: **European Workshop on Equine Nutrition**, 8, 2016. *Proceedings...* AgroSup Dijon, France, p. 37-39, 2016.
- GRIMM, P.; VASSEUR, M.; JULLIAND, V. What faecal parameters differ depending on the horse diet? In: **European Workshop on Equine Nutrition**, 8, 2016. *Proceedings...* AgroSup Dijon, France, p. p. 42-44, 2016.
- GROOT, J. C.; CONE, J. W.; WILLIAMS, B. A.; DEBERSAQUES, F. M.; LANTINGA, E. A. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 77-89, 1996.
- GRØNVOLD, A. M. R., L'A.; STRAND, E. T. M.; SØRUM, H.; YANNARELL, A. C.; MACKIE, R. I. . Fecal microbiota of horses in the clinical setting: potential effects of penicillin and general anesthesia. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 3, p. 366-372, 2010.
- HALLIWELL, G.; BRYANT, M. The cellulolytic activity of pure culture strains of bacteria from the rumen of cattle. **Journal of Genetic Microbiology**, v. 32, p. 441-448, 1963.
- HOFFMAN, R. M.; WILSON, J. A.; KRONFELD, D. S.; COOPER, W. L.; LAWRENCE, L. A.; SKLAN, D.; HARRIS, P. A. Hydrolysable carbohydrates in pasture, hay, and horse feeds: Direct assay and seasonal variation. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 500–506, 2001.

- JANS, C.; MEILE, L.; LACROIX, C.; STEVENS, M. J. Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 33, p. 419-436, 2015.
- JOUANY, J.P.; MEDINA, B.; BERTIN, G.; JULLIAND, V. Effect of live yeast culture supplementation on hindgut microbial communities and their polysaccharides and glycoside hydrolase activities in horses fed a high-fiber or high-starch diet. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 39-347. 2009.
- JULLIAND, V.; DE FOMBELLE, A.; DROGOUL, C.; JACOTOT, E. Feeding and microbial disorders in horses: part 3 – effects of three hay: grain ratios on microbial profile and activities. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, p. 543–546, 2001.
- JULLIAND, V.; DE VAUX, A.; MILLET, L.; FONTY, G. Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3738 - 3741, 1999.
- JULLIAND, V.; GRIMM, P. The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 6, p. 2262-2274, 2016.
- LAHO, T.; VÁRADYOVÁ, Z.; MIHALIKOVÁ, K.; KISIDAYOVÁ, S. Fermentation capacity of fecal microbial inocula of Przewalski Horse, Kulan, and Chapman Zebra and polysaccharide hydrolytic activities of fecal microbial constituents (Ciliates and Bacteria) of Kulan and Chapman Zebra. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 143-149, 2013.
- LEEDLE, J. A. Z.; HESPELL, R. B. Differential carbohydrate media and anaerobic replica plating techniques in delineating carbohydrate-utilizing subgroups in rumen bacterial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 709-719, 1980.
- LOWMAN, R. S.; THEODOROU, M. K.; CUDDEFORD, D. The effect of sample processing on gas production profiles obtained using the pressure transducer technique. **Animal feed science and technology**, v. 97, n. 3, p. 221-237, 2002.
- MACKIE, R. I.; HEATH, A. B. Enumeration and isolation of lactate utilizing bacteria from the rumen of sheep. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, p.416-421, 1979.
- MACZULAK, A. E.; DAWSON, K. A.; BAKER, J. P. Nitrogen utilization in bacterial isolates from the equine cecum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1439-1443, 1985.
- MARTINS, J. A. **Suplementação Dietética de Equinos com Eletrólitos**. UFRRJ, 37p. 2012. Seropédica, RJ. (Dissertação – Mestrado em zootecnia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil.
- MAURÍCIO, R. M.; MOULD, F.; DHANOA, M. S.; OWEN, E.; CHANNAA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminants feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, p. 321-330, 1999.
- McBURNEY, M.I., Van SOEST, P.J. Structure–function relationships. In: Phillips, S.F.; Pemberton, J.H.; Shorter, R.G. (Eds.), **The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease**. Raven Press, New York, NY, USA, 1991, p. 37–49.
- MEDINA, B.; GIRARD, I. D.; JACOTOT, E.; JULLIAND, V. Effect of a preparation of on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 10, p. 2600-2609, 2002.

- MOULD, F.L.; KLIEM, K.E.; MORGAN, R.; MAURICIO, R.M. *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123–124, p. 31–50, 2005.
- MURRAY, J.M.D.; LONGLAND, A.C.; MOORE-COLYER, M.J.S. *In vitro* fermentation of different ratios of high-temperature dried lucerne and sugar beet pulp incubated with an equine faecal inoculum. **Animal Feed Science and Technology**, v. 129, p. 89–98, 2006a.
- MURRAY, J.M.D.; LONGLAND, A. C.; MOORE-COLYER, M.; DUNNETT, C. The effect of feeding a low- or high-starch diet on the *in vitro* fermentative capacity of equine faecal inocula. **Animal Science**, v. 82, p. 627–635, 2006b.
- MURRAY, J. A. M.; MCMULLIN, P.; HANDEL, I.; HASTIE, P. M. The effect of freezing on the fermentative activity of equine faecal inocula for use in an *in vitro* gas production technique. **Animal Feed Science and Technology**, v. 178, n. 3, p. 175-182, 2012.
- MURRAY, J.M.D.; MCMULLIN, P.; HANDEL, I.; HASTIE P.M. Comparison of intestinal contents from different regions of the equine gastrointestinal tract as inocula for use in an *in vitro* gas production technique. **Animal Feed Science and Technology**, v. 187, p. 98-103, 2014.
- MURRAY, J.M.D.; SCOTT, B.D.; HASTIE, P.M. Fermentative capacity of equine faecal inocula obtained from clinically normal horses and those predisposed to laminitis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 151, p. 306–311, 2009.
- NAGADI, S.; HERRERO, M.; JESSOP, N. S. The influence of diet of the donor animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and *in vitro* gas production degradability parameters. **Animal Feed Science and Technology**, v. 87, n. 3, p. 231-239, 2000.
- National Research Council - **Nutrient Requirements of Horses**. Washington: National Academy Press, 2007, 6Ed, 341p.
- PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 4, p. 1063-1073, 1993.
- RYMER, C.; HUNTINGTON, J. A.; GIVENS, D. I. Effects of inoculum preparation method and concentration, method of inoculation and pre-soaking the substrate on the gas production profile of high temperature dried grass. **Animal Feed Science and Technology**, v. 78, n. 3, p. 199-213, 1999.
- RYMER, C.; HUNTINGTON, J.A.; WILLIAMS, B.A. ; GIVENS, D.I. *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123, p. 9–30, 2005.
- SADET-BOURGETEAU, S.; JULLIAND, V. La diversité de l'écosystème microbien du tractus digestif équin. **INRA Prod. Anim**, v. 25, n. 5, p. 407-418, 2012.
- SANTOS, A.S.; RODRIGUES, M.A.M.; BESSA, R.J.B.; FERREIRA, L. M.; MARTIN-ROSSET, W. Understanding the equine cecum-colon ecosystem: current knowledge and future perspectives. **Animal**, v. 5, n. 1, p. 48- 56, 2011.
- SANTOS, A. S.; FERREIRA, L. M. M.; MARTIN-ROSSET, W.; COTOVIO, M.; SILVA, F.; BENNETT, R.N.; CONE, J. W.; BESSA, R.J.B.; RODRIGUES, M.A.M. The influence of casein and urea as nitrogen sources on *in vitro* equine caecal fermentation. **Animal**, v. 6, n. 7, p. 1096–1102, 2012.



- SCHOFIELD P.; PELL, A. N. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 3455 – 3463, 1995.
- SCHOFIELD, P.; PITT, R. E.; PELL, A. N. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2980-2980, 1994.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos - métodos químicos e biológicos**. Viçosa, UFV: Imprensa Universitária, 3.ed., 2006, 235p.
- SILVA, V. P. **Avaliação nutricional de fenos de estilosantes e de alfafa em equinos**. UFMG, 103p. 2010, Belo Horizonte, MG (Tese Doutorado em zootecnia) UFMG, Escola de Veterinária, 2010.
- SILVA, V. P.; ALMEIDA, F. Q.; MAURICIO, R. M.; PEREIRA, M. B.; SOUZA, L. F.; REZENDE, A. S. C. Avaliação nutricional de fenos de leguminosos através da técnica semi-automática de produção de gases em equinos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 47, 2010. *Anais...* Salvador, UFBA, v. 47, p.1 – 4, 2010a.
- SILVA, V. P.; ALMEIDA, F. Q. D.; MORGADO, E. D. S.; RODRIGUES, L. M.; SANTOS, T. M. D.; VENTURA, H. T. In situ caecal degradation of roughages in horses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 2, p. 349-355, 2010b.
- SILVA, V. P.; ALMEIDA, F. Q.; PIMENTEL, R. R. M.; GODOI, F. N.; SANTOS, T. M. D.; PIRES, M. S. Passage kinetics of digesta in horses fed with coastcross hay ground to different degrees. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 5, p. 506-514, 2014.
- SILVA, V.P.; MAURICIO, R.M.; ALMEIDA, F.Q.; GOLLCHER, A. M. R.; SOUZA, L.F.; REZENDE, A. S.C. Cinética da produção de gases de leguminosas com inóculo do colón dorsal de equinos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 47, 2010. *Anais...* Salvador, UFBA, v. 47, p.1 – 4, 2010c.
- SOUZA, N. K. P.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; COSTA, V.A.C.; PINA, D.S.; GOMES, D.I.; QUEIROZ, A.C.; MANTOVANI, H.C. Accuracy of the estimates of ammonia concentration in rumen fluid using different analytical methods. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1752-1758, 2013.
- SUNVOLD, G.; HUSSEIN, H.S.; FAHEY JR, G.C.; MERCHEN, N R; REINHART, G A. *In Vitro* fermentation of cellulose, beet pulp, citrus pulp, and citrus pectin using fecal inoculum from cats, dogs, horses, humans, and pigs and ruminal fluid from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 3639-3648, 1995.
- THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, p. 185-197, 1994.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas** - SAEG. Viçosa: UFV. Manual do usuário, 150p, 2000.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.
- VIEIRA, RICARDO AUGUSTO MENDONÇA; TEDESCHI, LUIS ORLINDO; CANNAS, ANTONELLO. A generalized compartmental model to estimate the fibre mass in the ruminoreticulum: 1. Estimating parameters of digestion. **Journal of Theoretical Biology**, v. 255, n. 4, p. 345-356, 2008a.

VIEIRA, R.A.M.; TEDESCHI, L.O.; CANNAS, A. A generalized compartmental model to estimate the fibre mass in the ruminoreticulum: 2. Integrating digestion and passage. **Journal of Theoretical Biology**, v. 255, n. 4, p. 357-368, 2008b.

WANG, M.; TANG, S.X.; TAN, Z.L. Modeling *in vitro* gas production kinetics: Derivation of Logistic–Exponential (LE) equations and comparison of models. **Animal Feed Science and Technology**, v. 165, p. 137-150, 2011.

ZEYNER, A.; GEIBLER, C.; DITTRICH, A. Effects of hay intake and feeding sequence on variables in faeces and faecal water (dry matter, pH value, organic acids, ammonia, buffering capacity) of horses. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 88, n. 1-2, p. 7-19, 2004.

# 7 ANEXOS

A – Protocolo da Comissão de Ética no Uso Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL  
RURAL DO RIO DE JANEIRO  
17 ABR 10 4 5 2015 002590  
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL PROTOCOLO

2015

INTERESSADO:

ASSUNTO: **PROCESSO: 23083.002590/2015-22**  
 DATA: 17/04/2015 VOLUME(S): DE: 0 A 0

OUTROS DADOS: **REQUERENTE:**  
 VINICIUS PIMENTEL SILVA  
**ASSUNTO: PROJETO**  
 ENC. PROJETO DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES DE ALIMENTOS  
 VOLUMOSOS POR METODOLOGIAS ALTERNATIVAS

SERVIÇO NACIONAL DE PROTOCOLO  
- SENAPRO -

MOVIMENTAÇÕES							
Seq	SIGLA	CÓDIGO	DATA	Seq	SIGLA	CÓDIGO	DATA
01	IZ		14/04/15	15			/ /
02	Entrada no IZ		28/04/15	16			/ /
03	Entrada no IZ		06/05/15	17			/ /
04	DNAP		08/05/15	18			/ /
05	IZ		11/05/15	19			/ /
06	DPA		12/05/15	20			/ /
07	Entrada no IZ		18/05/15	21			/ /
08			/ /	22			/ /
09			/ /	23			/ /
10			/ /	24			/ /
11			/ /	25			/ /
12			/ /	26			/ /
13			/ /	27			/ /
14			/ /	28			/ /

AS MOVIMENTAÇÕES DEVERÃO SER COMUNICADAS AO PROTOCOLO

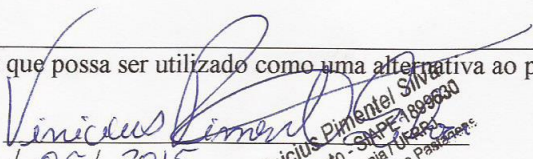
ANEXOS:

---



---

substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.

Assinatura: 

Data: 11 / 05 / 2015

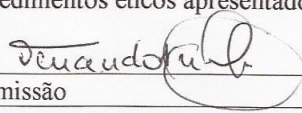
Vinicius Pimenta Silva  
Prof. Adjunto - SMT/FEA/USP  
Inst. Zootecnia/USP  
Dep. Nutrição Animal e Pastagens

Encaminhar em 2 vias.

A critério da CEUA, poderá ser solicitado o projeto, respeitando confidencialidade e conflito de interesses. Quando cabível, anexar o termo de consentimento livre e esclarecido do proprietário ou responsável pelo animal.

### 15. RESOLUÇÃO DA COMISSÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, na sua reunião de 14 / 05 / 2015, APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo.

Assinatura: 

Coordenador da Comissão

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, na sua reunião de \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_, emitiu o parecer em anexo e retorna o Protocolo para sua revisão.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Coordenador da Comissão

### \* GRAU DE INVASIVIDADE (GI) - definições segundo o CONCEA

**GI1 = Experimentos que causam pouco ou nenhum desconforto ou estresse** (ex.: observação e exame físico; administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, ou intramuscular de substâncias que não causem reações adversas perceptíveis; eutanásia por métodos aprovados após anestesia ou sedação; privação alimentar ou hídrica por períodos equivalentes à privação na natureza).

**GI2 = Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de leve intensidade** (ex.: procedimentos cirúrgicos menores, como biópsias, sob anestesia; períodos breves de contenção e imobilidade em animais conscientes; exposição a níveis não letais de compostos químicos que não causem reações adversas graves).

**GI3 = Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de intensidade intermediária** (ex.: procedimentos cirúrgicos invasivos conduzidos em animais anestesiados; imobilidade física por várias horas; indução de estresse por separação materna ou exposição a agressor; exposição a estímulos aversivos inescapáveis; exposição a choques localizados de intensidade leve; exposição a níveis de radiação e compostos químicos que provoquem prejuízo duradouro da função sensorial e motora; administração de agentes químicos por vias como a intracardíaca e intracerebral).

**GI4 = Experimentos que causam dor de alta intensidade** (ex.: Indução de trauma a animais não sedados).





SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

10  
A

12, em 14.05.2015  
Ao Sr. Diretor do IZ, encaminhando  
o Parecer da CEVA-IZ nº 39 para  
os procedimentos pertinentes.

*[Assinatura]*  
Coordenador do CEVA-IZ

Ao Prof. Vinícius Pimentel para  
ciência.

Em 18/05/2015

*[Assinatura]*  
Alexandre B. B. Araújo  
Diretor/IZ  
SIAPE 1220298

## B – Relatórios de Saída do Programa SAEG

Parâmetro = DMO

Procedimento = Testes de Cochran e Bartlett

Variáveis	Nome do Teste	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor (P=0.01)
DMO	Cochran	0.2868	*****	*****
DMO	Bartlett	0.1933	7.815	11.345

Procedimento = Teste de Lilliefors

Variáveis	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor (P=0.01)
DMO	0.0742	0.114	0.133

Procedimento = Arranjos Fatoriais

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	59	4400.716			
Total de Redução	27	4199.803	155.5482	24.77	0.0000
DILU	1	19.14027	19.14027	0.44	*****
HIDRAT	1	151.6895	151.6895	3.46	0.0722
DILU*HIDRAT	1	3.541398	3.541398	0.08	*****
** ERRO (A) **	16	702.0596	43.87872		
TEMP	2	3296.025	1648.013	262.48	0.0000
TEMP*DILU	2	17.14958	8.574790	1.37	0.2697
TEMP*HIDRAT	2	4.038217	2.019109	0.32	*****
TEMP*DILU*HIDRAT	2	6.159086	3.079543	0.49	*****
Resíduo	32	200.9129	6.278530		

Número de Dados = 60

Média Geral = 32.924

Coef. de Variação = 7.6105

N E W M A N K E U L S

Variável = DMO (6.278530)

TEMP	Descrição	Dados	Médias	Comparações	5%
72		20	41.8660	A	
48		20	33.1898	B	
24		20	23.7168	C	

Procedimento = Estatísticas com Quebras

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
HIDRAT	Todos	32.92419	8.636458	60
HIDRAT	- - - - -	1. 31.33417	8.389431	30
DILU	- - - - -	1. 31.65603	8.515589	15
TEMP	- - - - -	24. 21.52379	2.097235	5
TEMP	- - - - -	48. 32.64423	2.660869	5
TEMP	- - - - -	72. 40.80006	2.873959	5
DILU	- - - - -	3. 31.01231	8.547233	15
TEMP	- - - - -	24. 22.01147	2.667762	5
TEMP	- - - - -	48. 31.04406	4.471043	5
TEMP	- - - - -	72. 39.98142	5.172972	5
HIDRAT	- - - - -	12. 34.51421	8.725571	30
DILU	- - - - -	1. 35.32196	9.304577	15
TEMP	- - - - -	24. 25.57935	3.799776	5
TEMP	- - - - -	48. 35.25443	4.995389	5
TEMP	- - - - -	72. 45.13210	4.966751	5
DILU	- - - - -	3. 33.70646	8.350816	15
TEMP	- - - - -	24. 25.75270	4.781988	5
TEMP	- - - - -	48. 33.81642	5.397418	5
TEMP	- - - - -	72. 41.55025	6.006471	5

Parâmetro = DFDN

Procedimento = Testes de Cochran e Bartlett

Variáveis	Nome do Teste	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor (P=0.01)
DFDN	Cochran	0.2894	*****	*****
DFDN	Bartlett	0.3293	7.815	11.345

Procedimento = Teste de Lilliefors

Variáveis	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor (P=0.01)
DFDN	0.0910	0.114	0.133

Procedimento = Arranjos Fatoriais

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	59	8284.326			
Total de Redução	27	7602.661	281.5800	13.22	0.0000
DILU	1	101.4073	101.4073	0.77	*****
HIDRAT	1	151.1958	151.1958	1.14	0.2934
DILU*HIDRAT	1	10.47689	10.47689	0.08	*****
** ERRO (A) **	16	2120.256	132.5160		
TEMP	2	5078.636	2539.318	119.21	0.0000
TEMP*DILU	2	58.67526	29.33763	1.38	0.2668
TEMP*HIDRAT	2	44.28031	22.14015	1.04	0.3653
TEMP*DILU*HIDRAT	2	37.73290	18.86645	0.89	*****
Resíduo	32	681.6654	21.30204		

Número de Dados = 60  
Média Geral = 26.248  
Coef. de Variação = 17.584

N E W M A N K E U L S

Variável = DFDN (21.30204)

TEMP	Descrição	Dados	Médias	Comparações	5%
72		20	37.0408	A	
48		20	27.1459	B	
24		20	14.5587	C	

Procedimento = Estatísticas com Quebras

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
HIDRAT	Todos	26.24846	11.84957	60
HIDRAT	- - - - -	1. 24.66103	12.11196	30
DILU	- - - - -	1. 25.54321	12.87735	15
TEMP	- - - - -	24. 12.15578	2.955861	5
TEMP	- - - - -	48. 27.51438	12.15627	5
TEMP	- - - - -	72. 36.95945	5.663964	5
DILU	- - - - -	3. 23.77885	11.67835	15
TEMP	- - - - -	24. 11.86932	3.061167	5
TEMP	- - - - -	48. 23.26863	7.482332	5
TEMP	- - - - -	72. 36.19861	6.446136	5
HIDRAT	- - - - -	12. 27.83589	11.56517	30
DILU	- - - - -	1. 29.55380	12.16245	15
TEMP	- - - - -	24. 16.77129	6.313557	5
TEMP	- - - - -	48. 30.93988	8.479181	5
TEMP	- - - - -	72. 40.95024	6.081943	5
DILU	- - - - -	3. 26.11797	11.08200	15
TEMP	- - - - -	24. 17.43828	6.754433	5
TEMP	- - - - -	48. 26.86065	9.353170	5
TEMP	- - - - -	72. 34.05499	11.09629	5

Parâmetro (01) = DMS

Procedimento = Testes de Cochran e Bartlett

Variáveis	Nome do Teste	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor (P=0.01)
DMS	Cochran	0.2862	*****	*****
DMS	Bartlett	0.2177	7.815	11.345

Procedimento = Teste de Lilliefors

Variáveis	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor (P=0.01)
DMS	0.0712	0.114	0.133

Procedimento = Arranjos Fatoriais

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total			59		3659.920
Total de Redução	27	3503.960	129.7763	26.63	0.0000
HIDRAT	1	137.2759	137.2759	5.41	0.0265
DILU	1	12.41616	12.41616	0.49	*****
HIDRAT*DILU	1	6.939351	6.939351	0.27	*****
** ERRO (A) **	16	405.8511	25.36569		
TEMP	2	2922.415	1461.207	299.81	0.0000
TEMP*HIDRAT	2	1.762279	0.8811393	0.18	*****
TEMP*DILU	2	12.85187	6.425935	1.32	0.2817
TEMP*HIDRAT*DILU	2	4.448443	2.224222	0.46	*****
Resíduo	32	155.9600	4.873751		
Número de Dados			=		60
Média Geral			=		37.142
Coef. de Variação =		5.9438			

N E W M A N K E U L S

Variável = DMS (4.873751)

TEMP	Descrição	Dados	Médias	Comparações 5%
72		20	45.5533	A
48		20	37.4082	B
24		20	28.4644	C

Procedimento = Estatísticas com Quebras

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
HIDRAT	Todos	37.14197	7.876074	60
HIDRAT	- - - - -	1. 35.62938	7.695595	30
HIDRAT	- - - - -	12. 38.65456	7.889759	30

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
TEMP	Todos	37.14197	7.876074	60
TEMP	- - - - -	24. 28.46443	3.175259	20
TEMP	- - - - -	48. 37.40819	3.748359	20
TEMP	- - - - -	72. 45.55328	3.831918	20

Parâmetro = GAS

Procedimento = Testes de Cochran e Bartlett

Variáveis	Nome do Teste	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor (P=0.01)
GAS	Cochran	0.0350	*****	*****
GAS	Bartlett	134.4015	*****	*****

Procedimento = Teste de Lilliefors

Variáveis	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor (P=0.01)
GAS	0.0725	0.041	0.048



Procedimento = Arranjos Fatoriais

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	459	239458.1			
Total de Redução	107	232411.2	2172.067	108.50	0.0000
HIDRAT	1	11485.74	11485.74	10.13	0.0016
DILU	1	269.7706	269.7706	0.24	*****
DILU*HIDRAT	1	106.1825	106.1825	0.09	*****
** ERRO (A) **	16	18144.71	1134.044		
TEMP	22	200612.4	9118.746	455.49	0.0000
TEMP*DILU	22	475.0224	21.59193	1.08	0.3681
TEMP*HIDRAT	22	1300.178	59.09899	2.95	0.0000
TEMP*DILU*HIDRAT	22	17.18757	0.7812531	0.04	*****
Resíduo	352	7046.866	20.01951		
Número de Dados	=	460			
Média Geral	=	34.816			
Coef. de Variação	=	12.851			

Teste de Média S C O T T - K N O T T

Hidratação 1

TEMP	Médias	Comparações
72.00	69.20718	A
66.00	64.44044	A
60.00	59.39142	B
54.00	54.40876	C
48.00	49.68459	C
42.00	45.02011	D
36.00	41.51266	E
30.00	39.21273	E
27.00	37.95056	E
24.00	36.62403	F
21.00	34.88015	F
18.00	33.19110	F
16.00	30.88884	F
14.00	27.98893	G
12.00	24.45317	G
10.00	19.67412	H
8.00	15.08815	I
6.00	11.08486	J
5.00	9.467338	J
4.00	7.705960	K
3.00	5.947315	K
2.00	4.319742	K
1.00	1.883600	K

Hidratação 12

TEMP	Médias	Comparações
72.00	83.08105	A
66.00	78.36552	A
60.00	73.29742	B
54.00	68.42957	C
48.00	64.21882	C
42.00	59.88544	D
36.00	56.59469	D
30.00	54.08001	E
27.00	52.41837	E
24.00	50.59154	E
21.00	48.11668	F
18.00	45.70237	F
16.00	42.84539	G
14.00	39.46234	G
12.00	35.43124	H
10.00	29.82136	I
8.00	23.74944	J
6.00	18.43976	K
5.00	16.32027	K
4.00	13.84001	K
3.00	11.27722	L
2.00	8.715467	L
1.00	4.8930	M

Seleção = TEMP =1

HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	4.893029	A
1.00	1.883600	A

Seleção = TEMP =4

HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	13.84001	A
1.00	7.705960	A

Seleção = TEMP =2

HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	8.715467	A
1.00	4.319742	A

Seleção = TEMP =5

HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	16.32027	A
1.00	9.467338	A

Seleção = TEMP =3

HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	11.27722	A
1.00	5.947315	A

Seleção = TEMP =6

HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	18.43976	A
1.00	11.08486	A

Seleção = TEMP =8		
HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	23.74944	A
1.00	15.08815	B

Seleção = TEMP =10		
HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	29.82136	A
1.00	19.67412	B

Seleção = TEMP =12		
HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	35.43124	A
1.00	24.45317	B

Seleção = TEMP =14		
HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	39.46234	A
1.00	27.98893	B

Seleção = TEMP =16		
HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	42.84539	A
1.00	30.88884	B

Seleção = TEMP =18		
HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	45.70237	A
1.00	33.19110	B

Seleção = TEMP =21		
HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	48.11668	A
1.00	34.88015	B

Seleção = TEMP =24		
HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	50.59154	A
1.00	36.62403	B

Seleção = TEMP =27		
HIDRAT	Médias	Comparações

12.00	52.41837	A
1.00	37.95056	B

Seleção = TEMP =30		
HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	54.08001	A
1.00	39.21273	B

Seleção = TEMP =36		
HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	56.59469	A
1.00	41.51266	B

Seleção = TEMP =42		
HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	59.88544	A
1.00	45.02011	B

Seleção = TEMP =48		
HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	64.21882	A
1.00	49.68459	B

Seleção = TEMP =54		
HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	68.42957	A
1.00	54.40876	B

Seleção = TEMP =60		
HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	73.29742	A
1.00	59.39142	B

Seleção = TEMP =66		
HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	78.36552	A
1.00	64.44044	B

Seleção = TEMP =72		
HIDRAT	Médias	Comparações
12.00	83.08105	A
1.00	69.20718	B

Procedimento = Gauss-Newton

Equação =  $B1T1 B1T2 B1T3 B1T4 FUNÇÃO (V1/(1+(EXP(2-4*(C1*(TEMP-L)))))) + (V2/(1+(EXP(2-4*(C2*(TEMP-L))))))$

Amplitudes = (V1=1,50,5) (C1=0.01,1,0.5) (C2=0.01,1,0.10) (L=0.001,5,0.1) Tolerância

(V2=1,90,20)

= 0.0000100

Iterações = 00100

Variável Dependente = B1T1				
Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
V1	31.03648	0.92245	33.646	0.00000
C1	0.08687	0.00431	20.143	0.00000
L	3.71525	0.21138	17.576	0.00000
V2	64.63846	1.21977	52.992	0.00000
C2	0.01597	0.00053	29.912	0.00000
Soma de quadrados da regressão =		16954.14		
Soma de quadrados do resíduo =		11.74836		
Coef. de Determinação =		0.999		

Variável Dependente = B1T2

Parâmetros	Coeficientes	Desvios	T	Signif.
V1	10.68753	0.83340	12.824	0.00000
C1	0.13986	0.02869	4.875	0.00006
L	5.00000	0.65921	7.585	0.00000
V2	67.43241	3.36695	20.028	0.00000
C2	0.01325	0.00075	17.666	0.00000
Soma de quadrados da regressão =		8040.253		
Soma de quadrados do resíduo =		26.80962		
Coef. de Determinação =		0.997		

Variável Dependente = B1T3

Parâmetros	Coeficientes	Desvios	T	Signif.
V1	31.80246	1.12577	28.250	0.00000
C1	0.09048	0.00549	16.490	0.00000
L	5.00000	0.26453	18.902	0.00000
V2	64.57791	1.59209	40.562	0.00000
C2	0.01603	0.00068	23.716	0.00000
Soma de quadrados da regressão =		18392.98		
Soma de quadrados do resíduo =		18.41967		
Coef. de Determinação =		0.999		

Variável Dependente = B1T4

Parâmetros	Coeficientes	Desvios	T	Signif.
V1	49.96609	1.14801	43.524	0.00000
C1	0.01779	0.18195	0.098	0.46159
L	4.99907	0.03651	136.926	0.00000
V2	13.72565	5.33089	2.575	0.00954
C2	0.01780	0.66476	0.027	0.48947
Soma de quadrados da regressão =		9052.335		
Soma de quadrados do resíduo =		304.2611		
Coef. de Determinação =		0.975		

Procedimento = Guauss-Newton

Equação = B1T1 B1T2 B1T3 B1T4 B2T1 B2T2 B2T3 B2T4 B3T1 B3T2 B3T3 B3T4 B4T1 B4T2 B4T3 B4T4 B5T1 B5T2 B5T3 B5T4 FUNÇÃO (VF/(1+(EXP(2-4\*(C\*(TEMP-L))))))

Amplitudes = (VF=10,120,30) (C=0.0001,2,0.001) (L=0.0001,8,0.01)

Tolerância = 0.0000100

Iterações = 00100

Variável Dependente = B1T1

Parâmetros	Coeficientes	Desvios	T	Signif.
VF	83.53682	2.47525	33.749	0.00000
C	0.02668	0.00156	17.113	0.00000
L	0.00028	0.40092	0.001	0.50000
Soma de quadrados da regressão =		16464.25		
Soma de quadrados do resíduo =		501.6397		
Coef. de Determinação =		0.971		

Variável Dependente = B1T2

Parâmetros	Coeficientes	Desvios	T	Signif.
VF	71.46719	4.32722	16.516	0.00000
C	0.01536	0.00139	11.089	0.00000
L	0.00041	0.49154	0.001	0.50000
Soma de quadrados da regressão =		7853.188		
Soma de quadrados do resíduo =		213.8747		
Coef. de Determinação =		0.974		

Variável Dependente = B1T3

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	84.16168	2.75460	30.553	0.00000
C	0.02549	0.00160	15.894	0.00000
L	0.00104	0.11548	0.009	0.50000
Soma de quadrados da regressão =		17835.43		
Soma de quadrados do resíduo =		575.9673		
Coef. de Determinação =		0.970		

Variável Dependente = B1T4

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	65.31053	4.06839	16.053	0.00000
C	0.01849	0.00204	9.074	0.00000
L	7.31697	1.77201	4.129	0.00026
Soma de quadrados da regressão =		9078.249		
Soma de quadrados do resíduo =		278.3466		
Coef. de Determinação =		0.972		

Variável Dependente = B2T1

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	62.35362	3.13365	19.898	0.00000
C	0.03978	0.00502	7.922	0.00000
L	0.00010	0.76631	0.000	0.50000
Soma de quadrados da regressão =		8034.884		
Soma de quadrados do resíduo =		1365.607		
Coef. de Determinação =		0.865		

Variável Dependente = B2T2

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	60.02944	4.16096	14.427	0.00000
C	0.02385	0.00317	7.528	0.00000
L	0.00024	0.35321	0.001	0.50000
Soma de quadrados da regressão =		6808.971		
Soma de quadrados do resíduo =		1126.781		
Coef. de Determinação =		0.870		

Variável Dependente = B2T3

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	63.29925	2.00769	31.528	0.00000
C	0.05173	0.00426	12.132	0.00000
L	0.00025	0.00892	0.028	0.48911
Soma de quadrados da regressão =		8615.329		
Soma de quadrados do resíduo =		718.2137		
Coef. de Determinação =		0.927		

Variável Dependente = B2T4

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	48.29975	1.75890	27.460	0.00000
C	0.04259	0.00368	11.586	0.00000
L	0.00043	0.03987	0.011	0.49571
Soma de quadrados da regressão =		6075.303		
Soma de quadrados do resíduo =		464.9288		
Coef. de Determinação =		0.929		

Variável Dependente = B3T1

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	80.75209	3.45580	23.367	0.00000
C	0.03562	0.00334	10.667	0.00000
L	0.00025	0.01047	0.024	0.49047
Soma de quadrados da regressão =		16417.56		

Soma de quadrados do residuo = 1494.805  
Coef. de Determinação = 0.917

Variável Dependente = B3T2

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	60.96215	2.96364	20.570	0.00000
C	0.03746	0.00689	5.441	0.00001
L	2.17715	2.24075	0.972	0.17142

Soma de quadrados da regressão = 11491.25  
Soma de quadrados do residuo = 1082.062  
Coef. de Determinação = 0.917

Variável Dependente = B3T3

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	74.86079	2.36482	31.656	0.00000
C	0.04157	0.00308	13.507	0.00000
L	0.00031	0.01570	0.019	0.49233

Soma de quadrados da regressão = 13855.33  
Soma de quadrados do residuo = 821.1114  
Coef. de Determinação = 0.944

Variável Dependente = B3T4

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	52.13233	1.64761	31.641	0.00000
C	0.04764	0.00643	7.413	0.00000
L	2.78908	1.35172	2.063	0.02615

Soma de quadrados da regressão = 8595.341  
Soma de quadrados do residuo = 412.4931  
Coef. de Determinação = 0.956

Variável Dependente = B4T1

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	68.25858	4.18668	16.304	0.00000
C	0.01988	0.00276	7.209	0.00000
L	2.40636	2.29746	1.047	0.15370

Soma de quadrados da regressão = 10817.42  
Soma de quadrados do residuo = 561.6826  
Coef. de Determinação = 0.953

Variável Dependente = B4T2

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	61.69420	3.88057	15.898	0.00000
C	0.01944	0.00246	7.917	0.00000
L	5.60411	2.03836	2.749	0.00618

Soma de quadrados da regressão = 8759.835  
Soma de quadrados do residuo = 358.4673  
Coef. de Determinação = 0.963

Variável Dependente = B4T3

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	56.92547	3.35805	16.952	0.00000
C	0.02206	0.00265	8.328	0.00000
L	0.00058	0.69178	0.001	0.50000

Soma de quadrados da regressão = 7321.055  
Soma de quadrados do residuo = 587.7192  
Coef. de Determinação = 0.926

Variável Dependente = B4T4

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	58.37875	3.43657	16.988	0.00000
C	0.01912	0.00222	8.606	0.00000

L 5.33196 1.88202 2.833 0.00514  
 Soma de quadrados da regressão = 7648.541  
 Soma de quadrados do residuo = 266.9071  
 Coef. de Determinação = 0.968

Variável Dependente = B5T1

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	59.59884	2.63410	22.626	0.00000
C	0.03062	0.00286	10.713	0.00000
L	0.00022	0.56032	0.000	0.50000
Soma de quadrados da regressão =		7675.919		
Soma de quadrados do residuo =		716.5318		
Coef. de Determinação =		0.920		

Variável Dependente = B5T2

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	67.36212	3.36080	20.043	0.00000
C	0.02393	0.00243	9.850	0.00000
L	0.00022	0.34245	0.001	0.50000
Soma de quadrados da regressão =		9158.367		
Soma de quadrados do residuo =		733.1720		
Coef. de Determinação =		0.932		

Variável Dependente = B5T3

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	50.13487	1.32215	37.919	0.00000
C	0.03707	0.00247	15.025	0.00000
L	0.00025	0.60164	0.000	0.50000
Soma de quadrados da regressão =		5623.840		
Soma de quadrados do residuo =		226.5970		
Coef. de Determinação =		0.965		

Variável Dependente = B5T4

Parâmetros	Coefficientes	Desvios	T	Signif.
VF	61.69409	2.56350	24.066	0.00000
C	0.02546	0.00210	12.138	0.00000
L	0.00025	0.47084	0.001	0.50000
Soma de quadrados da regressão =		8319.069		
Soma de quadrados do residuo =		495.6294		
Coef. de Determinação =		0.946		

Parâmetro (01) = VF

Parâmetro (02) = C

Parâmetro (03) = L

Procedimento = Testes de Cochran e Bartlett

Variáveis	Nome do Teste	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor (P=0.01)
VF	Cochran	0.4988	0.629	0.721
VF	Bartlett	4.0727	7.815	11.345
C	Cochran	0.4014	0.629	0.721
C	Bartlett	1.6134	7.815	11.345
L	Cochran	0.5948	0.629	0.721
L	Bartlett	63.7785	7.815	11.345

Procedimento = Teste de Lilliefors

Variáveis	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor (P=0.01)
VF	0.1489	0.190	0.231
C	0.1794	0.190	0.231
L	0.4127	0.190	0.231

VF

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
HID	1	292.9951	292.9951	3.119	0.09647
DIL	1	184.8928	184.8928	1.968	0.17977
HID DIL	1	5.607405	5.607405	0.060	*****
Resíduo	16	1503.191	93.94945		
Coeficiente de Variação =		15.014			

C

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
HID	1	0.1630205E-03	0.1630205E-03	1.417	0.25123
DIL	1	0.1711125E-03	0.1711125E-03	1.488	0.24027
HID DIL	1	0.3120500E-05	0.3120500E-05	0.027	*****
Resíduo	16	0.1840492E-02	0.1150308E-03		
Coeficiente de Variação =		35.591			

L

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
HID	1	21.65489	21.65489	4.898	0.04177
DIL	1	1.378965	1.378965	0.312	*****
HID DIL	1	5.061387	5.061387	1.145	0.30052
Resíduo	16	70.74112	4.421320		
Coeficiente de Variação =		164.082			

Procedimento = Estatísticas com Quebras

Variável L

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
HID	Todos	1.281490	2.280770	20
HID	- - - - -	1. 2.322040	2.827871	10
HID	- - - - -	12. 0.2409400	0.7608300	10

Parâmetro (01) = PH

Procedimento = Testes de Cochran e Bartlett

Variáveis	Nome do Teste	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor (P=0.01)
PH	Cochran	0.3502	0.629	0.721
PH	Bartlett	0.7901	7.815	11.345

Procedimento = Teste de Lilliefors

Variáveis	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor (P=0.01)
PH	0.0963	0.190	0.231

Procedimento = Análise para modelos lineares

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
HIDRAT	1	0.3251250E-02	0.3251250E-02	0.684	*****
DILU	1	0.4186125E-01	0.4186125E-01	8.801	0.00909
HIDRAT DILU	1	0.1012500E-03	0.1012500E-03	0.021	*****
Resíduo	16	0.7610000E-01	0.4756250E-02		
Coeficiente de Variação =		1.047			

Procedimento = Estatísticas com Quebras

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
HIDRAT	Todos	6.589250	0.7990578E-01	20
HIDRAT	- - - - -	1. 6.602000	0.7627436E-01	10
DILU	- - - - -	1. 6.554000	0.5091660E-01	5
DILU	- - - - -	3. 6.650000	0.6882950E-01	5
HIDRAT	- - - - -	12. 6.576500	0.8544166E-01	10
DILU	- - - - -	1. 6.533000	0.8159350E-01	5
DILU	- - - - -	3. 6.620000	0.7097535E-01	5

Parâmetro (01) = NH3

Procedimento = Testes de Cochran e Bartlett

Variáveis	Nome do Teste	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor (P=0.01)
NH3	Cochran	0.4280	0.629	0.721
NH3	Bartlett	4.3923	7.815	11.345

Procedimento = Teste de Lilliefors

Variáveis	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor (P=0.01)
NH3	0.1860	0.190	0.231

Procedimento = Arranjos Fatoriais

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	19	22.93452			
Total de Redução	3	1.949000	0.6496667	0.50	*****
DILU	1	0.4500000E-02	0.4500000E-02	0.00	*****
HIDRAT	1	1.800000	1.800000	1.37	0.2586
DILU*HIDRAT	1	0.1445000	0.1445000	0.11	*****
Resíduo	16	20.98552	1.311595		
Número de Dados	=	20			
Média Geral	=	2.5020			
Coef. de Variação	=	45.773			

Procedimento = Estatísticas com Quebras

Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
HIDRAT	Todos	2.502000	1.098672	20
HIDRAT	- - - - -	1. 2.202000	0.6266631	10
DILU	- - - - -	1. 2.132000	0.7150315	5
DILU	- - - - -	3. 2.272000	0.6000583	5
HIDRAT	- - - - -	12. 2.802000	1.398418	10
DILU	- - - - -	1. 2.902000	1.498556	5
DILU	- - - - -	3. 2.702000	1.459236	5

Parâmetro (01) = LAC

Parâmetro (02) = LACLOG

Parâmetro (03) = STRE

Parâmetro (04) = STRELOG

Parâmetro (05) = CEL

Parâmetro (06) = CELOG

Parâmetro (07) = AT

Parâmetro (08) = ATLOG

Procedimento = Testes de Cochran e Bartlett

Variáveis	Nome do Teste	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor (P=0.01)
LAC	Cochran	0.3646	0.629	0.721
LAC	Bartlett	3.2956	7.815	11.345
LACLOG	Cochran	0.4917	0.629	0.721
LACLOG	Bartlett	3.2714	7.815	11.345
STRE	Cochran	0.4467	0.629	0.721
STRE	Bartlett	5.6265	7.815	11.345
STRELOG	Cochran	0.3525	0.629	0.721
STRELOG	Bartlett	0.5260	7.815	11.345
CEL	Cochran	0.7238	0.629	0.721
CEL	Bartlett	8.6497	7.815	11.345
CELOG	Cochran	0.4481	0.629	0.721
CELOG	Bartlett	2.2887	7.815	11.345
AT	Cochran	0.5081	0.629	0.721
AT	Bartlett	12.2670	7.815	11.345
ATLOG	Cochran	0.4473	0.629	0.721
ATLOG	Bartlett	4.5072	7.815	11.345



Procedimento = Teste de Lilliefors

Variáveis	Valor Calculado	Valor (P=0.05)	Valor (P=0.01)
LAC	0.0889	0.190	0.231
LACLOG	0.0948	0.190	0.231
STRE	0.1624	0.190	0.231
STRELOG	0.0928	0.190	0.231
CEL	0.2296	0.190	0.231
CELOG	0.0939	0.190	0.231
AT	0.2554	0.190	0.231
ATLOG	0.1201	0.190	0.231

Procedimento = Arranjos Fatoriais

LAC

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	19	0.9172270E+17			
Total de Redução	3	0.1046585E+17	0.3488618E+16	0.69	*****
DILU	1	0.4599208E+16	0.4599208E+16	0.91	*****
HIDRAT	1	0.3036802E+15	0.3036802E+15	0.06	*****
DILU*HIDRAT	1	0.5562965E+16	0.5562965E+16	1.10	0.3108
Resíduo	16	0.8125684E+17	0.5078553E+16		
Número de Dados	=	20			
Média Geral	=	0.15277E+09			
Coef. de Variação	=	46.649			

LACLOG

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	19	1.065104			
Total de Redução	3	0.4388833E-01	0.1462944E-01	0.23	*****
DILU	1	0.1800288E-01	0.1800288E-01	0.28	*****
HIDRAT	1	0.5581826E-02	0.5581826E-02	0.09	*****
DILU*HIDRAT	1	0.2030362E-01	0.2030362E-01	0.32	*****
Resíduo	16	1.021215	0.6382595E-01		
Número de Dados	=	20			
Média Geral	=	8.1313			
Coef. de Variação	=	3.1070			

STRE

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	19	0.6622846E+17			
Total de Redução	3	0.1423285E+17	0.4744282E+16	1.46	0.2629
DILU	1	0.8891076E+16	0.8891076E+16	2.74	0.1176
HIDRAT	1	0.3808187E+16	0.3808187E+16	1.17	0.2951
DILU*HIDRAT	1	0.1533584E+16	0.1533584E+16	0.47	*****
Resíduo	16	0.5199562E+17	0.3249726E+16		
Número de Dados	=	20			
Média Geral	=	0.89633E+08			
Coef. de Variação	=	63.600			

STRELOG

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	19	1.773555			
Total de Redução	3	0.4102139	0.1367380	1.60	0.2276
DILU	1	0.1921334	0.1921334	2.25	0.1527
HIDRAT	1	0.1370304	0.1370304	1.61	0.2229
DILU*HIDRAT	1	0.8105008E-01	0.8105008E-01	0.95	*****
Resíduo	16	1.363341	0.8520880E-01		
Número de Dados	=	20			
Média Geral	=	7.8582			
Coef. de Variação	=	3.7147			

CEL						
Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.	
Total	19	0.8968358E+10				
Total de Redução	3	0.5567749E+09	0.1855916E+09	0.35	*****	
DILU	1	0.1366076E+09	0.1366076E+09	0.26	*****	
HIDRAT	1	0.2361294E+09	0.2361294E+09	0.45	*****	
DILU*HIDRAT	1	0.1840379E+09	0.1840379E+09	0.35	*****	
Resíduo		16	0.8411583E+10	0.5257239E+09		
Número de Dados	=	20				
Média Geral	=	16306.				
Coef. de Variação	=	140.61				

CELOG						
Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.	
Total	19	6.966718				
Total de Redução	3	0.4073263	0.1357754	0.33	*****	
DILU	1	0.3683683	0.3683683	0.90	*****	
HIDRAT	1	0.3565547E-01	0.3565547E-01	0.09	*****	
DILU*HIDRAT	1	0.3302484E-02	0.3302484E-02	0.01	*****	
Resíduo		16	6.559391	0.4099620		
Número de Dados	=	20				
Média Geral	=	3.8902				
Coef. de Variação	=	16.459				

AT						
Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.	
Total	19	0.2957401E+15				
Total de Redução	3	0.4858655E+14	0.1619552E+14	1.05	0.3982	
DILU	1	0.3961978E+14	0.3961978E+14	2.56	0.1288	
HIDRAT	1	0.2834941E+13	0.2834941E+13	0.18	*****	
DILU*HIDRAT	1	0.6131830E+13	0.6131830E+13	0.40	*****	
Resíduo		16	0.2471535E+15	0.1544710E+14		
Número de Dados	=	20				
Média Geral	=	0.44792E+07				
Coef. de Variação	=	87.746				

ATLOG						
Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.	
Total	19	1.925611				
Total de Redução	3	0.1739220	0.5797400E-01	0.53	*****	
DILU	1	0.1245944	0.1245944	1.14	0.3019	
HIDRAT	1	0.2041176E-01	0.2041176E-01	0.19	*****	
DILU*HIDRAT	1	0.2891585E-01	0.2891585E-01	0.26	*****	
Resíduo		16	1.751689	0.1094806		
Número de Dados	=	20				
Média Geral	=	6.5287				
Coef. de Variação	=	5.0681				

Procedimento		=	Estatísticas		com	Quebras
LAC						
Descrição			Valores	Médias	Desvios	Dados
HIDRAT			Todos	0.1527678E+09	0.6948029E+08	20
HIDRAT	- - - - -		1.	0.1566644E+09	0.7270463E+08	10
DILU	- - - - -		1.	0.1551511E+09	0.8606317E+08	5
DILU	- - - - -		3.	0.1581778E+09	0.6693896E+08	5
HIDRAT	- - - - -		12.	0.1488711E+09	0.6979760E+08	10
DILU	- - - - -		1.	0.1807133E+09	0.8558482E+08	5
DILU	- - - - -		3.	0.1170289E+09	0.3319272E+08	5

STRE				
Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
HIDRAT	Todos	0.8963333E+08	0.5903989E+08	20
HIDRAT	- - - - -	1. 0.1034322E+09	0.5637471E+08	10
DILU	- - - - -	1. 0.9110444E+08	0.4509450E+08	5
DILU	- - - - -	3. 0.1157600E+09	0.6882801E+08	5
HIDRAT	- - - - -	12. 0.7583444E+08	0.6129827E+08	10
DILU	- - - - -	1. 0.4599333E+08	0.2053996E+08	5
DILU	- - - - -	3. 0.1056756E+09	0.7619847E+08	5

CEL				
Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
HIDRAT	Todos	16306.41	21725.99	20
HIDRAT	- - - - -	1. 12870.36	10286.09	10
DILU	- - - - -	1. 13290.32	12039.92	5
DILU	- - - - -	3. 12450.40	9625.898	5
HIDRAT	- - - - -	12. 19742.47	29401.43	10
DILU	- - - - -	1. 14095.51	18524.93	5
DILU	- - - - -	3. 25389.43	39014.16	5

AT				
Descrição	Valores	Médias	Desvios	Dados
HIDRAT	Todos	4479175.	3945284.	20
HIDRAT	- - - - -	1. 4855668.	4305615.	10
DILU	- - - - -	1. 6816851.	5603176.	5
DILU	- - - - -	3. 2894484.	836683.7	5
HIDRAT	- - - - -	12. 4102681.	3742552.	10
DILU	- - - - -	1. 4956451.	5135013.	5
DILU	- - - - -	3. 3248912.	1823296.	5