

## Digestibilidade da matéria seca de alimentos volumosos e concentrados, determinada por diferentes procedimentos *in vitro*

*Dry matter digestibility of roughages and concentrates determined different "in vitro" procedures*

DUQUE, Anna Carolynne Alvim<sup>1\*</sup>; LOPES, Fernando César Ferraz<sup>2</sup>; DORNELLAS, Rosemeire Aparecida de Carvalho<sup>2</sup>; PORTUGAL, José Alberto Bastos<sup>3</sup>; VERNEQUE, Rui da Silva<sup>2</sup>; SILVA OLIVEIRA, Jackson e<sup>2</sup>; AZAMBUJA, Alcio Azambuja<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Zootecnia, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

<sup>3</sup>Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Departamento de Biologia, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

\*Endereço para correspondência: [alvimduque@yahoo.com.br](mailto:alvimduque@yahoo.com.br)

### RESUMO

Objetivou-se neste trabalho comparar valores de digestibilidade *in vitro* da matéria seca de seis classes de alimentos concentrados e volumosos, determinados pelo método de dois estágios, realizado em tubos individuais ou em equipamento automatizado de fermentação (incubadora *in vitro*). No segundo estágio da análise foi adicionalmente avaliado o efeito sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca da utilização de solução ácida de pepsina ou do refluxo em solução de detergente neutro. Para ambos os estudos utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 6 (procedimentos *in vitro* x classes de alimentos). Os valores de digestibilidade *in vitro* da matéria seca determinados pelo método realizado em tubos foram mais próximos dos relatados na literatura e consistentemente inferiores aos obtidos na incubadora *in vitro*. Os desvios-padrão das médias de digestibilidade *in vitro* da matéria seca foram, em sua maioria, menores quando determinados pelo método realizado em tubos. O procedimento de refluxo com detergente neutro permitiu economia de tempo e recursos, com resultados semelhantes aos obtidos por meio da incubação em pepsina ácida. A aparente superestimativa dos valores de digestibilidade *in vitro* da matéria seca condiciona a recomendação do emprego do equipamento automatizado à implementação de novos estudos, com ênfase no material utilizado na confecção dos sacos de incubação.

**Palavras-chave:** cana-de-açúcar, extrusa, farelo, gramínea tropical

### SUMMARY

The aim of this work was to compare the values of *in vitro* dry matter digestibility of six classes of concentrates and roughages feeds, determined by the two-stage technique carried in individual digestion tubes or using an automatized equipment of fermentation (filter bag technique, FBT). In the second digestion stage of the technique it was also evaluated the effect of pepsin acid solution and the reflux with neutral detergent solution on the *in vitro* dry matter digestibility. For both studies the experimental design was completely randomized with a 2 x 6 factorial arrangement (*in vitro* procedures x food classes). The IVDMD values determined in tubes were close to those found by others authors and lower than those obtained by the filter bag technique. Standard deviation of *in vitro* dry matter digestibility means were, in general, lower when the individual tubes method were used. The procedure using reflux with neutral detergent was less expensive and time-consuming, and yield similar results when compared to those using the acidified pepsin digestion methodology. The apparent overestimated values of *in vitro* dry matter digestibility observed in the filter bag technique suggests that the recommendation of the automatized equipment will be dependent of new studies, with emphasis to the material used to make the incubation bags.

**Keywords:** extrusa, meal, sugarcane, tropical grass

## INTRODUÇÃO

O procedimento *in vitro* de dois estágios proposto por Tilley & Terry (1963) para determinação da digestibilidade de alimentos é o mais difundido e utilizado em todo o mundo, pois se tem revelado como uma ferramenta extremamente útil aos nutricionistas de ruminantes (QUEIROZ et al., 2000). No entanto, esta técnica apresenta limitações (ADESOGAN, 2002) e restrições de ordem prática, principalmente as relacionadas ao excesso de tempo e de trabalho despendidos com a utilização de mão de obra especializada, além de diferenças entre as marchas analíticas adotadas por diversos laboratórios (CAMPOS et al., 2000).

Sistemas automatizados de determinação de digestibilidade *in vitro* de alimentos foram desenvolvidos e são atualmente comercializados com a promessa de redução dos custos relacionados ao trabalho e à manipulação das amostras, as quais são coletivamente fermentadas em jarros de digestão, ao invés de individualmente incubadas nos tubos, como no procedimento de Tilley & Terry (1963). Ademais, permitem economia de espaço no laboratório e aumentam a segurança dos laboratoristas (VOGEL et al., 1999).

Vários autores recomendaram a utilização de sistemas automatizados de fermentação *in vitro* na análise de digestibilidade da matéria seca (TRAXLER et al., 1995; MABJEESH et al., 2000; ADESOGAN, 2005). Entretanto, valores de digestibilidade determinados nestes equipamentos foram superestimados (VOGEL et al., 1999; MABJEESH et al., 2000; SANTOS et al., 2000; WILMAN & ADESOGAN, 2000) ou subestimados (ADESOGAN, 2005) em relação àqueles obtidos de métodos tradicionais realizados em tubos individuais.

O refluxo com solução de detergente neutro em detrimento da utilização da pepsina ácida, no segundo estágio da técnica, permite não somente economia de tempo de análise, mas também obtenção de resíduo não-digerido de parede celular livre de material microbiano, o que viabiliza a determinação da digestibilidade verdadeira *in vitro* da amostra (VAN SOEST, 1994).

Objetivou-se comparar valores de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de concentrados e volumosos incubados em tubos individuais ou em equipamento automatizado de fermentação. No segundo estágio da análise, foi avaliado, também, o efeito sobre a DIVMS da utilização de solução ácida de pepsina ou de refluxo em solução de detergente neutro.

## MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos foram realizados no Laboratório de Digestibilidade da Embrapa Gado de Leite, situado no Campo Experimental de Coronel Pacheco (Coronel Pacheco, MG) mediante utilização de amostras pertencentes a seis classes de alimentos comumente empregados na dieta de bovinos (Tabela 1), a saber: 1) quatro extrusas coletadas em pastagens tropicais, obtidas através de um animal fistulado no esôfago; 2) quatro amostras de cana-de-açúcar picada, coletadas assim que picada para ser fornecida; 3) quatro forragens de leguminosas, obtidas na vitrine de forrageiras da Embrapa Gado de Leite; 4) quatro forragens de gramíneas tropicais, obtidas na vitrine de forrageiras da Embrapa Gado de Leite; 5) dois concentrados proteicos, obtidos de amostras já presentes no laboratório de alimentos da Embrapa Gado de Leite; 6) dois concentrados energéticos obtidos

de amostras já presentes no laboratório de alimentos da Embrapa Gado de Leite.

Todas as amostras foram pré-secadas por 72 horas, em estufa de ventilação forçada e regulada para 55°C. Posteriormente, essas amostras foram moídas em moinho de facas dotado de

peneira com abertura de malhas de 1mm, e analisadas quanto aos teores de proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), segundo métodos descritos por Silva & Queiroz (2002).

Tabela 1. Composição química dos alimentos volumosos e concentrados, sobre proteína bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido

Alimentos	Composição química		
	PB <sup>1</sup>	FDN <sup>1</sup>	FDA <sup>1</sup>
(% da matéria seca)			
<b>Extrusas coletadas em pastagens tropicais</b>			
<i>P. purpureum</i> – 30 dias de descanso – 1º dia de pastejo	15,4	72,2	41,1
<i>P. purpureum</i> – 45 dias de descanso – 1º dia de pastejo	10,5	77,0	46,6
<i>Cynodon</i> spp. – 28 dias de descanso – estação das chuvas	14,6	64,0	28,6
<i>Cynodon</i> spp. – 38 dias de descanso – estação da seca	14,3	60,5	34,0
<b>Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)</b>			
CB-47355	2,9	51,6	31,4
SP-811520	2,9	53,8	34,1
NA-5679	1,4	48,9	31,2
IAC 915156	3,5	49,1	35,3
<b>Forragens de leguminosas</b>			
<i>Cratylia argentea</i>	20,4	50,1	35,8
<i>Arachis pintoi</i> – 20 dias de crescimento	12,8	52,2	44,0
<i>Cajanus cajan</i> – 5 meses de rebrota	16,8	50,0	39,8
<i>Leucaena leucocephala</i> – 1 ano de rebrota	28,8	30,3	25,9
<b>Gramíneas tropicais (corte a 5 cm acima do nível do solo; 45 dias de crescimento)</b>			
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Xaraés	11,6	58,9	35,7
<i>B. decumbens</i>	13,2	57,6	33,3
<i>Panicum. maximum</i> cv. Mombaça	10,2	64,0	41,7
<i>P. maximum</i> cv. Tanzânia	12,4	61,1	37,6
<b>Concentrados proteicos</b>			
Farelo de soja	50,2	9,8	-
Farelo de algodão	40,4	31,8	22,5
<b>Concentrados energéticos</b>			
Fubá de milho	10,4	6,9	3,5
Farelo de trigo	17,8	-	-

<sup>1</sup>PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro e FDA = fibra em detergente ácido.

No Experimento 1 foram avaliados dois procedimentos *in vitro* para determinação da digestibilidade: tradicional, de dois estágios de Tilley & Terry (1963); e automatizado, com o uso de incubadora *in vitro* modelo TE-150 (Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP). Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 6 (dois procedimentos *in vitro* de determinação da DIVMS x seis classes de alimentos).

No procedimento de Tilley & Terry (1963), os 20 alimentos foram incubados em duplicata, em tubos contendo 50mL de solução tamponada (pH final = 6,74), mediante uma relação 4:1 (v/v) de saliva artificial e líquido ruminal. Foram também preparados dois tubos contendo somente a solução tamponada (“prova-em-branco”) e dois tubos com amostra de forragem de digestibilidade conhecida (“alimento-padrão”) e incluídos à bateria. Depois de 48h de incubação, 4mL de ácido clorídrico (HCl) a 7,4% (v/v) e 2mL de pepsina 1:10.000 a 5% (p/v) foram adicionados em cada tubo e, após novo período de 48h de incubação, foram realizados procedimentos de filtragem a vácuo, secagem e pesagem dos resíduos, visando aos cálculos da DIVMS (SILVA & QUEIROZ, 2002).

No método automatizado, as amostras dos alimentos pertencentes às classes (1), (2) e (5) foram incubadas em duplicata, em dois dos quatro jarros de fermentação, aos quais eram providos de artefato plástico divisor com furos colocado no interior dos jarros para auxiliar a mistura dentro destes, em sacos confeccionados em TNT-100 (Tecido-não-tecido, 100% polipropileno, 5,5 x 5,5cm), além de dois sacos vazios (“prova-em-branco”) e dois outros que continham o “alimento-padrão”, em um total de 24 sacos em cada um dos dois jarros de fermentação da incubadora *in vitro*, que

continha 1.200mL da mesma solução tamponada relatada para o tratamento realizado nos tubos. Nos dois outros jarros de fermentação, foram adotados os mesmos procedimentos para incubação das amostras pertencentes às classes de alimentos (3), (4) e (6). Depois de 48 horas de incubação foram adicionados 96mL de HCl a 7,4% (v/v) e 48mL de pepsina 1:10.000 a 5% (p/v) e, após novo período de 48 horas de incubação foram realizados procedimentos de lavagem, secagem e pesagem dos sacos, visando aos cálculos de DIVMS.

No Experimento 2, foram avaliados dois procedimentos para determinação das digestibilidades aparente e verdadeira da matéria seca. Na digestibilidade aparente a fração endógena e perdas por secreções não é levada em consideração e na digestibilidade verdadeira levam-se em conta as descamações do sistema endógeno, realizando-se no segundo estágio da técnica, respectivamente: incubação em solução ácida de pepsina durante 48 horas na incubadora *in vitro*; ou refluxo a quente com solução de detergente neutro. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 6 (dois procedimentos de determinação das digestibilidades aparente e verdadeira da matéria seca x seis classes de alimentos).

Os procedimentos de incubação das amostras no primeiro estágio da técnica realizados na Incubadora *In vitro* foram os mesmos adotados no Experimento 1. No entanto, depois de 48 horas de fermentação, dois jarros que continham amostras dos alimentos pertencentes a cada classe avaliada foram retirados e os sacos de incubação foram encaminhados para refluxo a quente (60 min) com solução de detergente neutro (SILVA & QUEIROZ, 2002) no equipamento “Determinador de Fibras” modelo TE-149 (Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP). Depois disto, foram secados em estufa

regulada a 55°C e pesados, visando aos cálculos de digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca. Nos outros dois jarros de fermentação foram adicionados 96mL de HCl a 7,4% (v/v) e 48mL de pepsina 1:10.000 a 5% (p/v). Depois de 48 horas de incubação na incubadora *in vitro*, todos os sacos foram lavados em água corrente (até a mesma tornar-se límpida), secados em estufa (55°C) e pesados, visando aos cálculos de digestibilidade aparente *in vitro* da matéria seca.

Para fornecimento de líquido ruminal, foi utilizada uma vaca Holandês x Zebu fistulada no rúmen, dotada de cânula de borracha com 110mm de diâmetro interno de abertura Kehl Ind. Com. Ltda., São Carlos, SP, Brasil. A vaca passou por período de adaptação de 14 dias em piquete de *Brachiaria* spp., e os procedimentos de coleta e de processamento do líquido ruminal foram aqueles rotineiramente adotados pelo Laboratório de Digestibilidade da da Embrapa Gado de Leite, segundo as recomendações de Silva & Queiroz (2002). A solução tamponada dispensada nos tubos de incubação e nos quatro jarros de fermentação da incubadora *in vitro* foi obtida de uma mesma alíquota, processada em quantidade suficiente para atender a demanda de cada um dos dois experimentos. As soluções de pepsina e HCl foram as mesmas utilizadas nos dois procedimentos *in vitro* avaliados no Experimento 1. Independentemente do método de análise da digestibilidade *in vitro* da matéria seca, a temperatura de incubação foi mantida em 39°C. Em ambos os experimentos os procedimentos de incubação *in vitro* foram repetidos no tempo, com duplicação do número de réplicas por tratamento.

Os dois experimentos foram analisados pelo procedimento GLM (*General Linear Models Procedure*) do SAS (1997), e as comparações das médias

( $P < 0,05$ ) realizadas com auxílio do LSMEANS do pacote estatístico SAS. (1997).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo geral, os valores de DIVMS (Tabela 2) determinados pelo método de dois estágios de Tilley & Terry (1963) foram mais próximos daqueles relatados na literatura (QUEIROZ et al., 2000; MAGALHÃES et al., 2003; SANTOS et al., 2004; MORAES et al., 2005) do que os obtidos pelo equipamento automatizado de fermentação *in vitro* (Experimento 1). Os resultados obtidos são reforçados, conforme pode ser visto na Tabela 2, com os desvios-padrão das médias de DIVMS que foram, em sua maior parte, menores quando determinados pelo método de dois estágios de Tilley & Terry (1963). Ao trabalhar com forrageiras de clima temperado, Wilman & Adesogan (2000) relataram que o método tradicional, no qual a incubação dos alimentos foi realizada em tubos individuais (TILLEY & TERRY, 1963), produziu resultados com menores erros-padrão e coeficientes de variação que aqueles observados quando utilizaram sistema automatizado de fermentação *in vitro*. Também, Traxler et al. (1995) relataram menores desvios-padrão nos valores da digestibilidade *in vitro* da matéria seca determinados pelo método tradicional, realizado em tubos individuais em relação aos obtidos do sistema automatizado.

No Experimento 1, foram observados efeitos ( $P < 0,0001$ ) da classe de alimentos e nos procedimento de determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca, não havendo interação entre os fatores estudados ( $P > 0,05$ ). Os valores da digestibilidade *in vitro* da matéria seca determinados pelo método tradicional de Tilley & Terry (1963) foram

consistentemente inferiores ( $P < 0,0001$ ) aos obtidos na incubadora *in vitro* (Tabela 3). Estes resultados corroboram com diversos trabalhos relatados, nos quais, os coeficientes de digestibilidade determinados em sistemas automatizados de fermentação *in vitro* foram superestimados (VOGEL et al., 1999; MABJEESH et al., 2000; SANTOS et al., 2000; WILMAN & ADESOGAN,

2000) em relação àqueles obtidos de métodos tradicionais realizados em tubos individuais. Ademais, ao utilizar-se a incubadora *in vitro*, os valores da digestibilidade *in vitro* da matéria seca do “alimento-padrão” foram superestimados em relação ao valor real, enquanto que na incubação realizada nos tubos, obteve-se boa concordância entre estes, com valores próximos.

Tabela 2. Médias  $\pm$  desvios-padrão dos valores de digestibilidade aparente *in vitro* da matéria seca (%) de volumosos e concentrados, em função do método de incubação (Experimento 1) e do modo de realização do segundo estágio na técnica de determinação da digestibilidade automatizada (Experimento 2)

Alimento	Experimento 1		Experimento 2	
	Tilley e Terry	Incubadora <i>n vitro</i>	Solução ácida de pepsina	Refluxo com detergente neutro
Extrusas coletadas em pastagens tropicais <sup>1</sup>				
Extrusa 1	55,5 $\pm$ 2,74	73,5 $\pm$ 3,11	68,5 $\pm$ 3,65	68,6 $\pm$ 5,76
Extrusa 2	48,9 $\pm$ 2,53	65,7 $\pm$ 3,08	64,9 $\pm$ 3,16	66,7 $\pm$ 1,67
Extrusa 3	61,0 $\pm$ 7,47	75,3 $\pm$ 4,02	73,1 $\pm$ 3,10	82,4 $\pm$ 3,70
Extrusa 4	59,5 $\pm$ 6,47	75,4 $\pm$ 5,11	75,4 $\pm$ 3,43	80,2 $\pm$ 3,45
Cana-de-açúcar				
CB-47355	57,7 $\pm$ 1,90	77,4 $\pm$ 3,23	74,3 $\pm$ 1,41	72,7 $\pm$ 1,74
SP-811520	53,3 $\pm$ 1,33	72,3 $\pm$ 5,59	67,0 $\pm$ 3,73	68,5 $\pm$ 1,37
NA-5679	54,5 $\pm$ 1,38	74,1 $\pm$ 3,37	68,6 $\pm$ 3,83	68,6 $\pm$ 1,81
IAC 915156	56,0 $\pm$ 2,25	75,0 $\pm$ 1,58	70,7 $\pm$ 2,36	69,1 $\pm$ 0,73
Forragens de leguminosas				
<i>Cratylia argentea</i>	45,9 $\pm$ 1,70	66,8 $\pm$ 2,41	57,8 $\pm$ 1,85	62,5 $\pm$ 1,73
<i>Arachis pintoi</i>	55,7 $\pm$ 1,28	76,9 $\pm$ 2,56	71,3 $\pm$ 2,16	72,0 $\pm$ 0,73
<i>Cajanus cajan</i>	55,3 $\pm$ 2,40	77,9 $\pm$ 2,51	68,2 $\pm$ 1,88	70,6 $\pm$ 2,86
<i>Leucaena leucocephala</i>	63,4 $\pm$ 0,71	83,6 $\pm$ 1,12	75,3 $\pm$ 2,05	79,0 $\pm$ 2,47
Forragens de gramíneas tropicais				
<i>B. brizantha</i> cv. Xaraés	64,5 $\pm$ 2,00	84,8 $\pm$ 3,38	77,1 $\pm$ 2,11	80,8 $\pm$ 0,73
<i>B. decumbens</i>	60,8 $\pm$ 1,22	78,0 $\pm$ 2,23	78,7 $\pm$ 2,98	83,1 $\pm$ 1,98
<i>P. maximum</i> Mombaça	55,8 $\pm$ 1,80	75,4 $\pm$ 3,69	73,5 $\pm$ 4,64	72,6 $\pm$ 2,49
<i>P. maximum</i> Tanzânia	57,6 $\pm$ 3,04	75,8 $\pm$ 5,71	74,2 $\pm$ 2,45	76,5 $\pm$ 1,51
Concentrados protéicos				
Farelo de soja	90,1 $\pm$ 0,89	95,7 $\pm$ 0,42	99,3 $\pm$ 0,69	99,7 $\pm$ 0,36
Farelo de algodão	59,4 $\pm$ 2,35	77,0 $\pm$ 5,52	76,5 $\pm$ 1,81	77,1 $\pm$ 0,50
Concentrados energéticos				
Fubá de milho	87,2 $\pm$ 5,23	97,5 $\pm$ 3,27	98,1 $\pm$ 1,46	99,0 $\pm$ 0,54
Farelo de trigo	73,9 $\pm$ 4,70	81,3 $\pm$ 5,72	76,1 $\pm$ 0,89	76,7 $\pm$ 0,61

<sup>1</sup>Extrusa 1 = capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) com 30 dias de descanso, 1º dia de pastejo; Extrusa 2 = capim-elefante com 45 dias de descanso, 1º dia de pastejo; Extrusa 3 = *Cynodon* spp., com 28 dias de descanso, estação das chuvas; Extrusa 4 = *Cynodon* spp. com 38 dias de descanso, estação da seca.

Tabela 3. Efeito do procedimento *in vitro* utilizado na determinação da digestibilidade da matéria seca (%) sobre diferentes classes de alimentos

Classe de alimento	Procedimento <i>in vitro</i>		EPM <sup>1</sup>
	Tilley e Terry (1963)	Incubadora <i>In vitro</i>	
Extrusadas de gramíneas tropicais	56,2 <sup>a</sup>	72,5 <sup>b</sup>	3,53
Cana-de-açúcar	55,4 <sup>a</sup>	74,7 <sup>b</sup>	3,53
Leguminosas	55,1 <sup>a</sup>	76,3 <sup>b</sup>	3,53
Gramíneas tropicais	59,7 <sup>a</sup>	78,3 <sup>b</sup>	3,53
Concentrados proteicos	74,8 <sup>a</sup>	86,3 <sup>b</sup>	5,00
Concentrados energéticos	80,6 <sup>a</sup>	89,4 <sup>b</sup>	5,00

Letras distintas na mesma linha indicam diferença ( $P < 0,0001$ ) pelo teste de Tukey entre procedimentos *in vitro* de determinação de digestibilidade.

<sup>1</sup>EPM = Erro-padrão da média

Segundo Adesogan (2002, 2005), os resultados de digestibilidade obtidos a partir de equipamentos automatizados de fermentação *in vitro* podem ser afetados por tamanho de amostra incubada, método de processamento, proximidade dos jarros de incubação em relação à fonte de calor, efeitos associativos na digestibilidade de materiais incubados em um mesmo jarro de fermentação e por eventuais diferenças na extensão pela qual cada saco encontra-se imerso na solução tamponada de inóculo ruminal.

No presente estudo, a despeito de ter sido utilizado artefato plástico divisor com furos, que foi colocado no interior dos jarros de fermentação para minimizar o problema, foi de fato observado que alguns sacos que continham as amostras de alimentos, frequentemente permaneciam flutuando na parte de cima dos jarros de fermentação da incubadora *in vitro*. Ao avaliar o sistema automatizado de fermentação *in vitro*, Adesogan (2005) relatou que em sacos de incubação onde foram colocadas bolas de vidro de 5g, os valores determinados de digestibilidade de várias forrageiras tropicais foram maiores ( $P < 0,001$ ) em relação àqueles obtidos dos sacos desprovidos dos pesos extras. Por esses

resultados, poder-se-ia postular que no presente estudo, a magnitude da diferença entre os valores de DIVMS obtidos da incubadora *in vitro* em relação aos determinados nos tubos individuais poderia ter sido ainda maior. Wilman & Adesogan (2000) e Adesogan (2005) relataram que o influxo e efluxo de partículas pelos poros dos sacos de incubação podem constituir-se importantes fontes de variação na determinação da digestibilidade *in vitro* quando se utilizam equipamentos automatizados de fermentação.

O tipo de saco de incubação considerado referência em estudos de digestibilidade *in vitro*, realizados em equipamentos automatizados de fermentação é o F-57, com porosidade de  $25\mu$  (Ankom Technology, Macedon, NY, EUA). No entanto, apresenta custo elevado e, por esta razão, diversos trabalhos foram conduzidos para avaliar o efeito da utilização de materiais alternativos na confecção dos sacos de incubação sobre os valores de digestibilidade *in vitro* realizados em equipamentos automatizados de fermentação (FIGUEIREDO et al., 2000; OLIVEIRA & MORGAN, 2002; RIBEIRO & OLIVEIRA, 2004; ADESOGAN, 2005). De modo geral, os resultados desses trabalhos

evidenciaram maiores ( $P < 0,05$ ) valores de DIVMS nas amostras incubadas nos sacos confeccionados com materiais alternativos, principalmente por estes apresentarem tamanho de poros superior ao do F-57 (OLIVEIRA & MORGAN, 2002; ADESOGAN, 2005). Segundo Adesogan (2005), isso pode facilitar a colonização e digestão dos alimentos pelos microrganismos ruminais, bem como permitir maior efluxo de pequenas partículas não-digeridas das amostras incubadas.

No presente estudo, o material utilizado na confecção dos sacos de incubação foi o TNT-100. Ao trabalhar com feno de alfafa (*Medicago sativa*, L.) e mediante a utilização de equipamento automatizado de fermentação *in vitro*, Ribeiro & Oliveira (2004) relataram que valores de DIVMS obtidos de amostras incubadas em sacos confeccionados com TNT-100 foram superiores ( $P < 0,01$ ) aos determinados nos sacos F-57. No entanto, mesmo ao adotarem os sacos F-57 em sistema automatizado de fermentação, Santos et al. (2000) relataram que valores de DIVMS de três das cinco gramíneas tropicais avaliadas em seu estudo foram superestimados ( $P < 0,05$ ) em relação aos obtidos por meio do método tradicional realizado em tubos. Isto evidencia que aspectos adicionais ao tipo de material utilizado na confecção dos sacos de incubação podem também influenciar nos resultados de DIVMS, determinados em equipamentos automatizados de fermentação.

Neste sentido, ressalta-se que a própria rotação contínua dos jarros de fermentação da incubadora *in vitro* em interação com o tipo de material utilizado na confecção do saco de incubação, poderia contribuir para maior digestão e/ou efluxo das amostras, uma vez que no método de Tilley & Terry (1963) foram realizadas apenas duas agitações nos tubos por dia. Adicionalmente, a própria forragem (SANTOS et al., 2000; WILMAN & ADESOGAN, 2000) ou

suplemento (MABJEESH et al., 2000) avaliados e seu processamento prévio (MABJEESH et al., 2000; ADESOGAN, 2005) são fontes de variação, que em função do método de análise, podem influenciar nos resultados de DIVMS.

Conforme pode ser visto na Tabela 2, em 14 dos 20 alimentos avaliados no Experimento 2, houve evidência de maior precisão nos resultados obtidos do emprego do procedimento de determinação da digestibilidade verdadeira da matéria seca, haja vista ter apresentado os menores desvios-padrão das médias, principalmente ao se considerar as amostras de cana-de-açúcar, forragens de gramíneas tropicais e de suplementos concentrados.

A despeito de em ambos os métodos, o processo de lavagem final dos sacos de incubação ter sido realizado da mesma forma, ou seja, com pouca interferência na magnitude do efluxo de partículas, é provável que o resíduo obtido após a incubação com a solução de pepsina ácida, tenha sido superestimado, uma vez que, conforme relataram Van Soest et al. (1966), no método de refluxo com solução de detergente neutro, há remoção de maior proporção de microrganismos aderidos às frações indigestíveis da amostra.

Os valores médios da digestibilidade *in vitro* da matéria seca de diferentes classes de alimentos volumosos e concentrados, em função dos procedimentos metodológicos utilizados no segundo estágio da técnica de determinação da digestibilidade são apresentados na Tabela 4. Ao avaliar capim Kikuio, azevém, feno e milho inteiro, Figueiredo et al. (2000) relataram que para duas delas não houve diferença ( $P > 0,05$ ) nos valores de digestibilidade aparente e verdadeira da matéria seca, obtidos utilizando no segundo estágio da determinação da digestibilidade, respectivamente, 24 horas de incubação das amostras em solução ácida de pepsina ou refluxo

a quente em solução de detergente neutro. Em comparação à digestibilidade aparente da matéria seca, esses autores observaram maiores valores de digestibilidade verdadeira e de desvios-padrão de suas médias, respectivamente, para capim Kikuiu e Azevém.

Os autores atribuíram esses resultados ao fato de não terem utilizado na determinação da digestibilidade verdadeira, equipamento automatizado para refluxo das amostras com solução de detergente neutro. Exceto por

uma amostra de caule de forrageira, Wilman & Adesogan (2000) observaram que todos os demais valores de digestibilidade aparente foram inferiores aos de digestibilidade verdadeira da matéria seca. Ademais, também relataram que os valores de digestibilidade verdadeira da matéria seca determinados em sistema automatizado de fermentação *in vitro* superestimaram aqueles obtidos de tubos individuais, o que pode ser explicado pela contaminação entre as amostras.

Tabela 4. Efeito do procedimento metodológico utilizado no segundo estágio de determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (%) de diferentes classes de alimentos volumosos e concentrados

Classe de alimento <sup>1</sup>	Solução ácida de pepsina	Refluxo com detergente neutro	EPM <sup>1</sup>
Extrusas de gramíneas tropicais	70,5 <sup>a2</sup>	74,5 <sup>a</sup>	4,04
Cana-de-açúcar	70,2 <sup>a</sup>	69,7 <sup>a</sup>	4,04
Leguminosas	69,9 <sup>a</sup>	73,0 <sup>a</sup>	3,61
Gramíneas tropicais	75,5 <sup>a</sup>	77,4 <sup>a</sup>	4,66
Concentrados proteicos	87,9 <sup>a</sup>	88,4 <sup>a</sup>	5,71
Concentrados energéticos	87,1 <sup>a</sup>	87,8 <sup>a</sup>	5,71

<sup>1</sup>EPM = Erro-padrão da média

<sup>2</sup>Letras distintas na mesma linha indicam diferença (P<0,05) pelo teste de Tukey, entre valores de digestibilidade *in vitro* da matéria seca determinados utilizando dois procedimentos metodológicos no segundo estágio da técnica de digestibilidade pelo método automatizado.

No presente estudo, as regressões obtidas entre os valores médios de digestibilidade verdadeira (DV, %) e aparente (DA, %) *in vitro* da matéria seca foram:  $DV = 4,4339 + 0,9655*DA$  ( $r^2 = 0,93$ ;  $P<0,0001$ ) para amostras de todos os alimentos avaliados; e  $DV = -1,8206 + 1,0563*DA$  ( $r^2 = 0,79$ ;  $P<0,0001$ ) para amostras de forragens (gramíneas e leguminosas). Ao trabalharem com amostras de fenos de 12 gramíneas e oito leguminosas, Van Soest et al. (1966) obtiveram a regressão:

$DV = 0,92 + 16,2*DA$  ( $r^2 = 0,95$ ; erro-padrão = 3,0). Aplicando os dados da Tabela 2 nesta equação obtêm-se valores consistentemente superestimados de digestibilidade verdadeira da matéria seca. No entanto, convém ressaltar que Van Soest et al. (1966) incubaram as amostras em tubos individuais, em detrimento de utilizar sistema automatizado de fermentação *in vitro*, conforme adotado no Experimento 2. Todavia, foi observado que os sacos confeccionados com TNT-100

frequentemente desfiavam-se, o que permitiu que partículas externas, suspensas na solução tamponada, ficassem aderidas ao saco.

A adoção do refluxo com solução de detergente neutro no segundo estágio do método de determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca permitiu economia de tempo e recursos, com resultados similares aos obtidos pelo método de incubação em solução de pepsina ácida.

A despeito de otimizar a utilização da mão de obra especializada e dos recursos financeiros, materiais e de infraestrutura do laboratório, o equipamento automatizado de fermentação *in vitro* superestimou os valores de digestibilidade da matéria seca de alimentos volumosos e concentrados comumente utilizados na dieta de ruminantes. Isto condiciona a recomendação de seu emprego, na implementação de novos estudos, com ênfase naqueles relacionados ao material utilizado e na confecção dos sacos de incubação.

## AGRADECIMENTOS

*Ao Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES-JF) pela concessão de bolsa de Iniciação Científica ao terceiro autor deste trabalho.  
À Fapemig (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo apoio financeiro ao trabalho.*

## REFERÊNCIAS

ADESOGAN, A.T. Effect of bag type on the apparent digestibility of feeds in ANKOM Daisy<sup>II</sup> incubators. **Animal Feed Science and Technology**, v.119, n.3-4, p.333-344, 2005.

ADESOGAN, A.T. What are feeds worth?: A critical evaluation of selected nutritive values methods. In: ANNUAL FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 13., 2002, Gainesville. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida, 2002. p.33-47.

CAMPOS, F.P.; BOSE, M.L.V.; BOIN, 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.

FIGUEIREDO, M.; MBHELE, A.; ZONDI, J.A modification of the Daisy II-220 technique for the determination of *in vitro* dry matter digestibility. **South African Journal of Animal Science**, v.30, p.9-50, 2000. Suppl. 1.

MABJEESH, S.J.; COHEN, M.; ARIELI, A. In vitro methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: comparison of methods and inoculum sources. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.10, p.2289-2294, 2000.

MAGALHÃES, L.J.; CARNEIRO, J.C.; CAMPOS, D.S.; MAURÍCIO, R.M.; ALVIM, M.J.; XAVIER, D.F. Composição química, digestibilidade e fracionamento do nitrogênio e dos carboidratos de algumas espécies forrageiras. **Pasturas Tropicales**, v.25, n.1, p.33-37, 2003.

MORAES, E.H.B.K.; PULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T.; VALADARES FILHO, S.C.; MORAES, K.A.K. Avaliação qualitativa da pastagem diferida de *Brachiaria decumbens* Staf., sob pastejo, no período da seca, por intermédio de três métodos de amostragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.1, p.30-35, 2005

OLIVEIRA, M.D.S.; MORGAN, V.C. Efeito do tipo de material utilizado na confecção dos sacos de fermentação sobre a degradabilidade ruminal *in vitro* da matéria seca pelo fermentador ruminal Daisy II. **ARS Veterinária**, v.18, n.1, p.88-93, 2002.

QUEIROZ, D.S.; GOMIDE, J.A.; MARIA, J. Avaliação da folha e do colmo de topo e base de perfilhos de três gramíneas forrageiras. 1. Digestibilidade *in vitro* e Composição Química **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.1, p.53-60, 2000.

RIBEIRO, G.M.; OLIVEIRA, M.Dal.S. Digestibilidade *in vitro* do feno de alfafa obtida no fermentador ruminal Daisy II. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004.

SANTOS, G.T.; ASSIS, M.A.; GONÇALVES, G.D.; MODESTO, E.C.; CECATO, U.; JOBIM, C.C.; DAMASCENO, J.C. Determinação da digestibilidade *in vitro* de gramíneas do gênero *Cynodon* com uso de diferentes metodologias. **Acta Scientiarum**, v.22, n.3, p.761-764, 2000.

SANTOS, E.D.G.; PAULINO, M.F.; QUEIROZ, D.S.; VALADARES FILHO, S. C.; FONSECA, D.M.; LANA, R.P. Avaliação de pastagem diferida de *Brachiaria decumbens* Stapf: 1. Características químico-bromatológicas da forragem durante a seca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.1, p.203-213, 2004.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics**. Version 6.12. Cary, NC, 1997.

SILVA, J.S.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2002. 235p.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal of the British and Grasslands Society**, v.18, n.1, p.104-111, 1963.

TRAXLER, M.J.; ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P.J.; FOX, D.G; PELL, A.N.; KOMAREK, A.R. A comparison of methods for determining IVDMD a three periods using the filter bag technique versus conventional methods. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.274, 1995. Suppl. 1.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.

VAN SOEST, P.J.; WINE, R.H.; MOORE, L.A. Estimation of the true digestibility of forages by the *in vitro* digestion of cell walls. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 10., 1966, Helsinki. **Proceedings...** Helsinki: University of Helsinki, 1966. p.438-441.

VOGEL, K.P.; PEDERSEN, J.F.; MASTERSON, S.D.; TOY, J.J. Evaluation of a filter bag system for NDF, ADF, and IVDMD forage analysis. **Crop Science**, v.39, n.1, p.276-279, 1999.

WILMAN, D.Dr. & ADESOGAN, A. A comparison of filter bag methods with conventional tube methods of determining the *in vitro* digestibility of forages. **Animal Feed Science and Technology**, v.84, n.1/2, p.33-47, 2000.

Data de recebimento: 02/06/2010

Data de aprovação: 19/08/2011