

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**ESCOLA DE VETERINÁRIA**  
**Colegiado dos cursos de Pós-Graduação**

UTILIZAÇÃO DIGESTIVA, METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO “IN VITRO” DE  
DIETAS E CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA CECAL EM COELHOS  
SUPLEMENTADOS COM *LITHOTHAMNIUM*

ANA CAROLINA CASTRO EULER

**Belo Horizonte**  
**UFMG - Escola de Veterinária**  
**2009**

Ana Carolina Castro Euler


UTILIZAÇÃO DIGESTIVA, METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO “IN VITRO” DE  
DIETAS E CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA CECAL EM COELHOS  
SUPLEMENTADOS COM *LITHOTHAMNIUM*

Tese apresentada à UFMG, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor em Zootecnia  
Área: Nutrição Animal  
Orientador: Walter Motta Ferreira

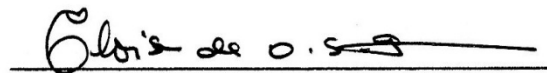
Belo Horizonte  
UFMG -Escola de Veterinária  
2009



Tese defendida e aprovada em 03 de abril de 2009 pela Comissão Examinadora composta por:



Prof. Walter Motta Ferreira  
(Presidente)




Profa. Dra. Eloísa de Oliveira Simões Saliba



Profa. Dra. Gerusa da Silva Salles Corrêa



Profa. Dra. Vanusa Patrícia Araújo Ferreira



Prof. Dr. Leonardo José Camargos Lara

## **Agradecimentos:**

À Deus pela vida e pela coragem que me proporcionou, bem como por todas as conquistas;

Ao Edgar por fazer parte da minha vida e ter compartilhado todos os momentos difíceis, obrigada por tudo;

Aos meus pais, Roberto e Maria José, aos meus irmãos, Ana Margarida, Bernardo e Pedro e a minha avó querida Zinéia, que mesmo distante acreditaram e me apoiaram em todas as etapas de minha vida;

Ao prof. Walter Motta Ferreira, pela orientação, pela amizade recebida, pelos conhecimentos transmitidos, pelo incentivo a pesquisa e por acreditar em mim;

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Departamento de Zootecnia e funcionários da Escola de Veterinária, pelas oportunidades;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo;

Ao Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, em especial a professora Dra. Célia Alencar Moraes pelas análises da diversidade microbiana através da técnica de PCR-DGGE;

Aos meus amigos, em especial ao Luciano, pelo apoio, amizade e carinho em todo momento;

Em fim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para o sucesso deste trabalho.

---

## SUMÁRIO

---

<b>Resumo</b> .....	11
<b>Abstract</b> .....	12
<b>Introdução Geral</b> .....	13
<b>Capítulo I - Revisão de literatura</b> .....	14
1- O trato intestinal dos coelhos .....	14
1.1 – Microbiota intestinal de coelhos .....	15
1.2 - Interação da microbiota intestinal com o alimento no trato digestivo dos animais .....	19
2- A importância do uso de aditivos na alimentação de coelhos .....	21
3- O uso do <i>Lithothamnium</i> sp. na nutrição animal .....	21
4- Técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) - estudo de ecologia microbiana .....	23
5- Metodologias de avaliação de alimentos para coelhos .....	24
Referências Bibliográficas .....	30
<b>Capítulo II - Desempenho produtivo, rendimento de carcaça e digestibilidade aparente da matéria seca, proteína e energia em coelhos alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de <i>Lithothamnium</i> sp.</b>	
Resumo .....	38
Abstract .....	38
Introdução .....	39
Material e Métodos .....	39
Resultados e Discussão .....	41
Conclusões .....	46
Referencias bibliografias .....	46
<b>Capítulo III - Diferentes metodologias de avaliação de alimentos para coelhos.</b>	
Resumo .....	49
Abstract .....	49
Introdução .....	50
Material e Métodos .....	50
Resultados e Discussão .....	53
Conclusões .....	61
Referencias bibliografias .....	61

<b>Capítulo IV - Impacto do <i>Lithothamnium sp.</i> na diversidade genética da microbiota cecal de coelhos</b>	
Resumo .....	62
Abstract .....	62
Introdução .....	63
Material e Métodos .....	63
Resultados e Discussão .....	67
Conclusões .....	71
Referencias bibliografias .....	71
<b>Capítulo V - Dinâmica de fosfatase alcalina, fósforo e cálcio em coelhos em crescimento alimentados com dietas suplementadas com <i>Lithothamnium sp.</i></b>	
Resumo .....	72
Abstract .....	72
Introdução .....	73
Material e Métodos .....	74
Resultados e Discussão .....	74
Conclusões .....	76
Referencias bibliografias .....	76
<b>Considerações finais</b>	78

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

I.1- Composição de minerais do <i>Lithothamnium</i> sp.	22
II.1-Formulação e composição nutricional das dietas experimentas e da dieta referência.	40
II.2- Análise bromatológica do <i>Lithothamnium</i> sp.	42
II.3- Média do consumo, peso vivo final (PV), ganho de peso diário (GP), conversão alimentar (CA), rendimento de carcaça (RC) e rendimento das vísceras comestíveis, fígado (Rfig), rins (Rrins) e coração (Rcor) de coelhos alimentados com diferentes concentrações de <i>Lithothamnium</i> sp.	43
II.4- Médias do consumo e coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (CDMS), proteína bruta (CDPB) e energia bruta (CDEB), das dietas testadas avaliadas na metodologia <i>in vivo</i> .	43
II.5- Médias do comprimento e da largura das vilosidades ileais dos coelhos alimentados com dietas com níveis crescentes de inclusão de <i>Lithothamnium</i> sp.	45
III.1- Médias da digestibilidade <i>in vivo</i> da matéria seca (DigMS), digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca com a técnica de Tilley e Terry (DigTT) com 24 horas de fermentação e 48 horas de fermentação e degradabilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DMS) e da matéria orgânica (DMO) avaliando os três tipos de inóculo pela técnica semi automática de produção de gás.	53
III.2- Valores para pH cecal ao final da fermentação do experimento <i>in vivo</i> (ao abate), técnica <i>in vitro</i> de Tilley e Terry (1963) (DITT) ao final das 24 e 48 horas de fermentação no primeiro estágio da técnica e ao final da fermentação na técnica semi-automática de produção de gás com os três tipos de inóculos, fresco, congelado no freezer e congelado no nitrogênio líquido.	53
III.3- Produção cumulativa de gás real e estimada pelo modelo de France et al. (1993) para o congelamento no nitrogênio (N).	56
III.4- Produção cumulativa de gás real e estimada pelo modelo de France et al. (1993) para o congelamento no freezer (Fr).	57
III.5- Produção cumulativa de gás real e estimada pelo modelo de France et al. (1993) para o congelamento no fresco (Fre).	58
III.6- Equações para estimar a produção de gás de acordo com o modelo de France et al. (1993) para os diferentes inóculos (conteúdo cecal fresco, conteúdo cecal congelado no nitrogênio líquido e conteúdo cecal congelado no freezer) testados.	59
IV.1- Sequência dos <i>primers</i> usados para amplificar fragmentos do gene rDNA 16S nos experimentos de PCR.	65
IV.2- Abundância das unidades taxonômicas operacionais (UTO), correspondentes aos tratamentos em gel de DGGE.	69

---



---

## LISTA DE FIGURAS

---

I.1- Implantação de algumas populações bacterianas no ceco de coelhos jovens.	17
I.2- Equilíbrio entre archea e população bacteriana no ecossistema cecal em relação a idade do coelho.	18
I.3- Elementos da microbiota cecal em coelhos até o desmame (28 dias).	18
I.4- Biodiversidade cecal de matrizes e lâparos em diferentes idades.	19
II.1-Fotos ilustrativas das vilosidades ileais.	45
III.1- Relação entre a produção de gases e as degradabilidades da matéria orgânica e matéria seca avaliadas pela técnica de Maurício et al. (1999) utilizando inoculo cecal fresco.	54
III.2- Teste de identidade de curvas para as três metodologias (fresco, freezer e nitrogênio) utilizadas para avaliar a técnica de produção de gases nos diferentes inóculos (T1, T2, T3, T4 e T5).	60
IV.1-. DNA extraído de fezes de coelho. M1: Marcador de quantidade de DNA de fago lambda na concentrações de 25 ng mL <sup>-1</sup> ; M2: marcadores de quantidade de DNA de fago lambda na concentração 50 ng mL <sup>-1</sup> ; A: dieta referência; B: 0,25%; C: 0,50%; D: 0,75%; E: 1,0% de inclusão do <i>Lithothamnium sp.</i> nas dietas experimentais.	66
IV.2- Eletroforese em gel de agarose 1,2% do produto amplificado por PCR dos fragmentos dos rDNA 16S de bactérias totais presentes em fezes de coelho. M1: Marcador hind; M2: Marcador de tamanho 100 pb DNA Ladder 1A: dieta referência; B: 0,25%; C: 0,50%; D: 0,75%; E: 1,0% de inclusão do <i>Lithothamnium sp.</i> nas dietas experimentais; C1-: controle negativo (0,4 µM de cada primer); C+: controle positivo ( <i>Escherichia coli</i> ); C2-: controle negativo (0,2 µM de cada primer).	66
IV.3- Eletroforese em gel de agarose 1,2% do produto amplificado por PCR dos fragmentos dos rDNA 16S de bactérias totais presentes em fezes de coelho. M1: Marcador hind; M2: Marcador de tamanho 100 pb DNA Ladder; A: dieta referência; B: 0,25%; C: 0,50%; D: 0,75%; E: 1,0% de inclusão do <i>Lithothamnium sp.</i> nas dietas experimentais.	67
IV.4- Perfil eletroforético em DGGE de fragmentos do gene rDNA 16S de bactérias totais presentes conteúdo cecal de coelho, obtido após amplificação enzimática utilizando primers específicos para Eubacteria. M: marcador preparado com a mistura de fragmentos do gene rDNA 16S das bactérias padrão (I) <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> ATCC 13138, (II) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATCC 12136, (III) <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579, (IV) <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 23858, (V) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, (VI) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, (VII) <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525, (VIII) <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 15176 e (IX) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12692. A: referência; B: 0,25%; C: 0,5% D: 0,75%; E: 1,0% de inclusão de <i>Lithothamnium sp.</i> nas dietas experimentais.	67
IV.5-. Valores em UTOs referentes a Eubacteria, nas dietas experimentais. Os dados foram obtidos pela análise do perfil eletroforético em DGGE de fragmentos do gene rDNA 16S de Eubacteria, com o auxílio do programa Gel Pro Analyser <sup>®</sup> .3.1.	68

IV.6- Índice de diversidade genética ( $H'$ ) referentes à Eubacteria das amostras experimentais. Os dados foram obtidos pela análise do perfil eletroforético em DGGE de fragmentos do gene rDNA 16S de Eubacteria, com o auxílio do programa Gel Pro Analyser <sup>Å</sup> ®.3.1.	70
IV.7- Valores de equitabilidade (dominância) referentes à Eubacteria das amostras experimentais. Os dados foram obtidos pela análise do perfil eletroforético em DGGE de fragmentos do gene rDNA 16S de Eubacteria, com o auxílio do programa Gel Pro Analyser <sup>Å</sup> ®.3.1.	70
V.1- Gráfico da concentração sérica da fosfatase alcalina (FAS) em relação aos níveis de inclusão do <i>Lithothamnium</i> sp. nas dietas experimentais.	74
V.2- Gráfico da concentração sérica do fósforo (P) em relação aos níveis de inclusão do <i>Lithothamnium</i> sp. nas dietas experimentais.	75
V.3- Gráfico da concentração sérica do cálcio (Ca) em relação aos níveis de inclusão do <i>Lithothamnium</i> sp. nas dietas experimentais	75

---

## RESUMO

Com o intuito de estudar o potencial do *Lithothamnium sp.*, como alimento funcional, foram realizados experimentos onde avaliou-se nutricionalmente dietas com níveis crescentes (0,25; 0,50; 0,75 e 1,00%) de inclusão de *Lithothamnium sp.* na alimentação de coelhos. Para tanto, foi analisada a composição de minerais traço do *Lithothamnium sp.*, a digestibilidade aparente das dietas e os parâmetros produtivos nos láparos, além de verificar a influência do *Lithothamnium* sobre a diversidade genética cecal e morfometria ileal. Foi avaliado também a fosfatase alcalina como indicador de níveis séricos de cálcio e fósforo. Além de estudar os efeitos do *Lithothamnium* na alimentação de coelhos, foram avaliadas diferentes metodologias de avaliação de alimentos, sendo elas, técnica semi-automática de produção de gases (Theodorou et al. (1994) adaptada por Maurício et al. (1999)), com diferentes métodos de conservação do conteúdo cecal para confecção do inóculo e técnica de Tilley e Terry (1963) . Contudo, pode-se concluir que o *Lithothamnium* não apresenta nenhum elemento traço prejudicial a nutrição animal. Nos níveis de inclusão testados nas dietas experimentais e para os tipos de avaliações realizadas, não foram encontrados resultados satisfatórios para ser considerado um alimento funcional; as técnicas *in vitro* de avaliação de alimentos demonstraram ser eficientes para determinar os coeficientes de digestibilidade para coelhos; o congelamento do conteúdo cecal como fonte de inóculo apresentou resultados satisfatórios, possibilitando seu uso na padronização do inóculo; a técnica de Tilley e Terry só demonstrou eficaz com 24 horas de fermentação durante o primeiro estágio de desenvolvimento; o *Lithothamnium sp.* não apresentou efeito benéfico sobre as vilosidades intestinais e no nível de 1% de inclusão prejudicou o desenvolvimento da mesma; a técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) foi adequada para as análises do DNA da microbiota cecal de coelhos e o perfil de diversidade genética apresentou maior riqueza nas amostras obtidas a partir da dieta referência e menor diversidade na amostra oriunda da dieta com 0,5% de inclusão de *Lithothamnium*; o nível sérico de fosfatase alcalina apresentou uma relação inversa com os níveis séricos de cálcio e fósforo, podendo representar um parâmetro potencialmente útil na determinação da biodisponibilidade destes elementos.

**Palavras-chaves:** aditivo; alimentação; fóssil de alga; monogástrico; nutrição

## ABSTRACT

In order to study the potential of *Lithothamnium* sp. as functional foods, where experiments were conducted to evaluate the nutritional diets with increasing levels (0.25, 0.50, 0.75 and 1.00%) for inclusion of *Lithothamnium* sp. in rabbit feeding. For this, we analyzed the composition of the trace minerals *Lithothamnium* sp., the apparent digestibility of diets and production parameters in young rabbits, and the influence of the genetic diversity *Lithothamnium* cecal and ileal morphometry. It also evaluated the alkaline phosphatase as an indicator of serum calcium and phosphorus. In addition to studying the effects of *Lithothamnium* the feeding of rabbits, were evaluated different methods of evaluation of food (Technical Mauricio et al. (1999) for gas production, with different methods of conservation of cecal contents for the inoculum preparation and technique Tilley and Terry (1963)). However, we can conclude that the *Lithothamnium* trace element presents no harm to animal nutrition, the levels tested for inclusion in experimental diets showed no satisfactory results to be considered a functional food, the techniques of in vitro evaluation of foods have been shown to be effective for determine the digestibility coefficients for rabbits, the cecal contents of the freeze as a source of inoculum showed satisfactory results, allowing its use in the standardization of the inoculum, the technique of Tilley and Terry showed only effective within 24 hours of fermentation during the first stage of development; the *Lithothamnium* sp. showed no beneficial effect on the intestinal villi and in the level of 1% of inclusion undermined the development of the same, the technique of gel electrophoresis with denaturing gradient (DGGE) was perfectly adequate for analysis of DNA from the cecal microbiota of rabbits and profile of genetic diversity showed greater richness in samples obtained from the reference diet and lower diversity in the sample derived from the diet with 0.5% for inclusion of *Lithothamnium*; the serum alkaline phosphatase showed an inverse relationship with serum levels of calcium and phosphorus, may represent a potentially useful parameter in determining the biodisponibilidad these elements.

**Key-word:** additive; food; fossil algae; monogastric; nutrition

## INTRODUÇÃO GERAL

Os coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) são criados em muitos países com finalidades distintas, tais como, animais de companhia, aproveitamento do pêlo, pele, couro e da carne, cobaias de laboratórios em institutos de pesquisa e indústrias farmacêuticas para produção e desenvolvimento de novas vacinas ou anticorpos policlonais, para estudos imunológicos e tecnológicos, dentre outros. Entretanto, o principal uso dos coelhos, como espécie comercial, é para produção de carne.

No Brasil, a cunicultura ainda é uma atividade discreta, porém, com grande potencial de crescimento. Ao se considerar os aspectos sócio-econômicos e ambientais envolvidos na produção de coelhos, é importante destacar a relativa facilidade de sua implantação, com pouca exigência de mão-de-obra e espaço físico, baixo impacto ambiental causado pelos resíduos e dejetos e a possibilidade de aproveitamento de subprodutos forrageiros na alimentação dos animais. A alimentação deste animal não necessita das *commodities* (milho e soja), como suínos e aves, fazendo com que estes animais não compitam nutricionalmente com a alimentação humana, nem interfira em interesses comerciais internacionais. Os coelhos possuem habilidade de extrair nutrientes dos alimentos não convencionais, tais como subprodutos agroindustriais, se tornando uma excelente fonte de proteína animal para a população a um custo baixo de produção.

O consumo da carne de coelho está presente em diversas culturas. Possui a mesma quantidade de proteína que a carne bovina. Contudo, a carne de coelho apresenta quantidades menores de gordura total, maior de vitaminas em relação à carne bovina, tornando-a atraente em dietas com restrições de calorias. É considerada uma fonte de proteína de alto valor biológico e com um custo de produção relativamente baixo, sendo possível credenciá-la como uma excelente opção de alimento à população humana.

O coelho é um herbívoro de ceco funcional com alta capacidade de conversão alimentar, especialmente por possuir a estratégia

nutricional de ingestão dos cecotrofos. O ceco apresenta uma intensa atividade microbiana, o que lhe confere a capacidade de melhorar o valor nutritivo do alimento.

Em sistemas eficientes de produção, o coelho consegue converter 20% das proteínas ingeridas pela dieta em proteína de origem animal para consumo humano, ao passo que alguns ruminantes conseguem converter até 12%.

Uma preocupação que têm definido as dietas contemporâneas em coelhos é o bem-estar dos animais, incluindo os novos critérios de saúde intestinal; o uso de produtos integrados ao modelo de sustentabilidade ambiental e a simplificação dos sistemas de alimentação.

Esta pesquisa propôs o estudo da avaliação nutritiva do uso prático do *Lithothamnium sp.* em dietas com níveis crescentes deste (0,25, 0,50, 0,75, 1,0% de inclusão), buscando atender a uma resposta produtiva dos animais fundamentadas no novo paradigma de alimentação racional.

Para tanto no capítulo 1 fez-se uma revisão de literatura sobre o trato gastrointestinal de coelhos, a importância do uso de aditivos, o *Lithothamnium* propriamente dito, a técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (dgge) para o estudo de ecologia microbiana e metodologias para avaliação de alimentos. No capítulo 2 foram abordados a composição de minerais traço do *Lithothamnium sp.*, a digestibilidade aparente das dietas, os parâmetros produtivos nos láparos e a morfometria ileal. No capítulo 3 avaliaram-se diferentes metodologias de avaliação de alimentos. Com o intuito de verificar a influência do *Lithothamnium* sobre a diversidade da microbiota cecal, no capítulo 4, foram avaliados a interferência do aditivo na colonização da microbiota cecal. Finalmente, no capítulo 5 avaliou-se a fosfatase alcalina como indicador de níveis séricos de cálcio e fósforo.

## CAPÍTULO I

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 1 - O TRATO INTESTINAL DOS COELHOS

O coelho é classificado como monogástrico herbívoro. O sistema digestivo é adaptado para fermentação da parede celular vegetal graças à importante microbiota existente no trato gastrointestinal (TGI). Desta forma, o coelho consegue aumentar a eficiência digestiva de dietas fibrosas.

O sistema digestivo dos coelhos é caracterizado pela importante relação que o ceco e o cólon expressam sobre o trato gastrointestinal, quando comparado a outras espécies (Portsmouth, 1977). Como consequência, a atividade microbiana existente no ceco tem grande importância sobre os processos de digestão e a utilização dos nutrientes. Além disso, a cecotrofia, comportamento de ingestão de fezes moles de origem cecal, após a digestão microbiana, é fundamental para o total aproveitamento dos nutrientes requeridos pelos coelhos (Carabaño e Piquer, 1998).

A motilidade cecal não deve ser considerada isoladamente, pois a região ileo-cecal, o ceco e o cólon proximal formam uma unidade funcional. Deve-se ressaltar que é essa região que permite que partículas de tamanho maior (<300µm) passe ao cólon, e partículas menores fiquem retidas no ceco para a degradação das bactérias (Jilge, 1980). De particular importância na fisiologia digestiva dos coelhos é esta separação de partículas no cólon. Após a digestão dos nutrientes no intestino delgado, os resíduos passam através da válvula ileal e seguem parte ao cólon proximal e parte ao ceco. O ceco proximal então realiza movimentos antiperistálticos e contrações no seu início e fim, as quais impulsionam a parte do material ao ceco. Em contrações rápidas, desde a base do apêndice até a junção ileocecólica e vice-versa, o ceco mistura continuamente seu conteúdo. Estes movimentos são responsáveis pela maior tendência das partículas maiores e com pouco líquido fluírem para o cólon proximal, e pelas partículas menores, microrganismos e grande parte dos líquidos seguirem para o ceco. O material no cólon perde água e é rapidamente eliminado em resposta a uma estimulação nervosa. As fezes duras são constituídas pelas partículas maiores e

modeladas por contrações do colo distal, e sua eliminação sempre precede contrações simples e amplas do ceco e cólon proximal, com rápida movimentação das fezes através do colo distal e reto. Desta forma o coelho é capaz de excretar rápida e seletivamente a fibra dietética, retendo por tempo prolongado as frações solúveis e as partículas pequenas, no ceco (Ferreira, 2003).

O ceco do coelho exibe aspecto estrutural particular, incluindo um apêndice secretor e um padrão de motilidade diurna de enchimento e esvaziamento, associado à prática da cecotrofia. A mucosa do ceco é bem vascularizada e rica em células mucosecretoras e absorptivas, sendo que sua porção distal apresenta um apêndice vermiforme (medindo cerca de 13 cm, aos 4 meses) contendo numerosas células linfóides, estando relacionada com a pressão arterial e secreção de íons bicarbonato ( $\text{HCO}_3$ ), tamponantes dos ácidos graxos voláteis produzidos durante a fermentação cecal. No apêndice cecal ocorre também uma fagocitose bacteriana e a apendicotomia reduz, significativamente, os níveis de vitamina  $\text{B}_{12}$  no conteúdo cecal, em uma clara relação com a fermentação microbiana. Na sua porção proximal, o ceco se relaciona com a junção ileocecólica, bastante importante na fisiologia do ceco e do cólon (Ferreira et al., 2006).

A microbiota cecal apresenta duas características principais: implantação lenta (quase não há microbiota até três dias de idade) e composição relativamente simples (principalmente bacilos gram-negativos não esporulados). A atividade metabólica da microbiota leva a produção de ácidos graxos voláteis (AGV) e amônia, após a fermentação de açúcares simples e aminoácidos. O perfil dos AGV cecais é específico para o coelho com predominância de acético ( $\text{C}_2=60$  a  $80$  mmol%) seguido pelo butírico ( $\text{C}_4=8$  a  $20$  mmol%) e pelo ácido propiônico ( $\text{C}_3=3$  a  $10$  mmol%) (Gidenne, 1997). Fatores que favorecem aumento no tempo de retenção do alimento no trato digestivo favorecem também ao aumento da concentração de AGV no ceco (Santomá et al. 1989). Estes AGV's são absorvidos pelas mucosas do ceco e cólon, sendo utilizados como fonte de energia para o organismo.

Os microorganismos cecais possuem baixa quantidade de material nitrogenado digestível disponível em comparação aqueles do rúmen, em função da maior parte da proteína bruta dietética ser digerida antes de chegar ao ceco. Portanto, uma significativa proporção da proteína microbiana é sintetizada da uréia e outras fontes nitrogenadas endógenas (enzimas digestivas e descamação celular). Proteínas fermentadas pela microbiota cecal são convertidas a amônia que representa a principal fonte de nitrogênio para a síntese de proteína bacteriana. Outra via metabólica contribui para o suprimento de  $\text{NH}_3$  pela flora ureolítica (Santomá et al. 1989). Quando a ingestão de proteína excede à exigência nutricional, há aumento da uréia recirculada do sangue para o ceco, conduzindo a uma elevação da concentração de  $\text{NH}_3$  cecal (Fraga, 1998).

A atividade fermentativa das bactérias varia de acordo com um ritmo diurno, que oscila com baixa concentração de AGV (<25%) durante o período de cecotrofia e alta concentração de AGV durante a fase de excreção das fezes duras (Gidenne, 1996). Este modelo diurno de atividade fermentativa cecal coincide com um ritmo semelhante de absorção e metabolização de AVG (Vernay, 1989). O metabolismo ceco-cólico da água e eletrólitos também está sob o controle da cecotrofia (Hornicke, 1984).

### 1.1 – Microbiota intestinal de coelhos

A microbiota cecal e o processo de fermentação desempenham um papel fundamental na digestão de coelhos. O desequilíbrio da microbiota intestinal representa de forma direta o desenvolvimento de distúrbios digestivos ou doenças em láparos. A composição da microbiota intestinal é bastante simples em coelhos, com a predominância de *Bacteroides* (Kovács et al., 2004).

A composição da microbiota intestinal não é decisivamente determinada pela nutrição. Assim, o trato digestivo dos coelhos não é colonizado pelas mesmas bactérias encontradas em outros roedores alimentados com dietas similares. No entanto, a contagem de bactérias que constituem a microbiota intestinal pode ser influenciada pela nutrição (Smith, 1965).

Estima-se que 90% da área do intestino de um animal adulto seja habitada por mais de 400 espécies diferentes de microrganismos, o que representa 10 vezes mais bactérias no trato digestivo do que células no corpo do hospedeiro (Silva e Nörnberg, 2003). A composição da microbiota é regularmente constante e as

características para cada espécie de hospedeiro podem ser afetadas pela idade, dieta, ambiente, estresse e utilização de medicamentos (Fuller, 1999). Fatores fisiológicos e ambientais têm importante papel na estabilização da microbiota intestinal e no estabelecimento de uma população nativa.

Em coelhos, o trato gastrointestinal alberga o maior número e a maior diversidade de espécies de bactérias que colonizam, em especial, o ceco. As bactérias são encontradas em todo trato gastrointestinal, porém têm distribuição heterogênea. No estômago e no intestino delgado o ambiente é desfavorável para a colonização e proliferação bacteriana, que é reduzida, tanto por ação bactericida do suco gástrico, da bile e da secreção pancreática, quanto pelo intenso peristaltismo do intestino delgado. O íleo é um sítio de transição bacteriológica, entre a escassa população bacteriana do jejuno e a densa microbiota do ceco e cólon. No ceco, as bactérias encontram condições favoráveis para sua proliferação devido à ausência de secreções intestinais, pelo peristaltismo lento e pelo abundante suprimento nutricional. As populações microbianas do ceco são estritamente anaeróbias ou anaeróbias facultativas, que ali existem em proporções similares ( $10^7$ - $10^{10}$  bact/g).

As bactérias são freqüentemente lembradas por sua capacidade de desencadear infecções, mais do que por seus efeitos benéficos. Nos últimos anos, estudos têm evidenciado que a interação microrganismo-hospedeiro pode influenciar favoravelmente a saúde do animal, de diversas maneiras. A comunidade bacteriana do trato gastrointestinal pode ter funções positivas – antibacteriana, imunomoduladoras e metabólica / nutricional (Brandt et al.; 2006).

As bactérias autóctones ou indígenas exercem proteção ecológica intestinal, impedindo o estabelecimento das bactérias patogênicas. O mecanismo principal desempenhado pela microbiota é conhecido como resistência à colonização pelo efeito barreira. Esta barreira ocorre pela ocupação, pela microbiota autóctone, dos possíveis sítios celulares de adesão de patógenos na mucosa intestinal. Há outros mecanismos de proteção adicionais como a competição pelos nutrientes disponíveis no meio, a produção de substâncias restritivas ao crescimento de bactérias alóctones (ácidos e metabólitos tóxicos) e a produção *in vivo* de substâncias com ação antimicrobianas (Tannock, 1999).

As bactérias interagem com as células do epitélio intestinal do hospedeiro e provocam uma resposta contínua do sistema imune; esta, por sua vez, tende a desenvolver-se e constitui importante componente do sistema imune. Como parte do sistema imunológico, o trato gastrointestinal com a sua microbiota, são considerados importantes para a tolerância imunológica (Schiffirin e Blum, 2002).

Evidências da importância da microbiota intestinal para o desenvolvimento do sistema imune foram obtidas através de estudos realizados nos animais *germ-free*. Nestes animais (isentos de microrganismos) observou-se que a mucosa intestinal apresentava baixa densidade de células linfóides, as Placas de Peyer eram pequenas e pouco numerosas, e era reduzida a concentração das imunoglobulinas circulantes. Após a colonização destes animais por microrganismos, os linfócitos intra-epiteliais expandiram-se, os centros germinativos com células produtoras de imunoglobulinas rapidamente proliferaram nas Placas de Peyer e na lâmina própria, e a concentração de imunoglobulinas circulantes aumentou (Falk et al.; 1998).

Uma terceira função atribuída à microbiota intestinal em coelhos está relacionada à contribuição para a nutrição e metabolismo do hospedeiro. A ação das bactérias intestinais sobre determinados nutrientes permite um melhor aproveitamento intestinal dos nutrientes provenientes da dieta. Isto ocorre com substratos que chegam não digeridos ao lúmen do ceco, principalmente carboidratos, que são fermentados e formam ácidos absorvíveis pela mucosa. O processo é denominado salvamento energético e forma os ácidos graxos de cadeia curta, que constituem a principal fonte de energia dos colonócitos e têm efeito trófico no epitélio intestinal. Os microrganismos colônicos desempenham ainda um papel na síntese de vitaminas. Há outras atividades metabólicas dos microrganismos cujo benefício para o hospedeiro ainda são pouco compreendidos (Guarner e Malagelada, 2003).

A microbiota intestinal é benéfica para o indivíduo quando há simbiose com o hospedeiro, equilíbrio entre as necessidades e efeitos recíprocos. Algumas bactérias que compõem a microbiota são sempre benéficas – apatogênicas e protetoras da mucosa intestinal (Kirjavainen e Gibson, 1999).

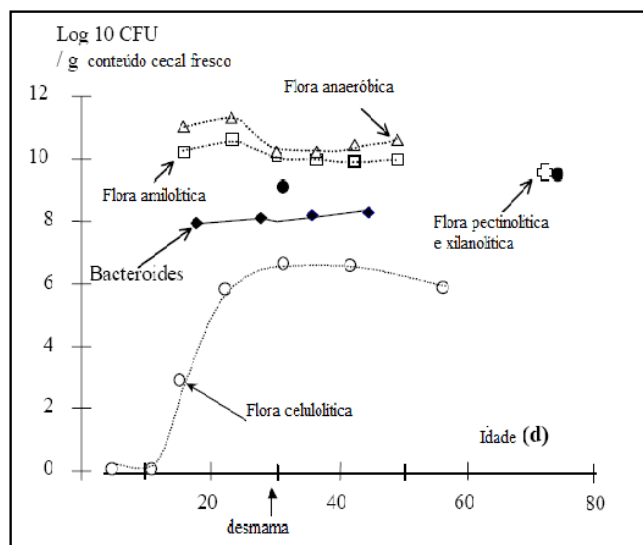
A colonização do trato gastrointestinal de coelhos por microrganismos começa após o nascimento, mas o seu desenvolvimento é um

processo gradual. A microbiota intestinal materna e do ambiente são as principais fontes de bactérias colonizadoras do intestino de lêpardos recém-nascidos. A colonização inicial é muito relevante para a composição final da microflora permanente em coelhos adultos (Guarner e Malagelada, 2003). Na verdade, bactérias pioneiras são capazes de modular expressão de genes em células epiteliais, criando assim um habitat favorável para si, e podem impedir o crescimento de outras bactérias introduzidas posteriormente no ecossistema. Berg (1996) lembrou a definição de flora autóctone como "microrganismos presentes em todas as comunidades de uma determinada espécie animal". Podem crescer anaerobiamente no trato gastrointestinal e estão sempre presentes nos animais adultos. Colonizam nichos gastrointestinais especiais, contribuem para a estabilidade do clímax e são muitas vezes intimamente associadas com a mucosa epitelial. Vários estudos demonstraram que bactérias são os principais constituintes da microbiota no intestino em coelhos (Gouet e Fonty, 1979; Boulharouf et al., 1991). Mais recentemente, a detecção e quantificação de populações microbianas foram avaliadas por meio de técnicas da microbiologia molecular (Abecia et al., 2005; Bennegadi et al., 2003). Os resultados obtidos confirmaram que as bactérias são necessariamente as populações dominantes. No entanto, Bennegadi et al. (2003) também relataram uma importante comunidade de archea (22% e 12% aos 28 e 70 dias de vida, respectivamente). Alguns autores relataram a presença de levedura (*Saccharomycopsis guttulata*) (Peeters, 1988) e protozoários (Forsythe e Parker, 1985) e ausência de fungos anaeróbios em coelhos (Giddene, 2006). Durante as duas primeiras semanas de vida, estão presentes dois tipos de bactérias: as estritamente anaeróbias e anaeróbias facultativas, em proporções semelhantes ( $10^7$ - $10^{10}$  bact / g). As bactérias anaeróbias facultativas, principalmente *Streptococcus* sp. e *Escherichia coli*, atingem níveis máximos na 2ª ou 3ª semana de vida e, em seguida, têm as populações reduzidas, podendo ser consideradas residuais ou ausentes após o desmame. As bactérias estritamente anaeróbias, não esporuladas, principalmente os bacilos gram-negativos Bacteróides dominam a microbiota digestiva em cada segmento do intestino. Bactérias formadoras de esporos (*Clostridium*, *Endosporus* e *Acuformis*) são 100 a 1000 vezes menos numerosas do que os *Bacteroides*, sendo consideradas como pertencendo à população subdominante. Alguns autores citam ausência do gênero *Lactobacillus* na microbiota de coelhos. As bactérias fibrolíticas (responsáveis



pela hidrólise de celulose, xilanas, pectinas etc.) só podem ser estabelecidas após 15 dias de idade, quando começa a ingestão de alimentos sólidos e o substrato fibroso entra no ceco (Figura 1). Essa microbiota aumenta lentamente até atingir  $10^7$  bact / g aos 25 dias de idade em

coelhos (Boulharouf et al., 1991). Convém notar que, enquanto os coelhos são alimentados apenas com leite, as bactérias celulolíticas não aparecem, mesmo em coelhos de 35-42 dias de idade (Padilha et al., 1999).



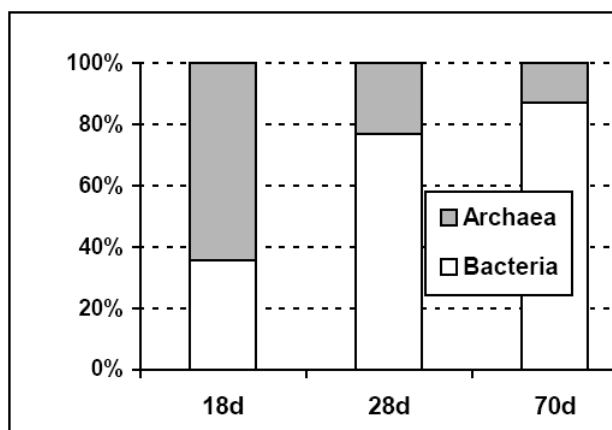
Fonte: Gidenne e Licois, 2005.

Figura 1: Implantação de algumas populações bacterianas no ceco de coelhos jovens.

Historicamente, a atividade fermentativa foi a primeira identificada em cecos de coelhos (Elsden et al.1946) e em seguida, a atividade celulolítica na microbiota cecal foi evidenciada *in vitro* por Cools e Jeuniaux (1961). Emaldi et al (1979) foram os primeiros a estudar a atividade metabólica da microbiota cecal e seu potencial enzimático para hidrolisar os substratos ao entrar no ecossistema cecal. A atividade da microbiota cecal pode ser classificada de acordo com a degradação do substrato: ureolítica, proteolítica e fibrolítica. A importância da atividade ureolítica é observada no ceco devido à presença de bactérias ureolíticas aeróbias e anaeróbias (Crociani et al. 1984). A atividade dos microrganismos fibrolíticos é estudada, mais recentemente, pela avaliação da concentração de enzimas bacterianas capazes de hidrolisar a celulose, xilanas e pectinas. A atividade fibrolítica cecal não é detectada em lãparos até duas semanas de idade, entretanto ao completarem quatro semanas, cerca de 80% delas já colonizaram o ceco dependendo da presença de substrato fibroso na dieta. A atividade celulolítica aparece

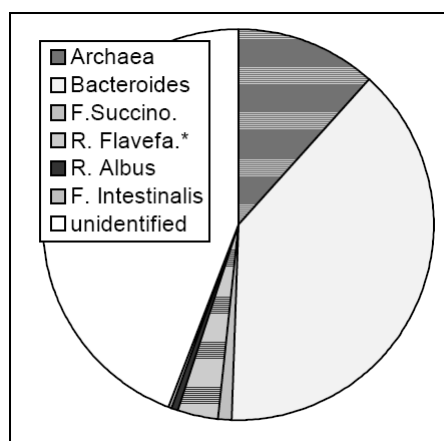
por volta do 25<sup>o</sup> dia de vida dos lãparos, e continua em níveis baixos. Por outro lado, as xilanas e pectinas aumentam entre 21 e 52 dias de idade desses animais.

Ao contrário dos ruminantes, dentre os microrganismos cecais de coelhos não existem fungos anaeróbicos ou protozoários (Bennegadi et al., 2003). Outros eucariontes podem estar presentes e aparecer em maior quantidade em animais debilitados (coccidiose). Bennegadi et al. (2003) afirmaram que as bactérias e Archaea representam respectivamente 73% e 22% do total de indivíduos das comunidades microbianas nos cecos de coelhos ao desmame, e estão em proporção inversa após o desmame (figura 2). Também demonstraram a presença de grupos de flexibacter-cytophaga-bacteroides e quatro espécies de bactérias celulolíticas, usualmente identificadas no rumem: *Fibrobacter succinogenes*, *F. intestinalis*, *Ruminococcus albus* e *R. flavefaciens*, esta última espécie como sendo dominante (figura 3).



Fonte: Gidenne, 2006

Figura 2. Equilíbrio entre archea e população bacteriana no ecossistema cecal, em relação a idade do coelho

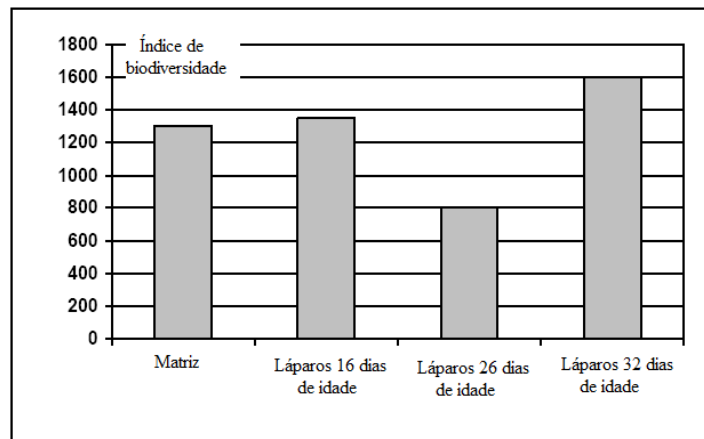


Fonte: Gidenne, 2006

Figura 3. Elementos da microbiota cecal em coelhos até o desmame (28 dias)

Alguns estudos recentes abordaram a questão da biodiversidade na microbiota cecal de coelho. Os primeiros resultados indicam que a biodiversidade pode mudar com a idade e com o desmame. Coelhos com 16 dias de idade apresentam biodiversidade cecal semelhantes à de sua mãe (figura 4), no entanto, quando começam a ingerir alimentos sólidos, ocorre diminuição da biodiversidade (García et al.,

2005). Depois, ela aumenta em paralelo com o consumo de ração sólida. Contudo, de acordo com García et al. (2005), o grau de similaridade entre a microbiota cecal da mãe e do seu correspondente pode ser muito baixa, possivelmente devido a diferenças na ingestão alimentar (alimentos sólidos vs leite). Quando lâparos de ninhadas diferentes são comparados, os irmãos apresentam 47% de similaridade.



Gidenne. 2006.

Figura 4. Biodiversidade cecal de matrizes e láparos em diferentes idades.

O desmame também produz uma diminuição (2000 - 600 seqüências identificadas) na biodiversidade cecal. A interpretação desses resultados em termos de estabilidade ou segurança da saúde intestinal não é fácil e deve ser complementada por informações mais precisas sobre os efeitos da mudança brusca de alimentação na produção de bactérias comensais e potenciais patógenos. A matriz e seus láparos aos 16 dias de lactação têm a mesma biodiversidade, mas o grau de similaridade entre a microbiota cecal é de apenas 10% (Garcia et al., 2005). Em paralelo, Abecia et al. (2006) relataram que as diferenças na microbiota cecal (Hamming Distance Analysis) entre láparos da mesma ninhada foi menor do que entre as mães. Foi também demonstrado que a população bacteriana do láparos foi grandemente dependente da diversidade microbiana em suas mães.

Fatores nutricionais também interferem no ecossistema cecal, pelo menos, em dois níveis: por quantidade e qualidade adequadas no fornecimento de nutrientes para os microorganismos, e para garantir boas condições físico-químicas no biotipo cecal, incluindo também motilidade e trânsito da digesta. Obviamente, a atividade microbiana depende estreitamente dos nutrientes fornecidos pela dieta. Com apenas algumas horas de jejum ocorre uma diminuição brusca do nível AGV cecal e a inversão na taxa de C3: C4 (Vernay e Raynaud, 1975; Gidenne e Bellier, 1992; Piattoni et al., 1997). Bennegadi et al. (2003) relataram que uma baixa ingestão de fibras reduziu a comunidade de archaea e a população de *R. albus*. Gómez-Conde et al., (2006) citam que a fibra solúvel reduz a proporção de *Clostridium perfringens* no ceco de coelhos e de outros patógenos como *Campylobacter* no íleo

e no ceco. Cortez et al., (1992) citam que um excesso de proteína dietética pode favorecer a proliferação de *Clostridium* em coelho adultos além de aumentar ligeiramente a prevalência de *E. coli*. No caso dos coelhos jovens, com alta exigência nutricional de proteína, uma excessiva substituição da fibra digestível por proteína aumenta o risco sanitário provocando diarreia (Gidenne et al., 2001). Uma hipótese que pode explicar tal fato seria uma maior disponibilidade de substratos para o crescimento microbiano, com prevalência de espécies patogênicas, quando os animais são alimentados com dietas com alta proteína. Assim, um maior fluxo ileal da proteína provoca o aumento da acidez cecal (Gómez-Conde et al., 2004), e pode favorecer espécies patogênicas. Além disso, alguns gêneros prejudiciais, como *E. coli* ou *Clostridium*, podem usar aminoácidos como substrato para o crescimento (Haffar et al., 1988).

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de se conhecer melhor a atividade da microbiota cecal (através de métodos indiretos, padrões de fermentação, enzimas, etc) e, mais amplamente sobre o desempenho e saúde animal. No entanto, em mamíferos domésticos, a microbiota gastrointestinal é uma comunidade muito complexa, onde apenas os microorganismos cultiváveis foram parcialmente conhecidos.

## 1.2 –Interação da microbiota intestinal com o alimento no trato digestivo dos animais

As superfícies e mucosas dos animais, que, em condições fetais, são estéreis, rapidamente sofrem colonização por diversos microorganismos. Destes, alguns são úteis e

outros nocivos. A microbiota útil auxilia na digestão e absorção de nutrientes, produz vitaminas que serão utilizadas pelo hospedeiro e diminuí, por exclusão competitiva, a proliferação de agentes patogênicos (Roy e Gibson, 1999). A nociva pode causar inflamações na mucosa intestinal, gerar metabólitos tóxicos e propiciar o aparecimento de enfermidades. Em condições normais, estas populações encontram-se em equilíbrio. No entanto, em condições de estresse (situação desfavorável) as populações úteis diminuem e as nocivas se proliferam, o que se reflete negativamente sobre a saúde e o desempenho animal (Mathew et al., 1993).

No período da desmama, os lárparos, encontram numerosos desafios, decorrente da separação da mãe, mudanças na dieta, no ambiente, e de imunologia (a imunidade ativa está em desenvolvimento e a imunidade passiva, adquirida pelo consumo do leite materno é limitada). Todos estes fatores fazem com que ocorra um desbalanceamento da microflora intestinal deixando estes animais susceptíveis as enfermidades.

Um aspecto importante a considerar é que a superfície interna do intestino é 100 vezes maior que a superfície da pele. Em monogástricos, encontram-se de  $10^{14}$  microrganismos no trato gastrointestinal e se tem identificado mais de 500 tipos de bactérias representados por múltiplas espécies e que são capazes de aproveitar os resíduos indigestíveis da dieta. Em sua maior parte são bactérias benéficas, ainda que junto a estas também se possam encontrar bactérias patogênicas (Corrêa et al. 2007).

A função do intestino não é só absorção, mas também proporcionar imunidade (como consequência do estímulo antigênico por contato com esses patógenos) (Fuente et al. 2005).

Durante o período de aleitamento os lárparos recebem o leite materno, que contém nutrientes de alta digestibilidade e numerosos compostos bioativos como imunoglobulinas, lisozimas e fatores de crescimento (IGF-I, IGF-II e insulina). A substituição dessa dieta líquida e altamente digestível pela ingestão de uma nova dieta sólida, ainda pouco digestível para os lárparos, proporciona um aumento do risco de diarreias, que provocam retardo no crescimento, distúrbios no balanço da microbiota intestinal, podendo levar a morte (Corrêa et al. 2007).

No período de transição da dieta, é observada redução na taxa de crescimento dos animais,

normalmente associada a alterações histológicas e bioquímicas no intestino delgado, como atrofia das vilosidades e aumento da profundidade das criptas, acarretando em reduzida capacidade de digestão e absorção dos nutrientes.

Os lárparos recém-desmamados possuem o trato digestório relativamente imaturos, o que leva a uma digestão ineficiente de carboidratos, proteínas e fibras. Isto está relacionado em parte, a quantidade insuficiente de enzimas secretadas ao longo do trato gastrointestinal. Neste período da desmama, ocorre o desenvolvimento natural do sistema enzimático, enquanto a lactase reduz, outras enzimas são secretadas em função da introdução da dieta sólida.

A digestão incompleta de carboidratos e proteínas, somado ao pH mais elevado do estômago, também pode propiciar um meio rico em substratos para bactérias dos intestinos delgado e grosso, provocando um desequilíbrio e favorecendo o crescimento de potenciais patógenos (*Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* e *Clostridium*). Esses microrganismos podem aderir à mucosa intestinal e, durante o processo de fermentação, produzir toxinas (cadaverina, putrescinas, tiraminas, histaminas e outras aminas), agravando ainda mais os danos ao epitélio intestinal (Molly, 2001).

O TGI é um micro-ecossistema cinético que possibilita o desempenho normal das funções fisiológicas do hospedeiro, a menos que microrganismos prejudiciais e potencialmente patogênicos dominem. Para manter o equilíbrio benéfico da microbiota do TGI mesmo em condições de estresse, os principais produtos usados nas últimas cinco décadas foram os antibióticos e os quimioterápicos que, em doses subterapêuticas, atuam como promotores de crescimento, diminuindo os índices de mortalidade e aumentando a eficiência produtiva e reprodutiva (Salyer, 1999). No entanto, a restrição destes produtos na nutrição animal tem se tornado crescente nos últimos anos, uma vez que ao seu uso é atribuído o aumento da resistência de bactérias patogênicas aos tratamentos com antibióticos na saúde humana e animal (Spring, 1999). Assim sendo, o equilíbrio apropriado da microbiota pode ser assegurado por uma suplementação sistemática da dieta com aditivos (probióticos, prebióticos e simbióticos) (Bielecka et al, 2002).

Desta forma, é o próprio alimento que irá fornecer os nutrientes necessários para que o organismo do animal se recupere. A simples

presença de alimento irá estimular as funções digestivas intestinais até que se alcance a maturidade intestinal e o animal possa suprir suas exigências nutricionais.

Vale a ressalva, que estes alimentos possuem potencial para promover a saúde através de mecanismos não previstos através da nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (Sanders, 1998).

## **2 – A IMPORTÂNCIA DO USO DE ADITIVOS NA ALIMENTAÇÃO DE COELHOS**

Um dos maiores desafios dos anos futuros é produzir quantidades de alimentos necessários para alimentar a população humana. Seguramente a proteína animal e os produtos derivados da mesma, terão um papel fundamental para suprir esta demanda. Diante desta realidade, pesquisadores e nutricionistas se deparam frente a desafios de desenvolver pesquisas, gerar conhecimentos e tecnologias sobre a nutrição e alimentação animal capaz de incrementar a produção animal de forma racional e eficiente.

A produção animal moderna tem se tornado cada vez mais complexa, modificando os padrões na alimentação. Os sistemas de criação estão cada vez mais intensivos, exigindo maior produção, curto espaço de tempo e menor custo.

Nas últimas décadas, a busca por uma melhor eficiência na produção animal propiciou o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas que proporcionaram incremento à produção animal, melhora na qualidade físico-química e nutricional dos derivados da indústria animal, redução na ocorrência de distúrbios metabólicos e dos custos produção, sem detrimento ao desempenho animal.

A alimentação pode representar até 70% do custo de produção de uma granja cunícula. Assim sendo, uma atenção especial na formulação de dietas e na busca de ingredientes que possam melhorar a eficiência produtiva dos animais, minimizando problemas digestivos e maximizando o aproveitamento das dietas é de fundamental importância.

De maneira geral dois pontos iniciais devem ser observados para obter a redução dos custos com a alimentação. Um refere-se ao emprego de alternativas para os ingredientes tradicionais (milho, soja, alfafa) visando a sua inclusão nas rações e, o outro diz respeito ao reconhecimento

das potencialidades e restrições no uso dos ingredientes alternativos e/ou aditivos nas diferentes fases de produção. Isso é uma consequência que se origina da necessidade de que as dietas sejam adequadamente formuladas visando o atendimento das exigências de nutrientes e de energia dos animais em suas respectivas fases produtivas e da conveniência de que possíveis fatores antinutricionais, quando presentes na dieta, não ultrapassem os limites máximos que afetem o desempenho. Por isso, sempre que se pensar em alternativas na alimentação, há que se fazer um balanço de nutrientes oferecidos na dieta e o custo de produção da ração, frente aos preços de mercado, devendo haver vantagem econômica para que se façam mudanças.

Neste contexto, a presença de aditivos, alimentos e/ou ingredientes funcionais que apresentam propriedades benéficas além das nutricionais básicas e que demonstrem capacidade de regular algumas funções corporais, tornam-se importantes.

Um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que o mesmo pode afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no organismo animal, além de possuir os adequados efeitos nutricionais, de maneira que seja tanto relevante para o bem-estar e a saúde quanto para a redução do risco de uma doença (Roberfroid, 2002). Seu papel em relação às doenças estará, na maioria dos casos, concentrado mais na redução dos riscos do que na prevenção.

Uma preocupação que têm definido as dietas contemporâneas em coelhos é o bem-estar dos animais, incluindo aí os novos conceitos de bem-estar intestinal; o uso de produtos integrados ao modelo de sustentabilidade ambiente e a simplificação dos sistemas de alimentação (De Blas et al., 1999; Xiccato, 1999, Pascual, et al., 1999).

## **3- O USO DO *LITHOTHAMNIUM SP.* NA NUTRIÇÃO ANIMAL**

As algas marinhas calcárias são as plantas que crescem naturalmente no meio marinho e em profundidades das mais variadas. As algas marinhas que se desenvolvem em grandes profundidades jamais podem ultrapassar as áreas onde não ocorre o fenômeno da fotossíntese. A renovação é permanente, contanto que haja incidência de luz natural, se tornando uma fonte de macro e microminerais renováveis. Estas algas vêm sendo utilizadas desde a antiguidade para uso agrícola (Dias,

1999), e mais atualmente empregada na nutrição animal.

A alga calcária é extraída do seu meio por processos manuais e mecânicos. A matéria prima *in natura* é lavada, desidratada e moída, e em seguida ensacada. O concentrado integral de

alga não é fonte de carboidrato, lipídeos, proteínas ou vitaminas, mas tão somente de elementos minerais (macro e micro elementos (tabela 1)). Administrado em proporções fracionadas, em veículo alimentício ou sal, atua como biocatalizador, corretivo mineral e orgânico do organismo vivo (Melo, 2006).

Tabela 1. Composição de minerais do *Lithothamnium sp.*

Calcio	34%	Selenio	1 ppm
Magnésio	2.4%	Molibdênio	<3 ppm
Fósforo	0.08%	Iodo	160 ppm
Potássio	0.10%	Arsenio	<1 ppm
Enxofre	0.45%	Cobre	10 ppm
Ferro	20 ppm	Cromo	13 ppm
Boro	16.5 ppm	Cadio	0.2 ppm
Sódio	300 ppm	Mercurio	<50 ppb
Magnésio	125 ppm	Aluminio	<1 ppm
Cobalto	6 ppm	Zinco	37 ppm

Fonte: Materiais Calcáreos... (2008)

Na nutrição animal pode ser utilizado em diversas espécies, melhorando a saúde dos animais, seu ciclo reprodutivo e a qualidade dos derivados (carne, leite, queijos e ovos). É aplicado também no controle de odores ambientais, alimentação de peixes, crustáceos, e outros. Segundo Algarea (1997), o *Lithothamnium sp.* possui as características de ser natural, fornecendo nutrientes balanceados pela natureza, altas concentrações de cálcio e nutrientes catalisadores do metabolismo, trazendo como benefícios a fácil absorção pelos animais, sem antagonismo iônico, melhorando a conversão alimentar, maior fixação de fósforo, rápida recuperação de fraturas, além de conferir maior resistência à casca do ovo.

Melo (2006) cita que o *Lithothamnium calcareum* pode ser usado em aves como uma fonte alternativa de cálcio. De acordo com Dias (1999), as algas calcárias são compostas basicamente por carbonato de cálcio e magnésio, além de conter mais de 20 oligoelementos, presentes em quantidades variáveis, tais como Fe, Mn, B, Ni, Cu, Zn, Mo, Se e Sr. O *Lithothamnium* pode ser aplicado no estado natural ou após secagem e moagem. As principais características que potencializam a atuação deste são atribuídas à maior disponibilidade dos micronutrientes que se encontram adsorvidos nas paredes celulares, sendo assim facilmente assimiláveis pelas plantas e animais e à elevada porosidade das algas (> 40%) que propicia maior superfície específica de atuação. Além disso, as algas

calcáreas podem ser utilizadas na agricultura, na potabilização, desnitrificação e tratamento de águas, na indústria de cosméticos e dietética, em cirurgias, como adsorvente e na nutrição animal.

De acordo com Dutra et al. (1989), a utilização da alga calcária em rações de *Helix aspersa*, pode ser utilizada como fonte de cálcio com efeitos significativos no crescimento do mesmo, quando comparado com calcário e farinha de ostras. Em estudo com ratos, Assoumani (1997) relatou que a farinha de algas apresentou vantagens em relação ao calcário no crescimento do osso fêmur e na biodisponibilidade de cálcio, sugerindo que provavelmente a concentração de magnésio e a porosidade da alga seriam os responsáveis por estas diferenças. Perali et al. (2003) referenciaram aumento na produção de ovos em 4,16 pontos percentuais em relação à testemunha na adição de 0,25% deste produto.

Utilizando a farinha de algas marinhas como suplemento para vacas leiteiras, Melo et al. (2004a) estudaram o efeito de diferentes doses e concluíram que 50 g/animal/dia promoveu aumento da produção e do teor de gordura no leite, assim como o teor de cálcio e magnésio no sangue dos animais. Também Melo et al. (2004b), relataram que para bovinos de corte, a utilização de 10% de farinha de algas marinhas em substituição à mistura mineral comercial, promoveu aumento de 26% no ganho de peso dos animais.

Nos estudos realizados por Zanini et al. (2000), utilizando farinha de algas como fonte de cálcio na ração de frangos de corte, concluíram que o uso de farinha de algas pode substituir totalmente o calcário sem prejudicar o desempenho dos animais.

Resultados de melhora de biodisponibilidade de nutrientes com o uso de farinha de algas marinhas em ratos foram apresentados por Assoumani (1997) e em pintinhos por Airhart et al. (2002), os quais observaram que o cálcio proveniente do *Lithothamnium calcareum* apresentou maior biodisponibilidade do que aquele proveniente do calcário, resultando em melhor conversão alimentar. Efeitos de melhora na conversão alimentar também foram observados por Pope et al. (2002), em frangos de corte suplementados com *Lithothamnium calcareum*, os quais apresentaram maior ganho de peso e melhor rendimento de peito.

Melo (2006) afirma não ter observado diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em experimentos avaliando desempenho de codornas japonesas em postura, porém citam que os animais que receberam a adição de farinha de algas marinhas em suas dietas apresentaram consumo médio 7,6% superior e produção média de ovos 9,7% maior em relação às aves que receberam a ração referência. O autor relata que a melhora não significativa ocorrida nos valores de produção de ovos pode ser explicada pela variação proporcional observada nos resultados de consumo de ração diário. Resultados semelhantes foram encontrados por Perali et al. (2003), onde os tratamentos com farinha de algas marinhas apresentaram melhora na produção de ovos em codornas japonesas. No mesmo experimento, resultados encontrados para peso médio final das aves também não apresentaram diferenças significativas, porém nas aves que receberam a farinha de algas marinhas, observou-se um peso médio final de 2,3% maior em relação à referência, possivelmente pelo maior consumo de ração daquelas aves. Analisando os resultados de conversão alimentar obtidos por Melo (2006), embora não tenha ocorrido diferença significativa, observou-se que as aves que receberam farinha de algas marinhas apresentaram, em média, melhora de 11,5 e 6,5%, respectivamente para valores obtidos por grama de ovo produzido e por dúzia de ovo produzido, em relação àquelas que receberam a ração referência. O autor sugere que provavelmente, esses resultados foram em função da melhor eficiência de utilização dos nutrientes pelos animais.

#### 4- TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE) - ESTUDO DE ECOLOGIA MICROBIANA

A ecologia microbiana está se consolidando como uma das áreas da microbiologia que expande os horizontes do conhecimento de forma inovadora, desenvolvendo e aprimorando métodos moleculares para identificação e o monitoramento de microrganismos em ecossistemas naturais, com vista em estudos do papel funcional dessa microbiota (Santos, 2008).

Na última década, o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares revolucionou os conceitos microbiológicos. O uso de métodos baseados em análise sequencial dos genes que codificam o RNA ribossomal (rRNA) 16S tem se tornado uma importante ferramenta no conhecimento das comunidades bacterianas em diversos nichos ambientais (Giovannoni et al. 1990).

Para realizar estudos moleculares, a amplificação do universo dos genes torna-se necessária, porque o gene que codifica o RNA 16S ribossomal é frequentemente utilizado. Este gene está localizado no cromossoma de todas as células procarióticas, e no material genético presente nas mitocôndrias ou cloroplastos de células eucarióticas. Apenas alguns protozoários anaeróbicos não apresentam o 16S r-RNA, mas a análise desses microrganismos pode ser realizada com a amplificação do 30S r-RNA (Badiola, 2004).

A molécula r-RNA 16S apresenta duas características complementares, relacionadas com a sua estrutura primária, que conferem a potencialidade no estudo de uma complexa microbiota, como os microrganismos intestinais. A primeira característica permite a utilização de alguns *primers* universais que realizam a amplificação de uma porcentagem de microrganismos. A segunda característica permite a resolução de sequências de restrição nucleares. A combinação de amplificação de DNA 16S-r DNA, digestão com restrição nuclear do DNA, e análise por eletroforese em gel agarose torna-se um excelente sistema para o estudo da composição dos componentes da população microbiana intestinal sem a necessidade de culturas *in vitro* (Badiola, 2004).

Segundo Santos (2008) as técnicas de *fingerprinting* genético são capazes de fornecer o perfil que representa a diversidade genética de

uma comunidade microbiana em um ambiente específico. São baseados na amplificação, por PCR, e na resolução das diversas sequências amplificadas, simplesmente por migração eletroforética diferencial em gel de agarose ou poliacrilamida, de acordo com o tamanho [Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA), terminal-Restriction Fragment Length Polymorphisms (t-RFLP), Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)] ou com a sequência [Denaturant Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE), Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE), Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)] (Hori et al., 2006).

DGGE é uma das técnicas de *fingerprinting* mais frequentemente utilizadas em estudos de ecologia microbiana, por obter uma representação qualitativa da presença e abundância de diferentes filotipos na amostra (Santos, 2008). Ela oferece oportunidade para se efetuar estimativas mais reais da diversidade microbiana existente (Muyer e Smalla, 1998). Esta técnica se baseia na separação eletroforética diferencial de amplicons, obtidos por PCR, quanto à susceptibilidade da molécula de DNA à desnaturação parcial promovida por agentes desnaturantes, e discrimina amplicons de tamanhos similares, de acordo com suas sequências de pares de bases (Muyzer et al., 1993). A capacidade dessa técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante em discriminar sequências de DNA de fragmentos de mesmo tamanho, mas que diferenciam em apenas um único par de nucleotídeos, permite a geração de padrões de bandas variáveis de acordo com a composição de microrganismos em diferentes amostras ambientais em estudos de microbiologia ambiental e ecologia microbiana (Fisher e Lerman, 1983; Muyer e Smalla, 1998; Santos, 2008).

No passado, os estudos sobre a microbiota intestinal de coelhos concentraram-se em alterações nos microrganismos facilmente cultiváveis como *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Clostridium perfringens* etc., mas a introdução de novas técnicas moleculares, especialmente a amplificação do DNA por PCR, possibilitam a redução do uso de culturas *in vitro* e ampliam o universo de estudo da microbiota intestinal (Badiola, 2004).

A avaliação da diversidade microbiana pela técnica de DGGE representa a variabilidade, inter e intra-específica, presente na comunidade

amostrada. Como o conceito de espécie microbiana está atrelado à parcela de microrganismos cultiváveis, a quantificação da diversidade requer que os elementos individuais sejam agrupados em classes, visto que a diversidade é função do número total de diferentes classes, denominado Riqueza, e da abundância relativa dos elementos individuais em cada classe, denominada Equitabilidade (Nubel et al., 1999).

Entretanto, é necessário considerar que as bandas exibidas no perfil eletroforético podem não corresponder a diferentes espécies bacterianas, já que algumas espécies possuem múltiplas cópias do operon *rrn* cujas sequências apresentam microheterogeneidade. Dessa forma, e considerando a base da técnica, uma única espécie pode mostrar um perfil com múltiplas bandas (Nubel et al., 1996; Kirk et al., 2004). As bandas resultantes do *fingerprint* em DGGE são referidas como Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs). Essas UTOs correspondem às classes, que juntas compõem a riqueza, e a intensidade de uma delas representa a Equitabilidade. A diversidade da comunidade microbiana é medida pelo cálculo dos índices de diversidade, como o índice de Shannon-Weaver, que é o índice mais comumente utilizado em estudos de Ecologia (Nubel et al., 1996).

## 5- METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO DE ALIMENTOS PARA COELHOS

Vários modelos de estudo *in vivo* estão disponíveis para avaliação de alimentos em animais. Estes envolvem o monitoramento da ingestão de alimentos, a digestibilidade aparente ao longo do trato digestivo, monitoramento da formação de produtos finais da fermentação, produção de metano em câmaras de respiração e o aparecimento de nutrientes no sangue portal. A maioria destes métodos avalia o desaparecimento de nutrientes após a ingestão pelo animal (Tamminga e Williams, 1998).

Numa tentativa de coordenar o esforço da pesquisa e de produzir uma plataforma metodológica que poderia gerar resultados científicos mais confiáveis e comparáveis no campo da nutrição de coelhos, se constituiu, em 1999, o Grupo Europeu de Nutrição de Coelhos (*European Group on Rabbit Nutrition – EGRAN*). O EGRAN é iniciativa da *World Rabbit Science Association* (WRSa) que reuniu especialistas de seis centros de pesquisa e de universidades européias (Bélgica, Espanha {2}, França, Itália e Portugal), com tradição na produção continuada de conhecimentos



científicos para a cunicultura mundial (Gidenne, 1999).

O EGRAN tem estimulado, com prioridade, o estudo de métodos e técnicas para a harmonização da avaliação nutritiva dos alimentos para coelhos incluindo ensaios de digestibilidade e análises químicas conseqüentes. O objetivo final deste esforço seria a elaboração de um Método de Referência Europeu que permitiria a melhora dos dados de avaliação de alimentos e que possam representar mais confiabilidade nas predições do conteúdo nutritivo.

Pérez et al. (1995) publicaram as primeiras recomendações metodológicas do EGRAN para ensaios *in vivo* de digestibilidade fecal aparente em coelhos, significando um importante passo na direção da obtenção de dados originados em experiências baseadas em métodos e técnicas harmonizadas.

Para determinação do valor nutritivo dos alimentos e/ou dietas por meio de ensaio de digestibilidade *in vivo*, para coelhos, a metodologia clássica consiste em alojar animais em gaiolas de metabolismo que permitam o controle do alimento consumido e a coleta de fezes em separado da urina. Após um período de adaptação às rações e às gaiolas, as quantidades de alimento ingerido e fezes excretadas de cada animal são medidas durante um período denominado de coleta e a composição química dos alimentos, das sobras e das fezes coletadas é, em seguida, utilizada para o cálculo dos coeficientes de digestibilidade aparentes para cada animal (Scapinello et al. 2005).

Nos animais a digestibilidade e a disponibilidade definem o valor potencial dos alimentos (Fuller & Wang, 1990) e mesmo que os dois termos estejam relacionados e tenham significados diferentes, é freqüente achar estudos onde são utilizados como sinônimos, o que, de acordo com Batterham (1992), este fato é explicado pela crença de que se um nutriente é digerido, está em forma disponível para ser usado. Sibbald (1987) esclareceu perfeitamente a relação entre os dois termos ao assinalar que a absorção dos nutrientes no trato digestivo é pré-requisito para a sua utilização, mas não demonstra que tenha que existir disponibilidade: alguns aminoácidos presentes, por exemplo, nas proteínas danificadas pelo calor pode ser absorvidos e excretados na urina, o que, em conseqüência, indicaria que não se encontraram disponíveis para serem utilizados pelo metabolismo animal. O mesmo Sibbald (1987) considerou, por um outro lado que a utilização

de um nutriente que foi absorvido no TGI é evidência da sua disponibilidade, porém, a excreção não prova a perda da mesma.

A digestibilidade deve ser entendida como afirma Rénat (1990): uma medida do desaparecimento dos nutrientes e/ou energia durante sua passagem pelo sistema digestivo e não sob a idéia de absorção, como tem sido adotada por muitos pesquisadores. A absorção refere-se aos intercâmbios que acontecem entre sangue e o lúmen digestivo, os quais são medidos de maneiras simultâneas pela diferença entre as concentrações dos nutrientes no sangue portal e arterial e o fluxo de sangue na veia porta.

Ensaio *in vivo* que envolvem a produção animal e a digestibilidade são os métodos mais precisos para essa determinação. Isso traz dificuldades ao experimento, pois requer o uso de animais, alimentos, mão-de-obra, tempo e elevado custo financeiro, limitando sua aplicabilidade.

Devido à avaliação de alimentos através da digestibilidade *in vivo* ser trabalhosa, tem-se desenvolvido alternativas a este processo, onde se espera reproduzir no laboratório reações semelhantes às que ocorrem no trato digestivo dos animais. Embora estes processos digestivos não sejam tão facilmente reproduzidos em sua totalidade, algumas metodologias adaptadas para simular *in vitro* a digestibilidade em coelhos tem sido propostas (Ramos et al., 1992; Ramos e Carabaño, 1994; Xiccato et al., 1994; Plattoni et al., 1996; Ferreira, 2003.) Estas metodologias podem ser aplicáveis e melhoradas para a estimação do valor nutritivo dos alimentos e/ou dietas para coelhos, apesar de hoje não oferecerem total precisão e reprodutibilidade desejável para todos os princípios nutritivos.

Os métodos biológicos capazes de simular o processo digestivo, através de microrganismos ruminais *in vitro* (Tilley e Terry, 1963) ou *in situ* (Ørskov et al., 1980) têm sido utilizados como alternativa ao método *in vivo* para a avaliação de forrageiras. Entretanto, pode-se citar como desvantagens dos métodos *in vitro* (Tilley e Terry, 1963), a falta de informações para descrever a cinética da digestão ou superestimar a fermentação ruminal, respectivamente, têm resultado na busca do emprego de outras técnicas, como por exemplo, a produção de gases (Menke et al., 1979; Theodorou et al., 1994).

A técnica descrita por Tilley e Terry (1963) é a mais comumente usada para ruminantes, entretanto, não foram encontrados na literatura trabalhos realizados com coelhos. Esta foi modificada por Goering e Van Soest (1970) para estimar a digestibilidade da matéria seca.

A metodologia de Tilley e Terry (1963) se tornou uma importante ferramenta para avaliação de alimentos para ruminantes e é amplamente utilizada para estas espécies, devido sua conveniência. É muito utilizado para avaliação de forragens e envolve duas etapas, onde na primeira, o substrato (alimento) é submetido a fermentação com uma solução tampão contendo líquido ruminal durante 48 horas de digestão, seguindo para segunda etapa, com duração de 24 horas, onde é adicionada uma solução ácida com pepsina. Após estas duas etapas verifica-se a digestibilidade da matéria seca do substrato. Embora esteja extensivamente validada com valores *in vivo*, mostra algumas desvantagens. Apresenta apenas um ponto de medição (permite apenas uma observação) não fornecendo a cinética da fermentação do substrato, entretanto, necessita de pouca mão-de-obra e curto tempo para execução experimental (Getachew et al. 1998). Esta técnica possui alta correlação com a digestibilidade *in vivo*, mas geralmente fornece somente dados da degradabilidade final, não evidenciando informações da cinética de fermentação (Van Soest, 1994).

Outra técnica *in vitro* consiste na utilização de enzimas no lugar de microorganismos, cuja vantagem é que não requer animais como doadores de inóculo, porém apresenta um alto custo. Estas técnicas são usadas para estimar a digestibilidade final do substrato. A técnica *in situ* apresenta informações mais detalhadas o processo de digestão, como estimativas da taxa e dinâmica da degradação dos constituintes do alimento, entretanto, é trabalhosa, custosa e invasiva que apenas um número pequeno de amostras pode ser avaliado ao mesmo tempo.

A estreita associação entre fermentação ruminal e produção de gás foi reconhecida a muito tempo por Tappeiner (1884) citado por Getachew et al. (1998), mas o estudo de técnicas de mensuração da produção de gás teve início na década de 40. Esta técnica foi considerada um método de rotina para avaliação de alimentos em ruminantes após o trabalho de Menke et al (1979), onde estes pesquisadores demonstraram uma alta correlação entre a produção de gás *in vitro* e digestibilidade aparente *in vivo*.

As técnicas *in vitro* de produção de gases são capazes de simular o ambiente ruminal e a digestão enzimática (Theodorou et al., 1994), além de descrever a cinética de fermentação ruminal e estimar o consumo (Blümmel, Ørskov, 1993).

As técnicas *in vitro* cujo princípio é a produção de gases (Theodorou et al., 1994; Malafaia et al., 1998; Cabral et al., 2000) baseiam-se na estimativa do volume de gases produzidos por meio da leitura direta com seringa graduada ou mesmo por predições do volume a partir de dados de pressão.

As técnicas *in vitro*, que fazem uso de animais doadores de inóculos, necessitam que estes sejam mantidos em um regime de alimentação padronizados por um longo período, além dos inconvenientes da manipulação do conteúdo ruminal (Jones e Theodorou, 2000), no caso deste trabalho, manipulação do conteúdo cecal.

Variações na concentração de microorganismos do inóculo podem ocorrer, mesmo quando obtidas dos mesmos animais e consumindo a mesma dieta. Portanto espera-se que ocorram variações principalmente nas primeiras horas, mas também se espera que ao final das 48 horas seja atingida a estabilidade, porque a maioria das bactérias deste ambiente possui um rápido tempo de duplicação. Portanto desde que seja mantida a anaerobiose e as condições adequadas, a digestibilidade no tempo final (48 horas) não tende a variar (Broderick e Cochran, 2000).

Os modelos da produção de gás (Menke et al., 1979; Pell e Schofield, 1993; Theodorou et al., 1994; Calabrós, et al., 1999; Maurício. et al, 1999) medem a produção total de gás metano liberada a partir da fermentação de uma amostra, no caso de ruminantes, em conteúdo ruminal e em monogástrico de ceco funcional, em conteúdo cecal tamponado. O método de Menke et al. (1979) consiste na medida direta do volume de gás sob condições normais de pressão atmosférica, e exige atenção contínua do laboratorista. Os outros métodos citados consistem em acumular o gás produzido em garrafas de volume fixo e o volume é calculado em função de variação de pressão. O método proposto por Pell e Schofield (1993), é inteiramente automatizado, onde cada garrafa contém um transdutor individual, limitando portanto, o número de mostras e elevando o custo desta metodologia. O método proposto por Theodorou et al. (1994) adotaram apenas um transdutor, sendo assim mais simples, permitindo aumentar o números de amostras por

corridas. A técnica semi-automática de produção de gases (RPT – *Reading Pressure Technique*), desenvolvida por Maurício et. al. (1999) utilizaram um transdutor de pressão (medidor de pressão em polegadas/cm<sup>2</sup>), em que os dados obtidos pelas leituras de cada frasco são apresentados em um leitor digital. Os dados são transmitidos a um computador onde são transformados em volume através de uma equação matemática específica para altitude de cada laboratório (Maurício et. al., 2001). Esta metodologia permitiu, com um custo relativamente baixo por amostra, aumentar sensivelmente a quantidade de substrato utilizado (336 frascos ou 75 substratos por experimento), reduzindo consideravelmente o tempo gasto por amostra analisada.

A técnica semi-automática de produção de gases (Maurício et. al., 1999) ou RTP (*Reading Pressure Technique*) é um sistema de avaliação da qualidade nutricional de alimentos, realizada a partir de adaptações feitas à técnica manual de produção de gases desenvolvida por Theodorou et. al. (1994). A técnica semi-automática utiliza equações de regressão entre a pressão interna dos frascos e o volume de gases produzidos por um substrato, tornando a técnica mais precisa e mais rápida (Maurício et. al., 2003).

Quando comparada à técnica das seringas (Theodorou et. al., 1994), a técnica semi-automática aprimorou os resultados por diminuir os erros humanos e aumentar a velocidade com que as leituras são realizadas (cinco a seis segundos por frasco), considerando o número de amostras analisadas.

Nos últimos anos, a técnica de produção cumulativa de gás (GTP) *in vitro*, utilizada para avaliar o valor nutritivo dos alimentos para ruminantes, de acordo com a cinética da fermentação do substrato (Pell & Schofield, 1993; Theodorou et al., 1994) tem sido cada vez mais utilizada. Esta técnica utiliza um substrato (alimento), um meio (solução tampão) e um inóculo anaeróbico com população microbiana ruminal. São realizadas medições de gás, produzidos a partir da fermentação do substrato por microorganismos, em intervalos de tempo, fornecendo informações muito detalhadas sobre a cinética de fermentação do alimento. Quando o alimento é incubado com a solução tampão e o líquido ruminal, os carboidratos são fermentados a ácidos graxos de cadeia curta (AGVs), gases (CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>) e células microbianas. A produção de gás é basicamente o resultado da fermentação de carboidratos a acetato, propionato e butirato. A produção de gás a partir da fermentação protéica é

relativamente pequena comparada a fermentação dos carboidratos. A contribuição das gorduras na produção de gás é insignificante. Por tanto o gás produzido na técnica de produção de gás é o resultado direto da fermentação (CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>) e indireto do gás produzido a partir do tamponamento dos AGV (CO<sub>2</sub>, liberado a partir do bicarbonato da solução tampão). Além disso, a determinação do total de ácidos graxos voláteis (AGV) e sua concentração molar permite avaliar a fermentação de uma forma mais geral, e fazer uma comparação mais exata do gás produzido a partir do substrato. Correlação altamente significativa tem sido observada entre a produção de AGV e produção de gás (CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>).

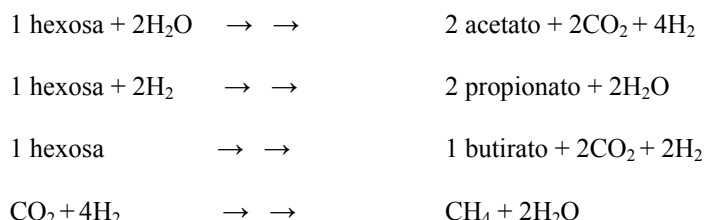
Sistemas *in vitro* baseados na produção de gases têm atraído a atenção de pesquisadores no sentido de obter a descrição de fermentação ruminal, no caso deste trabalho, fermentação cecal. Segundo Mould (2002), embora o perfil de produção de gases seja altamente correlacionado com o perfil de degradação da matéria seca, estes podem sofrer variações quanto ao tipo de substrato analisado. Desta forma é de vital importância que a degradação do substrato, cuja função é similar a digestão seja realizada simultaneamente com a produção de gases, responsável pela descrição da cinética de fermentação, retirando assim as possíveis variações que podem ocorrer quando se avaliam substratos diferentes em sua composição bromatológica.

A significância biológica dos valores de produção de gás obtida fica confirmada pela alta correlação linear encontrada entre o gás metano produzido pela fermentação de diferentes amostras, e a correspondente perda de matéria seca, dentro de cada período de fermentação.

A produção de gás no interior dos frascos é devido a produção de energia para o crescimento microbiano derivado da fermentação dos carboidratos, principalmente amido e celulose, cuja digestão anaeróbica produz ácidos graxos voláteis, succinato, fumarato, lactato, etanol, dióxido de carbono, metano e hidrogênio; todavia eles também aportam esqueletos de carbono essenciais pra a síntese de biomassa microbiana (Opatpatanakit et al 1994; Schofield et al 1994). A produção de gás oriunda da fermentação das proteínas é relativamente pequena e dos ácidos graxos insignificantes (Makkar, 2001).

Em resumo, a técnica de produção de gás mede diretamente a quantidade de gás liberado como

produto final da fermentação e indiretamente o fluido ruminal neutralizado (Schofield et al 1994). O gás é produzido principalmente quando o substrato é fermentado até butirato e acetato. A fermentação do substrato até propionato produz gás somente durante a neutralização do ácido; como consequência, uma menor produção de gás é associada com a fermentação propiônica (Getachew et al 1998).



A formação de ácido propiônico é a única reação que requer H<sub>2</sub>; os demais H<sub>2</sub> são usualmente convertidos a CH<sub>4</sub>. Igualmente, na produção de propionato não gera produção de de CO<sub>2</sub> (Williams 2000).

O ajuste da produção acumulado de gás a uma equação apropriada permite resumir as informações da cinética de fermentação (Williams 2000). Assim, a descrição matemática das curvas de produção de gás permite a comparação do substrato, a avaliação dos diferentes ambientes e fermentação fornecem informações sobre a composição do substrato e da taxa de fermentação dos componentes solúveis e estruturais (Groot et al 1996 ; Noguera et al 2004).

Vários modelos estão disponíveis para parametrização dos perfis de degradação (Beuvink Kogut e 1993), cada um com vantagens e desvantagens de um ajuste estatístico para o outro, dependendo das condições experimentais e do tipo de substrato, o que exige uma avaliação do pesquisador para escolher o modelo adequado para cada situação e não o uso indiscriminado de um modelo único (Noguera et al 2004). A escolha do modelo deve levar em conta não só a matemática, mas também o significado dos parâmetros biológicos (Williams 2000).

Perfis de produção de gás podem ser descrita por um modelo de três fases (Cone et al 1997). Componentes solúveis são rapidamente fermentados após incubação, em seguida, ocorre uma mudança gradual para a fermentação do insolúvel, que devem ser hidratados e colonizados por microorganismos ruminais antes de ser fermentado e, finalmente, o gás é produzido pela reciclagem da população

A técnica de produção de gás registra o acúmulo do volume de gás estabelecendo relações estequiométricas entre a produção de AGV e o volume de gás (Blümmel et al 1999). Estas reações estequiométricas da fermentação das hexosas foram descritas por Hungate (1966) e estão a seguir:

microbiana e não pela fermentação do alimento (Van Milgen et al 1991; Cone et al 1997). Sobre esta última fase, deve evitar fermentação prolongada após o esgotamento do substrato, porque a análise microbiana torna difícil a interpretação dos dados (Stefanon et al 1996).

Equações de regressões podem ser usadas para prever a digestibilidade a partir da composição química do alimento (Van Soest, 1994). Usando a técnica de produção de gás *in vitro* e a composição química do alimento em múltiplas equações de regressão, Menke et al. (1979) encontrou alta precisão (R<sup>2</sup>= 0,98) na predição da digestibilidade da matéria orgânica *in vivo*. A partir daí, outros autores (Chenot et al., 1997; Fernandez-Rivera, 1997; Macheboeuf et al., 1997) também encontraram correlações significativas entre a produção de gás *in vitro* e a digestibilidade *in vivo* de alimentos para ruminantes.

Recentemente, o GTP tem sido aplicado com sucesso usando outras espécies animais, como cavalos (Macheboeuf et al., 1997), frango (Kwakkel et al., 1997), suínos (Bauer et al. 2004; Bindelle et al., 2006). Em coelhos, Calabro et al. (1999) propôs a GTP para prever o valor nutritivo de dietas para esta espécie utilizando o conteúdo cecal fresco como inoculo. Seus resultados preliminares, avaliando 10 dietas, indicaram a possibilidade de prever com precisão a digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica e energia com resultados confiáveis em coelhos (R<sup>2</sup>: 0,725 e 0,744 para matéria orgânica e energia, respectivamente). Stanco et al. (2003) cita que o principal obstáculo para esta técnica parece ser a variabilidade do inoculo padrão, entretanto afirma que este problema poderia ser resolvido

ao utilizar conteúdos cecais congelados como inóculos em oposição ao conteúdo cecal fresco. Assim sendo, pesquisadores poderiam trabalhar com um número de substratos maior com um inóculo padronizado.

Stanco et al. (2003) avaliaram o valor nutritivo de dietas para coelhos usando a técnica de produção de gás *in vitro* e encontraram resultados semelhantes aos de Calabrós (1999). Estes pesquisadores encontraram alta correlação entre a digestibilidades *in vivo* e *in vitro* para matéria seca ( $r=0,79$ ) e matéria orgânica ( $r=0,77$ ). Os resultados desta pesquisa indicaram que a técnica de produção de gás *in vitro*, utilizando o conteúdo cecal como fonte de inóculo, pôde estimar a digestibilidade da MS, MO e ED de dietas com moderada precisão. Também citaram que esta técnica pode fornecer informações sobre a cinética de fermentação, sendo então um método que apresenta um grande potencial para caracterização de dietas no futuro. Ainda relataram que a comparação entre resultados de digestibilidade *in vitro* é difícil, devido a diferentes técnicas relatadas na literatura. Pascual et al (2000) obtiveram equações de regressão para coeficientes de digestibilidade com elevado  $R^2$ . Utilizando o método multienzimático descrito por Ramos e Carabaño (1996) encontraram valores de 0,94 e 0,82 com método cecal descrito por Fernandez-Carmona et al (1993). Em contrapartida, a técnica que utilizou material fecal como inóculo forneceu equações com baixo  $R^2$  (0,67). Pesquisas realizadas por Ramos et al (1992) e Ramos e Carabaño (1996) com o método multienzimático para estimativa da digestibilidade encontraram  $R^2$  de 0,90.

Piattoni et al. (1996) avaliando metodologias *in vivo* e *in vitro* para padrão de fermentação cecal em coelhos entre 22 e 56 dias de idade mostraram correlações significativas entre as metodologias para produção de AGV, porém esse resultado não se sustentou quando avaliado  $NH_3-N$  e lactato, pois estes produtos finais são continuamente produzidos e utilizados. Portanto, a técnica aplicada de incubação *in vitro* é de valioso interesse em estudos relacionados a fisiologia digestiva de coelhos.

Atualmente, o principal obstáculo á difusão da GTP parece ser a variabilidade do inóculo padrão (Williams et al., 1995). Conseqüentemente, a padronização do inóculo é de grande interesse, a fim de se obter resultados comparáveis e reprodutíveis. Para esse efeito, a possibilidade de manter o inóculo inalterado com sua capacidade de fermentação é muito importante. Entretanto, Calabrós et. al., (2000)

estudaram as diferenças entre as características de fermentação *in vitro* de coelhos e a atividade microbiana induzida pela preparação e conservação por congelamento do inóculo. Os dados obtidos abriram a possibilidade de usar a GTP para descrever a cinética de fermentação de alimentos para coelhos com o conteúdo cecal como fonte do inóculo. O congelamento do inóculo resultou diferenças quando comparado com inóculos frescos. No entanto, os autores citam que esses resultados devem ser considerados, porque oferecem novas possibilidades de funcionamento da técnica. O processo de congelamento do inóculo permite uma avaliação no estudo da cinética de fermentação com um número maior de substratos com inóculos mais padronizados, porém sugere mais estudos para investigar os efeitos do processo de congelamento e deferimento sobre a atividade microbiana.

Na pesquisa realizada por Calabros et al. (2000), a produção cumulativa de gás foi maior no inóculo congelado quando comparado ao inóculo fresco, além disso apresentou mais rapidez no processo de fermentação e menor degradabilidade da matéria orgânica. Quando analisado a produção de AGV, foi observado diferenças entre a produção do ácido butírico, onde o inóculo fresco apresentou 18,1% do total de AGV enquanto o inóculo congelado apresentou 4,88% do total de AGV. Os autores correlacionam essa diferença a danos causados à microbiota durante o processo de congelamento. Entretanto, o inóculo congelado proporcionou maior produção de acetato e butirato. A não-correspondência entre os resultados encontrados para os diferentes inóculos não era esperado e os autores citam que é difícil de explicar, principalmente porque a produção de propionato não apresenta diferença entre inóculos frescos e congelados.

O objetivo desta pesquisa, foi avaliar o uso de *Lithothamnium sp.* na alimentação de coelhos em crescimento e observar as respostas biológicas sobre os parâmetros de digestibilidade aparente *in vivo* e *in vitro* (através das técnicas Tilley e Terry e de produção de gases – Técnica semi-automática de produção de gases, Theodorou et al (1994) adaptada por Maurício et al. (1999) dos nutrientes, desempenho, morfometria intestinal (íleo), alteração na diversidade da microbiota cecal. Além de avaliar duas metodologias de congelamento dos conteúdos cecais para posterior avaliação de produção de gases e avaliar a dinâmica da fosfatase alcalina como indicador dos níveis séricos do cálcio e fósforo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABECIA, L.; McEWAN, N.R. ; BALCELLS, J.; SOLAMAS, E.; LOBLEY, G.E.; FONDEVILA, M. Microbial biodiversity in the caecum of litters from lactating does given antibiotics I the diets to manipulate their digestive population. *In: Proc. 50 Joint Meeting RRI-INRA, Gastrointestinal Tract Microbiology Symposium 21-23 june 2006. Aberdeen Scotland UK, Repr.Nutr. Develop.*, v.46, suppl. 1., S84, 2006.
- ABECIA, L.; FONDEVILA, M.; BALCELLS, J.; EDWARDS, J.E.; NEWBOLD, C.J.; McEWAN, N.R. Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum. *Fems Microbiology Letters*, v.244, p.111-115, 2005.
- AIRHART, J.C.; TAYLOR, S.J.; PURSER, K.W. et al. The bioavailability in chicks of calcium in a product derived from calcified seaweed (Marigro). **91<sup>ST</sup> Annual Meeting Abstracts**, Poscal 80 (Supplement I) p. 08 S32. 2002.
- ALGAREA Mineração Ltda., 1997. **SUMINAL®**, Mimeo, Rio de Janeiro, 4p.
- ASSOUMANI, M.B. Aquamin, a natural calcium supplement derived from seaweed. **Agro-food-Industry Hi Tech**. September/October 1997.
- AUFRERE, J., GRAVIOU, D., DEMARQUILY, C., VERITE, R., MICHALET-DOREAU, B., CLAPOULOT, R. 1991. Predicting *in situ* degradability of feed protein in the rumen by two laboratory methods (solubility and enzymatic degradation). *Anim. Feed Sci. Technol.* 33:97-116.
- BADIOLA, I.; PEREZ DE ROZAS, A.M.; ROCA, M.; CARABANO, R.; GÓMEZ, M.; GARCÍA, J.; DE BLAS, C. Caracterización of the microbial diversity of rabbit intestinal tract by restriction fragment length polymorphism. *In: 8 World Rabbit Congress*, Puebla, México, 2004.
- BAUER E., WILLIAMS B., BOSCH M.W., VOIGHT C., MOSENTIN R., VERSTEGEN M.W.A. 2004. Differences in microbial activity of digesta from three sections of the porcine large intestine according to *in vitro* fermentation of carbohydrate-rich substrates. *J. Sci. Food Agric.*, 84, 2097-2104.
- BATTERHAM, E.S. Availability and utilization of amino acids for growing pigs. *Nutrition Research Reviews*, v. 5, p. 1-18, 1992.
- BENNEGADI, N.; FONTY, G.; MILLET, L.; GIDENNE, T.; LICOIS D.. Effects of age and dietary fibre level on caecal microbial communities of conventional and specific pathogen-free rabbits. *Microbial ecology in Health and Disease*, v. 15, p.23-32, 2003.
- BEUVINK J M e KOGUT J. Modeling gas production kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. *Journal of Animal Science*. 71: 1041-1046, 1993.
- BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for symbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. *Food Res. Int.* Amsterdam, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.
- BINDELLE J., BULDGEN A., BOUDRY C., LETERME P. 2007. Effect of inoculum and pepsin-pancreatin hydrolysis on fibre fermentation measured by gas production technique in pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 132, 212-226.
- BLÜMMEL, M.; ØRSKOV, E.R. Comparison of "*in vitro*" gas production and nylon degradability of roughage in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.40, p.109-119, 1993.
- BLÜMMEL, M.; MGOMEZULU, R.; CHEN, X.B.; MAKKAR, H.P.; BECKER, K. E ØRSKOV, E.R. The modification of an *in vitro* gas production test to detect roughage related differences in *in vivo* microbial protein synthesis as estimated by the excretion of purine derivatives. *Journal of Agricultural Science*. 133: 335-340, 1999.
- BOULAHROUF, A.; FONTY, G.; GOUET, P. Establishment, counts and identification of fibrolytic bacteria in the digestive tract of rabbit. Influence of feed cellulose content. *Current microb.* v.22:1-25, 1991.
- BRANDT, K.G.; SAMPAIO, M.M.S.; MIUKI, C.J. Importância da microflora intestinal. *Pediatrics (São Paulo)* v.28(2), p.117-27, 2006.
- BRODERICK, G.A., COCHRAN, R.C., 2000. *In vitro* and *in situ* methods for estimating digestibility with reference to protein degradability. *In: Givens, D.I., Owen, E.,*

- Axford, R.F.E., Omed, H.M. (eds). Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. *CAB International* 2000, p. 53-79.
- CABRAL, L.S.; VALADARES FILHO, S.C.; MALAFAIA, P.A.M. et al. Frações de carboidratos de alimentos volumosos e suas taxas de degradação estimadas pela técnica de produção de gases. *Rev. Bras. Zootec.*, v.29, p.2087-2098, 2000.
- CALABRÓS, S., NIZZA, A., PINNA, W., CUTRIGNELLI, M.I., PICCOLO, V. Estimation of digestibility of compound diets for rabbits using the *in vitro* gas production technique. *World Rabbit Sci.*, v.7, n.4, p. 197-201, 1999.
- CALABRÒ S., NIZZA A., SANNA C., PICCOLO V. Fermentation kinetics of some feedstuffs for rabbits using the *in vitro* gas production technique. In: 7 World Rabbit Congr.- Nutrition and Digestive Physiology-short paper, Valencia, 2000.
- CARABAÑO, R. e PIQUER, J. The digestive system of the rabbit. In: De Blas, C. e Wiseman, J. (eds). *The nutrition of the rabbit*. CAB INTERNATIONAL, 1998, p.1-17.
- CHENOST, M.; DEVERRE, F.; AUFRERE, J.; DEMARQUILLY, C. The use of gás-test technique for predicting the feeding value forage plants. In: *In vitro* techniques for measuring nutrients supply to ruminants. Proceedings of Occasional Meeting of the British Society of Animal Science, 8-10 July 1997. University of Reading, UK, 1997.
- CONE, J.W.; VAN GELDER, A.H. e DRIEHUIS, F. Description of gas production profiles with a three-phasic model. *Animal Feed Science and Technology*. 66: 31-45, 1997.
- CORRÊA, G.S.S.; FONTES, D.O.; SILVA, M.A.; CORRÊA, A.B. Antimicrobianos nas dietas de suínos. *Cad. Tec. Vet. Zoot.*, v.53, p.1-108, 2007.
- CORTEZ, S.; BRANDEBURGER, H.; GREUEL, E.; SUNDRUM, A. Investigations of the relationships between feed and health status on the intestinal flora of rabbits. *Tierarztl. Umsch.*, v.47, p. 544-549, 1992.
- CROCIANI, F.; BIAVATI, B.; CASTAGNOLI, P.; MATTEUZZI, D. Anaerobic ureolytic bacteria from caecum content and soft faeces of rabbit. *J. Appl. Bacteriology*, v.57, p. 83-88, 1984.
- De BLAS, J. C.; GARCIA, J.; CARABAÑO, R. Role of fibre in rabbit diets. *Ann. Zootech.*, v.48: 3-13, 1999.
- DIAS, J.C.C.A. Níveis decrescentes de proteína em dietas suplementadas com complexo enzimático para coelhos em crescimento. Universidade Federal de Minas Gerais, 40p. 1999 (Dissertação).
- DUTRA, A.V.G.; AGUIAR, J.C.F.; ANTÚNEA, N.L. et al. Utilización de concentrado de alga calcarea (*Lithothamnium* sp.) em la ración de *Helix aspersa*, MULLER, 1774 (Gastropoda, helicidae). **Revista Cubana de Alimentación y Nutrición**. V.3, n.3, p.429-441. 1989.
- EGRAN – European Group on Rabbit Nutrition. *Harmonization in rabbit nutrition research: recommendations to analyse some basic chemical components of feeds and faeces*. Workshop document from meeting of Madrid, 23-24 September, 1999. 10pp.
- ELSDEN, S.R.; HITCHCOCK, M.W.S.; MARSHALL, R.A.; PHILLIPSON, A.T. Volatile acid in the digesta of ruminants and other animals. *J. Exp. Biol.*, v.20, p.191-202, 1946.
- EMALDI, O.; CROCIANI, F.; MATTEUZZI, D.; PROTO, V. A note on the total viable count and selective enumeration of anaerobic bacteria in the caecal content soft and hard feces of rabbit. *J. Appl. Bact.*, v. 46, p. 169-172, 1979.
- FALK, P.G.; HOOPER, L.V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J.I. creating and maintaining the gastrointestinal system: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol. Molecular Biol. Rev.* v.6, p.1157-1170, 1998.
- FISHER, S.G.; LERMAN, L.S. DNA fragments differing by single base pair substitutions are separated in denaturing gradients gels: Correspondence with melting theory. *Proceeding of National Academy of Sciences*, v.80, p.1579-1583, 1983.
- FERNANDEZ-CARMONA, J.; CERVERA, C.; BLAS, E. Un nuevo método *in vitro* para el estudio de la digestión en el conejo. Procc XVIII Symposium de Cunicultura, Gronoller, Spain, p.43-45, 1993.
- FERNANDEZ-RIVER, S. Relationships between gas release *in vitro* and *in vivo* quality measures of tropical forages. In: *In vitro*

techniques for measuring nutrient supply to ruminants. Proceedings of Occasional Meeting of the British Society of Animal Science, 8-10 July 1997. University of Reading, UK, 1997.

FERREIRA, V.P.A. Valor nutritivo e eficácia de utilização digestiva de dietas com óleo vegetal, gordura animal e lipase para coelhos em crescimento. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2003, 83p. Tese (Doutorado).

FERREIRA, W.M.; SAAD, F.M.O.B.; PEREIRA, R.Q.N. Fundamentos da nutrição de coelhos. *Anais...* 3º Congresso de Cunicultura das Américas, Maringá, 2006.

FORSYTHE, S.J.; PARKER, D.R. Nitrogen metabolism by the microbial flora of the rabbit. *J. Appl. Bacteriology*, v.58, p.363-369, 1985.

FORTUN-LAMOTHE, L.; BOULLIER, S. Interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity, and strategies to improve digestive health in young rabbits. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 8, Puebla, México, 2004, Digestive Physiology, main paper, p. 1035-1067.2004.

FRAGA, M. J. 1998. Protein digestion. In *The nutrition of the rabbit* (ed. C. de Blas and J. Wiseman), pp. 39-54. CAB International, Wallingford.

FUENTE, I.M.; FERNANDEZ, C.; BLANCH, A. et al. Aditivos zootécnicos: alternativas a los antibióticos como promotores de crecimiento en porcinos. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 12, 2005, Fortaleza, Brasil, *Anais...* Fortaleza: ABRAVES, 2005. P. 18-49.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* Oxford, v.66, p.365-378, 1999.

FULLER, M.F.; WANG, T.C. Digestible ideal protein- a measure of dietary protein value. *Pigs News and Information*, v. 11, n. 3, p. 353-357, 1990.

GARCÍA, J.; GÓMEZ-CONDE, M.S.; CHAMORRO, S.; NICODEMUS, N.; DE BLAS C.; CARABANO, R.; PÉREZ DE ROZAS, A.; BADIOLA, I. Proyecto INIA sobre enteropatía mucóide: Resultados sobre las investigaciones em nutrición. In: XXX Simposium de Cunicultura. ASESU. pp. 157-165, 2005.

GETACHEW, G.; BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H.P.S. et al. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.72, p.261-281, 1998.

GIDENNE, T.; BELLIER, R. Etude in vivo de l'activité fermentaire caecale chez le lapin. Mise au point et validation d'une nouvelle technique de canulation caecale. *Repr. Nutr. Develop.*, v. 32, p. 365-376, 1992

GIDENNE, T. Consequences digestives de l'ingestion de fibres et d'amidon chez le lapin en croissance. Vers une meilleure definition des besoins. INRA, *Prod. Anim.*, (in press), 1996

GIDENNE, T. Caeco-colic digestion in the growing rabbit: impact of nutritional factors and related disturbances. *Livest. Prod. Sci.*, v.51: 73-88, 1997.

GIDENNE, T. An european group for rabbit nutrition: presentation and activity. *World Rabbit Science*, v.7 n.2, p. 101-106, 1999.

GIDENNE, T.; KERDILINES, V.; JEHL, N.; ARVEUX, P.; BRIENS, C.; ECKENFELDER, B.; FORTUNE, H.; MONTESSUY, S.; MUAZ, G.; STEPHAN, S. An increase of dietary ratio digestible fibre/ crude protein doe not affect the performances of the growing rabbit but reduce enteritis incidence: preliminary results of a multi-site study. In: Proceeding of 91eme J. Rech Cunicoles, G. Bolet (Ed.), ITAVI publ. Paris, pp. 65-68, 2001.

GIDENNE, T.; LICOIS, D. Effect of a high fibre intake on the resistance of the growing rabbit to an experimental inoculation with an enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. *Anim. Sci.*, v.80, p.281-288, 2005.

GIDENNE, T. The caecal ecosystem in the growing rabbit: Impact of nutrition and feeding factors. In: 3 American Rabbit Congress, Maringá, Brasil, 21-23, agosto, 2006.

GIDDENE, T.; FORTUN-LAMOTHE, L. Feeding strategy for young rabbit around weaning: a review of digestive capacity and nutritional needs. *Anim. Sci.* v.75.:169-184, 2002.

GOERING, H. K., E P. J. VAN SOEST. 1970. Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). Agric. Handbook No. 379. USDA-ARS, Washington, DC.



GOMEZ-CONDE, M.S.; CHAMORRO, S.; NICODEMUS, N.; DE BLAS, C. Effect of the level of soluble fibre on ileal apparent digestibility at different ages. In: Proceeding of the 8 th World Rabbit Congress. C. BECCERIL and A. PRO. (Eds.), Puebla, México, 7-10 setember, Colégio Posgraduados for WRSA publ., pp. 130. (<http://www.dcam.upv.es/8wrc>).

GOMEZ-CONDE, M.S.; PÉREZ DE ROZAS, A.; BADIOLA, I., CHAMORRO, S.; MATEOS, G.G.; DE BLAS, C.; GARCIA, J.; CARABANO, R. Level of soluble fiber and medication influence the presence of intestinal pathogen microbiota in Young rabbit. In: Joint ADSA-ASAS Annual meeting (in press), 2006.

GROOT, J.C.; CONE, J.W.; WILLIAMS, B.A.; DEBERSAQUES, F.M. E LANTINGA, E.A. Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 64: 77-89. 1996.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 360:512-519, 2003.

HAFFAR, A.; LAVAL, A.; GUILLOU, J.P. Enterotoxemie a *Clostridium spiroforme* chez lês lapins adultes. *Le Point Veterinaire*, v.20, p.99-102, 1988.

HORI, T., HARUTA, S., UENO, Y., ISHII, M., IGARASHI, Y. Direct comparison of single-strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel eletrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16S rRNA gene fragments. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p.165-169. 2006.

HORNICKE, H. Neuere ergebnisse zur physiologie des dickdaems beim kaninchen. 1) Morphologie, passagezeiten, microbiologie, wasser und electrolyte. *Ubers Tierenachr.*, 12, p.215-250, 1984.

HUDSON, R.; SCHAAL, B.; BILKO, A.; ALTBACKER, V. Just three minutes a day: The behavior of yong rabbits viewed in the context of limited maternal care. 6 World Rabbit Congress, Toulouse, v.2, p.395-403, 1996.  
HUNGATE, R.E. *The Rumen and its Microbes*. Academic Press, New York. 533 p. 1966.

HUNTINGTON, J.A., GIVENS, D.I. The *in situ* technique for studying the degradation of feeds:

a review of the procedure. *Nutrition Abstract and reviews* (Series B), v.65, p.63-93, 1995.

JILGE, B. Selective cumulation of small-sized marker particles during hard feces excretion. *Proc. 2<sup>nd</sup> Congr. Of World Rabbit Sci. Assoc.*, 16-18 april, Barcelona, WRSA ed.1, 1980.

JONES, D.I.K., THEODOROU, M.K. Enzyme techniques for estimating digestibility. In: Givens, D.I., Owen, E., Axford, R.F.E., Omed, H.M. (eds). *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. CAB International 2000*, p.155-173.

KIRJAVAINEN, P.V; GIBSON G.R. Healthy gut microflora and allergy: factors influencing development of the microbiota. *Ann Med*, v.31, p.288-92, 1999.

KIRK, J.L., BEAUDETTE, L. A., HART, M., MOUTOGLIS, P., KLIRONOMOS, J.N., LEE, H., TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, v.58, p.169-188. 2004.

KOVÁCS, M.; GYARMATI, T.; SZENCSNÉ, K.Z.; DONKO, T.; TORNOS, G.; LUKACS, H.; BOTA, B. A kétszer szoptatas ES a korai elvalastás hatasa a hazinyul vakbelflorajanak fejlődésere (effect of Double nursing and early weaning on the development of the caecal microflora in rabbits). *Hungarium Veterinary Journal*, v.124, p.742-748, 2002.

KOVÁCS, M.; SZENDRO, ZS.; CSUTORAS, I.; BOTA, B.; BENCASNÉ, K.Z.; OROVA, Z.; RADNA, I.; BIRONÉ, N.E.; HORN, P. Development of the caecal microflora of newborn rabbits during the first ten days after birth. 8 *World Rabbit Congress*, p. 1091-1096, 2004.

LEBAS, F. Vitamins in rabbit nutrition: Literature review and recommendations. *World Rabbit Sci*. v.8:185-192, 2000.

MACHEBOEUF, M.; JESTIN, M.; ANDRIEU, J.; MARTIN-ROSSET, W. Prediction of the organic matter digestibility of forages in horses by the gas test methods. In: *In vitro* techniques for meansuring nutrients supply to ruminants. Proceedings od Occasional Meeting of the British Society of Animal Science, 8-10 july 1997. University of Reading, UK, 1997.

MALAFAIA, P.A.M.; VALADARES FILHO, S.C.; VIEIRA, R.A.M. et al. Cinética ruminal de alguns alimentos investigada por técnicas gravimétricas e metabólicas. *Rev. Bras. Zootec.*, v.27, p.370-380, 1998.

- MAKKAR, H. Recent advances in *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. 2001. [http://www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/AGRI/PPA/570\\_EN\\_toc.htm](http://www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/AGRI/PPA/570_EN_toc.htm)
- MATHEW, A.G. et al. Effect of galactan on selected microbial populations and pH and volatile fatty acids in ileum of weanling pig. *J. Anim. Sci.* Savoy, v.71, n.6, p. 1503-1509, 1993.
- MAURÍCIO,R.M., MOULD,F.L., DHANO,A.M.S., OWENS,E., CHANNA,K.S., THEODOROU, M.K. 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79:321-330.
- MAURÍCIO,R.M., PEREIRA,L.G., GONÇALVES,L.C., RODRIGUEZ,N.M., BORGES, A.C.C., BORGES,I., SALIBA,E.O.S., JAYME, C.G. Obtenção da equação quadrática entre volume e pressão para implementação da técnica *in vitro* semi-automática de produção de gás para avaliação de forrageiras tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38 2001, Piracicaba, *Anais...* Piracicaba: SBZ, p. 1340-1341.
- MAURÍCIO, R.M., TOMICH,T.R., FILHO, R.A., REIS,R.B., GONÇALVES,L.C., BORGES,I., 2003. Comparison between *in vitro* gas production and *in situ* method for evaluating rumen dry matter degradation of maize grain and tropical grasses. In: Wild and Domestic Herbivore Diet Characterization. Universidad Autonoma de Yocatan, Mérida, México, 17-16 October, 2003, p.37-38.
- MATERIAIS CALCÁRIOS. **European Patent EP0966295**. (2003) Publicado em: 08/20/2003, link: <http://www.freepatentsonline.com/EP0966295/B1.html>>, acessado em: 20 de Fevereiro, 2008.
- MELO, P.C.; REZENDE, A.B.; SOUZA, M.W.R. **Efeitos de doses do Lithothamnium sp na produção leiteira**. Disponível em : [www.calmarmineracao.com.br/calmar/farinha2.htm](http://www.calmarmineracao.com.br/calmar/farinha2.htm) . Acesso em 4/09/2004. 2004a.
- MELO, P.C.; FRANCO, C.A.R.; FRANCO, A.R. **Uso de farinha de algas marinhas (Lithothamnium sp) na suplementação mineral de bovinos de corte**. Disponível em: [www.calmarmineracao.com.br/calmar/farinha1.htm](http://www.calmarmineracao.com.br/calmar/farinha1.htm) . Acesso em 4/09/2004. 2004b.
- MELO, T. V. utilização de farinha de algas marinhas (*lithothamnium calcareum*) e de fosfato monoamônio em rações para codornas japonesas em postura criadas sob condições de calor. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (dissertação),2006. 44p.
- MENKE,K.H., et al., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *J. Agric. Sci.* 93, 217-222.
- MOLLY, K. Formulation to solve the intestinal puzzle. *Pig Prog.*,v.17, p.20-22, 2001.
- MOULD,F.L. 2002. 21<sup>st</sup>Century feeds - 19<sup>th</sup> Century techniques. In: RESPONDING TO INCREASING GLOBAL DEMAND FOR ANIMAL PRODUCTS. University Cultural Centre, Merida, Yucatan, México. Novembro, 2002. *British Society of Animal Science*. Uk, p.34-36.
- MOULD,F.L. 2003. Predicting food quality – Chemical analysis and *in vitro* evaluation. *Field Crops Research*. 84, 31-44.
- MUYZER, G.; DE WALL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl.and Environ. Microbiol.*, v.59, p.695-670, 1993.
- MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.73, p.127-141, 1998.
- NOGUERA, R.R.; SALIBA, E.O. E MAURICIO, R.M. Comparación de modelos matemáticos para estimar los parámetros de degradación obtenidos a través de la técnica de producción de gas. **Livestock Research for Rural Development**. Volume 16, 2004. Acessado em dezembro/2008:<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd16/11/nogu16086.htm>
- OPATPATANAKIT, Y.; KELLAWAY, R.C.; LEAN, I.J.; ANNISON, G.; KIRBY, A. Microbial fermentation of cereal grains *in vitro*. Australian. Journal of Agricultural Research. 45: 1247-1263. 1994.

- ØRSKOV, E.R.; HOVELL, F.D.B.; MOULD, F. The use of the nylon bag technique for evaluation of feedstuffs. *Trop. Anim. Produc.*, v.5, p.195-213, 1980.
- PADILHA, M.T.S.; LICOIS, D.; GIDENNE, T.; CARRÉ, B. Caecal microflora and fermentation pattern in exclusively Milk-fed young rabbits. *Rep. Nutr. Develop.*, v.39, p.223-230, 1999.
- PASCUAL, J.J., FONFRIA, M.J., ALQUEDA, I. et al. Use of lucerne-based diet on reproductive rabbit does. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 7 Madrid, 1999. Espanha Proceedings... 1999: 352-358.
- PELL, A.N., SCHOFIELD, P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 76, 1063-1073.
- PERALI, C.; ARANOVICH, M.; SANTOS, M.W. et al. Efeito de diferentes níveis de adição do Suminal® sobre a produção e peso de ovos de codornas alimentadas com concentrados. 40 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003. Santa Maria, **Anais** (CD) ....Santa Maria: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003.
- PÉREZ, J.M.; LEBAS, F.; GIDENNE, T.; MAERTENS, L.; XICCATO, G.; PARIGIBINI, R.; DALLE-ZOTTE, A.; COSSU, M.E.; CARAZZOLO, A.; VILLAMIDE, M.J.; CARABAÑO, R.; FRAGA, M.J.; RAMOS, M.A.; CERVERA, C.; BLAS, E.; FERNANDEZ, J.; FALCÃO E CUNHA, L.; BENGALA FREIRE, J. European reference method for *in vivo* determination of diet digestibility in rabbits. *World Rabbit Science*. V.3 (1): 41-43, 1995.
- PEETERS, J.E.; MAERTENS, L. L'alimentation et les enterites post-sevrage. *Cuniculture*, v.83, p.224-229, 1988
- PIATTONI, F.; MAERTENS, L.; DEMEYER, D.I. In vivo and in vitro study of the caecal fermentation pattern in rabbits between 22 and 56 days of age. . In: 6 World Rabbit Congr., Toulouse, 1, p. 271-276, 1996.
- PIATTONI, F.; DEMEYER, D.; MAERTENS, L. Fasting effects on in vitro fermentation pattern of rabbit caecal contents. *World Rabbit Science*, v.5, p.23-26, 1997.
- PINHEIROS, V. GIDENNE, T.; FALCÃO, E.; CUNHA, L. Effect of age on bacterial fibrolytic activity of caecal flora of rabbit. *Proc. 2<sup>nd</sup> Meeting of Work Group Nutrition and Pathology*, 29-30 June, Godollo, Hungary, 50, 2001.
- PLATTONI, F. MAERTENS, L. DEMEYER, D.I. In vivo and in vitro study of the caecal fermentation pattern in rabbits between 22 and 56 day of age. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 6, Toulouse, França, 1996, v.1. p. 271-276.1996.
- POPE, H.R.; OWENS, C.M.; CAVITT, L.C. et al.. Efficacy of Marigro in Supporting Growth, Carcass Yield and Meat Quality of Broilers. **91<sup>ST</sup> Annual Meeting Abstracts**, Poscal 80 (Supplement I) p25. 2002.
- PORTSMOUTH, J.I. (1977). The nutrition of rabbit. In: Haresign, W.; Swan, H. and Lewis, D. (eds) *Nutrition and the climatic environment*. Butterworths, London, p. 93-111.
- RAMOS, M.A.; CARABAÑO, R.M.; BOISEN, S. An in vitro method for estimating digestibility in rabbits. In: WORLD RABBIT CONGRESS, CORVALLIS, 5, Oregon, 1992. USA. *Proc...* 1992 : vol. B, 939-946.
- RAMOS, M.A.; CARABAÑO, R.M. Predicción de la digestibilidad de la energía de los piensos para conejos a partir de su digestibilidad "in vitro" . *Revista Portuguesa de Zootecnia*, v. 1(1): 233-240, 1994.
- RAMOS, M. e CARABANO, R. Nutritive evaluation of rabbits diets by na *in vitro* method. In: 6 World Rabbit Congr., Toulouse, 1, p. 277-282, 1996.
- RÉRAT, A. Absorption of nitrogen and amino acids from exogenous (fish meal proteins) or endogenous sources in the pig. *Pigs News and Information*, v. 11, n. 2, p.173-180, 1990.
- ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*.v.34, Suppl.2, p.105-110, 2002.
- ROY, M.; GIBSON, G.R. **Probiotics and prebiotics – microbial in menu**. Capturado em 21 de novembro de 2008. Online. Disponível na internet <http://www.babelfish.altavista.com/cgi-bm>.
- SALYER, A.A. Agricultural use of antibiotics and antibiotic resistance in human pathogens: is there a link? In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 15, 1999, Nottingham.

- Proceedings...** Nottingham: Alltech, 1999, p.155-171.
- SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotics bacteria. *Int. Dairy J.*, Amsterdam, v.8, p.341-347, 1998.
- SANTOMÁ, G., DE BLAS, J.C., CARABAÑO, R. et al. Nutrition of rabbits. In: Nothigan Conference, Nothigan. *Proceedings...*, s.n.t., 1989, p.109-138.
- SCAPINELLO, C., FURLAN, A. C., GIDENNE T. Importância da padronização de metodologias e técnicas experimentais para avaliação de alimentos em coelhos. Anais dos simpósios da 42ª reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia. 2005.
- SCHIFFRIN E.J, BLUM S. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *Eur J Clin Nutr*, v.56 (Suppl 3), p.S60-S64, 2002.
- SCHOFIELD, P.; PITT, R.E. E PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *Journal of Animal Science*. 72: 2980-2991. 1994.
- SIBBALD, I.R. Estimation of bioavailable amino acids in feedingstuffs for poultry and pigs: a review with emphasis on balance experiments. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 67, n. 2, p. 221-300, 1987.
- SILVA, L.P E NÖRNBERG, J.L. **Prebióticos na nutrição de não ruminantes**. *Cienc. Rural*, Out 2003, vol.33, no.5, p.983-990.
- SMITH, H.W. Observations of the flora of alimentary tract and factors effecting its composition. *J. Path. Bact.*, v.89, p.53-66, 1965.
- SPRING, P. The move away from antibiotic growth promoters in Europe. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 15, 1999. Nottingham. **Proceeding...** Nottingham: Alltech, 1999, p. 173-183.
- STANCO, G.; Di MEO, C.; CALABRÓ, S.; NIZZA, A. Prediction of nutritive value of diets for a rabbits using na *in vitro* gas production technique. *World Rabbit Sci*, v. 11, p.199-210, 2003.
- STEFANON, B.; PELL, A.N. e SCHOFIELD, P. Effect of maturity on digestion kinetics of water-soluble and water-insoluble fractions of alfalfa and brome hay. *Journal of Animal Science*. 74: 1104-1115. 1996
- TAMMINGA, S., WILLIAMS, B. 1998 *In vitro* technique as tools to predict nutrient supply in ruminants. *British Society of Animal Science*. 22, 1-11.
- TAPPEINER, H. VON 1884 Untersuchungen uiber die Garung der Cellulose, insbesondere uiber deren Lösung im Darmkanal. *Z. Biol.*, 20, 52-134.
- THEODOROU, M.K., WILLIAMS, B.A., DHANOA, M.S., MCALLAN, A.B., FRANCE, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48: 185-187.
- TILLEY, J.M.A., TERRY, R.A., 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grass. Sco.* 18, 104-111.
- TANNOCK G.W. The normal microflora: an introduction. In: Tannock GW, ed. Medical importance of normal microflora. Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1999. p.1-23.
- VAN MILGEN, J.; MURPHY, M.R. e BERGER, L. L. A compartmental model to analyze ruminal digestion. *Journal of Dairy Science*. 74: 2515-2529. 1991.
- VAN SOEST, P.J. 1994. Nutritional ecology of ruminant, 2<sup>nd</sup> ed. *Cornel University Press*, Ithaca, NY, 1994. 476p. absorption and metabolism in the rabbit hind-gut. *Rep. Nutr. Develop.*, 29, p.185-196, 1989.
- VERNAY, M.; RAYNAUD, P. Repartitions des acides gras volatils dans Le tube digestif du lapin domestique. 2- Lapins soumis au jeune. *Ann. Rech. Vet.*, v.6, p.369-377, 1975.
- WILLIAMS B.A., BHATIA S.K., BOER H., TAMMINGA S. A preliminary study using the cumulative gas production technique to compare the kinetics of different fermentation by use of standard substrates. *Ann. Zoot.* 44, Suppl. 35, 1995.
- WILLIAMS, B. A. 2000. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: Givens D I, Owen E, Omed H M and Axford R F E (editors). *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. Wallingford (UK). CAB International. 475 p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Trace elements in human nutrition and health**, Geneva, 1996.

XICCATO, G.; Feeding and meat quality in rabbits: a review. *World Rabbit Science*. v.7 (2): 75-86, 1999.

XICCATO, G.; COSSU, M.E.; CARAZZOLO, A.; CARABAÑO, R.M.; RAMOS, M. Evaluation in vitro de la valeur nutritive des aliments pour lapins: efficacité de différents enzymes digestifs. In: JOURNÉES DE LA

RECHERCHE CUNICOLE, La Rochelle, France, 1994. *Proc...* vol.2, p. 375-383, 1994.

ZANINI, S.F.; CARVALHO, M.A.G.; COLNAGO, G., et al. Uso de farinha de algas como fonte de cálcio na ração de frangos de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA XXXVII. 2000, Viçosa, MG. **Anais...** 2000. 325p.

## CAPÍTULO II

### DESEMPENHO PRODUTIVO, RENDIMENTO DE CARÇA, DIGESTIBILIDADE APARENTE DA MATÉRIA SECA, PROTEÍNA E ENERGIA E MORFOMETRIA DA VILOSIDADE ILEAL EM COELHOS ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS DE INCLUSÃO DE *LITHOTHAMNIUM SP.*

#### RESUMO

Com o intuito de avaliar o potencial da farinha de algas marinhas (*Lithothamnium sp*) na nutrição de coelhos foram realizados, análises de presença de elementos traço na composição do *Lithothamnium*, um ensaio de desempenho com determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente para matéria seca, proteína e energia e análise morfométrica da vilosidade ileal de coelhos alimentados com dietas de diferentes níveis de inclusão (0,25%; 0,50%; 0,75% e 1,00%). Foram utilizados 60 coelhos Nova Zelândia Branco, de ambos os sexos, com 30 dias de idade. As dietas experimentais foram isoprotéicas e isoenergéticas, sendo uma controle e as demais com os diferentes níveis de inclusão de *Lithothamnium sp* em substituição ao inerte (bentonita) da dieta controle fornecidas *ad libitum*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e doze repetições. As variáveis avaliadas foram submetidas a análise de variância e análise de regressão com modelo pré-definido mediante o programa estatístico SAEG. Os resultados demonstraram que a inclusão do *Lithothamnium* em diferentes concentrações não interferiu ( $P>0,05$ ) nas variáveis estudadas: consumo, coeficientes de digestibilidade da matéria seca, proteína e energia, ganho de peso, rendimento de carcaça e peso de vísceras comestíveis. Entretanto o nível de inclusão de 1,0% afetou negativamente ( $P<0,05$ ) a largura e o comprimento das vilosidades ileais.

#### ABSTRACT

In order to evaluate the potential of seaweed meal (*Lithothamnium sp*) in the nutrition of rabbits were realized, analysis of the presence of trace elements in the composition of *Lithothamnium*, a performance test with determination of apparent digestibility coefficients for dry matter, protein and energy and morphometric analysis of the ileal villi of rabbits fed diets with different levels of inclusion (0.25%, 0.50%, 0.75% and 1.00%). We used 60 New Zealand White rabbits of both sexes, with 30 days of age. The experimental diets were isonitrogenous and isocaloric, and a control and the other with the different levels of inclusion of *Lithothamnium sp.* to replace the inert (bentonite) from the control diet *ad libitum*. The experimental design was completely randomized, with five treatments and twelve repetitions. The variables were subjected to analysis of variance and regression analysis model with pre-defined by the statistical program SAEG. The results showed that the inclusion of *Lithothamnium sp.* in different concentrations did not interfere ( $P>0.05$ ) in the variables studied: intake, digestibility coefficients of dry matter, protein and energy, weight gain, carcass yield and weight of edible offal. However it was verified that the level of inclusion of 1.0% interfere ( $P <0.05$ ) in a negative way the length and width of villi.



## INTRODUÇÃO

A produção animal moderna tem se tornado cada vez mais complexa, modificando os padrões na alimentação. Os sistemas de criação estão cada vez mais intensivos, exigindo maior produção, curto espaço de tempo e menor custo. Estes fatores podem causar estresse aos animais, submetendo-os a constantes desafios.

A produção de coelhos passa obrigatoriamente pela qualidade do manejo nutricional o que interfere substancialmente no custo final de produção. Daí a importância de se fornecer dietas nutricionalmente adequadas à espécie que proporcionem um bom desenvolvimento.

A avaliação de alimentos é um passo importante para caracterização de dietas para coelhos, a fim de se conhecer o potencial nutritivo destas e seus possíveis efeitos sobre o aproveitamento nutricional dos animais.

Os alimentos funcionais fazem parte de uma nova concepção de alimentos, apresentando propriedades benéficas além das nutricionais básicas. São consumidos em dietas convencionais, mas demonstram capacidade de regular funções corporais (Souza, et al., 2003). É o próprio alimento que irá fornecer os nutrientes necessários para que o organismo do animal se recupere. A simples presença de alimento irá estimular as funções digestivas intestinais até que se alcance a maturidade intestinal e o animal possa suprir suas exigências nutricionais.

As algas marinhas calcárias são plantas que crescem naturalmente no meio marinho e em profundidades das mais variadas. Desenvolvem em grandes profundidades, mas jamais podem ultrapassar as áreas onde não ocorre o fenômeno da fotossíntese. A renovação é permanente, contanto que haja incidência de luz natural, se tornando uma fonte de macro e microminerais renovável. Estas algas vêm sendo utilizadas desde a antiguidade para uso agrícola (Dias, 2000), e mais atualmente empregada na nutrição animal.

O *Lithothamnium sp.* é um fóssil de algas marinhas, rico em elementos minerais, com potencial uso na alimentação animal. Segundo Algarea (1997) a farinha de algas marinhas por ser um produto natural e possuir altos teores de cálcio, apresenta benefícios no processo absorptivo melhorando a conversão alimentar. Materiais... (2008) cita que esta espécie de alga marinha apresenta efeitos benéficos sobre o sistema imunorregulatório, podendo desta forma, atuar em diversos mecanismos do corpo

como, por exemplo: constituinte da estrutura óssea, regulação do sistema osmótico e equilíbrio ácido-base, além de contribuir significativamente para a fisiologia digestiva dos animais. Com bovinos, diversos estudos já foram realizados (Orsine et al., 1989; Melo et al., 2002; Melo et al., 2004a e 2004b), os quais relatam que a adição da farinha de algas marinhas melhorou a qualidade e a produção de leite, promoveu aumento no ganho de peso e melhorou a digestibilidade aparente da proteína bruta de forragens de baixa qualidade. Pouco se sabe sobre o uso de *Lithothamnium sp.* na nutrição de coelhos.

Diferentes estratégias nutricionais podem ser utilizadas para aumentar a eficiência de produção, dentre estas tem se destacado o uso de aditivos na alimentação animal. Nesse contexto, a farinha de algas marinhas (*Lithothamnium sp.*), um suplemento mineral de fonte renovável, que contém mais de 40 elementos (macro e micronutrientes) orgânicos pode atuar como pró-nutriente para coelhos.

Este trabalho objetivou avaliar a farinha de algas marinhas (*Lithothamnium sp.*) como alimento funcional em dietas para coelhos com diferentes níveis de inclusão (0,25, 0,50, 0,75 e 1,0%), através da avaliação dos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína e energia, além dos índices produtivos (consumo, ganho de peso, rendimento de carcaça e peso das vísceras comestíveis) e morfometria ileal.

## MATERIAL E MÉTODOS

A experiência de desempenho foi realizada no ambiente apropriado reservado para pesquisas metabólicas e de avaliação de alimentos em coelhos no laboratório de metabolismo animal da *Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)*, localizada em Belo Horizonte. As condições ambientes foram mantidas como temperatura e umidade estáveis, com protocolos experimentais conforme as recomendações suficientes de infraestrutura propostas pelo *European Group on Rabbit Nutrition (EGRAN, 1999)*.

As dietas experimentais eram compostas de uma dieta controle ou de referência (tabela 1), formulada seguindo as recomendações de De Blas & Mateos (1998) a fim de atender as exigências nutricionais de coelhos nesta fase de produção e mais quatro dietas com níveis de inclusão de 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0% de farinha de algas marinhas (*Lithothamnium sp.*) em



substituição ao inerte (Bentonita) da dieta controle, ficando estas isoprotéicas e isoenergéticas. Todas as dietas foram

peletizadas com grânulos de 12-15 mm de comprimento por 4-5 mm de diâmetro

Tabela 1. Formulação e composição nutricional das dietas experimentais e da dieta referência

Ingrediente (kg)	RF	0,25%	0,50%	0,75%	1,0%
Feno de alfalfa	35,09	35,09	35,09	35,09	35,09
Farelo de trigo	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00
Farelo de soja	10,53	10,53	10,53	10,53	10,53
Milho moído	6,69	6,69	6,69	6,69	6,69
Milho desintegrado com palha e sabugo	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Óleo de Soja	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Fosfato bicálcico	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57
Calcáreo	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71
Sal	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Bentonita	2,00	1,75	1,50	1,25	1,00
<i>Lithothamnium sp</i>	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00
Melaço em pó	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
DL-metionina	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
L-Lisina	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Premix vitamínico e mineral <sup>1</sup>	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

**Composição Nutricional das Dietas (% matéria natural)**

	Calculado	Analisado				
		Controle	0,25%	0,50%	0,75%	1,0%
Matéria seca	88,87	87,95	88,38	87,86	87,93	88,20
Proteína bruta	16,50	16,57	16,26	16,79	16,54	16,72
Fibra em Detergente Ácido	17,50	21,38	23,49	22,54	22,12	23,74
Cálcio	0,90	1,11	1,15	1,28	1,49	1,51
Fósforo total	0,60					
Lisina total	0,74					
Met + cist total	0,60					
Energia digestível (Kcal)	2567,46	2136,0	2071,5	2154,1	2132,1	2058,8

<sup>1</sup>Premix de vitaminas e minerais da Vaccinar Ltda: Se (0,10mg); I(0,40mg); Fe(40mg); Cu(10,00mg); Mn(40,00mg); Zn(50,00mg); Vit.A(10.000UI); Vit. D<sub>3</sub>(1.000UI); Vit.E(15,00mg); VitB<sub>12</sub>(10,00mg); Vit.K<sub>3</sub>(2,00mg); Tiamina(2,00mg); Riboflavina(5,00mg); Piridoxina(3,00mg); Niacina(30,00mg) Ácido Pantotênico(15,00mg); Colina(500,00mg) e Ácido fólico(0,50mg).

A fim de se estudar o efeito das dietas sobre os índices produtivos foram utilizados 60 coelhos da raça Nova Zelândia Branco (12 repetições por tratamento), de ambos os sexos. Os lâparos foram introduzidos no experimento logo após o desmame, que ocorreu aos 30 dias de idade. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de arame galvanizado, medindo 0,6×0,6×0,37m, providas de bebedouro tipo *nipple* e comedouro automático, o que permitiu livre acesso ao alimento e a água. As dietas foram fornecidas à vontade em comedouros divididos ao meio na sua largura com a utilização de fio de arame para reduzir o desperdício de ração. Controlou-se semanalmente o consumo de ração, o ganho de peso e a mortalidade entre os tratamentos até os animais completarem 2 Kg de peso vivo (aproximadamente 72 dias de idade).

Os animais foram abatidos de acordo com as recomendações de Gidenne e Lebas (1984) com

atordoamento na base do crânio, suspensos pelas patas posteriores e sangrados por corte da jugular. Imediatamente após a retirada de pele e anexos (cauda, patas e cabeça) os animais foram eviscerados.

Os efeitos dos diferentes tratamentos foram avaliados sobre o ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar da desmama (30 dias de idade) ao abate (72 dias de idade), rendimento de carcaça sem cabeça e rendimento das vísceras comestíveis (fígado, rins e coração). O ganho de peso foi obtido pela diferença entre os pesos inicial e final. O consumo de ração foi medido através da diferença entre a ração fornecida durante o período e as sobras ao final da experiência. A conversão alimentar foi mensurada dividindo o consumo diário de ração pelo ganho de peso vivo final. O rendimento de carcaça e de vísceras comestíveis foi obtido dividindo-se os

seus pesos pelo peso do animal antes do abate, multiplicando-se por 100.

O ensaio de digestibilidade *in vivo* foi realizado na última semana do ensaio de desempenho, quando os animais apresentavam 65 dias de idade. Foram mensurados o consumo individual de ração e a produção fecal durante esta fase experimental (quatro dias). Para a mensuração do consumo foram realizadas medições diárias das quantidades de ração fornecida e das sobras no comedouro. Não se evitou a coprofagia, e os cecotrofos encontrados nas bandejas foram pesados e incorporados às fezes duras para análises. Foi evitada a contaminação das fezes pela ração, retirando-as das fezes secas, e descontando-os da ração ingerida.

Diariamente as fezes foram recolhidas, pesadas e acondicionadas em potes plásticos hermeticamente fechados em *freezer* para posteriores análises químicas. Amostras das dietas experimentais também foram armazenadas em potes plásticos e congeladas para posteriores análises químicas.

A preparação das amostras de alimentos (ou dietas) e fezes, assim como, as análises químicas foram efetuadas de acordo com a metodologia proposta pelo EGRAN (1999).

Para o cálculo das digestibilidades aparentes dos princípios nutritivos (Pn) foi utilizada a fórmula proposta Schneider & Flat (1975):

$$\text{CD (\%)} = 100 \times (\text{Pn ingerido} - \text{Pn excretado}) / \text{Pn ingerido}$$

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e doze animais por tratamento, sendo a unidade experimental constituída de um animal. As variáveis avaliadas foram submetidos à análise de variância e análise de regressão com modelo pré definido mediante o programa estatístico SAEG.

Com o intuito de caracterizar o fósfil de algas (*Lithothamnium sp.*) foram realizadas as

Para avaliar a morfologia intestinal (íleo) dos coelhos foram coletadas amostras do íleo de 20 animais (quatro amostras/animal por tratamento) logo após o abate. Procedeu-se a colheita de um segmento de 4 cm de comprimento da mucosa do intestino delgado (íleo), padronizado a 8 cm da junção íleo-cecócólica, aberto em sua borda mesentérica, lavado com água destilada, estendido pela túnica mucosa, com alfinetes em papel cartão e fixados em solução de formol a 5%. Após 48 horas, as amostras foram reduzidas a fragmentos de 0,5 cm, lavadas em álcool etílico a 70°C e transferidas para soluções com concentrações crescentes de álcool (70, 80 e 90%) seguidas de duas baterias de álcool etílico absoluto (durante 6 horas cada), concluindo-se assim o processo de desidratação. Após a desidratação, foram diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, para se obter cortes transversais de 5mm da parede intestinal, sendo posteriormente coradas pela técnica de hematoxilina-eosina de Harris. Para as análises morfométricas das vilosidades ileais, foram realizadas 30 medidas de comprimento (compreende uma medida

seguintes análises: potenciometria íon seletivo - F<sup>-</sup> (FAO, 2004); gravimetria - S e SiO<sub>2</sub>, fósforo por colorimetria com fosdomolibdato (Cunnif, 1995); CaO e urânio pela técnica nuclear de análise por reação neutrônica no reator nuclear IPR - R1 (Canella et al., 2002) e espectrofotometria de absorção atômica alumínio. Todas as análises foram realizadas no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) da Universidade Federal de Minas Gerais.

longitudinal da vilosidade, desde a ponta do viló até sua base na cripta de Lieberkuhn) e largura (compreende uma medida horizontal da vilosidade, de uma parede lateral a outra) das vilosidades em cada lâmina, com o auxílio de um microscópio biológico binocular (objetiva de 20X) e uma ocular graduada para medição.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro animais por tratamento, sendo a unidade experimental constituída de um animal. As variáveis avaliadas foram submetidos à análise de variância e análise de regressão com modelo pré-definido e posteriormente ao teste de média Student Newman Keuls (SNK) e análise de correlação entre as variáveis, mediante o programa estatístico SAEG.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 2 encontram-se os resultados analisados do produto avaliado (*Lithothamnium sp.*).

Tabela 2. Análise bromatológica do *Lithothamnium sp.* (na matéria natural)

PB	EB	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	F <sup>-</sup>	S	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Urânio
-	-	51,3 %	0,03 %	0,17 %	0,3 %	0,77 %	0,29 %	1 ppm

Observa-se por estes resultados que o *Lithothamnium* não apresenta valores para proteína e energia, não contribuindo, portanto, com aporte energético e protéico às dietas, como já era esperado. As análises de minerais indicam que o *Lithothamnium sp.* apresenta elevada concentração de cálcio corroborando com Algarea (1997) que cita valores de 34% Ca, 0,08% P, 0,45% S e concentrações menores que 1ppm de Al. Nesta pesquisa foram encontrados valores para cálcio, alumínio e enxofre mais elevados. Em coelhos não há grande preocupação com excesso de cálcio nas dietas, pois estes animais apresentam metabolismo deste mineral diferente de outras espécies. A absorção é muito eficiente e independente da necessidade do animal, sendo o nível de cálcio sanguíneo um reflexo do nível de cálcio da dieta. O excesso de cálcio é excretado pela urina e não pela bile, como nas demais espécies de animais domésticos, mostrando que os rins desempenham o papel principal na homeostase de Ca. Gonzáles (1984) cita que em coelhos, o excesso de cálcio não é armazenado no organismo e sim, excretado via urina. Por isso, os rins dos coelhos são órgãos essenciais que estão constantemente sobrecarregados.

O enxofre não apresenta problemas práticos quando em elevadas concentrações nas dietas, uma vez que é baixa a absorção intestinal dos compostos inorgânicos deste mineral.

Dentre alguns minerais reconhecidamente com potencial tóxico para alimentação animal, pode-se destacar o flúor, urânio e alumínio. Nesta pesquisa foram feitas análises quantitativas para detectar a presença destes no *Lithothamnium sp.* para poder avaliar seu possível potencial toxicológico.

O flúor é o elemento mais eletronegativo da tabela periódica. Pode combinar de forma irreversível com o hidrogênio formando o ácido HF que apresenta grande poder de difusão e explica a grande absorção do F no estômago e sua presença nos fluidos intra e extracelulares. Sua elevada afinidade com o cálcio torna o flúor um elemento sempre presente nos tecidos calcificados (Institute of Medicine (1997), citado por Canella (2008)). Quantidades de flúor são comuns em várias fontes de suplemento mineral usadas na alimentação animal. Uma grande fonte de flúor na cadeia alimentar animal são os fosfatos. Toda rocha fosfática possui F

em sua estrutura. O Ministério da Agricultura estabelece na Instrução Normativa nº 12 de 30 de novembro de 2004, que o limite máximo de F nos produtos de pronto uso (suplemento destinado a bovinos) deverá ser no máximo de 0,2% (MAPA, 2004). National... (1980) cita que o nível dietético tolerável de flúor em coelhos é inferior aos das aves e suínos e situa-se ao redor de 40ppm. Níveis de flúor superiores podem provocar intoxicação, prejudicando o desempenho e causando alterações ósseas. Nesse experimento foi encontrado na amostra de *Lithothamnium sp.* um valor para F abaixo do limite máximo recomendado pelo Ministério da Agricultura (Tabela. 2). Contudo, é preciso considerar a quantidade de F nos outros ingredientes utilizados na formulação das dietas para coelhos como o de fosfatos, afim de não ultrapassar o limite de 40 ppm acima citado.

Não existe valor descrito como máximo tolerável para o urânio em dietas animais. Para a ingestão em humanos são propostos alguns limites admissíveis: 2ppm (ASTDR, 1999) e 0,6 ppm (WHO, 1996), sendo estes, valores um tanto discrepantes. Nesta pesquisa, foi encontrado um valor intermediário entre os autores acima citados (Tabela 2).

A concentração encontrada para alumínio nesse trabalho (Tabela 2) foi muito superior ao citado por Material...(2003) que foi de <1ppm. Deve-se ter cuidado com a quantidade de alumínio na dieta total dos animais, pois o excesso deste mineral pode resultar em deficiência de fósforo, uma vez que este se liga ao P, formando complexos insolúveis que não são absorvidos na luz intestinal. Entretanto como já foi mencionado, a quantidade de alumínio presente no *Lithothamnium sp.* não apresenta risco a saúde animal pois está diluído na formulação de uma dieta total, ficando seu nível abaixo do tolerável.

Nas tabelas 3 e 4 encontram-se os valores para as médias de todas as variáveis estudadas (consumo, peso final, ganho de peso, conversão alimentar, rendimento de carcaça, rendimento das vísceras comestíveis (fígado, rins e coração), coeficiente de digestibilidade da matéria seca, proteína e energia). Apenas o rendimento de carcaça apresentou na análise de regressão o valor de F significativo a 5%, tanto para equações linear quanto quadrática, porém seus R<sup>2</sup> não se apresentaram satisfatórios

( $R^2=0,01$  e  $R^2=0,02$ , respectivamente). Para os outros parâmetros, a análise de regressão não indicou efeitos significativos ( $P>0,05$ ), não se

ajustando assim, a nenhum modelo de equação pré-definido.

Tabela 3. Média do consumo, peso vivo final (PVF), ganho de peso diário (GPD), conversão alimentar (CA), rendimento de carcaça (RC), e rendimento das vísceras comestíveis, fígado (Rfig), rins (Rrins) e coração (Rcor) de coelhos alimentados com diferentes concentrações de *Lithothamnium*.

Parâmetro	Referência	Tratamentos				Média	CV
		0,25%	0,50%	0,75%	1,00%		
Consumo(g)	117,08	107,94	104,91	107,30	111,76	109,68	12,12
PVF (g)	2271	2292	2293	2218	2399	2295	10,25
GPD(g)	38,56	38,97	39,70	38,02	40,60	39,16	10,75
CA	3,06	2,77	2,65	2,85	2,76	2,81	9,99
RC (%)	47,58	48,48	48,16	47,17	48,48	47,98	4,14
Rfig (%)	4,12	3,74	3,85	4,11	4,39	4,04	17,37
Rrins (%)	0,68	0,67	0,67	0,66	0,66	0,67	7,27
Rcor (%)	0,28	0,27	0,27	0,27	0,28	0,27	16,25

CV= coeficiente de variação

Tabela 4. Médias do consumo e coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (CDMS), proteína bruta (CDPB) e energia bruta (CDEB), das dietas testadas avaliadas na metodologia *in vivo*.

Parâmetro	Tratamentos					Média	CV
	Controle	0,25%	0,5%	0,75%	1,0%		
Consumo (g)	158,51	134,81	137,11	143,65	147,30	<b>144,28</b>	17,4
CDMS (%)	55,36	56,62	57,67	56,94	55,71	<b>56,46</b>	6,29
CDPB (%)	71,94	72,61	74,07	73,64	70,89	<b>72,63</b>	4,05
CDEB (%)	54,91	53,73	55,14	54,67	52,57	<b>54,21</b>	8,17

CV= coeficiente de variação;

Os valores encontrados nesta pesquisa estão dentro do esperado para animais alimentados com dietas tradicionais. Corroboram ainda com os dados citados por Ferreira et al. (2007a e 2007b) e Euler et al. (2007) que avaliaram variáveis de desempenho e digestibilidade aparente em dietas com inclusão do *Lithothamnium sp.* em níveis de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% para coelhos e também não encontraram diferença ( $P>0,05$ ). Melo (2006) não observou diferenças significativas ( $p>0,05$ ) em experimentos avaliando desempenho de codornas japonesas em postura alimentadas com diferentes fontes de cálcio, entre eles o *Lithothamnium sp.* nas proporções de 0,25% e 0,50% de inclusão nas dietas destas aves, entretanto, este mesmo autor cita ter encontrado um peso médio final de 2,3% maior ( $P>0,05$ ) das aves alimentadas com esse fósil de algas em relação à dieta referência, e relaciona este aumento possivelmente pelo maior consumo de ração das aves alimentadas com *Lithothamnium*. Neste experimento não foi observado ( $P>0,05$ ) aumento do consumo em nenhum dos níveis estudados. Airhart et al. (2002) observaram que em pintinhos o cálcio proveniente do *Lithothamnium calcareum* apresentou maior biodisponibilidade do que aquele proveniente do calcário, resultando em melhor conversão alimentar. Efeitos de melhora

na conversão alimentar foram observados por Pope et al. (2002), em frangos de corte também suplementados com *Lithothamnium calcareum*, os quais apresentaram maior ganho de peso. Fepagro (2008) cita que pesquisas realizadas com bovinos da raça nelore e em bovinos de leite obtiveram resultados superiores em 23% no ganho de peso e 6,5% no desempenho, respectivamente, para animais suplementados com *Lithothamnium sp.*

Os resultados encontrados para peso vivo final aos 72 dias de idade estão próximos ao citado por Scapinello et al. (2001), Faria et al. (2004), Lui et al. (2005) e Ferreira et al. (2006) que foram 1953g, 2026g, 2145g e 2023g, respectivamente. O ganho de peso diário neste trabalho ficou superior aos citados por Scapinello et al. (2001), Ferreira et al. (2006), Lui et al. (2005) e Faria et al. (2004) (28,0; 33,0; 35,9 e 36,0g, respectivamente). O consumo de ração entre os 35 e 72 dias de idade foram semelhantes aos relatados pelos autores anteriormente citados, porém pouco superior a 92g encontrado por Scapinello et al. (2001). Já a conversão alimentar foi melhor neste experimento quando comparada aos valores de 3,34; 3,25 e 3,01 citados por Scapinello et al. (2001), Lui et al. (2005) e Faria et al. (2004). Para o rendimento de carcaça, apenas os

resultados 49% de Faria et al. (2004) e 46% de Ferreira et al. (2006) ficaram semelhantes aos encontrados neste experimento, estando todos os resultados obtidos pelos demais autores, Scapinello et al. (2001), Lui et al. (2005) e Oliveira e Lui (2006) superiores, sendo eles, 53%, 55,4% e 54,7%, respectivamente.

Ao analisar o rendimento de fígado, pode-se observar que neste experimento os valores encontrados representam, em média, 4% do peso da carcaça, sendo próximos aos observados nos trabalhos de Herrera (2003) e Fernández-Carmona et al. (1998) onde o rendimento do fígado representa, respectivamente, 3,43 e 3,96% do PV, abaixo dos 6,42% encontrados por Lebas et al. (1982) e superiores aos 2,25%, 2,59% e 2,66% encontrados por Lui et al. (2005), Oliveira e Lui (2006) e Ferreira et al. (2003), respectivamente. Vários trabalhos que estudaram a variação do peso do fígado em relação ao tipo de dieta não são conclusivos (Ouhayoun et al., 1986). Schlolaut et al. (1984) citaram que o peso do fígado foi maior em coelhos alimentados com dietas ricas em fibra. Pesos maiores dos fígados também foram relacionados com dietas de densidade energética maior, como observado por Butcher et al. (1981) trabalhando com dietas de 3.130 kcal e dietas menos densas em energia (2.294,4 kcal) resultados também reportados por Lebas et al. (1982).

Herrera (2003) cita que dietas contendo carboidratos mais indigestíveis levarão a menor deposição de gordura e glicogênio no fígado e conseqüentemente este apresentará menor tamanho. Sabe-se que o fígado é o órgão exportador de nutrientes para todo o organismo, então oferecendo uma dieta pobre em carboidratos fermentáveis, o fígado vai depositar pouco glicogênio, pois terá que exportar bastante glicose para suprir as necessidades deste nutriente dos outros sistemas, e conseqüentemente o tamanho deste órgão será menor.

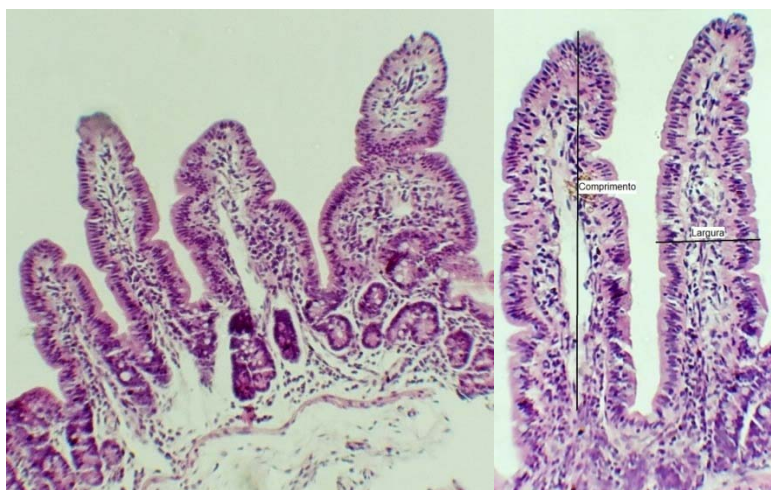
O rendimento dos rins apresenta-se menor quando comparado aos 0,85% citados por Herrera (2003) e 0,81% citado por Ferreira et al. (2006) e superior aos encontrados por Oliveira e Lui (2006) que foi de 0,32%. Entretanto, semelhantes aos 0,66% relatados por Lui et al. (2005). Herrera (2003) cita que o tamanho dos

rins pode estar relacionado com a função do metabolismo intermediário e ao perfil de proteína integrante da célula vegetal se a dieta for composta por uma proteína que não apresenta um bom perfil de aminoácidos, conseqüentemente terá poucos aminoácidos desaminados e o ciclo da úreia será pouco intenso o que levará a menor trabalho e tamanho dos rins.

O rendimento do coração foi semelhante aos 0,29% citados por Oliveira e Lui (2006), porém inferior aos 0,32% encontrados por Lui et al. (2005) e superior aos 0,21% citados por Ferreira et al. (2006).

Apesar de Melo (2006) citar que o *Lithothamnium sp.* contém nutrientes catalisadores do metabolismo animal e das formações celulares e protéicas, favorecendo uma nutrição equilibrada e com mais saúde, nas condições em que este experimento foi realizado, não foi possível observar respostas significativas ( $P>0,05$ ). Possivelmente pelo fato das fontes de minerais da dieta controle terem sido mantidas constantes nas dietas experimentais e a composição do ingrediente avaliado ser de elementos minerais. Além disso, as condições experimentais não desafiaram o sistema imune dos animais, sendo um pré-requisito básico para obtenção de resposta de ingredientes com potencial de atuação na fisiologia digestiva, refletindo em uma melhor absorção de nutrientes, como é o caso, por exemplo, dos prebióticos.

A figura 1. ilustra as lâminas das vilosidades ileais analisadas nesta pesquisa. Na análise de regressão não foram encontrados efeitos significativos ( $P>0,05$ ), não se ajustando assim, a nenhum modelo de equação pré-definido. Na tabela 5 estão apresentados os valores obtidos para comprimento e largura das vilosidades ileais. Ao aplicar o teste SNK a 5% de probabilidade, foi observado uma redução nos valores médios tanto para comprimento quanto para largura das vilosidades ileais no nível de 1,0% de inclusão do *Lithothamnium sp.* sugerindo que este nível prejudicou o desenvolvimento da mucosa intestinal, talvez pelo *Lithothamnium* apresentar-se de forma abrasiva ao passar pelo trato digestivo.



(Foto: André Almeida Fernandes)

Figura 1. Fotos ilustrativas das vilosidades ileais

Tabela 5. Médias do comprimento e da largura das vilosidades ileais dos coelhos alimentados com dietas com níveis crescentes de inclusão de *Lithothamnium* sp.

Parâmetro	Tratamentos					CV
	Controle	0,25%	0,5%	0,75%	1,0%	
Comprimento (mm)	264,99 A	246,52 A	287,08 A	257,67 A	140,83 B	20,29
Largura (mm)	77,27 A	89,33 A	84,12 A	82,95 A	38,21 B	19,27

Médias seguidas de letras maiúsculas na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ( $p < 0,05$ )

Melo et al. (2004) citam que o *Lithothamnium* sp. pode interferir positivamente na absorção de nutrientes, então supõe-se que este deve atuar de forma benéfica sobre a mucosa intestinal. Porém nesta pesquisa não se pode observar tal efeito, uma vez que não foi observado efeito ( $P > 0,05$ ) sobre o comprimento e a largura das vilosidades ileais até o nível de 0,75% de inclusão. Apesar do nível de 1,0% de inclusão ter prejudicado o tamanho das vilosidades, esse efeito não pode ser observado quando foi avaliado a digestibilidade dos nutrientes e o desempenho dos animais.

Embora os produtos (aditivos) terem sido diferentes do testado nesta pesquisa, Michelan et al. (2002) avaliaram através da morfometria intestinal, a utilização de probiótico, ácido orgânico e antibiótico em dietas para coelhos em crescimento e concluíram não haver diferença ( $P > 0,05$ ) para as medidas morfométricas da parede do jejuno. Loddi (1998) também não observou diferença na altura dos vilos e profundidade de cripta do jejuno em

frangos de corte, quando avaliou o probiótico LBC ME 10® - *Enterococcus faecium* Cernelle 68, 40 g/t). Por outro lado, Lima et al. (2000), analisando a morfometria do duodeno de frangos de corte, suplementados com o probiótico Calsporin-10®, obtiveram aumento na altura da vilosidade e na profundidade da cripta. Dobrogosz et al. (1991) observaram aumento, tanto no comprimento do vilos, como na profundidade de cripta no intestino delgado de frangos de corte, em que as dietas foram suplementadas com *Lactobacillus reuteri*.

Fica claro que a ação dos aditivos, tanto em características de desempenho, como histológicas do trato digestivo, dependem, basicamente, da composição do produto e, segundo Fuller (1989), das características e sua relação com os microrganismos presentes no trato digestivo das diferentes espécies.

Nesta pesquisa, foi observada uma correlação de 0,85 entre os parâmetros (comprimento e largura) avaliados.

## CONCLUSÕES

O *Lithothamnium* sp. não apresenta nenhum elemento traço em concentrações que impossibilitem sua utilização na alimentação animal.

Nos níveis de até 1,0% de inclusão e nas condições experimentais desta pesquisa o *Lithothamnium* sp. não apresentou características de alimento funcional, pois não melhorou nenhum índice para as variáveis estudadas.

Não apresentou efeito benéfico sobre as vilosidades intestinais, sendo que o nível de 1,0% de inclusão afetou negativamente ( $p < 0,05$ ) o comprimento e a largura das vilosidades ileais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRHART, J.C.; TAYLOR, S.J.; PURSER, K.W. et al. The bioavailability in chicks of calcium in a product derived from calcified seaweed (Marigro). 91<sup>ST</sup> Annual Meeting Abstracts, Poscal 80 (Supplement I) p. 08 S32. 2002.
- ALGAREA Mineração Ltda., 1997. SUMINAL®, Mimeo, Rio de Janeiro, 4p.
- ATSDR – Agency for toxic substances and disease registry of United States. *Toxicological profile for uranium*. Atlanta, USA: U.S. Department of health and human services, 1999.432p.
- BUTCHER, C. BRYANT, M.J., MACHIN, D.H., OWEN, E., OWEN, J.E. The effect of metabolizable energy concentration on performance and digestibility in growing rabbit. *Tropical Animal Production*, v. 6, p.93-100. 1981.
- CANELLA, A.A. Análises de fontes de fósforo na nutrição animal: técnicas nucleares e correlatas em estudos em coelhos. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2008, 68p. Tese (Doutorado).
- CANELLA, A.A.; VEADO, J.C.; MENEZES, M.A.B.C. Study of essential elements in cattle tissue from a tropical country using neutron activation analysis. *Food and Nutrition Bulletin*, v. 23, p.237-240, 2002.
- CUNNIF, P. Official methods of analysis of *AOAC International*. Arlington: AOAC International, 1995. Vol.1 e 2. p. 5-26.
- De BLAS, J.C., MATEOS, G.G. Feed Formulation. In: The nutrition of the rabbit. DE BLAS, J.C., WISEMAN, J. (Ed) p. 241-253, 1998.
- DIAS, G.T.M. Granulados Bioclásticos – Algas Calcárias. *Brazilian Journal of Geophysics*, vol. 18(3), 2000.
- DOBROGOSZ, W.J.; BLACK, B.L.; CASAS, I. A. Delivery of viable *Lactobacillus reuteri* to the gastrointestinal tract of poultry. **Poultry Science**, n.70, p.158, 1991.
- EGRAN – European Group on Rabbit Nutrition. *Harmonization in rabbit nutrition research: recommendations to analyze some basic chemical components of feeds and faeces*. Workshop document from meeting of Madrid, 23-24september, 1999. 10pp.
- EULER, A.C.C; FERREIRA, W.M.; TEIXEIRA, E.A.; SANTOS, A.G.T. Desempenho de coelhos Nova Zelândia Branco alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de farinha de algas marinhas (*Lithothamnium* sp.) In: ZOOTECA, 27., 2007. Londrina. Anais... Londrina: Congresso Brasileiro de Zootecnia, [2007] (CD-ROM).
- FAO – Food and agriculture organization. Use of phosphate rocks for sustainable agriculture, Roma: FAO, 2004. 144p.
- FARIA, HG.; SCAPINELLO, C.; PERALTA, R.M.; GIDENNE, T.; FURLAN, A.C.; ANDREAZZI, M.A. Digestibilidade e desempenho de coelhos oriundos de quatro padrões de alimentação até a desmama alimentados com dietas contendo diferentes níveis de amido após a desmama. R. Bras. Zootec. [online]. 2004, v. 33, n. 5, pp. 1172-118.
- FERNÁNDEZ-CARMONA, J., BERNAT, F., CERVERA, C. PASCUAL, J.J. High lucerne diets for growing rabbits. *World Rabbit Science*. V. 6, n.2, p. 237-240. 1998.
- FERREIRA, V.P.A. Valor nutritivo e eficácia de utilização digestiva de dietas com óleo vegetal, gordura animal e lipase para coelhos em crescimento. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2003, 83p. Tese (Doutorado).

- FERREIRA, V.P.A.; FERREIRA, W.M.; SALIBA, E.O.S.; SCAPINELLO, C.; TEIXEIRA, A.O.; KAMWA, E.B. Digestibilidade, cecotrofia, desempenho e rendimento de carcaça de coelhos em crescimento alimentados com rações contendo óleo vegetal ou gordura animal. *R.Bras.Zootec.* vol.35 n.4 suppl., Viçosa, 2006.
- FERREIRA, W. M.; EULER, A. C; TEIXEIRA, E. A. Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca e da proteína bruta de dietas com inclusão de farinha de alga marinhas (*Lythothamnium* sp.) para coelhos Nova Zelândia Branco. In: ZOOTEC, 27., 2007. Londrina. Anais... Londrina: Congresso Brasileiro de Zootecnia, [2007] (CD-ROM).2007<sup>a</sup>
- FERREIRA, W. M.; EULER, A. C; TEIXEIRA, E. A; ARAUJO, A. V. Avaliação do rendimento de carcaça de coelhos Nova Zelândia Branco alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de farinhas de algas marinhas (*Lythothamnium* sp.) In: ZOOTEC, 27., 2007. Londrina. Anais... Londrina: Congresso Brasileiro de Zootecnia, [2007] (CD-ROM). 2007b.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals: a review. **Journal of Applied Bacteriology**, n.66, p.365-378, 1989.
- FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – FEPAGRO. **Algas calcárias e bactérias para melhorar produtividade do solo**. Disponível em: [http://www.fepagro.rs.gov.br/index.php?acao=not&cod\\_noticia=130&int\\_novidade=&pag=6](http://www.fepagro.rs.gov.br/index.php?acao=not&cod_noticia=130&int_novidade=&pag=6) Acesso em: 20 abr.2008.
- GIDENNE, T., LEBAS, F. Evolution circadienne du contenu digestif chez le lapin en croissance relation avec la caecotrophie. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 3, Roma, 1984. Roma *Proc...* 1984: 494-501.
- GONZÁLES, G. Minerales, vitaminas, antibioticos, anticoccidiostáticos y otros aditivos en la alimentación de conejos. In: De Blas, C. Alimentación Del conejos, Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, 1984, p. 83-103.
- HERRERA, A.D.P.N. Eficiência produtiva e avaliação nutricional de dietas simplificadas a base de forragens para coelhos em crescimento. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2003, 104p. Tese (Doutorado).
- INSTITUTE OF Medicine, *Dietary reference intake for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride*. NRC: Washington, D.C., 1997. 449p.
- LEBAS,F., LAPLACE, J.P., DROUMENQ, P. Effects de la teneur en énergie de l'aliment chez le lapin. Variations en fonction de l'âge des animaux et de la séquence des régimens alimentaires. *Animal Zootech*, v. 31. p. 233-256. 1982.
- LIMA. A.C.F.; HARNICH, F.R.; PIZAURO, J.M. et al. Suplementação enzimática e/ou probiótica na ração sobre a atividade de enzima e morfometria intestinal de frangos de corte criados no calor. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, n.2, p. 52-53, 2000.
- LODDI, M.M. **Aspectos produtivos e qualitativos do uso de probiótico para frangos de corte**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1998. 60p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, 1998.
- LUI, J.F.; OLIVEIRA, M.C.; CAIRES, D.R.; CANCHERINI, L.C. Desempenho, rendimento de carcaça e ph cecal de coelhos em crescimento alimentados com dietas contendo níveis de probiótico. *Ciência Animal Brasileira*, Vol. 6, No 2, 2005.
- MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Instrução normativa nº 12 de novembro de 2004*, Governo Federal: Brasília. Disponível em <<http://www.mapa.gov.br>> acesso em 12 de junho de 2008.
- MATERIAIS CALCÁRIOS. European Patent EP0966295. (2003) Publicado em: 08/20/2003, link: <[http://www.freepatentsonline.com/EP0966295\\_B1.html](http://www.freepatentsonline.com/EP0966295_B1.html)>, acessado em: 20 de Fevereiro, 2008.
- MELO, P.C.; DA SILVA, F.C.; DE SOUZA, M.W.R. et al. Efeito de doses do SUMINAL® na produção leiteira. XII Congresso Brasileiro de Zootecnia e IV Congresso Internacional de Zootecnia, ZOOTEC 2002. Rio de Janeiro, Anais.... 2002.
- MELO, P.C.; REZENDE, A.B.; SOUZA, M.W.R. Efeitos de doses do Lithothamnium sp na produção leiteira. Disponível em : [www.calmarmineracao.com.br/calmar/farinha2.htm](http://www.calmarmineracao.com.br/calmar/farinha2.htm) . Acesso em 4/09/2004. 2004a.



- MELO, P.C.; FRANCO, C.A.R.; FRANCO, A.R. Uso de farinha de algas marinhas (*Lithothamnium* sp) na suplementação mineral de bovinos de corte. Disponível em: [www.calmarmineracao.com.br/calmar/farinha1.htm](http://www.calmarmineracao.com.br/calmar/farinha1.htm). Acesso em 4/09/2004. 2004b.
- MELO, T. V. utilização de farinha de algas marinhas (*lithothamnium calcareum*) e de fosfato monoamônio em rações para codornas japonesas em postura criadas sob condições de calor. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (dissertação),2006. 44p.
- MICHELAN, A.C.; SCAPINELLO, C.; NATALI, M.R.M.; et al. Utilização de Probiótico, Ácido Orgânico e Antibiótico em Dietas para Coelho em Crescimento: Ensaio de Digestibilidade, Avaliação da Morfometria Intestinal e Desempenho. *Rev. Bras. Zootec.*, v.31, n.6, p.2227-2237, 2002.
- NRC – National Research Council. Sub commite on mineral toxicity in animals. Committee on Animal Nutrition. Mineral tolerance of domestic animals. Washington: National Academy of Sciences, 1980. 577p.
- OLIVEIRA, M.C. AND LUI, J.F. Desempenho, características de carcaça e viabilidade econômica de coelhos sexados abatidos em diferentes idades. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Dez 2006, vol.58, no.6, p.1149-1155.
- ORSINE, G.F.; COSTA, C.P.; DE OLIVEIRA, B.; et al. Efeito da fonte de cálcio (Calcário vs *Lithothamnium calcareum*) na digestibilidade aparente do feno de capim *Brachiaria decumbens* Stach cv. Basiliski. *Anais Esc. Agron. e Vet.* v.19(1), p.49-58 1989.
- OUHAYOUN, J. LEBAS, F., DELMAS, D. La croissance et la composition corporelle du lapin: Influence des facteurs alimentaires. *Cuni-Sciences*, v.3, p. 7-21. 1986.
- POPE, H.R.; OWENS, C.M.; CAVITT, L.C. et al. Efficacy of Marigro in Supporting Growth, Carcass Yield and Meat Quality of Broilers. <sup>ST</sup> 91<sup>ST</sup> Annual Meeting Abstracts, Poscal 80 (Supplement I) p25. 2002.
- RIBEIRO JÚNIOR IR. 2001. *Análises estatísticas no SAEG*. Viçosa: UFV. 301p.
- SCAPINELLO, C.; FARIA, H.G.; FURLAN, A.C.; MICHELAN, A.C. Efeito da Utilização de Oligossacarídeo Manose e Acidificantes sobre o Desempenho de Coelhos em Crescimento. *Rev. bras. zootec.*, 30(4):1272-1277, 2001.
- SCHLOLAUT, W., WALTER, A., LANGE, K. Fattening performance and carcass quality in the rabbit in dependence on the final fattening weight and the fattening method. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 3, 1984, Roma. Proceedings... Roma, AFC, v.1, p.445-452. 1984.
- SCHNEIDER, B.A., FLATT, W.P. The evaluation of feeds through digestibility experiences. Athens : The University of Georgia, 1975. 423p.
- SOUZA, P.H.M.; SOUZA NETO, M.H.; MAIA, G.A. Componentes funcionais nos alimentos. *Boletim da SBCTA*. V. 37, n.2, p. 127-135, 2003.
- WHO – World Health Organization. Trace elements in human nutrition and health, Geneva: WHO, 1996. 343p.

## CAPÍTULO III

### DIFERENTES METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO DE ALIMENTOS PARA COELHOS

#### RESUMO

Neste capítulo objetivou-se avaliar diferentes metodologias para avaliação de alimentos em coelhos, através das técnicas *in vitro* de produção de gás (técnica semi-automática de produção de gases – RPT (Theodorou et al. (1994) modificada por Maurício et al, (1999)) e Tilley e Terry (1963). Para a metodologia de produção de gás foram também testadas diferentes formas de conservação do inóculo, sendo elas, inóculo fresco, inóculo congelado submetido a um congelamento rápido (nitrogênio líquido) e inóculo submetido a um congelamento lento (freezer). Para a metodologia de Tilley e Terry foram testados dois tempos para o primeiro estágio de fermentação, sendo eles 24 horas e 48 horas de fermentação. Todos os resultados foram comparados com os resultados encontrados para digestibilidade *in vivo* previamente realizado. Pode-se concluir que os resultados encontrados para degradabilidade (produção de gás) e digestibilidade (Tilley e Terry) da matéria seca demonstram similaridade com os resultados *in vivo* para as diferentes metodologias testadas, com exceção da metodologia de Tilley e Terry com 48 horas de fermentação que apresentou valores para digestibilidade muito superior aos demais, não se adequando aos modelos de avaliação de alimentos para coelhos. A metodologia de produção de gás apresentou elevada correlação com a degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica,  $r=0,93$  e  $0,95$ , respectivamente, sendo uma alternativa rápida e menos onerosa para avaliação de alimentos para coelhos. Em relação ao congelamento do conteúdo cecal como fonte de inóculo, apesar da não similaridade entre as curvas, os resultados demonstraram que o congelamento pode ser uma alternativa útil para facilitar o uso da técnica de produção de gás, sendo permitida a padronização do inóculo.

#### ABSTRACT

This chapter aimed to evaluate different methodologies for assessment of food in rabbits, using the techniques of *in vitro* gas production (Mauricio et al., 1999) and Tilley and Terry (1963). Methodology for gas production were also tested different forms of conservation of inoculum, and these, fresh inoculum, frozen inoculum undergo a rapid freezing (liquid nitrogen) and inoculated undergo a slow freezing (freezer). For the method of Tilley and Terry were tested two times for the first stage of fermentation, which were 24 hours and 48 hours of fermentation. All results were compared with the results for *in vivo* digestibility made in Chapter 2. It can be concluded that the results for degradability (gas production) and digestibility (Tilley and Terry) of dry matter shows similarity with the *in vivo* results for the different methodologies tested, except the method of Tilley and Terry with 48 hours of fermentation which showed much higher digestibility values for the other, is not the model for assessment of food for rabbits. The methodology for gas production showed strong relationship with the degradability of dry matter and organic matter,  $R^2 = 0.93$  and  $0.95$ , respectively, with a rapid and less costly alternative for assessment of food for rabbits. Regarding the freezing of the cecal contents as inoculum source, although not the similarity between the curves, the results showed that the freeze can be a useful tool to facilitate the use of technical gas production, which allowed the standardization of the inoculum.

## INTRODUÇÃO

O melhor caminho para determinar o valor nutricional dos alimentos é através da análise de sua composição química e dos coeficientes de digestibilidade dos nutrientes da dieta. Diversas metodologias foram desenvolvidas para tal finalidade.

A digestibilidade *in vivo* é a mais tradicional e rotineira metodologia utilizada para avaliação de alimentos em coelhos, uma vez que esta espécie requer espaço experimental pequeno, fácil manejo, reduzida quantidade de ração consumida, além da facilidade do baixo custo dos animais. Apesar destas vantagens, apresenta a desvantagem da necessidade de um período mais prolongado de experimentação animal quando comparada a outras metodologias, além do trabalho laborioso para mensuração do consumo e da coleta total de fezes no período experimental propriamente dito. Por isso, muitas metodologias têm sido desenvolvidas para prever o consumo e a digestibilidade utilizando técnicas laboratoriais.

Outras metodologias (métodos biológicos) de avaliação de alimentos foram desenvolvidas para ruminantes e estão sendo testadas e validadas para coelhos na tentativa de obtenção de fácil e rápida predição do valor nutritivo dos alimentos. Para que um método laboratorial (*in vitro*) seja considerado eficiente, deve ser reproduzível, além de correlacionar com parâmetros medidos efetivamente *in vivo*. Estes métodos têm como vantagens serem menos dispendiosos e com execução rápida, além de permitir um maior controle experimental quando comparados as condições experimentais *in vivo*. Estas metodologias utilizam material de diferentes partes do aparelho digestivo (Aderibigbe et al., 1992; Fernández-Carmona et al., 1993), sendo o mais comum em ruminantes, o líquido ruminal e em coelhos, material cecal, ou misturas de enzimas (Ramos e Carabaño, 1996) como inóculos para incubação. Dentre elas pode-se destacar a técnica de Tilley e Terry (1963) utilizada para avaliar a digestibilidade da matéria seca dos alimentos e a técnica semi-automática de produção de gás (RPT) (Maurício et al., 1999), que descreve a cinética de fermentação e a degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica dos alimentos .

O objetivo deste trabalho foi comparar as metodologias de avaliação de alimentos para coelhos através da técnica tradicional de digestibilidade *in vivo*, as técnicas *in vitro* de

produção de gás (Maurício et al. 1999) subdividida em três ensaios: avaliando cecos frescos, cecos congelados no nitrogênio e cecos congelados no freezer (-18°C) como fonte de inóculo e a metodologia de Tilley e Terry (1969) em dois tempos de fermentação (24h e 48h) para o primeiro estágio da técnica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas três metodologias distintas de digestibilidade. A técnica de digestibilidade *in vivo* foi realizada no laboratório de metabolismo animal (LAMA) da Escola de Veterinária na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), conforme descrito no capítulo 2. As experiências de digestibilidade *in vitro* de produção de gases (técnica semi-automática de produção de gases - RPT) e Técnica de Tilley e Terry (1963) foram realizadas nas dependências do Laboratório de Nutrição da Escola de Veterinária da UFMG, utilizando os cecos dos coelhos abatidos do experimento de desempenho. Para cada experimento *in vitro* foi utilizado um *pool* de três cecos de cada tratamento para confecção do inóculo.

Foram avaliadas quatro dietas com diferentes níveis (0,25, 0,50, 0,75 e 1,0%) de inclusão de *Lithothamnium sp.* e uma dieta referência balanceada dentro dos padrões de exigências estabelecidos por De Blas & Mateos (1998), as mesmas citadas no capítulo 2.

### a) Técnica de produção de gás (*in vitro*)

Esta fase experimental foi dividida em três ensaios experimentais, sendo o primeiro realizado com inóculo cecal fresco, o segundo e o terceiro com inóculos congelados. A metodologia de desenvolvimento experimental para medição da produção de gás foi semelhante para todos os ensaios (Theodorou et al., 1999 adaptada por Maurício et al., 1999). Para o ensaio de produção de gás avaliando inóculo fresco foi realizado três tempos de degradação (6,12 e 24 horas), onde foi realizada a análise de regressão para relacionar a produção de gás e os valores de degradabilidade, nos demais ensaios foi realizada a degradação apenas ao final do período de fermentação (24 horas). O protocolo de congelamento diferiu em duas formas de congelamento (rápido – Nitrogênio líquido e lenta – freezer). Os ensaios com cecos congelados foram realizados 60 dias após o abate e com cecos frescos imediatamente após o abate.

A forma de congelamento rápida procedeu-se logo após ao abate, onde os cecos foram separados do trato digestivo, identificados e rapidamente submergidos no nitrogênio líquido. Após congelados foram armazenados em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$ . A forma de congelamento lenta, os cecos também foram separados do trato digestivo após o abate, identificados, armazenados em sacos plásticos e levados direto para o freezer horizontal a  $-18^{\circ}\text{C}$ . O protocolo de descongelamento foi semelhante para as duas técnicas de congelamentos. Os cecos foram retirados do freezer, colocados em potes com tampas, já adicionado  $\text{CO}_2$  para manter o ambiente em anaerobiose, e foram levados a estufa a  $39^{\circ}\text{C}$  até descongelarem. Após esta etapa a metodologia foi a mesma utilizada para cecos fresco descrita a seguir.

A fermentação das dietas experimentais foi realizada em frascos (160 ml) previamente lavados com água destilada e posteriormente secos em estufa. Visando a manutenção de fermentações anaeróbicas, todos os frascos foram injetados com  $\text{CO}_2$  anteriormente à adição do substrato. Adicionou-se a cada frasco 1 g de substrato (dieta) conforme recomendações de Beuvinck e Spoelstra (1992). Foram feitos cinco inóculos, a partir dos conteúdos cecais, de cada grupo de tratamento (0,0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0 % de inclusão de *Lithothamnium sp.* nas dietas experimentais). Cada inóculo conteve um *pool* com conteúdo cecal de três coelhos. Cada dieta foi testada em seu inóculo correspondente, para que posteriormente os resultados possam ser comparados com a digestibilidade aparente real (*in vivo*).

Foram utilizados três frascos por tratamento (réplica) e também frascos contendo somente líquido cecal e meio de cultura (Buffer) como controle, ou seja, a produção de gás oriunda do conteúdo cecal foi descontada da produção total (dois frascos controle para cada inóculo testado). A inoculação foi efetuada testando as cinco dietas experimentais nos cinco grupos de conteúdo cecal. O líquido cecal fresco foi retirado manualmente imediatamente após o abate. No laboratório o líquido cecal foi filtrado, passando por duas camadas de panos de algodão sob injeção contínua de  $\text{CO}_2$  e mantido em banho maria a  $39^{\circ}\text{C}$ . Foram adicionados em cada frasco 90 ml de meio de cultura (Teodorou *et al.*, 1994) composto por solução macromineral (9.5 g/l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 6.2 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0.6 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), solução micromineral (132 g/l de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 100 g/l

de  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 10 g/l de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 80 g/l de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) solução buffer (4 g/l de  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  e 35 g/l de  $\text{NaHCO}_3$ ), indicador (0.01 g/l de Rezasurin) e agente redutor (625 mg de HCl Cysteine, 95 ml água destilada, 4 ml de 1 M NaOH e 625 mg de  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ). Estas soluções foram misturadas na seguinte ordem e proporção: 500 ml de água destilada, 200 ml de solução buffer, 200 ml solução macromineral, 0.1 ml de solução micromineral e 1 ml de solução indicadora. Em cada frasco 10 ml do inóculo preparado foi injetado usando uma seringa graduada e agulha. Logo após a injeção do inóculo a agulha foi mantida fixa na tampa por alguns segundos para o escape de eventuais gases injetados ou mesmo formados dentro dos frascos. Em seguida os frascos foram manualmente agitados e colocados em estufa a  $39^{\circ}\text{C}$  (tempo zero). A pressão originada dos gases acumulados na parte superior dos frascos foi medida através de um transdutor de pressão conectado a um leitor digital sendo este conectado a um computador via porta paralela permitindo desta forma a captura de dados. As leituras foram tomadas inicialmente de 2 em 2 horas e posterior a 12 horas e a cada três horas até as 24 horas (2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18 e 24 horas). A agulha acoplada a um transdutor de pressão foi inserida através da tampa de borracha e a pressão medida e armazenada no computador. O transdutor foi então removido e a agulha mantida inserida a tampa por alguns segundos para completa estabilização entre pressão interna e externa. Este processo foi repetido em todos os frascos de cada bandeja e após as leituras, essas foram agitadas manualmente e recolocadas na estufa. No final dos períodos de fermentação (6, 12 e 24 horas para inóculo fresco e 24 horas para os demais inóculos) os frascos foram removidos da estufa e levados para geladeira a  $4^{\circ}\text{C}$ . O material sólido e líquido de cada frasco foi então filtrado em cadinhos de filtragem (porosidade 1) usando bomba de vácuo. A matéria seca degradada foi determinada pela secagem a  $100^{\circ}\text{C}$  até obtenção de peso constante. A matéria orgânica degradada foi obtida pela diferença após obtenção das cinzas (6 h /  $500^{\circ}\text{C}$ ). Utilizou-se o modelo de France *et al.* (1993) para descrever a curva de produção de gás em termos de taxa de produção de gás ( $\mu$ ), "lag time" (L) e potencial de produção de gás (A), onde: a produção de gases acumulada em (mL) "y", o tempo de incubação "t" (horas), o total de gases (mL) "A", o tempo de colonização "T" (horas), as taxas constantes ( $h^{-1}$  e  $h^{-1/2}$ , respectivamente) "b" e "c" e a taxa de degradação fracional ( $h^{-1}$ ) "μ". Sendo, "μ":

$$\mu = \frac{b+c}{2\sqrt{t}}, \quad t \geq T$$

$$y = A \{1 - \exp^{[-b(t-T) - c(\sqrt{t} - \sqrt{T})]}\}$$

Os resultados de produção de gás utilizando o conteúdo cecal fresco e os congelados foram comparados através do teste de identidades de curvas (Ross, 1980).

b) Técnica de Tilley e Terry (1963) - (*in vitro*)

A técnica desenvolve em dois estágios, onde o primeiro consiste em deixar as amostras em contato com o líquido cecal (inóculo), no interior de jarros de fermentação, onde se tenta reproduzir as condições predominantes do ceco (presença de microorganismo, anaerobiose, temperatura de 39°C, poder tampão de 6,9) e o segundo, visa o desdobramento da proteína do substrato. Para tal, foi usado o equipamento Daisy II (ANKOM technology).

Para essa técnica foram realizados dois ensaios experimentais, onde a diferença entre ambos foi no tempo de fermentação durante o estágio 1. No primeiro ensaio experimental foi realizada a tecnologia tradicional para ruminantes (estágio 1- 48 horas de fermentação) e o segundo ensaio experimental foi realizado em função do tempo de fermentação utilizado na tecnologia na técnica de produção de gases (estágio 1- 24 horas de fermentação). Esta redução no tempo de fermentação foi em função do rápido transito da digesta em coelhos quando comparação à ruminantes.

Estágio 1 :

Foram usadas bolsas de filtro (Filter Bags F-57). Para a preparação destas bolsas foi necessário pré- enxaguar em acetona durante três a cinco minutos e secar por completo com ar seco a

55°C. O enxágüe com acetona remove um surfactante que pode inibir a digestão microbiana. As bolsas de filtros já secas foram pesadas e seu peso registrado, quando então foram adicionados 0,25g da amostra. As bolsas foram seladas e colocadas (em triplicada) no jarro de fermentação. Foram incluídas ao jarro duas bolsas lacradas com branco – fator de correção e duas bolsas lacradas com uma amostra testemunha.

Ambas soluções tampões (**A** – 10,0g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,5g/l NaCl; 0,1g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,5g/l urea e **B** – 15,0g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 1,0g/l Na<sub>2</sub>S·9 H<sub>2</sub>O) foram pré-aquecidas (39°C), misturadas na proporção de 266ml de solução B e 1.330ml de solução A (relação 1:5) e 1600ml desta solução final (pH final de 6,8 a 39°C) foi adicionada aos jarros que contém as bolsas com as amostras.

Adicionou-se então, 400ml do inóculo (conteúdo cecal fresco diluído 1:1). Foi injetado gás CO<sub>2</sub> por 30 segundos no jarro de digestão e este foi fechado de forma segura e colocado no aparelho Daisy II sob situação de aquecimento e agitação (ensaio 1 – 48 horas e ensaio 2 – 24 horas).

Estágio 2:

O segundo estágio foi completado adicionando 8g de pepsina e 40ml de HCl 6N em cada jarro e mantido aquecido a 39°C por mais 24 horas. Após esta etapa os jarros foram drenados, bem lavados com água destilada e colocados em estufa a 100°C por 24 horas quando então foram pesados.

$$\text{Cálculo: \% DIVMS} = 100 - [(W3 - (W1 \times W4)) \times 100 / W2]$$

Onde: W1 = peso de tara de bolsa

W2 = peso de amostra

W3 = peso de bolsa final depois de 24 horas de digestão no estágio 2

W4 = correção da bolsa em branco (peso da bolsa em branco depois do ensaio de digestão no estágio 2).

Os resultados de todos os ensaios experimentais foram comparados de forma descritiva.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da tabela 1 demonstram haver similaridade entre os resultados para as diferentes metodologias com 24 horas de fermentação e a digestibilidade *in vivo* da matéria seca. Comparando os valores médios para digestibilidade da matéria seca, excluindo a metodologia sugerida por Tilley e Terry com 48 horas de fermentação, todas as demais indicaram que as metodologias *in vitro* servem

como importante ferramenta para determinar os coeficientes de digestibilidade em dietas para coelhos. Corroborando com os resultados de Ferreira (2003), no qual citou que mesmo utilizando substratos diferente ao que chega ao ceco, existe uma alta tendência para simular a fermentação cecal *in vivo* com 10 horas de fermentação *in vitro* (técnica de produção de gás- Maurício et al. 1999), sendo possível estimar valores de digestibilidade *in vivo*.

Tabela 1. Médias da digestibilidade *in vivo* da matéria seca (DigMS), digestibilidade *in vitro* da matéria seca com a técnica de Tilley e Terry (DigTT) com 24 horas de fermentação e 48 horas de fermentação e degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DMS) e da matéria orgânica (DMO) avaliando os três tipos de inóculo pela técnica semi automática de produção de gás.

Tratamentos	<i>In vivo</i> (%)		<i>In vitro</i> (%)						
	DigMS	DigTT		Fresco		Freezer		Nitrogênio	
		24h	48h	DMS	DMO	DMS	DMO	DMS	DMO
Controle	55,36	55,44	66,47	47,91	53,54	51,97	54,93	53,42	56,73
0,25%	56,62	55,09	72,27	52,54	57,69	54,22	59,85	53,04	55,92
0,50%	57,57	55,40	76,21	46,15	52,43	54,59	60,51	50,75	54,18
0,75%	56,94	56,53	72,31	49,43	55,57	51,43	55,09	56,36	60,88
1,0%	55,71	53,42	75,82	51,02	57,42	54,94	55,93	53,70	56,52
Média	56,44	55,18	72,62	49,49	55,33	53,43	57,26	53,45	56,85

Tendo em consideração o rápido trânsito da digesta em coelhos, as metodologias que avaliaram a digestibilidade com 24 horas de fermentação foram mais eficientes nas estimativas de digestibilidade, quando comparada a técnica de Tilley e Terry tradicional para ruminantes, onde se permite que o substrato fermente por 48 horas no primeiro estágio da digestão.

Na tabela 2 encontram-se os resultados para pH cecal no final do período de fermentação. Calabrés et al. (1999) ao avaliar o valor de pH cecal após 96 horas de fermentação *in vitro* através da técnica de produção de gás, encontraram valores entre 6,81 a 7,18 corroborando com os achados desta pesquisa para as diferentes metodologias. Satter e Roffer (1977) citam que esta faixa de variação de pH é ótima para fermentação celulolítica e crescimento microbiano.

Tabela 2. Valores para pH cecal ao final da fermentação do experimento *in vivo* (ao abate), técnica *in vitro* de Tilley e Terry (1963) (DITT) ao final das 24 e 48 horas de fermentação no primeiro estágio da técnica e ao final da fermentação na técnica semi-automática de produção de gás com os três tipos de inóculos, fresco, congelado no freezer e congelado no nitrogênio líquido.

Tratamentos	Fresco ao abate		<i>In vitro</i>			
	pH	DigTT		Fresco	Freezer	Nitrogênio
		pH/24h	pH/48h	pH	pH	Ph
Controle	6,7	6,67	6,73	-	7,33	7,47
0,25%	6,8	6,72	6,75	-	7,59	7,46
0,50%	6,7	6,84	6,81	-	7,66	7,49
0,75%	6,8	6,86	6,83	-	7,40	7,40
1,0%	6,6	6,86	6,79	-	7,24	7,41

A adequabilidade de um modelo pode ser avaliada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

De acordo com Sampaio (1998), com  $R^2$  alto, o modelo fará melhores estimativas e será

adequado aos dados obtidos. Por outro lado,  $R^2$  baixo não permite estimativas confiáveis, quer pela alta variabilidade da resposta medida, quer pelo fato de o modelo testado não ser adequado à dispersão dos dados observados. Na figura 1 estão demonstradas as equações e os  $R^2$  encontrados para as variáveis produção de gás e degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica avaliadas pela metodologia de produção de gás utilizando inóculo fresco. Pelos resultados pode-se citar que esta metodologia se adéqua ao modelo estudado, com um  $R^2$  de 0,95 e 0,93 de confiabilidade para degradabilidade da matéria orgânica e matéria seca, respectivamente, sendo uma importante ferramenta na avaliação de alimentos para coelhos.

A adequabilidade de um modelo pode ser avaliada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

De acordo com Sampaio (1998), com  $R^2$  alto, o modelo fará melhores estimativas e será adequado aos dados obtidos. Por outro lado,  $R^2$  baixo não permite estimativas confiáveis, quer pela alta variabilidade da resposta medida, quer pelo fato de o modelo testado não ser adequado à dispersão dos dados observados. Na figura 1 estão demonstradas as equações e os  $R^2$  encontrados para as variáveis produção de gás e degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica avaliadas pela metodologia de produção de gás utilizando inóculo fresco. Pelos resultados pode-se citar que esta metodologia se adéqua ao modelo estudado, com um  $R^2$  de 0,95 e 0,93 de confiabilidade para degradabilidade da matéria orgânica e matéria seca, respectivamente, sendo uma importante ferramenta na avaliação de alimentos para coelhos.

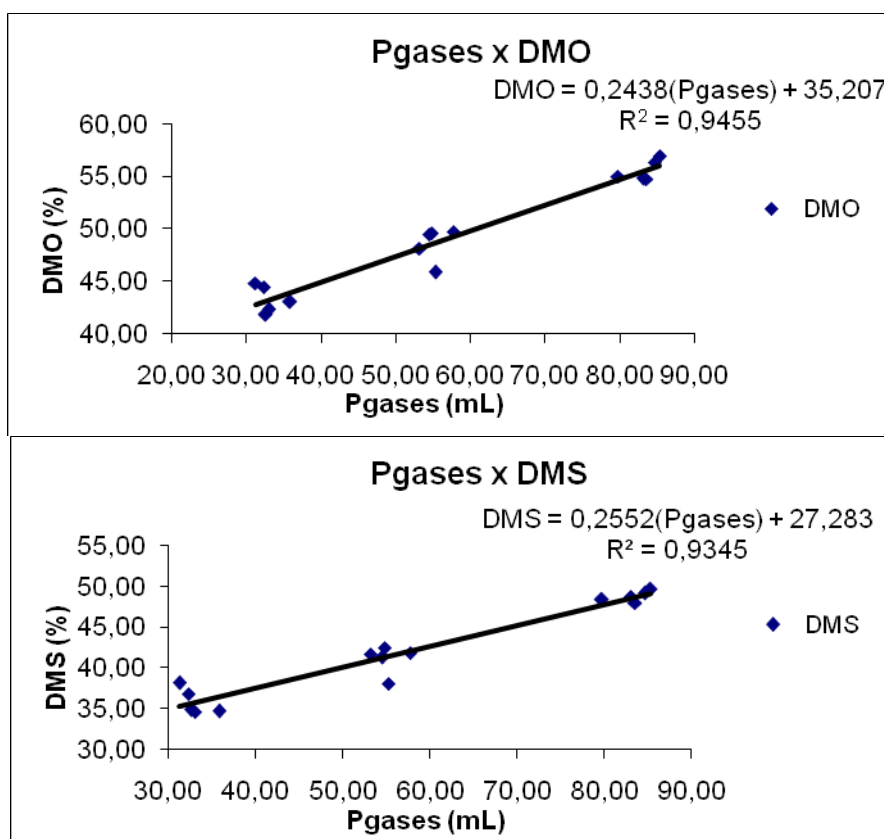


Figura 1. Relação entre a produção de gases e as degradabilidades da matéria orgânica e matéria seca avaliadas pela técnica de Maurício et al. (1999) utilizando inóculo cecal fresco.

Nas tabelas 4,5, 6 e figuras 2 estão os valores reais e estimados pelo modelo de France *et al.* (1993) para produção acumulada de gás. Comparando as diferentes metodologias através do teste de identidade de curvas, podemos concluir que os processos de congelamento alteraram a produção de gás, ficando a metodologia de ceco fresco com menor produção acumulativa de gás, a metodologia de ceco congelado no freezer com maior produção acumulativa de gás e o congelamento no nitrogênio com uma produção acumulativa intermediária. Sugere-se que este aumento da produção de gás em cecos congelados se deve a uma seletividade dos microrganismos no momento do congelamento. Calabrós *et. al.* (2000), também encontraram maior produção de gás quando avaliaram o inóculo congelado no freezer, entretanto, ocorreu uma discordância

quanto a menor degradabilidade da matéria orgânica, pois nesta pesquisa foi encontrado semelhança entre os valores de degradabilidade da matéria orgânica entre inóculos fresco e os congelados (tabela 2). Os achados para os três tipos de metodologias acima citados, apresentam-se de forma não paralelas e, portanto com resultados diferentes. Apesar da não similaridade entre as curvas pode-se considerar que o congelamento cecal pode ser uma ferramenta útil para facilitar o uso da técnica de produção de gás, sendo permitida a padronização do inóculo. Esse resultado soma aos achados de Stanco *et al.* (2003) que afirma que o principal obstáculo para a técnica de produção de gás é a variabilidade do inóculo e a solução seria utilizar conteúdos cecais congelados em oposição aos frescos.





Tabela 3. Produção cumulativa de gás real e estimada pelo modelo de France et al. (1993) para o congelamento no nitrogênio(N)

Tempo	N-T1		N-T2		N-T3		N-T4		N-T5		média	
	real	estimado	real	estimado	real	estimado	real	estimado	real	estimado	real	estimado
2	13,4	12,0	21,2	18,0	14,2	10,3	22,6	19,0	17,5	14,9	17,8	15,2
4	26,3	26,9	37,7	38,7	28,8	28,4	42,7	43,3	33,0	33,0	33,7	34,5
6	36,4	37,0	50,9	51,5	43,2	43,9	58,8	59,9	44,5	44,9	46,7	47,6
8	44,5	44,7	60,5	60,7	55,9	57,4	71,7	72,4	53,2	53,7	57,1	57,7
10	51,3	50,8	67,8	67,6	68,1	69,1	82,6	82,4	60,5	60,8	66,1	65,9
12	56,4	56,0	73,4	73,1	79,3	79,2	90,9	90,6	66,5	66,2	73,3	72,7
15	62,3	62,3	79,1	79,5	92,9	92,1	100,4	100,5	72,7	73,1	81,5	81,2
18	67,2	67,5	83,7	84,4	103,0	102,6	107,8	108,3	78,1	78,6	88,0	88,1
21	71,8	71,9	88,4	88,4	111,5	111,2	115,0	114,5	82,9	83,2	93,9	94,0
24	75,8	75,6	92,3	91,5	118,4	118,2	120,2	119,7	98,0	87,0	98,9	99,0

Tabela 4. Produção cumulativa de gás real e estimada pelo modelo de France et al. (1993) para o congelamento no freezer (Fr)

Tempo	Fr-T1	Fr-T1	Fr-T2	Fr-T2	Fr-3	Fr-T3	Fr-T4	Fr-T4	Fr-T5	Fr-T5	Média	média
	real	estimado	real	estimado	real	estimado	real	estimado	real	estimado	Real	estimado
2	19,5	16,0	12,1	10,3	15,7	11,3	13,9	12,3	17,0	14,0	15,6	13,1
4	35,6	35,8	26,5	27,3	33,7	31,4	30,4	31,2	36,0	36,6	32,4	32,8
6	48,2	49,1	40,3	41,3	49,6	48,5	45,3	46,1	53,5	54,5	47,4	48,0
8	58,4	59,1	54,0	53,4	62,0	63,0	58,0	58,4	68,4	69,2	60,2	60,5
10	66,9	67,2	64,1	63,8	73,0	75,5	69,3	68,8	81,6	81,5	71,0	71,1
12	74,1	73,8	72,7	72,9	82,9	86,2	79,3	77,6	92,9	91,8	80,4	80,1
15	81,6	82,0	85,0	84,6	96,1	99,4	88,2	88,7	104,4	104,3	91,0	91,5
18	88,6	88,7	94,2	94,4	110,3	109,8	96,7	97,5	114,2	114,0	100,8	100,8
21	94,7	94,3	102,5	102,5	121,4	118,1	104,4	104,8	120,9	121,6	108,8	108,5
24	99,6	99,1	109,2	109,3	128,9	124,7	111,2	110,7	128,1	127,5	115,4	114,9

Tabela 5. Produção cumulativa de gás real e estimada pelo modelo de France et al. (1993) para o congelamento no freezer (Fre)

Tempo	Fre-T1	Fre-T1	Fre-T2	Fre-T2	Fre-T3	Fre-T3	Fre-T4	Fre-T4	Fre-T5	Fre-T5	Média	média
	real	estimado	real	estimado	real	estimado	real	estimado	real	estimado	Real	estimado
2	11,7	11,7	10,8	10,9	12,8	11,3	18,3	16,0	13,1	2,3	13,4	12,1
4	21,8	21,7	20,7	20,7	25,9	24,7	32,1	30,8	24,3	11,6	25,0	24,2
6	31,4	30,4	29,4	29,2	37,5	36,7	42,8	43,1	35,0	22,4	35,2	34,8
8	38,3	38,1	36,9	36,6	46,4	47,0	51,4	53,3	43,5	32,9	43,3	43,9
10	44,5	44,8	43,3	43,3	53,7	55,7	60,0	61,7	52,0	42,5	50,7	51,8
12	50,0	50,8	48,8	49,2	60,6	63,1	67,0	68,6	60,1	51,1	57,3	58,7
15	57,5	58,6	56,3	56,8	69,5	72,0	74,8	76,7	70,7	62,0	65,8	67,2
18	64,6	65,1	63,5	63,3	78,6	78,8	82,9	82,8	79,6	70,7	73,8	73,9
21	70,8	70,6	68,9	68,8	86,5	84,0	89,8	87,2	86,3	77,6	80,4	79,3
24	76,8	75,2	73,7	73,4	93,6	88,0	96,0	90,5	92,1	82,9	86,4	83,6

Tabela 6. Equações para estimar a produção de gás de acordo com o modelo de France et al. (1993) para os diferentes inóculos (conteúdo cecal fresco, conteúdo cecal congelado no nitrogênio líquido e conteúdo cecal congelado no freezer) testados.

Tratamentos	Equações	R <sup>2</sup>
Nitrogênio T1	$y = 118,8 \{1 - \exp^{[-0,00076(t-1,0027) - 0,25527(\sqrt{t} - \sqrt{1,00269})]}\}$	0,99
Freezer T1	$y = 149,6 \{1 - \exp^{[-0,00158(t-1,0013) - 0,26901(\sqrt{t} - \sqrt{1,0013})]}\}$	0,99
Fresco T1	$y = 199,9 \{1 - \exp^{[-0,05477(t-0,1069) - 0,01904(\sqrt{t} - \sqrt{0,10692})]}\}$	0,99
Nitrogênio T2	$y = 114,2 \{1 - \exp^{[-0,00024(t-1,0014) - 0,41352(\sqrt{t} - \sqrt{1,00136})]}\}$	0,99
Freezer T2	$y = 146,2 \{1 - \exp^{[-0,005047(t-1,0000) - 0,05521(\sqrt{t} - \sqrt{1,0000})]}\}$	0,99
Fresco T2	$y = 99,99 \{1 - \exp^{[-0,05118(t-0,20475) - 0,02416(\sqrt{t} - \sqrt{1,20475})]}\}$	0,99
Nitrogênio T3	$y = 149,9 \{1 - \exp^{[-0,06492(t-1,00164) - 0,01554(\sqrt{t} - \sqrt{1,00164})]}\}$	0,99
Freezer T3	$y = 149,9 \{1 - \exp^{[-0,07655(t-1,00125) - 0,00528(\sqrt{t} - \sqrt{1,00125})]}\}$	0,99
Fresco T3	$y = 99,97 \{1 - \exp^{[-0,10138(t-0,11486) - 0,6624(\sqrt{t} - \sqrt{0,11486})]}\}$	0,99
Nitrogênio T4	$y = 149,9 \{1 - \exp^{[-0,02396(t-1,0000) - 0,26981(\sqrt{t} - \sqrt{1,0000})]}\}$	0,99
Freezer T4	$y = 139,2 \{1 - \exp^{[-0,05277(t-1,0000) - 0,09551(\sqrt{t} - \sqrt{1,0000})]}\}$	0,99
Fresco T4	$y = 99,97 \{1 - \exp^{[-0,10227(t-0,10294) - 0,01824(\sqrt{t} - \sqrt{0,10294})]}\}$	0,99
Nitrogênio T5	$y = 123,7 \{1 - \exp^{[-0,00021(t-1,0015) - 0,31046(\sqrt{t} - \sqrt{1,0015})]}\}$	0,99
Freezer T5	$y = 149,9 \{1 - \exp^{[-0,07173(t-1,0000) - 0,06425(\sqrt{t} - \sqrt{1,0000})]}\}$	0,99
Fresco T5	$y = 99,92 \{1 - \exp^{[-0,11408(t-0,8989) - 0,21849(\sqrt{t} - \sqrt{0,8989})]}\}$	0,99
Média Nitrogênio	$y = 149,2 \{1 - \exp^{[-0,0056(t-1,00173) - 0,24609(\sqrt{t} - \sqrt{1,00173})]}\}$	0,99
Média Freezer	$y = 149,9 \{1 - \exp^{[-0,07355(t-1,0000) - 0,11595(\sqrt{t} - \sqrt{1,0000})]}\}$	0,99
Média Fresco	$y = 149,9 \{1 - \exp^{[-0,07938(t-0,10453) - 0,01914(\sqrt{t} - \sqrt{0,10453})]}\}$	0,99

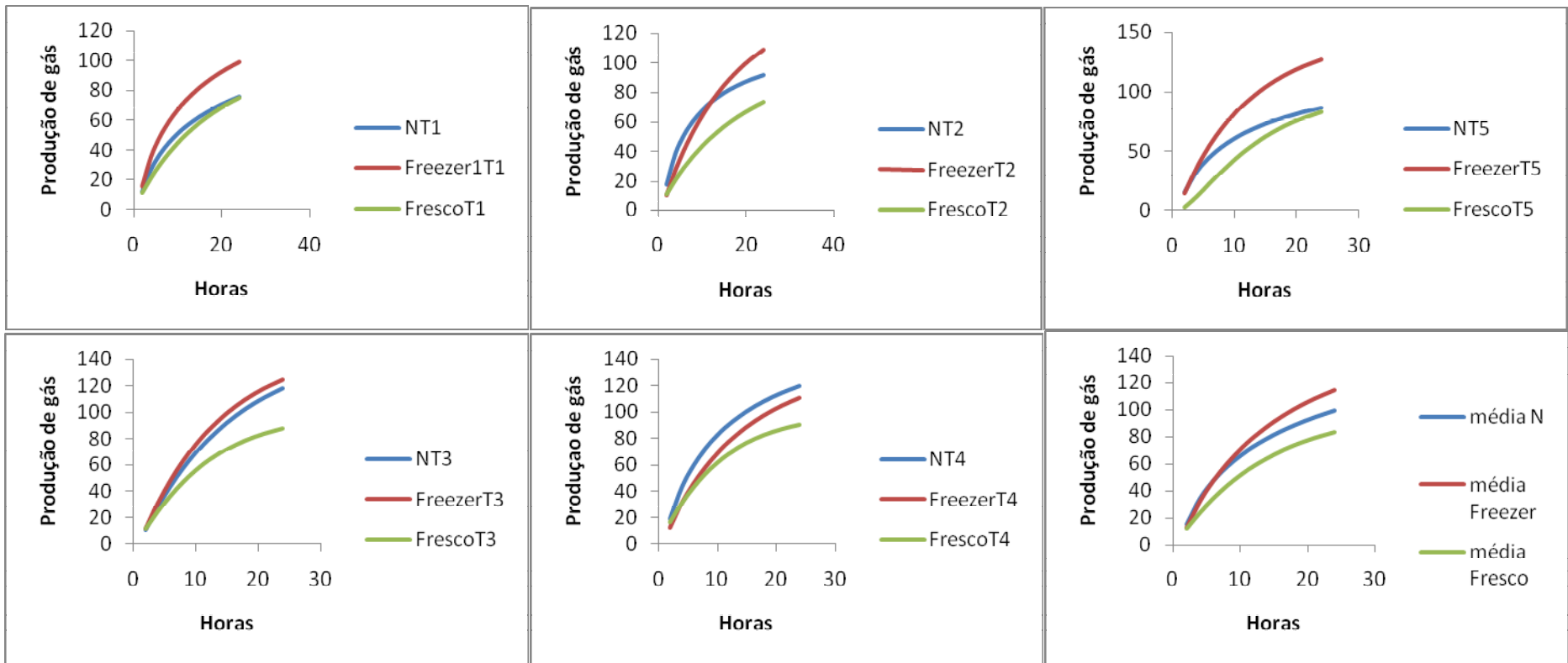


Figura 2. Teste de identidade de curvas para as três metodologias (fresco, freezer e nitrogênio) utilizadas para avaliar a técnica de produção de gases nos diferentes inóculos (T1, T2, T3, T4 e T5).

## CONCLUSÃO

A metodologia de produção de gás utilizando inóculo cecal de coelhos, foi efetivo para estimar a degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica, onde o modelo apresentou alta adequabilidade entre a produção de gás e os parâmetros de degradabilidade.

As avaliações dos cecos congelados, na técnica semi-automática de produção de gás, demonstraram ser uma importante ferramenta para na padronização do inóculo.

A metodologia de digestibilidade *in vitro* através da técnica de Tilley e Terry só demonstrou ser eficiente para coelhos com um período de 24 horas de fermentação durante o primeiro estágio da técnica.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- ADERBIGBE, A.O.; CHEEKE, P.R.; PATTON, N.M. In vitro rumen and rabbit cecum digestibilities: effects of probiotics and incubation times. *J. Appl. Rabbit Res.* 15: 947-957, 1992.
- BEUVINK, J.M.; SPOELTRA, S.F. Interaction between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed-rumen microorganisms in vitro. *Appl. Microbiol. Technol.*, 37, 505-509, 1992.
- CALABRÓS, S. NIZZA, A.; PINNA, W.; CUTRIGNELLI, M.I.; PICCOLO, V. Estimation of digestibility of compound diets for rabbits the *in vitro* gas production technique. *World Rabbit Sci.*, 7 (4), p. 197-201, 1999.
- CALABRÒ S., NIZZA A., SANNA C., PICCOLO V. Fermentation kinetics of some feedstuffs for rabbits using the *in vitro* gas production technique. In: 7 World Rabbit Congr.- Nutrition and Digestive Physiology-short paper, Valencia, 2000.
- FERNANDEZ-CARMONA, J.; CERVERA, C.; BLAS, E. Un nuevo método *in vitro* para El estudio de La digestion em El conejo. Procc XVIII Symposium de Cunicultura, Gronoller, Spain, p.43-45, 1993.
- FERREIRA, V.P.A. Valor nutritivo e eficácia de utilização digestiva de dietas com óleo vegetal, gordura animal e lipase para coelhos em crescimento. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2003, 83p. Tese (Doutorado).
- FRANCE, J.; DHANOA, M.S.; THEODOROU, M.K.; LISTER, S.J.; DAVIES, S.J.; ISAC, D. A model to interpret gas accumulation profiles with in vitro degradation of ruminant feeds. *J. Theor Biol.* 163, 99-111, 1993.
- MAURÍCIO, R.M., MOULD, F.L., DHANOA, M.S., OWENS, E., CHANNA, K.S., THEODOROU, M.K. 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79:321-330.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SATTER, L.D.; ROFFER, R.E. Influence of nitrogen and carbohydrate imputo n rúmen fermentation. In: W. Haresion, P.E. Lewis (Ed.). Recent advances in animal nutrition, Butterworths, London, UK. 25-49p, 1977.
- STANCO, G.; Di MEO, C.; CALABRÒ, S.; NIZZA, A. Prediction of nutritive value of diets for a rabbits using na *in vitro* gas production technique. *World Rabbit Sci*, v. 11, p.199-210, 2003.
- 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. *Anim. Feed Sci. Techn.* 48, 185-197 1994.
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage techniques for digestion of forage crops. *J.Br. Grass. Soc.* v. 18, p.104-111, 1963.

## CAPÍTULO IV

### IMPACTO DO *LITHOTHAMNIUM SP.* NA DIVERSIDADE GENÉTICA DA MICROBIOTA CECAL DE COELHOS

#### RESUMO

Com o intuito de analisar a diversidade genética da microbiota cecal de coelhos alimentados com dietas contendo níveis crescentes (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0%) de inclusão de *Lithothamnium sp.* utilizando métodos moleculares baseados na extração de DNA total de cecos de coelho, seguida de PCR-DGGE, foram coletadas amostras de conteúdo cecal de 25 coelhos (5 tratamentos x 5 repetições) abatidos aos 72 dias de idade. Os resultados demonstraram a técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) foi adequada para as análises do DNA da microbiota cecal de coelhos. O perfil de diversidade genética apresentou maior riqueza nas amostras obtidas a partir da dieta referência e menor diversidade na amostra oriunda da dieta com 0,5% de inclusão de *Lithothamnium*. E foi observada dominância entre os grupos de Eubacteria para os tratamento 0,25%, 0,75% e 1,0% de inclusão de *Lithothamnium*.

#### ABSTRACT

In order to analyze the genetic diversity of the cecal microflora in rabbits fed diets containing increasing levels (0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0%) for inclusion of *Lithothamnium sp.* using molecular methods based on extraction of total DNA of cecos rabbit, followed by PCR-DGGE, samples were collected from cecal contents of 25 rabbits (5 treatments x 5 replicates) slaughtered at 72 days of age. The results demonstrated the technique of gel electrophoresis with denaturing gradient (DGGE) was perfectly adequate for analysis of DNA from the cecal microbiota of rabbits, the profile of genetic diversity showed greater richness in samples obtained from the reference diet and lower diversity in sample derived from the diet with 0.5% for inclusion of *Lithothamnium*. Dominance was observed between the groups of Eubacteria for treatment 0.25%, 0.75% and 1.0% for inclusion of *Lithothamnium*.



## INTRODUÇÃO

Há décadas foram reconhecidos os microorganismos intestinais nos animais, e em especial o amplo predomínio de bactérias na sua porção distal. Em 1885, Louis Pasteur expressou seu ponto de vista sobre a importância das bactérias, acreditando que a vida na ausência de microrganismos seria impossível. Isto não se confirmou na experiência com os animais isentos de germes (criados em condições especiais e isentos de bactérias). Estes animais sobrevivem, porém os prejuízos são significativos para o desenvolvimento imunitário (Brandt et al., 2006).

A microbiota intestinal compreende as espécies microbianas presentes no trato intestinal dos animais. É composta por mais de 40 gêneros e cerca de 100 espécies. Apenas 23% das espécies presentes neste complexo microbiano podem ser cultivadas *in vitro*, uma característica que dificulta o seu estudo pelos pesquisadores (Badiola, 2004).

A ecologia microbiana está se consolidando como uma das áreas da microbiologia que expande os horizontes do conhecimento de forma inovadora, desenvolvendo e aprimorando métodos moleculares para identificação e o monitoramento de microrganismos em ecossistemas naturais, com vista em estudos do papel funcional dessa microbiota (Santos, 2008).

Na última década, o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares revolucionou os conceitos microbiológicos. O uso de métodos baseados em análise sequencial dos genes que codificam o RNA ribossomal (rRNA) 16S tem se tornado uma importante ferramenta no conhecimento das comunidades bacterianas em diversos nichos ambientais (Giovannoni et al. 1990).

Segundo Santos (2008) as técnicas de *fingerprinting* genético são capazes de fornecer o perfil que representa a diversidade genética de uma comunidade microbiana em um ambiente específico. São baseados na amplificação, por PCR, e na resolução das diversas sequências amplificadas, simplesmente por migração eletroforética diferencial em gel de agarose ou poliacrilamida, de acordo com o tamanho [*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)*, *terminal-Restriction Fragment Length Polymorphisms (t-RFLP)*,

*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA)*, *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*] ou com a seqüência [*Denaturant Gradient Gel Eletrophoresis (DGGE)*, *Temperature Gradient Gel Eletrophoresis (TGGE)*, *Temporal Temperature Gel Eletrophoresis (TTGE)*, *Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)*] (Hori et al., 2006).

DGGE é uma das técnicas de *fingerprinting* mais freqüentemente utilizadas em estudos de ecologia microbiana, por obter uma representação qualitativa da presença e abundância de diferentes filotipos na amostra (Santos, 2008). Ela oferece oportunidade para se efetuar estimativas mais reais da diversidade microbiana existente (Muyer e Smalla, 1998). Esta técnica se baseia na separação eletroforética diferencial de amplicons, obtidos por PCR, quanto à susceptibilidade da molécula de DNA à desnaturação parcial promovida por agentes desnaturantes, e discrimina amplicons de tamanhos similares, de acordo com suas seqüências de pares de bases (Muyzer et al., 1993). A capacidade dessa técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante em discriminar seqüências de DNA de fragmentos de mesmo tamanho, mas que diferenciam em apenas um único par de nucleotídeos, permite a geração de padrões de bandas variáveis de acordo com a composição de microrganismos em diferentes amostras ambientais em estudos de microbiologia ambiental e ecologia microbiana (Fisher e Lerman, 1983; Muyer e Smalla, 1998; Santos, 2008).

Novas conexões entre os microbiologistas e nutricionistas estão emergindo. Em coelhos, várias equipes estão envolvidas neste tema, com um objetivo específico: compreender a maturação da flora comensal em relação à alimentação e para melhorar a prevenção das doenças digestivas, em particular nos láparos. Com esse enfoque, esse trabalho objetivou analisar a diversidade genética da microbiota cecal de coelhos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de inclusão de *Lithothamnium sp.* utilizando métodos moleculares baseados na extração de DNA total do conteúdo cecal de coelho, seguida de PCR-DGGE.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Industrial e Laboratório de Ecologia Microbiana do Departamento de

Microbiologia, localizados no Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais.

As amostras de conteúdo cecal de 25 coelhos (5 tratamentos e 5 repetições) foram coletadas no momento do abate dos animais do experimento 1 (capítulo 2). Foi feito um *pool* de cinco cecos (repetições) para cada tratamento (0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0% - níveis de inclusão do *Lithothamnium sp.*).

A extração de DNA total foi realizada utilizando-se o protocolo estabelecido por Lu et al. (2003) e Knarreborg et al. (2002), com modificações feitas no Laboratório de Microbiologia Industrial, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Um grama de cada amostra correspondente a cada um dos cinco tratamentos foi pesado, totalizando 5g de fezes. As amostras foram homogeneizadas. Das 5 gramas, 2 foram transferidas para um novo tubo e ressuspendidas em 10mL de TN 150 (10mM Tris-HCl [pH8,0], 150mM NaCl [pH8,0]). Adicionou-se 200µL de β-mercaptoetanol. O tubo contendo o material ressuspenso foi incubado em banho-maria a 65°C por 20 minutos. Do volume total presente no tubo, uma alíquota de 500 µL de cada amostra foi transferida para novo tubo. Adicionou-se lisozima (150 µg mL<sup>-1</sup>) e mutanolisina (4 µg mL<sup>-1</sup>). Os tubos foram incubados em gelo por 1 hora e, em seguida, adicionou-se SDS para uma concentração final de 2%. Os tubos foram novamente incubados em banho-maria a 65°C por 15 minutos. As amostras foram desproteinizadas duas vezes com fenol (600 µL). A suspensão foi centrifugada a 10000 g por 15 minutos e o sobrenadante transferido para tubo novo. Ao sobrenadante foi adicionado NaCl 5M e isopropanol e o tubo foi incubado a temperatura ambiente por 2 horas, seguindo-se a centrifugação a 10000 g por 15 minutos e o descarte do sobrenadante. O sedimento foi lavado com álcool 70% e mantido a temperatura ambiente. Após a lavagem, o sedimento foi ressuspenso em 30 µL de tampão TE [Tris-HCl 100mM (pH 8,0) e EDTA 1mM (pH8,0)], 20 µg mL<sup>-1</sup> de RNase (Sigma-Aldrich). As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 1 hora. O DNA foi novamente purificado utilizando-se o Kit Wizard Genome DNA Purification (Promega, Madison, USA) a fim de obter DNA de melhor qualidade.

As amostras de DNA extraídas foram analisadas em gel de agarose (Sigma-Aldrich) 0,8% em

tampão TAE 1X [Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1mM (pH 8,3)]. Após a eletroforese, o gel foi mantido sob agitação em solução de bometo de etídeo (0,25 µg mL<sup>-1</sup>) (Sambrook et al., 1989). A quantificação foi feita pela comparação com marcadores de quantidade de DNA de fago lambda nas concentrações de 25 ng mL<sup>-1</sup>, 50 ng mL<sup>-1</sup> e 100 ng mL<sup>-1</sup>. O DNA extraído foi visualizado no sistema de digitalização de imagem Eagle Eye™ (Stratagene) e armazenado a 4 °C, até sua utilização.

O perfil genético da microbiota intestinal de coelhos foi avaliado pela técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE (Muyzer et al., 1993). Fragmentos do gene codificador dos rRNAs 16S de grupos microbianos específicos representantes do domínio Eubactéria foram amplificados por PCR, utilizando DNA extraído das fezes de coelho.

Para amplificar a região dos genes rDNA 16S de Eubactéria, correspondente às posições 341 a 534 do rDNA 16S de *Escherichia coli*, foram utilizados os *primers* universais de eubactérias p3/p2 (Muyzer et al., 1993). A reação de PCR foi realizada em tubos de 200 µL para um volume final de 25 µL. A mistura de reação foi preparada com 5 µL de tampão GoTaq® Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Promega, Madison, USA), 200 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfatados, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 1), 5 µg de albumina sérica bovina (BSA) (Invitrogen), 2% (v/v) de formamida desionizada, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 20 ng de DNA total e água desionizada (MilliQ) esterilizada para completar o volume final. A PCR foi realizada sob as seguintes condições (Muyzer et al., 1993, com modificações): temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação, 55°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C por 2 minutos para a extensão dos *primers*. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Utilizou-se controle negativo sem DNA molde e controle positivo (*Escherichia coli*). A reação de PCR foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf).

Os amplicons resultantes da amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose (Sigma-Aldrich) 1,2% tampão TAE (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM). Após a

eletroforese, o gel foi mantido sob agitação em solução de bometo de etídeo ( $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Sambrook et al., 1989). Marcador de tamanho *100 pb DNA Ladder* (Promega, Madison, USA) foi utilizado para estimativa dos tamanhos dos diferentes amplicons.

A Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) foi realizada utilizando-se o equipamento “DCode™ Universal Mutation Detection System”. (BIORad – Califórnia, USA). Foram aplicados 20  $\mu\text{L}$  dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida (acrilamida: N, N'-metilenobisacrilamida 37,5:1) vertical a 8% (p/v) em tampão TAE 1X. O gradiente desnaturante variou linearmente de 40% a 60% para a análise dos fragmentos.

O gradiente foi formado a partir da solução estoque de poliacrilamida a 8%, dispensados pelo formador de gradiente (Modelo 475 Gradient Delivery System – BIO-Rad, Califórnia, USA), uma com 100% dos agentes desnaturantes, que correspondem a uréia 7 M e formamida desionizada 40% (v/v), e outra sem esses agentes. Além das soluções-estoque, foram utilizados 0,003% (p/v) de persulfato de amônio [polimerizador], 0,17% (v/v) de TEMED (N,N,N',N'- tetrametiletileno diamino) [catalisador]. O tempo de polimerização do gel, antes da aplicação das amostras, foi de 3 horas.

Uma mistura de fragmentos de rDNA 16S das seguintes espécies bacterianas foi utilizada como marcador específico para os diferentes filios: *Alcaligenes xylosoxydans* ATCC 13138, *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 12136, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC 23858, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Pseudomonas putida* ATCC 15176 e *Staphylococcus aureus* ATCC 12692.

A eletroforese foi conduzida em temperatura de 60°C e voltagem constante de 50V, durante 16 horas. O gel foi corado por 20 minutos com solução de SYBR® Gold (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. A imagem do

gel foi visualizada no sistema de digitalização de imagem Eagle Eye™ (Stratagen).

A análise dos perfis de bandas dos géis obtidos após a DGGE para determinação prévia da diversidade genética foi realizada utilizando as imagens obtidas pelo sistema de digitalização, com o auxílio do programa Gel Pro Analyser®.3.1 (Media Cybernetics Inc., Maryland – USA). Os ajustes básicos feitos no programa foram os seguintes:

- largura da raia: 8 pixels;
- altura mínima da banda: 2%;
- separação mínima de bandas 0,5% Rf;
- raias retilíneas;
- correção de “Background”: nenhuma;
- raias contendo padrão: nenhuma;

Os ajustes feitos, de modo interativo, foram os que propiciaram a maior concordância entre as bandas detectadas pelo programa e as bandas detectadas visualmente. Obtidos os valores para os ajustes referidos, nos poucos casos em que as bandas detectadas pelo programa não correspondiam àquelas detectadas visualmente, utilizou-se do recurso do programa para adição ou exclusão manual de bandas.

Os dados obtidos com o auxílio do programa Gel Pro Analyser®.3.1 (Media Cybernetics Inc., Maryland – USA), foram usados para calcular o índice de diversidade Shannon-Weaver (H), a riqueza e a equitabilidade. O índice de diversidade (H) é calculado como:  $H = (C/N) (N \times \log N - \sum n_i \times \log n_i)$ , em que  $C=2,3$ ;  $N$ = soma da massa de todas as bandas de DNA;  $n_i$ = massa da  $i$ th da banda de DNA. A riqueza representa o número de bandas, que se refere às UTOs. E a equitabilidade (E) é expressa como:  $E = H/\log R$ , em que H é o índice de diversidade e R representa o número de bandas. A diversidade Shannon-Weaver é o índice de diversidade geral que aumenta com o número de espécies e é maior quando a massa é distribuída mais uniformemente entre as espécies. A equitabilidade indica se existem bandas dominantes.

Tabela 1. Sequência dos *primers* usados para amplificar fragmento do gene rDNA 16S nos experimentos de PCR

Primer <sup>A</sup>	rDNA 16S alvo (Posição) <sup>B</sup>	Sequência (5' - 3')	Referência
p3	Eubacteria (341-357)	gc.-CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer et al., 1993
p2	Eubacteria (518-534)	ATTACCGCGGCTGCTGG	Muyzer et al., 1993

<sup>A/</sup>gc.: seqüência rica em G+C (Grampo-GC) ligada à extremidade 5' (Muyzer et al., 1993).

<sup>B/</sup>gc.: posição no genoma de *Escherichia coli* (Brosius et al., 1981).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização do protocolo estabelecido por Lu et al. (2003) e Knarreborg et al. (2002), com modificações, bem como do kit Wizard Genome DNA Purification (Promega, Madison, USA) para a extração e purificação das amostras de DNA total do conteúdo cecal de coelho dos cinco tratamentos avaliados mostraram-se adequados para as análises do DNA (Figura 1).

Foram testadas várias condições nas reações de PCR até alcançar a reação satisfatória para as análises de DGGE, não havendo,

aparentemente, amplificação de bandas inespecíficas ou formação de produtos quiméricos.

O produto da reação de PCR, utilizada para amplificar fragmentos específicos de rDNA 16S de Eubacteria foi detectado visualmente em gel de agarose (Figuras 2 e 3), apresentando além das cinco amostras (cinco tratamentos) de DNA dos conteúdos cecais de coelho, o controle positivo (*Escherichia coli*), o controle de pureza (sem DNA molde) e o marcador de tamanho *100 pb DNA Ladder* (Promega, Madison, USA).

M1 M2 A B A B C D C D E E

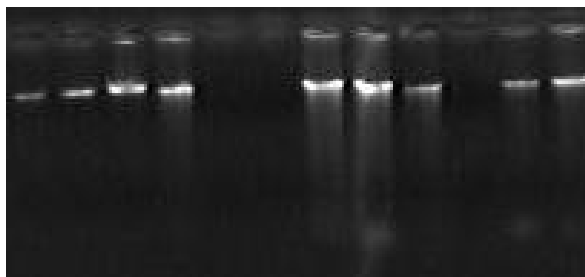


Figura 1. DNA extraído de fezes de coelho. M1: Marcador de quantidade de DNA de fago lambda na concentrações de  $25 \text{ ng mL}^{-1}$ ; M2: marcadores de quantidade de DNA de fago lambda na concentração  $50 \text{ ng mL}^{-1}$ ; A: dieta referência; B: 0,25%; C: 0,50%; D: 0,75%; E: 1,0% de inclusão do *Lithothamnium sp.* nas dietas experimentais.

M1 M2 A B C D E C1- C+ C2-

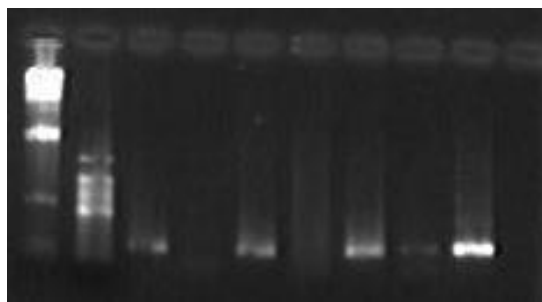


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 1,2% do produto amplificado por PCR dos fragmentos dos rDNA 16S de bactérias totais presentes em fezes de coelho. M1: Marcador hind; M2: Marcador de tamanho *100 pb DNA Ladder* 1A: dieta referência; B: 0,25%; C: 0,50%; D: 0,75%; E: 1,0% de inclusão do *Lithothamnium sp.* nas dietas experimentais; C1-: controle negativo ( $0,4 \mu\text{M}$  de cada *primer*); C+: controle positivo (*Escherichia coli*); C2-: controle negativo ( $0,2 \mu\text{M}$  de cada *primer*).

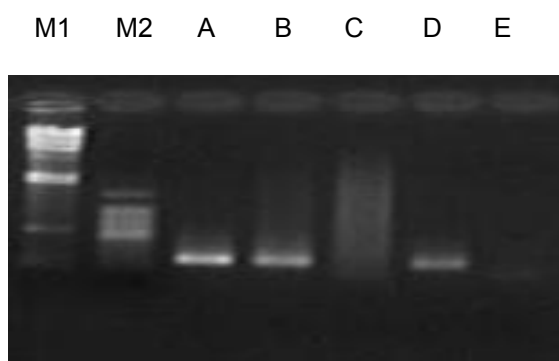


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 1,2% do produto amplificado por PCR dos fragmentos dos rDNA 16S de bactérias totais presentes em fezes de coelho. M1: Marcador hind; M2: Marcador de tamanho 100 pb DNA Ladder; A: dieta referência; B: 0,25%; C: 0,50%; D: 0,75%; E: 1,0% de inclusão do *Lithothamnium sp.* nas dietas experimentais.

A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) mostrou a existência de um variado perfil de diversidade genética nas cinco amostras (tratamentos) de DNA (Figura 4). A amostra A, correspondente a dieta controle apresentou maior riqueza, ou seja, maior quantidade de unidades taxonômicas com 29 UTOs referentes a Eubacteria. As amostras B, D

e E, correspondentes aos tratamentos com 0,25, 0,75 e 1,0% de inclusão de *Lithothamnium sp.* nas dietas, respectivamente, apresentaram 21, 15 e 19 UTOs respectivamente. A amostra C, correspondente a dieta com 0,5% de inclusão de *Lithothamnium sp.* na dieta, tem menor riqueza, apresentando 8 UTOs (figura 5).

M A B C D E M

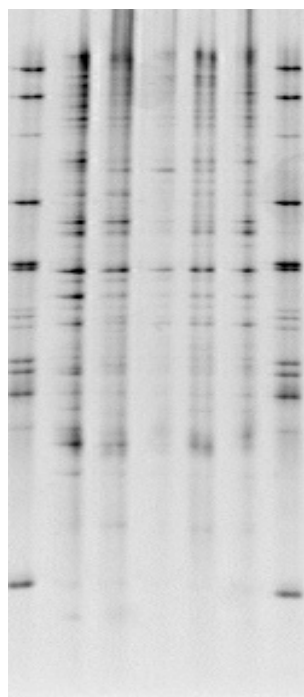


Figura 4: Perfil eletroforético em DGGE de fragmentos do gene rDNA 16S de bactérias totais presentes conteúdo cecal de coelho, obtido após amplificação enzimática utilizando primers específicos para Eubacteria. M: marcador preparado com a mistura de fragmentos do gene rDNA 16S das bactérias padrão

(I) *Alcaligenes xylosoxydans* ATCC 13138, (II) *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 12136, (III) *Bacillus cereus* ATCC 14579, (IV) *Bacillus subtilis* ATCC 23858, (V) *Escherichia coli* ATCC 25922, (VI) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, (VII) *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, (VIII) *Pseudomonas putida* ATCC 15176 e (IX) *Staphylococcus aureus* ATCC 12692. A: referência; B: 0,25%; C: 0,50%; D: 0,75%; E: 1,00% de inclusão de *Lithothamnium sp.* nas dietas experimentais.

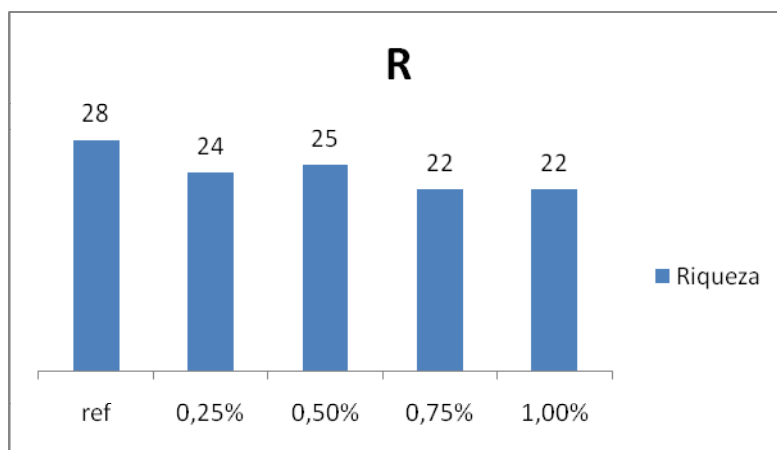


Figura 5. Valores em UTOs referentes a Eubacteria, nas dietas experimentais. Os dados foram obtidos pela análise do perfil eletroforético em DGGE de fragmentos do gene rDNA 16S de Eubacteria, com o auxílio do programa Gel Pro Analyser<sup>®</sup>.3.1.

Todos os fragmentos de DNA evidenciados no gel apresentam com o mesmo tamanho, em pares de bases, mas diferem quanto à seqüência de bases. Quanto maior o conteúdo G+C presente na seqüência, maior é a mobilidade eletroforética da banda, considerando o

gradiente desnaturante formado ao longo do gel de DGGE. A intensidade de cada banda capturada na imagem do gel de DGGE corresponde a D.O. (em pixels) máxima, e está diretamente relacionada com a abundância relativa da UTO que representa (Tabela 2).

Tabela 2. Abundância das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO), correspondentes aos tratamentos em gel de DGGE

UTO	Referência		0,25%		0,50%		0,75%		1,0%	
	P.M.	D.O.	P.M.	D.O.	P.M.	D.O.	P.M.	D.O.	P.M.	D.O.
<b>1</b>	.11	7943	.11	16653	.10	3444	.11	10467	.11	9826
<b>2</b>	.14	2221	.14	5807	.14	3708	.14	5080		
<b>3</b>	.15	2438			.16	10478			.16	5281
<b>4</b>	.17	4974	.17	3509						
<b>5</b>	.18	3641	.17	4595					.18	2281
<b>6</b>	.20	2139	.20	2605			.20	1856	.20	3271
<b>7</b>	.21	2714	.21	4186			.21	2611	.21	3191
<b>8</b>	.25	1866	.27	2376			.27	2019	.27	3139
<b>9</b>	.27	7891	.28	4963	.28	1984	.28	1876		
<b>10</b>	.30	1386					.30	1209	.30	1297
<b>11</b>	.32	2863	.32	2923			.32	1840	.32	2616

---

<b>12</b>	.33	1882								
<b>13</b>	.36	5806	.36	4552	.36	2493	.36	2094	.36	2852
<b>14</b>	.38	4495	.38	2694			.38	2769	.38	3474
<b>15</b>	.40	1600							.40	1385
<b>16</b>	.44	7749	.43	5030	.43	2569	.43	5600	.43	5348
<b>17</b>	.45	2338	.45	1882						
<b>18</b>	.47	5389	.47	2070			.47	1706	.47	2012
<b>19</b>	.49	1898								
<b>20</b>	.52	4536	.51	2261	.52	1838	.52	2187	.52	2518
<b>21</b>	.56	2490								
<b>22</b>	.57	4281							.57	2963
<b>23</b>	.59	4849	.58	3943					.59	3606
<b>24</b>	.63	3740	.63	2657					.63	2107
<b>25</b>	.65	2558								
<b>26</b>	.68	3504	.69	2289					.69	3933
<b>27</b>	.71	8993	.71	4540	.71	6549	.71	6525	.71	1974
<b>28</b>	.75	2151								
<b>29</b>			.83	1955			.84	4367		
<b>30</b>	.97	892	.97	941						

---



A amostra que representa a dieta referência apresentou maior diversidade ( $H=3,09$ ) e a amostra do conteúdo cecal referente a dieta com 0,5% de inclusão de *Lithothamnium* apresentou a menor diversidade ( $H=2,87$ ). As amostras

correspondentes a 0,25%, 0,75 e 1,0% de inclusão de *Lithothamnium* apresentaram índice de diversidades semelhantes ( $H= 3,04$ ,  $H=2,95$  e  $H= 2,97$  respectivamente) (figura 6).

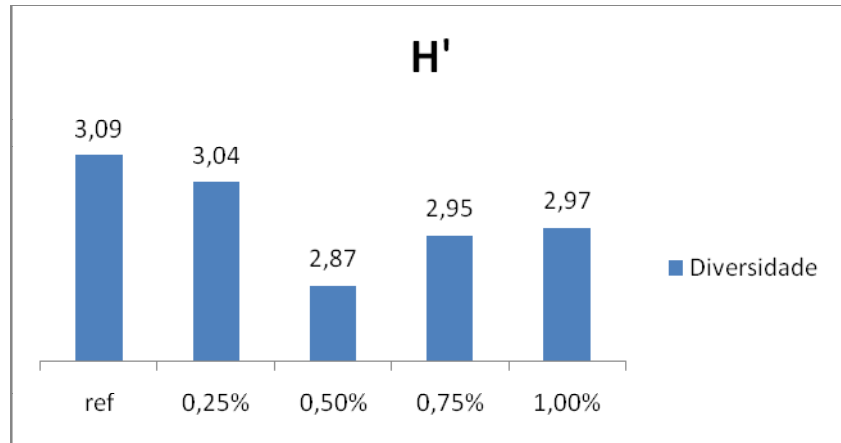


Figura 6. Índice de diversidade genética ( $H'$ ) referentes à Eubactéria das amostras experimentais. Os dados foram obtidos pela análise do perfil eletroforético em DGGE de fragmentos do gene rDNA 16S de Eubactéria, com o auxílio do programa Gel Pro Analyser<sup>®</sup>.3.1.

A equitabilidade indica se existem bandas dominantes, mostrando a uniformidade ou não das bandas. O índice de equitabilidade das amostras 0,25%, 0,75% e 1,0% foram semelhante, sendo eles, 2,2, 2,2 e 2,21 respectivamente, indicando a uniformidade entre estas bandas. Entretanto, o nível de 0,5%

apresentou menor índice de equitabilidade ( $E=2,06$ ). A amostra proveniente da dieta referência apresentou índice de equitabilidade intermediário entre os tratamentos ( $E=2,13$ ). Pode-se observar que ocorreu dominância de grupos de Eubactéria para as amostras 0,25%, 0,75% e 1,0% (figura 7).

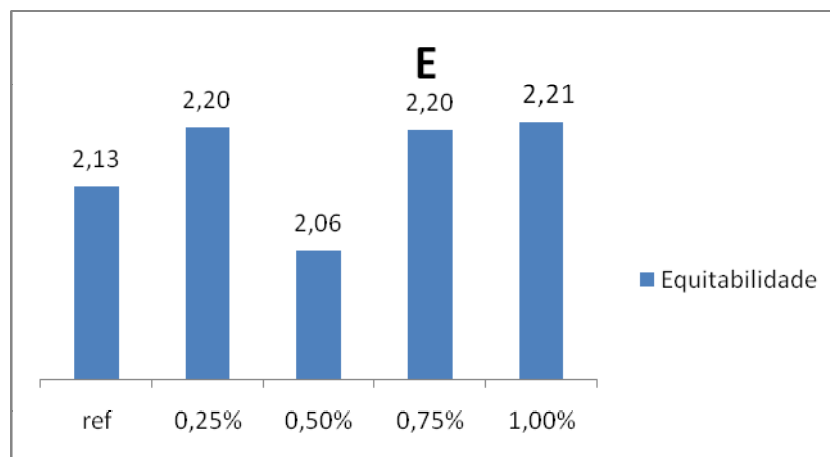


Figura 7. Valores de equitabilidade (dominância) referentes à Eubacteria das amostras experimentais. Os dados foram obtidos pela análise do perfil eletroforético em DGGE de fragmentos do gene rDNA 16S de Eubacteria, com o auxílio do programa Gel Pro Analyser<sup>®</sup>.3.1.

Em um grupo de animais de mesma espécie, que vivem em um mesmo grupo, dividindo o mesmo ambiente, tendem a possuir o mesmo perfil na microbiota intestinal. Assim sendo, os resultados obtidos nesta pesquisa apontam para um efeito no uso do *Lithothamnium sp.* sobre o perfil desta, uma vez que foi observado diferença na riqueza, diversidade e equitabilidade quando comparada as amostras dos conteúdos cecais entre os tratamentos. Entretanto, sugere-se que outras pesquisas sejam realizadas a fim de conhecer qual grupo de Eubacterias foi alterado na presença do *Lithothamnium sp.* e poder inferir um efeito benéfico ou prejudicial deste sobre a seletividade da microbiota.

### CONCLUSÃO

A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) mostrou-se adequada para as análises do DNA da microbiota cecal de coelhos.

O perfil de diversidade genética da microbiota cecal apresentou maior riqueza nas amostras obtidas a partir da dieta referência e menor diversidade na amostra oriunda da dieta com 0,5% de inclusão de *Lithothamnium*. Foi observado dominância entre os grupos de Eubacteria para os tratamentos 0,25%, 0,75% e 1,0% de inclusão de *Lithothamnium*.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADIOLA, I.; PEREZ DE ROZAS, A.M.; ROCA, M.; CARABANO, R.; GÓMEZ, M.; GARCÍA, J.; DE BLAS, C. Caracterización of the microbial diversity of rabbit intestinal tract by restriction fragment length polymorphism. *In: 8 World Rabbit Congress*, Puebla, México, 2004.

BRANDT, K.G.; SAMPAIO, M.M.S.; MIUKI, C.J. Importância da microflora intestinal. *Pediatria (São Paulo)* v.28(2), p.117-27, 2006.

FISHER, S.G.; LERMAN, L.S. DNA fragments differing by single base pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. *Proceeding of National Academy of Sciences*, v.80, p.1579-1583, 1983.

GIOVANNONI, S.J.; BRITSCHGI, T.B.; MOYER, C.L.; FIELD, K.G. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, v.345, p.60-63, 1990.

HORI, T., HARUTA, S., UENO, Y., ISHII, M., IGARASHI, Y. Direct comparison of single-strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16S rRNA gene fragments. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p.165-169. 2006.

MUYZER, G.; DE WALL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. and Environ. Microbiol.*, v.59, p.695-670, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.73, p.127-141, 1998.

PASTEUR, L. Methode pour prevenir la rage apres morsure. *C. R Acad Sci.* v.101, p.765, 1885.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning a laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor: Laboratory Press. 1989. Paginação irregular.

VERNAY, M.; RAYNAUD, P. Repartitions des acides gras volatils dans Le tube digestif du lapin domestique.2- Lapins soumis au jeune. *Ann. Rech. Vet.*, v.6, p.369-377, 1975.

## CAPÍTULO V

### DINÂMICA DE FOSFATASE ALCALINA, FÓSFORO E CÁLCIO EM COELHOS EM CRESCIMENTO ALIMENTADOS COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM FARINHA DE ALGAS MARINHAS (*LITHOTHAMNIUM SP.*)

#### RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a dinâmica da fosfatase alcalina (FAS), fósforo (P) e cálcio (Ca) séricos em coelhos Nova Zelândia Branco em crescimento, alimentados com cinco dietas, sendo uma referência, que responde às exigências nutricionais de coelhos nesta fase e outras quatro suplementadas com *Lithothamnium* sp. nos níveis de 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0% em substituição ao inerte (bentonita). As dietas experimentais foram isoprotéicas e isoenergética. Foram utilizados 55 lóparos, desmamados aos 30 dias de idade alimentados *ad libitum* até os 72 dias de idade em gaiolas individuais de arame galvanizado equipadas com alimentador e bebedouro automáticos. As amostras de sangue foram coletadas aos 72 dias de idade, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e 11 repetições. Foi realizada uma análise de regressão linear simples para estabelecer a relação entre as variáveis estudadas, de acordo com a suplementação de farinha de algas. Os resultados mostraram correlação inversa entre os níveis de cálcio e fósforo com a fosfatase alcalina ( $P < 0,05$ ). Foram obtidas equações de regressão significativas para os níveis séricos de fósforo, cálcio e fosfatase alcalina em relação à inclusão de *Lithothamnium* sp. nas dietas experimentais.

#### ABSTRACT

This study aimed to evaluate the dynamics of alkaline phosphatase (FAS), phosphorus (P) and calcium (Ca) levels in New Zealand White rabbits growing, fed five diets, and a reference that meets the nutritional requirements of rabbits in this phase and supplemented with four other *Lythothamnium* sp levels of 0.25, 0.50, 0.75 and 1.0% to replace the inert (bentonite). The experimental diets were isonitrogenous and isocaloric. We used 55 young rabbits, weaned at 30 days of age fed *ad libitum* until 72 days of age in individual galvanized wire cages equipped with automatic feeder and drinker. Blood samples were collected at 72 days of age, was completely randomized experimental design with five treatments and 11 repetitions. We performed a simple linear regression analysis to establish the relationship between the variables studied, according to the supplementation of algae meal. The results showed inverse correlation between the levels of calcium and phosphate with alkaline phosphatase ( $p < 0.05$ ). We obtained significant regression equations for serum phosphorus, calcium and alkaline phosphatase in relation to the inclusion of *Lithothamnium* sp. in experimental diets.

## INTRODUÇÃO

A fosfatase alcalina é uma hidrolase, isto é, uma enzima capaz de remover grupos fosfatos de um grande número de moléculas diferentes, incluindo nucleotídeos, proteínas e alcalóides; como o próprio nome sugere, essa enzima é mais ativa em soluções alcalinas. O processo de remoção desses grupos fosfatos é denominado desfosforilação (Arouca, 2008). Segundo Hays e Swenson (1996), demonstrou-se há anos que a fosfatase alcalina está presente em regiões de calcificação do osso, especialmente na membrana das vesículas da matriz óssea. Sugere-se também que as enzimas fosfatases estão envolvidas no transporte de cálcio para o interior dessas vesículas. Com a fosfatase alcalina e sua capacidade de aumentar as concentrações de fosfatos ou íons cálcio para as vesículas da matriz, as condições são favoráveis para nova formação de cristais de mineral. Outra função sugerida para a fosfatase alcalina e outras fosfatases do compartimento da matriz é a remoção dos inibidores da calcificação. Esses inibidores estão presentes no osso e incluem o pirofosfato e o trifosfato de adenosina. A hidrólise desses inibidores pelas fosfatases promoveria e contribuiria para deposição mineral e crescimento dos cristais.

De acordo com Furtado (1991), frente a uma deficiência dietética de Ca ou P ocorre uma queda dos níveis desses elementos no sangue, quando tem início a absorção óssea pelos osteoblastos. Simultaneamente, há uma necessidade de recomposição das regiões absorvidas do osso, promovendo um aumento progressivo da atividade dos osteoblastos. Os osteoblastos em atividade segregam grande quantidade de fosfatase alcalina, que segundo Guyton e Hall (1997), parece atuar aumentando a concentração de fosfato inorgânico no local, além de ativar fibras colágenas onde são depositados os sais de Ca. Parte da fosfatase alcalina é difundida para o sangue, quase sempre indicando intensa formação óssea. Assim sendo, a atividade da fosfatase alcalina no soro tenderá a ser alta durante a fase de crescimento, após fraturas ósseas externas, em doenças que provoquem destruição óssea e nos casos de deficiência de Ca e P na dieta.

A fosfatase alcalina óssea é um marcador bioquímico do metabolismo ósseo, o qual pode definir como sendo uma substância que retrata a formação ou a reabsorção óssea. Como a formação é dependente da ação dos osteoblastos, os marcadores de formação

(fosfatase alcalina óssea) na realidade medem produtos decorrentes da ação destas células (Martins et al. 2006). A avaliação da atividade sérica da fosfatase alcalina óssea é um marcador ósseo que fornece informações úteis sobre o remodelamento ósseo. A fosfatase alcalina contida no plasma sanguíneo é fisiologicamente a somatória de diversas isoenzimas que provêm do osso, do fígado, do intestino e da placenta (Arouca, 2008).

Farinha de algas do gênero *Lithothamnium*, com predominância das espécies *Lithothamnium calcarium*, é um produto natural renovável de origem marinha e apresenta um potencial para utilização na alimentação animal como um suplemento mineral por causa de suas características químicas. Alguns nutrientes essenciais em sua composição, como os níveis de Ca e P, estão entre os mais de 20 minerais identificados, que podem contribuir significativamente para a fisiologia digestiva dos animais. O *Lithothamnium sp.*, possui características como relação de Ca equilibrada pela presença de magnésio na proporção de 10:1, nutrientes catalisadores do metabolismo animal e das formações celulares e protéicas, além de produzir um forte poder tampão, o que pode contribuir para o ganho de peso e promover a absorção de nutrientes. Não apresenta antagonismo iônico, o que permite uma nutrição equilibrada, proporcionando melhor conversão alimentar e melhor qualidade da carne (Melo, 2006).

A utilização do P pelos animais pode ser verificada através da dinâmica sérica ou ensaios de biodisponibilidade quando se comparam várias fontes a uma considerada padrão. A metodologia mais rotineira utilizada nas pesquisas é a biodisponibilidade que pode ser traduzida como a capacidade da fonte de P fornecer o elemento para o animal de forma absorvível e utilizável no seu metabolismo. Embora os estudos de biodisponibilidade sejam importantes, eles quase sempre envolvem o sacrifício de animais para obter amostras (Gomes, 1988), que em alguns casos, ainda não atingiram o peso de abate. Além disso, está envolvido, um elevado custo da pesquisa e demora na obtenção dos resultados, sendo estes alguns aspectos negativos que aumentam a necessidade de desenvolver metodologias mais rápidas e mais baratas (Furtado, 1991).

Boyd et al. (1983) observaram em suínos que a atividade da fosfatase alcalina (FAS) no sangue representa um papel bioquímico direto na

mobilização de P. Pode ser medida tanto no soro como no plasma que apresentam concentrações inversamente proporcionais aos níveis de P presente na dieta. Estes autores afirmam que a fosfatase alcalina representa uma variável potencialmente útil na determinação da biodisponibilidade e de igual importância para analisar a mobilização de P.

Sabe-se que o Ca se mantém em equilíbrio com o P no sangue através da ação do paratormônio agindo principalmente nos ossos, rins e intestinos, em uma ação conjunta com vitamina D. A ação do paratormônio nos rins é capaz de promover um aumento na reabsorção de Ca e uma redução na reabsorção de fosfato. Nos ossos, estimula a reabsorção elevando os níveis de Ca e de fosfatos na circulação sanguínea (Silveira, 1988). Como as variações de P estão intrinsecamente relacionadas ao Ca, se infere que a mobilização destes minerais também pode ser correlacionada através dos estudos dos níveis de fosfatase alcalina. Colaborando com esta hipótese, Coles (1984) comprovou que a fosfatase alcalina participa dos processos de deposição e reabsorção óssea e Ramos (1997) encontrou, em estudos com potros, uma correlação da fosfatase alcalina com a hidroxiprolina e o P.

Este estudo teve como objetivo verificar os níveis séricos de Ca, P e fosfatase alcalina em coelhos alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes (0,25; 0,50; 0,75 e 1,00%) de farinha de algas marinhas do gênero *Lithothamnium* como tentativa de avaliar a

dinâmica da fosfatase alcalina com a mobilização destes minerais.

## MATERIAL E METODOS

Para a realização deste experimento, procedeu-se a coleta amostras de sangue dos animais do experimento de desempenho e rendimento de carcaça (capítulo 2). Foram coletados três mL de sangue de cada animal em frascos devidamente identificados, O soro foi separado por centrifugação a 1000 rpm e imediatamente enviado ao laboratório de Análise Clínica da Escola de Veterinária na Universidade Federal de Minas Gerais, onde foram medidos os níveis séricos de fosfatase alcalina, cálcio e fósforo,

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e onze repetições, sendo a unidade experimental constituída por um animal, Os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância e análise de regressão com modelos pré-definidos do programa estatístico SAEG.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar os níveis séricos de fosfatase alcalina (FAS), P e Ca em função das inclusões do *Lithothamnium*, (L) nas dietas experimentais, foram encontradas equações de regressões lineares significativas ( $P < 0,05$ ) para as três variáveis sanguíneas estudadas, representadas como nas equações a seguir (figuras 1,2,e 3):

$$\text{FAS} = 162,180 + 41,390 (\% \text{ Lithothamnium.sp})$$

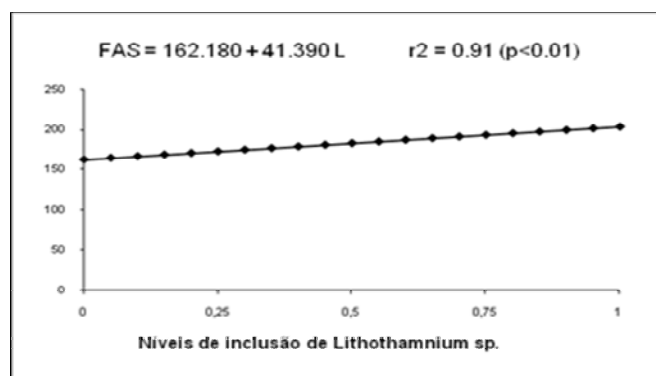


Figura 1. Gráfico da concentração sérica da Fosfatase alcalina (FAS) em relação aos níveis de inclusão do *Lithothamnium sp.* nas dietas experimentais

$$P = 8,774 - 1,016 (\% \text{ Lithothamnium.sp})$$

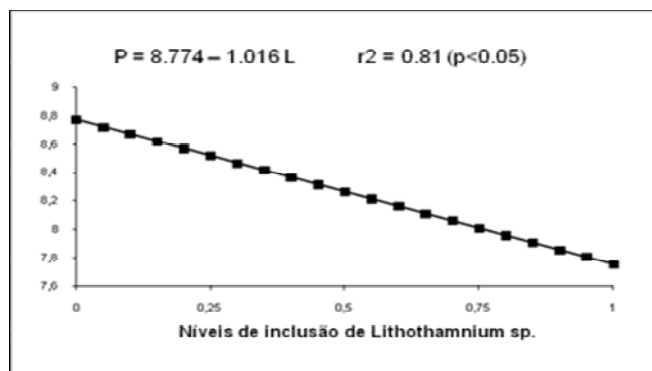


Figura 2. Gráfico da concentração sérica de Fósforo (P) em relação aos níveis de inclusão do *Lithothamnium sp.* nas dietas experimentais

$$Ca = 13,202 - 0,728 (\% \text{ Lithothamnium.sp})$$

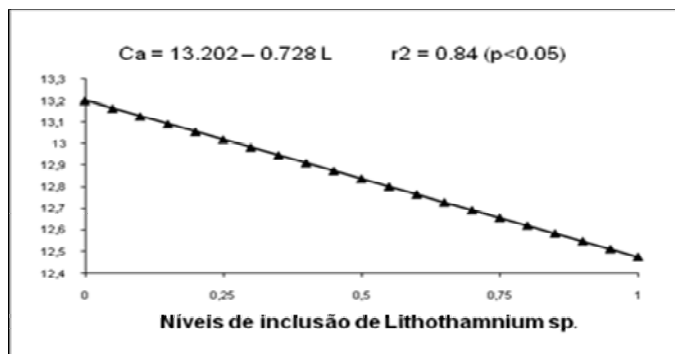


Figura 3. Gráfico da concentração sérica do Cálcio (Ca) em relação aos níveis de inclusão do *Lithothamnium sp.* nas dietas experimentais

Observa-se que apenas na dieta controle o valor médio (158,45 ml/dl) encontrado para níveis séricos de fosfatase alcalina (figura 1) neste experimento foi inferior ao valor máximo citado por Emanuelli et al, (2008) que estudaram concentrações séricas de fosfatase alcalina em coelhos adultos e encontraram valores variando entre 10,66 a 167,39 UI (ml/dl) com média de  $72,41 \pm 29,68$  UI, todas as demais dietas apresentaram valores superiores, sendo eles, 180,81, 179,64, 189,73 e 205,73 mg/dl, respectivamente. Schuchman (1984) encontrou média de 60,7 mg/dl, Kaneko et. al, (1997) citam valores médios de 120 mg/dl e Moncorvo et al, (1998) citam valores médios de 93,58 mg/dl. Emanuelli et al (2008) afirmam que os valores de fosfatase alcalina são bastante divergentes entre autores e justifica esta afirmativa com o fato das pesquisas serem diferenciadas, realizadas em países estrangeiros, animais sob condições, clima e instalações

diferentes, Fagundes e Taha (2004) responsabilizam variáveis como idade, dieta, sexo, raça, sofrimento, estação do ano, ou temperatura diária, como intervenientes no processo de pesquisa, portanto, deve-se ter cuidado ao comparar dados de outros pesquisadores. Segundo Ferreira e Santiago (1999) as dietas e instalações dos animais podem ser outras questões a serem consideradas, uma vez que altas densidades de animais podem alterar a ingestão dos animais.

Lopes (1973) estudando alguns fatores que influenciam os níveis de P inorgânico, Ca, Mg e os níveis de fosfatase alcalina em bovinos, também encontrou uma relação inversa entre as concentrações do P e da fosfatase alcalina ( $p < 0,05$ ) colaborando com os achados deste experimento (figura 2 e 3).

A interpretação das equações obtidas nos permite inferir que a inclusão do *Lithothamnium* nas dietas para coelhos em crescimento implica em incrementar os níveis de fosfatase alcalina o que se relaciona estreitamente com a indução à mobilização do P bem como do Ca. Isto demonstra que deve ter havido uma importante contribuição dos elementos minerais (Ca e P) presentes no *Lithothamnium sp.* para o metabolismo dos coelhos.

Resultados diferentes foram obtidos por Boyd et al, (1993) que trabalharam com suínos com peso médio inicial de 15,9 verificou que os valores de fosfatase alcalina e os níveis de P adicionados à dieta, não foram inversamente proporcionais em obediência aos padrões fisiológicos esperados, Os dados observados pelo autor, não se apresentaram lineares como neste trabalho.

### CONCLUSÃO

Pode-se concluir que nas condições em que este trabalho foi realizado, as equações de regressão apresentadas, demonstraram uma relação inversa entre os níveis de FAS e os de Ca e P, sendo assim, a fosfatase alcalina representa um parâmetro potencialmente útil na determinação da biodisponibilidade de Ca e P.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AROUCA, C,L,C, Exigências de P disponível para suínos selecionados geneticamente para deposição de carne em diferentes fases de crescimento, dos 15 aos 120kg, Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2008, 81p, Tese (Doutorado),
- BOYD, R. D., HALL, D. Y., WU, J. F. Plasma alkaline phosphatase as a criterion for determining biological availability of phosphorus for swine. **Journal of Animal Science**, v.57, n.2, p. 396-401, 1983.
- COLES E.H. 1984. Patologia Clínica Veterinária. 3ª ed. Editora Manole, São Paulo, p.566.
- De BLAS, J,C,, MATEOS, G,G, Feed Formulation, In: The nutrition of the rabbit, DE BLAS, J,C,, WISEMAN, J, (Ed) p, 241-253, 1998,
- EMANUELLI, M,P,; LOPES, S,T,A,; MACIEL, R,M,; GARMATZ, B,C,; TAVARES, M,O, Concentração sérica de fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, uréia e creatinina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), *Ciência Animal Brasileira*, v,9, n,1, p,251-255, jan/mar, 2008,
- FAGUNDES, D,J,; TAHA, M,O, Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente, **Acta Cirúrgica Brasileira**, v, 19, p, 59-65, 2004,
- FERREIRA, W,M,; SANTIAGO, G,S, Desempenho de coelhos criados em diferentes densidades populacionais, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v, 28, p,113-117, 1999.
- FURTADO, M.A.O. Determinação da biodisponibilidade do fósforo em suplementos de fósforo para aves e suínos.1991. 61p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- GOMES,P.C. Exigência nutricional de fósforo e sua disponibilidade em alguns alimentos para suínos de diferentes idades. 1988. 163p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de fisiologia médica. 9ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.1014p.
- HAYS, V. W.; SWENSON, M.J. Minerais. In: DUKES,H.H.; SWENSON, M.J.; REECE, W.O.(Ed.). *Dukes – Fisiologia dos animais domésticos*. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. P.471.
- KANEKO, J,J,; HARVEY, J,W,; BRUSS, L,M, Appendixes IX In: \_\_\_\_\_, **Clinical biochemistry of domestic animals**, 5, ed, San Diego: Academic, 1997, p, 895-899.
- LOPES, H.O.S.; FERREIRA,NETO, J.M.; SAMPAIO, I.B.M.Alguns fatores que influenciam os níveis de fósforo inorgânico, cálcio, magnésio e fosfatase alcalina no soro sanguíneo de bovinos no cerrado. *Arq. Bras. de Med. Vet. e Zootec.*, UFMG, v.25.n.3, p. 309-328, 1973.
- MARTINS, A.S.; ROCHA, D.F.; MELLO, F.A. Fosfatase alcalina óssea. *Fisioweb Wgate, CNFisio*. 2006. Disponível em: [HTTP://www.wgate.com.br/conteúdo/medicina esaudefisioterapia/reumato/fosfatase\\_2006\\_universo/fosfatase\\_2006\\_universo.htm](http://www.wgate.com.br/conteúdo/medicina_esaudefisioterapia/reumato/fosfatase_2006_universo/fosfatase_2006_universo.htm). Acessado em: 04/12/2008.
- MELO, T. V. utilização de farinha de algas marinhas (*lithothamnium calcareum*) e de

fosfato monoamônio em rações para codornas japonesas em postura criadas sob condições de calor. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (dissertação),2006. 44p.

MONCORVO, M,C,R, et al, Tratamento homeopático de hepatotoxicose aguda induzida por tetracloreto de carbono em coelhos, **Ciência Rural**, v, 28, p, 405-409, 1998.

RAMOS, L. C. V. O. 1997. Hidroxiprolina e fosfatase alcalina como parâmetros estimadores do status de cálcio e fósforo em diferentes sistemas de criações de equinos Mangalarga

Marchador. Belo Horizonte: UFMG – Escola de Veterinária. 61p. (dissertação).

RIBEIRO JÚNIOR IR, 2001, *Análises estatísticas no SAEG*, Viçosa: UFV, 301p,

SCHUCHMAN, S,M, Cuidados e tratamento individual de coelhos, camundongos, ratos, cobaias, *hamsters* e gerbilos, In: KIRK, R,W, **Atualização terapêutica veterinária de pequenos animais**, São Paulo: Manole, 1984, p, 825-855.

SILVEIRA, J.M. Patologia clínica veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 196p.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições as quais os experimentos foram conduzidos pode-se concluir que:

- O *Lithothamnium sp.* não apresenta nenhum elemento traço em concentrações que impossibilitem sua utilização na alimentação animal.
- O *Lithothamnium sp.* não apresentou características de alimento funcional, pois não interferiu no desempenho dos láparos, rendimento de carcaça e vísceras comestíveis. Também não apresentou respostas para os coeficientes de digestibilidade da matéria seca, proteína e energia. Entretanto o nível de inclusão mais elevado testado (1%) prejudicou o desenvolvimento das vilosidades ileais. Em relação ao perfil da diversidade genética, o *Lithothamnium sp.* apresentou maior riqueza nas amostras obtidas a partir da dieta referência e menor diversidade na amostra oriunda da dieta com 0,5% de inclusão.
- As metodologias de avaliação de alimentos *in vitro* estudadas foram efetivas para estimar a digestibilidade da matéria seca e matéria orgânica, sendo uma importante ferramenta para avaliação de alimentos em coelhos.
- A viabilidade de utilização de cecos congelados como fonte de inóculo, demonstra uma importante ferramenta na padronização deste.
- A metodologia de digestibilidade *in vitro* através da técnica de Tilley e Terry parece ser uma adequada de forma mais eficiente para coelhos, com um período de 24 horas de fermentação durante o primeiro estágio da técnica.
- A fosfatase alcalina representa um parâmetro potencialmente útil na determinação da biodisponibilidade de Ca e P.