



Adaptação de uma Técnica "in vitro" para Descrição da Cinética de Degradação Ruminal da Matéria Seca de Volumosos

Thierry Ribeiro Tomich¹
Luiz Gustavo Ribeiro Pereira²
Roberto Guimarães Júnior³
Lúcio Carlos Gonçalves⁴

Introdução

O conhecimento da cinética de degradação dos alimentos no rúmen é de extrema importância para o estabelecimento de estratégias eficientes de manejo alimentar para os animais ruminantes. A técnica de digestibilidade *in situ*, que utiliza animais fistulados para a incubação ruminal de amostras de alimentos, tem sido amplamente adotada para se estimar a taxa e a extensão de degradação ruminal dos componentes nutricionais de alimentos fornecidos a esses animais.

Sampaio et al. (1995) e Tomich e Sampaio (2004) propuseram estratégias para se reduzir o número de animais, diminuir trabalho experimental e aperfeiçoar os resultados de degradação obtidos nos estudos com a técnica de digestibilidade *in situ*. Contudo, essa técnica não tem sido empregada em experimentos delineados para estudar elevado número de substratos, porque o número de amostras avaliadas por experimento é limitado pela capacidade de sacos de náilon que podem ser incubados simultaneamente.

A técnica de digestibilidade *in vitro* proposta por Tilley e Terry (1963) é considerada uma metodologia de referência para a predição da digestibilidade dos alimentos de ruminantes, apresenta relativo baixo custo, precisão nos resultados e tem sido rotineiramente utilizada em estudos de digestibilidade que envolvem grande número de substratos. Essa técnica é conduzida em duas fases, onde a primeira, chamada de fase fermentativa, simula a digestão que ocorre no

rúmen e, portanto, pode ser empregada para a predição da digestão ruminal dos alimentos. Todavia, não descreve a cinética, mas apenas a extensão da digestão.

Este trabalho teve como objetivo adaptar a fase fermentativa da técnica de digestibilidade *in vitro* proposta por Tilley e Terry (1963) para a descrição da cinética de degradação ruminal da matéria seca (MS) de volumosos. Para tal, comparou os resultados da cinética de degradação ruminal obtidos pela técnica *in situ* aos resultados obtidos pela fase fermentativa da técnica de Tilley e Terry (1963) empregando diferentes tempos de incubação das amostras de forrageiras.

Material e Métodos

A escolha dos alimentos utilizados neste estudo procurou abranger forrageiras com ampla variação no valor nutritivo. Dessa forma, amostras pré-secas e moídas de três forrageiras de corte foram utilizadas em avaliações de degradação da MS empregando a metodologia de incubação ruminal *in situ* e a fase fermentativa da técnica *in vitro* de dois estágios proposta por Tilley e Terry (1963). Foram utilizadas amostras de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Shum) cultivar napier e de um híbrido de sorgo de corte (*Sorghum bicolor* cv. Bicolor x *Sorghum bicolor* cv. Sudanense) (BRS800), coletadas aos 30 dias de rebrota, e uma variedade de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (RB72454), colhida com 12 meses. Nas duas metodologias, as amostras foram incubadas pelos períodos de 0, 6, 12, 24, 48 e 96 horas.

¹ Médico Veterinário, Dr., Embrapa Pantanal, Rua 21 de Setembro, 1880, 79320-900, Corumbá, MS. thierry@cpap.embrapa.br

² Médico Veterinário, Dr., Embrapa Semi-Árido, Rodovia BR 428, km 152, 56302-970, Petrolina, PE. luiz.gustavo@cpatsa.embrapa.br

³ Médico Veterinário, Dr., Embrapa Cerrados, Rodovia BR 020, km 18, 73310-970, Planaltina, DF. guimaraes@cpap.embrapa.br

⁴ Engenheiro Agrônomo, Dr., Escola de Veterinária da UFMG, Avenida Pres. Antônio Carlos, 6627, 30123-900, Belo Horizonte, MG. luciocg@vet.ufmg.br

2 Adaptação de uma Técnica "in vitro" para Descrição da Cinética de Degradação Ruminal da Matéria Seca de Volumosos

Os animais experimentais utilizados para incubação ruminal na técnica *in situ* e coleta de inóculo de rúmen para técnica *in vitro* foram três carneiros adultos, portadores de cânula ruminal, alimentados com dieta composta por 80% de volumoso (feno de gramínea do gênero *Cynodon*) e 20% de concentrado (22% de proteína bruta - PB), água e mistura mineral à vontade.

Para a execução da técnica *in situ* foram utilizados sacos de náilon com malha de $50 \pm 15 \mu\text{m}$, amostras com tamanho médio de partícula de 5 mm e a relação de 17,5 mg de amostra por cm^2 de área superficial do saco de náilon. Após a retirada do rúmen, os sacos contendo resíduo de incubação foram imersos em água fria e lavados em água corrente. Os resíduos foram retirados e pré-secos em estufa, triturados em moinho com peneira de 1 mm e utilizados para a determinação do teor de MS a 105°C.

Para a execução da técnica *in vitro* seguiu-se o procedimento descrito para a fase fermentativa da técnica de Tilley e Terry (1963), exceto para o período de incubação. Nesse caso, as filtragens (papel filtro qualitativo) e a recuperação dos resíduos de incubação foram feitas nos tempos de incubação descritos anteriormente.

As frações solúveis (tempo zero de incubação) foram determinadas pelos mesmos procedimentos de lavagem e filtragem empregados, respectivamente, para as técnicas *in situ* e *in vitro*, porém, sem a incubação prévia das amostras.

Os dados foram processados empregando-se o programa Microsoft Excel e analisados utilizando-se o Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG). A taxa e o potencial de degradação da MS foram calculados utilizando-se o modelo proposto por Sampaio et al. (1995): $D_{ms} = A - B \exp(-Ct)$, em que:

D_{ms} = desaparecimento da matéria seca

A = degradabilidade potencial

B = total a ser degradado pela ação microbiana se não houvesse tempo de colonização

C = taxa constante de degradação da fração que permanece no saco de náilon

t = tempo de incubação

O tempo de colonização foi estimado conforme McDonald (1981): $TC = -1 / C * \ln(A-S) / B$, em que:

TC = tempo de colonização em horas

A, B e C = mesmos parâmetros definidos na equação anterior

S = fração solúvel determinada pela porcentagem de desaparecimento no tempo zero de incubação (fração rapidamente degradada).

A degradabilidade efetiva da MS foi estimada para a taxa de passagem de 5%/hora, utilizando-se a equação $DE = S + [(B1 * C) / (C + K)]$, em que:

DE = degradabilidade efetiva

S = fração solúvel

B1 = fração degradável (A - S)

C = taxa constante de degradação da fração que permanece no saco de náilon

K = taxa de passagem (5%/hora)

As correlações entre as técnicas foram estimadas pelo coeficiente de correlação de Pearson.

Resultados e Discussão

O alcance do objetivo de empregar no estudo alimentos com ampla variação no valor nutritivo foi confirmado pela larga variação dos resultados de composição bromatológica das forrageiras apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição bromatológica das forrageiras.

Componente	Capim-elefante	Sorgo de corte	Cana-de-açúcar
Matéria seca (%)	17,4	16,6	27,5
Cinzas (%MS)	6,4	6,5	2,9
Proteína Bruta (%MS)	8,2	14,4	1,8
CS (%MS)	2,6	4,5	40,6
FDN (%MS)	70,8	64,4	49,8
FDA (%MS)	37,6	35,3	30,8
Lignina (%FDN)	4,4	5,7	9,0

Matéria seca a 105°C e cinzas a 600°C. Proteína bruta pelo método de combustão. Carboidratos solúveis (CS) pelo método proposto por Bailey (1967). Fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina conforme descrito por Van Soest et al. (1991).

Na Tabela 2 estão os resultados de degradação das forrageiras nos horários de incubação e os coeficientes de correlação entre as técnicas. Para uma mesma forrageira, os coeficientes de correlação dos resultados de degradação da MS obtidos entre as metodologias *in situ* e *in vitro* foram altos e significativos, variando de 92,5% a 97,4% ($P < 0,001$).

Tabela 2. Porcentagem média de degradação ruminal da matéria seca das forrageiras avaliadas em diferentes períodos de incubação e coeficientes de correlação entre as técnicas.

Período de incubação (horas)	Capim-elefante		Sorgo de corte		Cana-de-açúcar	
	<i>in situ</i>	<i>in vitro</i>	<i>in situ</i>	<i>in vitro</i>	<i>in situ</i>	<i>in vitro</i>
6	31,0	25,1	36,4	27,8	51,2	34,9
12	41,1	33,5	44,4	35,5	54,4	41,0
24	56,4	48,7	56,8	49,1	57,4	49,1
48	67,1	59,8	67,8	60,6	62,1	58,0
96	75,7	63,4	76,9	63,4	66,8	59,6
Coeficiente de correlação entre técnicas (R ²)	0,974 (P<0,001)		0,965 (P<0,001)		0,925 (P<0,001)	

Na Tabela 3 estão os parâmetros cinéticos de degradação ruminal da MS das forrageiras obtidos pelas duas técnicas. As frações solúveis da matéria seca obtidas pelo emprego das metodologias *in situ* e *in vitro* foram, respectivamente, de 20,8% e 19,6% para o capim-elefante, 27,7% e 24,5% para o sorgo de corte e 45,0% e 47,4% para a cana de açúcar. Tanto para a metodologia *in situ* quanto para a *in vitro*, foi observada a mesma ordenação das forrageiras quanto à proporção da fração solúvel e, além disso, para uma mesma forrageira, essas frações apresentaram pequenas variações entre as técnicas. Esses resultados indicaram que o processo empregado para se estimar frações solúveis na metodologia *in vitro* apresenta resultados próximos aos obtidos pela metodologia *in situ* e, possivelmente, não necessita de adequações.

As taxas de degradação da MS obtidas pela metodologia *in situ* foram de 4,3%/h para o capim-elefante, 3,5%/h para o sorgo de corte e 2,2%/h para a cana-de-açúcar. Já na metodologia *in vitro*, observaram-se taxas de 5,1%/h para o capim-elefante, 5,6%/h para o sorgo de corte e 4,8%/h para a cana-de-açúcar. As duas metodologias ordenaram as forrageiras de forma distinta em relação à taxa de degradação ruminal da MS. Além disso, houve grande variação entre técnicas quanto à taxa de degradação da MS de uma mesma forrageira, o que indica que há necessidade de ajustes dos parâmetros que interferem na estimativa da taxa de degradação *in vitro*.

Os potenciais de degradação da MS observados para as técnicas *in situ* e *in vitro* foram, respectivamente, de 76,0% e 64,1% para capim-elefante, 78,4% e 64,0% para o sorgo de corte e 69,1% e 60,5% para a cana-de-açúcar. O capim-elefante e o sorgo de corte apresentaram resultados semelhantes de potencial de degradação da MS, enquanto a cana-de-açúcar apresentou os menores potenciais de degradação nas metodologias *in situ* e *in vitro*. Contudo, resultados obtidos para uma mesma forrageira apresentaram grande diferença entre metodologias. As respectivas equações de descrição da cinética de degradação ruminal da MS obtidas pelas metodologias *in situ* e *in vitro* foram:

Dms capim-elefante *in situ* = 76,0 - 58,0 exp(-0,043*t)
R² = 0,983;

Dms capim-elefante *in vitro* = 64,1 - 53,8 exp(-0,051*t) R² = 0,975;

Dms sorgo de corte *in situ* = 78,4 - 51,5 exp(-0,035*t)
R² = 0,969;

Dms sorgo de corte *in vitro* = 64,0 - 51,8 exp(-0,056*t) R² = 0,986;

Dms cana-de-açúcar *in situ* = 69,1 - 20,0 exp(-0,022*t) R² = 0,971;

Dms cana-de-açúcar *in vitro* = 60,5 - 34,3 exp(-0,048*t) R² = 0,961.

Os altos coeficientes de determinação (R²) observados para as duas técnicas apontaram a boa adequação dos resultados de degradação de MS ao modelo de descrição da cinética de degradação proposto por Sampaio et al. (1995), mostrando que esse modelo também pode ser empregado para os resultados obtidos pela adaptação da técnica *in vitro* proposta neste trabalho.

O tempo de colonização da MS de uma mesma forrageira apresentou variações entre técnicas, sendo a maior variação entre os resultados apresentados pela cana-de-açúcar. Já as degradabilidades efetivas da MS obtidas para uma mesma forrageira apresentaram valores próximos nas duas metodologias.

Embora tenham sido observadas variações entre metodologias para alguns parâmetros da cinética de degradação ruminal da MS das forrageiras avaliadas, os resultados indicaram que a fase fermentativa da técnica de Tilley e Terry (1963) com vários períodos de incubação mostrou potencial para ser empregada para a predição da cinética de degradação ruminal da MS de volumosos. A conveniência na utilização da adaptação da técnica "in vitro" descrita neste trabalho reside na sua capacidade de avaliação de grande número de substratos em um mesmo experimento, o que não pode ser realizado empregando a técnica *in situ*. Portanto, o uso dessa adaptação da técnica *in vitro* para a descrição da cinética de degradação ruminal da MS de volumosos é apropriado para estudos que requerem análise simultânea de grande número de substratos, como os de triagem e seleção de forrageiras.

Entretanto, avalia-se que o uso da adaptação de técnica proposta neste trabalho não seja adequado para estudos mais detalhados acerca do valor nutritivo dos alimentos, uma vez que ela não permite a descrição da cinética de degradação ruminal de outros componentes nutricionais além da MS. Assim, embora a técnica *in situ* apresente limitação na capacidade de análise, ela permite a avaliação da cinética de degradação de todos os

4 Adaptação de uma Técnica "in vitro" para Descrição da Cinética de Degradação Ruminal da Matéria Seca de Volumosos

componentes nutricionais presentes na matéria seca do alimento e, portanto, possibilita uma avaliação mais apropriada acerca do valor nutritivo dos alimentos para ruminantes.

Tabela 3. Parâmetros da cinética de degradação ruminal obtidos para a matéria seca de forrageiras de corte empregando-se a metodologia *in situ* e a fase fermentativa da metodologia *in vitro*.

Forrageira	Fração solúvel (S) %MS		Taxa de degradação (C) %MS/hora		Potencial de degradação (A) %MS		Tempo de colonização (TC) horas: minutos		Degradabilidade efetiva a 5%/h %MS	
	<i>in situ</i>	<i>in vitro</i>	<i>in situ</i>	<i>in vitro</i>	<i>in situ</i>	<i>in vitro</i>	<i>in situ</i>	<i>in vitro</i>	<i>in situ</i>	<i>in vitro</i>
	Capim-elefante	20,8	19,6	4,3	5,1	76,0	64,1	1:07	3:45	46,2
Sorgo de corte	27,7	24,5	3,5	5,6	78,4	64,0	0:25	4:52	48,5	45,3
Cana-de-açúcar	45,0	47,4	2,2	4,8	69,1	60,5	-8:22	20:07	52,4	53,8

Conclusões

Os resultados observados indicam que o emprego da adaptação de técnica *in vitro* proposta neste estudo apresenta potencial para determinar os parâmetros da cinética de degradação ruminal da matéria seca de volumosos.

A vantagem da utilização dessa adaptação da técnica *in vitro* em relação à técnica *in situ* é representada pela mais alta capacidade de análise da metodologia *in vitro*. Assim sendo, indica-se a aplicação da metodologia proposta neste trabalho para a execução de estudos que requerem análise de grande número de substratos em um mesmo experimento.

Referências Bibliográficas

BAILEY, R.W. Quantitative studies of ruminant digestion. II. Loss of ingested plant carbohydrates from the reticulo rumen. **New Zealand Journal of Agricultural Research**. v.10, n.1, p.15-32, 1967.

McDONALD, J. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. **Journal of Agricultural Science** (Cambridge). v.96, n.1, p.251-252, 1981.

SAMPAIO, I.B.M.; PIKE, D.J. OWEN, E. Optimal design for studying dry matter degradation in the rumen.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.47, n.3, p.373-383, 1995.

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

TOMICH, T.R.; SAMPAIO, I.B.M. A new strategy for the determination of forage degradability with an *in situ* technique through the use of one fistulated ruminant. **Journal of Agricultural Science** (Cambridge). v.142, n.5, p.589-593, 2004.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**. v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.

Comunicado Técnico, 57

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Pantanal
Endereço: Rua 21 de Setembro, 1880
Caixa Postal 109
CEP 79320-900 Corumbá, MS
Fone: 67-32332430
Fax: 67-32331011
Email: sac@cpap.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2006): Formato digital

Comitê de Publicações

Presidente: Thierry Ribeiro Tomich
Secretário-Executivo: Suzana Maria Salis
Membros: Débora Fernandes Calheiros
Marçal Hernique Amici Jorge
Jorge Ferreira de Lara
Regina Célia Rachel dos Santos

Expediente

Supervisor editorial: Suzana Maria de Salis
Revisão de texto: Mirane dos Santos Costa
Tratamento das ilustrações: Regina Célia R. Santos
Editoração eletrônica: Regina Célia R. Santos