

Utilização da Técnica de Produção de gás *In Vitro* para Estimar a Digestibilidade dos Alimentos

Using the Technique of *In Vitro* Gas Production to Estimate Digestibility of Food

OLIVEIRA, Vinicius da Silva

Doutorando em Zootecnia Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil. e-mail:
viny_oliveira@yahoo.com.br

VALENÇA, Roberta de Lima

Doutoranda em Zootecnia da UNESP/JABOTICABAL. Jaboticabal, SP, Brasil.

SANTANA NETO, José Adelson

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)- Doutorando em Zootecnia, Areia, PB, Brasil.
Bolsista CAPES

SANTANA, Juliana Caroline Santos

Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristovão, SE,
Brasil

SANTOS, Camila Batista

Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristovão, SE,
Brasil

LIMA, Irla Gabriela Souza

Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristovão, SE,
Brasil



Resumo

Esta revisão tem como objetivo relatar as implicações do uso da técnica de produção de gás *in vitro*. Tendo em vista a necessidade de se estudar a digestibilidade dos alimentos, de forma mais rápida e precisa é que foi desenvolvida a técnica de digestibilidade *in vitro* por produção de gás. Esta técnica permite obter os resultados da digestibilidade dos alimentos de forma rápida, e utilizando-se para isso menor quantidade de alimentos, possibilitando a avaliação de vários alimentos ao mesmo tempo. Além de que, permite conhecer a cinética de fermentação ruminal dos alimentos, dando indícios dos produtos oriundos desta fermentação, tendo alta correlação com o método *in vivo*.

Palavras-Chave: Alimentos, Cinética, Fermentação Ruminal

Abstract

This review aims to report on the implications of using the technique of *in vitro* gas production. Given the need to study the digestibility of foods, more quickly and accurately is that the technique was developed *in vitro* by gas production. This technique provides the results of the digestibility of food quickly, and using for this smaller amount of food, allowing the evaluation of various foods simultaneously. Besides that allows to know the kinetics of ruminal fermentation of foods, giving indications for products from this brew, having high correlation with the *in vivo* method.

Keywords: Food, Kinetic, Fermentation Ruminal



Introdução

A produção animal depende diretamente do consumo de alimentos e de seu aproveitamento por parte do animal. Por esta razão, o conhecimento da composição químico-bromatológica e da digestibilidade dos alimentos é imprescindível, uma vez que esses fatores vão ter influência direta na resposta do animal à dieta que está sendo ofertada e em seu desempenho. O resultado da composição química e da digestibilidade é que determina o valor nutritivo do alimento, por tanto um alimento para que tenha um bom valor nutricional tem que ter além de um alto teor de nutrientes, uma boa digestibilidade. O conhecimento da digestibilidade dos alimentos é um fator importante para definir a qualidade nutricional da dieta, uma vez que é a digestibilidade quem vai determinar o quanto de nutrientes serão efetivamente aproveitados pelo animal. Segundo Berchielli et al. (2005), a quantidade total de nutrientes absorvidos na dieta é um dos fatores que mais vão exercer influência na resposta do animal em produção.

A digestibilidade é a fração do alimento que é degradada e absorvida pelo animal, para posterior aproveitamento, e não é eliminada via fezes. Vários fatores exercem influência na taxa de degradação do alimento, tais como granulometria, taxa de passagem e a composição química. Tendo em vista a necessidade de se determinar a digestibilidade das dietas, foram desenvolvidas técnicas que predissessem com precisão o coeficiente de degradabilidade dos alimentos, os métodos desenvolvidos para esta finalidade foram os *in vivo*, *in situ* e *in vitro*.

O método *in vivo* de avaliação da digestibilidade é o mais preciso de todos, por está sendo realizado no próprio animal, no entanto esse método é custoso, pois exige uma grande quantidade de animais e uma grande quantidade de alimentos, além de demandar um maior tempo, esta técnica também gera um grande volume de amostras para análise (alimento, fezes e urina). Isto muitas vezes inviabiliza o seu uso em determinados experimentos principalmente quando se deseja avaliar mais de um alimento. Experimentos que utilizam o método *in vivo*, para determinar a digestibilidade, consumo e desempenho animal, são os que apresentam resultados mais precisos, no entanto estes demandam de muito tempo, trabalho e um grande volume de



alimentos, inviabilizando o uso em avaliações rotineiras de alimentos (SENGER et al., 2007).

Nesse sentido é importante a utilização de metodologias que estimem a digestibilidade dos alimentos de forma precisa, e que, no entanto sejam de baixo custo e fácil aplicação. Devido aos inconvenientes gerados pelo método *in vivo*, foram desenvolvidas técnicas alternativas para estimar a digestibilidade das dietas, que permitissem utilização de uma menor quantidade de material e as avaliações fossem realizadas em um menor espaço de tempo, os métodos alternativos que surgiram com essa finalidade, foram os *in situ* e *in vitro*.

A técnica de degradação *in vitro* foi desenvolvida por Tilley & Terry (1963), esta técnica simula os processos de digestão que ocorrem no rúmen, e tem sido muito utilizada por apresentarem valores de digestibilidade condizentes com o *in vivo* (SILVEIRA, 2006). A técnica de digestibilidade *in situ*, consiste na avaliação da degradação de alimentos incubados em sacos de náilon porosos, estes sacos são mantidos dentro do rúmen de animais fistulados e são removidos em intervalos de tempo determinados, esta técnica foi proposta por Orskov & McDonald (1979).

Entre as formas de se avaliar a degradabilidade e cinética de fermentação ruminal, o método de produção de gás *in vitro*, descrito por Theodorou et al. (1994), vem sendo utilizado por apresentar resultados satisfatórios, por ser uma técnica de baixo custo e obter resultados mais rápidos quando comparado ao método *in vivo* (SENGER et al., 2007; CABRAL et al., 2002; SILVEIRA, 2006; MAURÍCIO et al., 2003; VELÁSQUEZ, 2006).

O objetivo da presente revisão é abordar as vantagens e implicações do uso da técnica de digestibilidade *in vitro* por produção de gás.

Desenvolvimento

O conhecimento da digestibilidade dos alimentos é importante para definir a qualidade da dieta, uma vez que esse fator determina o quanto de nutrientes serão efetivamente aproveitados pelo animal. Segundo Berchielli et al. (2005), a quantidade total de nutrientes absorvidos na dieta é um dos fatores que mais vão exercer influência na resposta do animal em produção.



Tendo em vista a necessidade de se determinar a digestibilidade das dietas, foram desenvolvidas técnicas que predissessem com precisão o coeficiente de degradabilidade dos alimentos. Os métodos desenvolvidos para esta finalidade foram os *in vivo*, *in situ* e *in vitro*.

Experimentos que utilizam o método *in vivo*, para determinar a digestibilidade, consumo e desempenho animal, são os que apresentam resultados mais precisos. No entanto, estes demandam de muito tempo, trabalho e grande volume de alimentos, inviabilizando o uso em avaliações rotineiras de alimentos (SENGER et al., 2007). Por essa razão foi desenvolvida a técnica de digestibilidade *in vitro* e *in situ*, como métodos alternativos para predizerem a degradabilidade dos alimentos de forma mais rápida e permitindo a utilização de uma menor quantidade de alimentos, bem como a avaliação de vários alimentos diferentes ao mesmo tempo.

A técnica de digestibilidade *in situ*, consiste na avaliação da degradação de alimentos incubados em sacos de náilon porosos. Estes sacos são mantidos dentro do rúmen de animais fistulados sendo removidos em intervalos de tempo determinados, segundo técnica proposta por Orskov & McDonald (1979). Esta técnica apresenta como limitação a falta de padronização, apesar dos esforços para se tentar padronizar a sua utilização. Por conta da falta de padronização são detectadas diferenças nos resultados entre os laboratórios, mesmo quando utilizam condições de avaliação idênticas (NOCEK, 1985).

A primeira técnica de degradabilidade *in vitro* foi desenvolvida por Tilley e Terry (1963) baseada em dois estágios para simular a digestibilidade do alimento. No primeiro estágio o alimento é incubado por 48h em líquido ruminal. Posteriormente o alimento é incubado por mais 48 horas em pepsina e ácido fraco. No entanto, foi constatado que essa técnica apresenta algumas limitações para estimar a digestibilidade *in vivo* naquelas situações em que se suspeita ou se sabe que o material ingerido é retido no rúmen durante um período de tempo mais curto do que a incubação (DI MARCO et al., 2005). Theodorou et al. (1994), afirmam que esta técnica não fornece informações sobre a cinética da digestão de forragem, por avaliar apenas o resultado final da digestão.



Por não ser possível avaliar a cinética da digestão pelo método de dois estágios proposto por Tilley e Terry (1963), que foi desenvolvido o método de avaliação da digestibilidade pela produção de gás *in vitro*.

Quando um alimento é incubado no rúmen, este passa por processo de degradação, podendo ser fermentado, produzindo gases e ácidos de fermentação, ou ser incorporado à massa microbiana do rúmen (REYMER et al., 2005). Por essa razão os estudos de fermentação *in vitro* por produção de gás servem para entender os processos de aproveitamento dos nutrientes, que começam pela fermentação ruminal e refletem diretamente no desempenho dos animais.

A técnica de produção de gás *in vitro*, consiste na incubação de amostras de alimentos em garrafas com um medidor de gás acoplado. Para determinar o volume do gás pode-se utilizar uma seringa plástica graduada, quando ocorre a fermentação do alimento e a liberação de gás. A quantidade de gás produzido é medida em tempos definidos, para que se obtenha uma curva de degradação (THEODOROU et al., 1994). A digestibilidade *in vitro* por produção de gás gera uma curva sigmóide, e pode ser dividida em três fases: 1) a fase lenta, sem produção de gás (fase inicial), 2) a fase de produção de gás rápida (fase exponencial) e 3) a fase em que a taxa de produção de gás diminui, chegando à zero (fase assintótica) (BEUVINK e KOGUT, 1993). Durante a fase inicial ocorre hidratação, fixação e colonização do substrato pelos microrganismos ruminais (CHENG et al., 1980).

De acordo com Tagliapietra et al. (2010), o gás liberado a partir de alimentos inoculados com líquido ruminal reflete a atividade microbiana. O gás que é produzido como produto da fermentação e o perfil acumulado deste gás podem dar informação sobre a digestibilidade do alimento e cinética de fermentação (GETACHEW et al., 1998). Cabral et al. (2002), ressaltam que a técnica de produção de gases *in vitro* é importante para o estudo dos parâmetros cinéticos das frações que compõe os alimentos. Isto porque os gases produzidos durante a fermentação refletem a taxa e extensão em que os componentes são fermentados pelos microrganismos ruminais.

O sistema de produção de gás *in vitro* permite estimar a digestibilidade da matéria seca e matéria orgânica, indicando diretamente os produtos finais produzidos pela fermentação, como os gases (CO₂ e CH₄) e indiretamente a produção de ácidos graxos



de cadeia curta (AGCC) (BUENO et al., 2005). Os AGCC são a principal fonte de energia dos ruminantes, sendo responsáveis por 50 a 70% da energia digestível do alimento (KOZLOSKI, 2002).

De acordo com Brow et al. (2002), a técnica de produção de gás simula a fermentação ruminal, e pode ser utilizados para prever o padrão de fermentação do rúmen. Para Theodorou et al. (1994), esta técnica é capaz de simular o ambiente ruminal e a digestão enzimática.

O método de produção de gás *in vitro* tem como principal vantagem determinar a cinética de fermentação em uma única amostra. Sendo necessária uma quantidade relativamente pequena de amostra, permitindo avaliar maior número de amostras ao mesmo tempo, possibilitando a obtenção de várias observações demonstrando boas correlações com metodologias *in vivo* e *in situ* (BLUMMEL e ORSKOV, 1993).

Campos et al. (2000), comparando o método de digestibilidade *in vitro* por produção gás no período de 48 horas com os métodos *in situ* e *in vivo*, de silagem de milho com alta ou baixa matéria seca (MS), observaram que para silagem com alta MS os métodos *in situ* e *in vitro* não diferiram entre si (65,2% e 65,4%, respectivamente). Porém, ambos foram menores que o método *in vivo* (66,4%). Quanto à silagem com baixa MS, os três métodos não diferiram apresentando valores de 67,4%, 66,9% e 72,3% para os métodos *in vitro*, *in vivo* e *in situ*, respectivamente.

Santos et al. (2003), utilizando a técnica de produção de gás para estimar a degradabilidade ruminal de alimentos nas espécies bovina, caprina e ovina, concluíram que a técnica de produção de gás permitiu estimar as taxas de digestão das frações insolúveis e, principalmente, das frações solúveis dos carboidratos totais. Campos et al. (2000), comparando os métodos do sistema de monitoramento computadorizado de digestão *in vitro* com o *in vivo* e *in situ*, utilizando resíduo de forragem, concluíram que a quantificação do desaparecimento da matéria seca e fibra em detergente neutro pelo método *in vitro* de produção de gás se assemelha aos demais métodos.

Castro et al. (2007), avaliando a cinética de degradação e fermentação pelo método *in vitro* de produção de gás, do capim Marandu colhido em diferentes idades de corte, concluíram que as idades de 28 e 56 dias, são os melhores momentos para a



utilização do capim Braquiarião, pois nessas idades é que foi observada a maior fermentação ruminal dessa forrageira.

Sousa et al. (2011), utilizando a técnica de produção de gás *in vitro* para estudar a fermentação ruminal do capim Marandu em sistema silvipastoril, concluíram que a forrageira teve maior fermentação no período da chuva, do que no de transição. Sá et al. (2011), estudando a cinética de fermentação *in vitro* do capim Marandu em diferentes idades de corte, observaram maior potencial de produção de gases do capim cortado aos 35 dias (116,8 ml/g MS⁻¹) em relação ao capim cortado aos 28 (95,75 ml/g MS⁻¹) e 54 dias (68 ml/g MS⁻¹), e maior degradabilidade da matéria seca aos 28 dias (73,7%).

Velásquez (2006), estudando a produção de gás *in vitro* da *Brachiaria brizantha*, Tifton 85 e Tanzânia, observou maior produção de gás às 96h de incubação para a *Brachiaria brizantha*, devido a esta forrageira possuir maior quantidade de carboidratos prontamente solúveis (fração A+B1).

Considerações Finais

A técnica de produção de gás *in vitro* tem se demonstrado promissora, e tem sido largamente utilizada, por necessitar menor quantidade de amostra para realizar as avaliações e permitir a obtenção de resultados mais rapidamente.

Referências Bibliográficas

- BERCHIELLI, T. T.; OLIVEIRA, S. G.; GARCIA, A. V. Aplicação de técnicas para estudo de ingestão, composição da dieta e digestibilidade. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n.2, p. 29-40, 2005.
- BLUMMEL, M.; ORSKOV, E.R. Comparison of "in vitro" gas production and nylon degradability of roughage in predicting feed intake in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v.40, p.109-119, 1993.
- BROWN, V. E.; RYMER, C.; AGNEW, R. E.; GIVENS, D. I. Relationship between in vitro gas production profiles of forages and in vivo rumen fermentation patterns in beef steers fed those forages. **Animal Feed Science and Technology**, v.98, p.13-24, 2002.



- BUENO, I. C. S.; CABRAL FILHO, S. L. S.; GOBBO, S. P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M. S. S.; ABDALLA, A. L. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, v.123–124, p.95–105, 2005.
- CABRAL, L. S.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E.; ZERVOUDAKIS, J. T.; PEREIRA, O. G.; VELOSO, R. G.; PEREIRA, E. S. Cinética Ruminal das Frações de Carboidratos, Produção de Gás, Digestibilidade *In Vitro* da Matéria Seca e NDT Estimado da Silagem de Milho com Diferentes Proporções de Grãos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.6, p.2332-2339, 2002.
- CAMPOS, F. P.; BOSE, M. L. V.; BION, C.; LANNA, D. P. D.; MORAIS, J. P. G. Comparação do Sistema de Monitoramento Computadorizado de Digestão *In Vitro* com os Métodos *In Vivo* e *In Situ*. 2. Uso do Resíduo da Matéria Seca de Forragens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.2, p.531-536, 2000.
- CASTRO, G. H. F.; GRAÇA, D. S.; GONÇALVES, L. C.; MAURICIO, R. M.; RODRIGUES, N. M.; BORGES, I.; TOMICH, T. R. Cinética de degradação e fermentação ruminal de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu colhida em diferentes idades de corte. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1538-1544, 2007.
- CHENG, K. J. J. P.; FAY, R. E.; HOWARTH, J. W. Sequence of events in the digestion of fresh legume leaves by rumen bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, 40:613, 1980.
- DI MARCO, O. N.; ALLEO, M. S.; ARIAS, A. Digestibility and ruminal digestion kinetics of corn silage. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.2, p.223-228, 2005.
- GETACHEW, G.; BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutrition quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.72, p.261-281, 1998.
- KOZLOSKI, G. B. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2002. 139p.
- MAURÍCIO, R. M.; PEREIRA, L. G. R.; GONÇALVES, L. C.; RODRIGUEZ, N. M. Relação entre pressão e volume para implantação da técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases na avaliação de forrageiras tropicais. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2003.



- NOCEK, J. E. Evaluation of specific variables affecting *in situ* estimate of ruminal dry matter and protein digestion. **Journal Animal Science**, v.60, n.5, p.1347-1358, 1985.
- ORSKOV, E. R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p.499-503, 1979.
- RODRIGUES, N. M.; SALIBA, E. O. S.; GUIMARÃES JÚNIOR, R. Uso de indicadores para estimar o consumo a pasto e digestibilidade. In: Simpósios da 43^a Reunião Anual da SBZ. 2006. Paraíba, **Anais...** p.1-26, 2006.
- SÁ, J. F.; PEDREIRA, M. S.; SILVA, F. F.; FIGUEIREDO, M. P.; REBOUÇAS, G. M. N.; SOUZA, D. R. Cinética de fermentação *in vitro* do capim-Marandu em diferentes idades de corte. **Acta Animal Science**, v.33, n.3, p.225-231, 2011.
- SANTOS, R. A.; TEIXEIRA, J. C.; PÉREZ, J. R. O.; PAIVA, P. C. A.; MUNIZ, J. A.; ARCURI, P. B. Estimativa da Degradabilidade Ruminal de Alimentos Utilizando a Técnica de Produção de Gás em Bovinos, Ovinos e Caprinos. **Ciência Agropecuária**, v.27, n.3, p.689-695, 2003.
- SENGER, C. C. D.; MÜHLBACH, P. R. F.; SANCHEZ, L. M. B.; KOZLOSKI, G. V.; KIST, G. P.; LIMA, L. D.; NETTO, D. P. Comparação entre os métodos químicos, *in situ* e *in vivo* para estimativa do valor nutritivo de silagens de milho. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.835-840, 2007.
- SILVEIRA, M. F. **Comparação de métodos *in vivo* e laboratoriais para estimar o valor nutritivo de dietas para bovinos de corte.** Santa Maria, 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, 2006.
- SOUSA, L. F.; MAURÍCIO, R. M.; GONÇALVES, L. C.; BORGES, I.; MOREIRA, G. R. Cinética de fermentação ruminal *in vitro* da forrageira *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em sistema silvipastoril. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p.382-391, 2011.
- TAGLIAPIETRA, F.; CATTANI, M.; BAILONI, L.; SCHAIIVON, S. *In vitro* rumen fermentation: Effect of headspace pressure on the gas production kinetics of corn meal and meadow hay. **Animal Feed Science and Technology**, n. 158, p.197-201, 2010.



THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, n.48, v.3-4, p.185-197, 1994.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two stages technique for the “in vitro” digestion of forage crops. **Journal of British Grassland Society**, v.18, n.2, p.104-111,1963.

VELÁSQUEZ, P. A. T. **Composição química, digestibilidade e produção de gases “in vitro” de três espécies forrageiras tropicais**. 2006. 77p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Júlio de Mesquita Filho”, Universidade Estadual de São Paulo, 2006.

