



## Digestibilidade aparente e verdadeira da matéria seca de alimentos concentrados e de forrageiras tropicais, determinada por procedimentos *in vitro* automatizados

Jailton da Costa Carneiro<sup>1</sup>, Rosemeire Aparecida de Carvalho Dornellas<sup>2</sup>, Fernando César Ferraz Lopes<sup>3</sup>, José Alberto Bastos Portugal<sup>4</sup>, Rui da Silva Verneque<sup>5</sup>, Cláudio Ribeiro Ramos<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Juiz de Fora/MG. E-mail: [jailton@cnppl.embrapa.br](mailto:jailton@cnppl.embrapa.br).

<sup>2</sup>Estudante de Ciências Biológicas do CES-JF – Juiz de Fora/MG. Assistente da Embrapa Gado de Leite. Bolsista de IC do CES-JF. E-mail: [miererose@yahoo.com.br](mailto:miererose@yahoo.com.br).

<sup>3</sup>Analista da Embrapa Gado de Leite. E-mail: [fernando@cnppl.embrapa.br](mailto:fernando@cnppl.embrapa.br).

<sup>4</sup>Professor do CES-JF. E-mail: [portugal@cesjf.br](mailto:portugal@cesjf.br).

<sup>5</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite. E-mail: [rsverneq@cnppl.embrapa.br](mailto:rsverneq@cnppl.embrapa.br).

<sup>6</sup>Assistente da Embrapa Gado de Leite. E-mail: [claudio@cnppl.embrapa.br](mailto:claudio@cnppl.embrapa.br).

**Resumo:** Para otimizar o emprego de recursos financeiros e humanos, sistemas automatizados de fermentação *in vitro* foram desenvolvidos, permitindo processar maior número de amostras em relação ao método de dois estágios realizado em tubos individuais, e tradicionalmente adotado na determinação da digestibilidade *in vitro*. O refluxo com solução de detergente neutro em detrimento da utilização da pepsina ácida no segundo estágio da técnica permite a obtenção de resíduo de parede celular livre de material microbiano, viabilizando a determinação da digestibilidade verdadeira *in vitro*. Foi objetivo deste experimento, comparar valores de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de 20 amostras de suplementos concentrados e de forrageiras tropicais, realizando no segundo estágio da análise, incubação em solução ácida de pepsina ou refluxo em solução de detergente neutro, em equipamentos automatizados. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 6 (procedimentos utilizados no segundo estágio da técnica x classes de alimentos), com os alimentos sendo as repetições. O procedimento de refluxo com detergente neutro permitiu economia de tempo e recursos, com resultados semelhantes ( $P > 0,05$ ) aos obtidos por meio da incubação em pepsina ácida. Em ambos procedimentos houve superestimativa dos valores de DIVMS em relação aos publicados na literatura.

**Palavras-chave:** análise química, composição química, método de análise, nutrição de ruminantes

### Apparent and true dry matter digestibility of concentrate supplements and tropical forages determined by automatized *in vitro* procedures

**Abstract:** To optimize the financial and human resources automatized systems of *in vitro* fermentation had been developed, allowing to process greater number of samples in relation to the two-stage 48 h digestion technique carried through in individual sample digestion tubes, traditionally adopted for *in vitro* digestibility determination. Boiling the samples with neutral detergent after 48 h of incubation on fluid rumen instead of further 48 h acidified pepsin digestion allows to obtain cell wall residue free of microbial debris and to determine the *true in vitro* dry matter digestibility. The aim of this trial was to compare the *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) values of 20 tropical forages and concentrates, by doing, in the second digestion stage, incubation in acid pepsin solution or reflux with neutral detergent solution, using automatized equipment. The experimental design was completely randomized with a 2 x 6 factorial arrangement (true or apparent digestibility *in vitro* procedures x food classes), with foods being the repetitions. The procedure using reflux with neutral detergent was less expensive and time-consuming, and yield similar results ( $P > 0.05$ ) when compared to those from the methodology using 48 h acidified pepsin digestion. Both procedures overestimated the digestibility values in relation to the published ones.

**Keywords:** chemical analysis, chemical composition, method of analysis, ruminant nutrition

### Introdução

Equipamentos automatizados de determinação de digestibilidade *in vitro* de alimentos estão sendo atualmente comercializados, permitindo redução dos custos relacionados ao trabalho, e processando até 100 amostras por vez, coletivamente fermentadas em jarros de digestão, ao invés de individualmente incubadas em tubos, como no procedimento *in vitro* tradicional de TILLEY & TERRY (1963). Ademais,



permitted economy of space in the laboratory, and increase the safety of the laborers by reducing the manipulation of reagents (VOGEL et al., 1999), being its utilization in the analysis of digestibility of dry matter recommended by several authors (e.g. HOLDEN, 1999). The standard procedure of determination of digestibility *in vitro* in these equipments, is based on the utilization of synthetic bags containing the food object of the analysis, which are incubated in jars of fermentation filled with ruminal fluid tamponed and kept in condition of constant temperature (39°C), under automatic rotation. After 48 h, the drainage of the jars is done, adding acid solution of pepsin, and the bags containing the residues of the samples are incubated for another 48 h (VOGEL et al., 1999). The reflux with neutral detergent solution to the detriment of the utilization of acid pepsin in the second stage of the technique, allows not only economy of time of analysis, but also the obtaining of undigested residue of cell wall free of microbial material, making possible the determination of true digestibility *in vitro* of the sample (VAN SOEST, 1994).

The objective of this experiment was to compare values of digestibility *in vitro* of dry matter of concentrated feeds and tropical forages, realizing incubation in acid solution of pepsin or reflux with neutral detergent solution in the second stage of analysis realized in automated fermentation equipment.

### Material e Métodos

The experiment was conducted in the Digestibility Laboratory of Embrapa Gado de Leite (Coronel Pacheco, MG). Two automated *in vitro* procedures for determination of apparent or true digestibility of dry matter were used, respectively: 1) incubation in acid solution of pepsin for 48 h; or 2) reflux with neutral detergent solution. Six classes of feeds commonly used in the formulation of diets for bovines (Table 1), were: (1) four extruded samples of tropical forages; (2) four samples of sugarcane; (3) four samples of leguminous forages; (4) four samples of tropical grasses; (5) two samples of protein concentrates; and (6) two samples of energetic concentrates. The samples of feeds were pre-dried in a forced ventilation oven (72 h, 55°C) and milled (1 mm).

Table 1 Chemical composition (% of dry matter) of the feeds evaluated in the study<sup>a</sup>

Alimentos	PB	FDN	FDA
Extrusa de capim-elefante ( <i>Pennisetum purpureum</i> ) – pastagem com 30 dias de descanso - 1 <sup>o</sup> dia de pastejo	15,4	72,2	41,1
Extrusa de capim-elefante (45 dias de descanso; 1 <sup>o</sup> dia de pastejo)	10,5	77,0	46,6
Extrusa de <i>Cynodon</i> spp. (28 dias de descanso; estação das chuvas)	14,6	64,0	28,6
Extrusa de <i>Cynodon</i> spp. (38 dias de descanso; estação da seca)	14,3	60,5	34,0
Cana-de-açúcar ( <i>Saccharum officinarum</i> , L.) – cultivar CB-47355	2,9	51,6	31,4
Cana-de-açúcar – cultivar SP-811520	2,9	53,8	34,1
Cana-de-açúcar – cultivar NA-5679	1,4	48,9	31,2
Cana-de-açúcar – cultivar IAC 915156	3,5	49,1	35,3
<i>Cratylia argentea</i>	20,4	50,1	35,8
Amendoim-forrageiro ( <i>Arachis pintoi</i> ) – 20 dias de crescimento	12,8	52,2	44,0
Feijão-guandu ( <i>Cajanus cajan</i> ) – 5 meses de rebrota	16,8	50,0	39,8
Leucena ( <i>Lecaena leucocephala</i> ) – 1 ano de rebrota	28,8	30,3	25,9
<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
Farelo de soja	50,2	9,8	-
Farelo de algodão	40,4	31,8	22,5
Fubá de milho	10,4	6,9	3,5
Farelo de trigo	17,8	-	-

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

The samples of feeds belonging to classes (1), (2) and (5) were incubated in duplicate in two of the four fermentation jars of the “Incubadora *In vitro*” model TE-150 (Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP), in bags made of TNT-100 (Tecido-não-tecido, 100% polypropylene; 5,5 x 5,5 cm). Besides these, two empty bags (“blank test”) and two others containing a sample of known digestibility feed (“reference feed”), totaling 24 bags in each of the two fermentation jars, which contained 1.200 mL of solution



tamponada (pH final = 6,98), preparada utilizando-se relação 4:1 (v/v) de saliva artificial e líquido ruminal, coletado de vaca Holandês x Zebu fistulada no rúmen, mantida em pastagem formada por forrageiras de clima tropical. O mesmo procedimento foi adotado na incubação das amostras pertencentes às classes de alimentos (3), (4) e (6). Depois de 48 h de incubação, dois jarros contendo amostras dos alimentos pertencentes à cada classe avaliada foram retirados, sendo os sacos de incubação encaminhados para refluxo (60 minutos) 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 secos em estufa regulada a 55°C, e pesados, visando aos cálculos de digestibilidade verdadeira *in vitro* da MS. Nos outros dois jarros de fermentação, foram adicionados 96 mL de ácido clorídrico (HCl) a 7,4% (v/v) e 48 mL de pepsina 1:10.000 a 5% (p/v). Depois de 48 h de incubação, foram lavados em água corrente (até a mesma tornar-se límpida), secos em estufa (55°C) e pesados, visando aos cálculos de digestibilidade aparente *in vitro* da MS. O inóculo dispensado nos quatro jarros de fermentação da “Incubadora *In vitro*” foi obtido de uma mesma alíquota, processada em quantidade suficiente para, sendo a temperatura de incubação mantida em 39°C. O experimento foi analisado, utilizando delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 6 (dois procedimentos *in vitro* de determinação da digestibilidade x seis classes de alimentos), com os alimentos de cada classe sendo as repetições.

### Resultados e Discussão

De modo geral, os valores de digestibilidade da MS determinados pelos dois procedimentos *in vitro* avaliados foram superiores àqueles publicados na literatura para alimentos similares. Da mesma forma, para o “alimento-padrão”, foram observados coeficientes de digestibilidade *in vitro* superiores em relação ao valor real. Vários autores relataram que coeficientes de digestibilidade *in vitro* determinados em sistemas automatizados de fermentação foram superestimados em relação àqueles obtidos de métodos tradicionais, realizados em tubos individuais (VOGEL et al., 1999). No presente estudo observou-se que os sacos confeccionados com TNT-100 freqüentemente desfiavam-se, facilitando a adesão de partículas suspensas da solução tamponada. Houve efeito de classe de alimentos ( $P < 0,0017$ ), mas não foi observada diferença ( $P > 0,05$ ) nos valores de digestibilidade aparente e verdadeira da MS, determinados pelos dois procedimentos *in vitro*. Também não foi observada interação entre os fatores estudados ( $P > 0,05$ ). Em 14 dos 20 alimentos avaliados, houve maior precisão nos resultados obtidos a partir do emprego do procedimento de determinação da digestibilidade verdadeira da MS, haja vista ter apresentado os menores desvios-padrão das médias.

### Conclusões

A adoção do refluxo com solução de detergente neutro no segundo estágio do método de determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca permite 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 dos recursos humanos, financeiros e de infra-estrutura do laboratório, o emprego do equipamento automatizado de fermentação para determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca deve estar condicionado aos resultados decorrentes da implementação de novos estudos, com ênfase nos relacionados ao material utilizado na confecção dos sacos de incubação.

### Agradecimentos

À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade de realização do trabalho e ao Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES-JF) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

### Literatura citada

HOLDEN, L. A. Comparison of methods of *in vitro* dry matter digestibility for ten feeds. **J. Dairy Sci.**, v. 82, n. 8, p. 1791-1794, 1999.

SILVA, J. S.; QUEIROZ, A. C. da. **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. **J. Brit. Grassl. Soc.**, v. 18, p. 104-111, 1963.

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

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