

---

## **AVALIAÇÃO DE ALIMENTOS**

---

### **PELA TÉCNICA SEMI-AUTOMÁTICA**

---

### **IN VITRO DE PRODUÇÃO**

---

### **DE GASES: UMA REVISÃO**

---

PAULO CESAR MOREIRA  
**RONALDO BRAGA REIS**  
ROBERTO DE CAMARGO WASCHECK  
**ROGÉRIO MARTINS MAURÍCIO**  
ALBERTO CORREA MENDONÇA  
**APÓSTOLO FERREIRA MARTINS**  
ALECSSANDRO REGAL DUTRA  
**PAULO ROBERTO DE SOUZA**  
SÉRGIO RENATO ARTIAGADA ROSA  
**OTÁVIO CORDEIRO DE ALMEIDA**

*Resumo: procurou-se mostrar, no presente estudo, a aplicação da técnica semi-automática in vitro de produção de gases para avaliação de alimentos. É uma técnica não invasiva que reproduz eficientemente o modelo de fermentação da microbiota do trato digestório. Além disso é barata, acessível, de fácil execução e pode, com mínimos recursos, ser implantada com rapidez e eficiência. Apesar de recente, essa técnica vem se difundindo com boa aceitação para simulação laboratorial da cinética da digestão e da qualidade dos alimentos.*

*Palavras-chave: produção de gás in vitro, alimentos, animais*

**O**s modelos dinâmicos da digestão fornecem estimativa dos valores nutritivos dos alimentos, com a mudança da dieta, da população microbiana e do estado fisiológico do animal, além de informações sobre os fatores que deprimem os processos digestivos (MERTENS, 1993). Com a estimativa das variáveis da cinética dos nutrientes no trato gastrintestinal, é possível o fornecimento de dietas mais adequadas que visem à

máxima eficiência de síntese de proteína microbiana e à redução das perdas energéticas e nitrogenadas decorrentes da fermentação ruminal, com observação, entre os alimentos, da sincronização na degradação de nitrogênio e carboidratos no rúmen.

Os sistemas atuais de adequação de dietas para ruminantes necessitam de informações sobre o alimento no que diz respeito às suas frações de carboidratos e proteínas, bem como de suas taxas de digestão, para que se possa estimar com maior exatidão o desempenho dos animais e maximizar a eficiência de utilização dos nutrientes (RUSSELL *et al.*, 1992; SNIFFEN *et al.*, 1992; FOX *et al.*, 1992).

Os métodos para avaliar alimentos para ruminantes, até o início do ano de 1980, forneciam apenas estimativa da digestibilidade potencial dos alimentos, com pouca referência à dinâmica da fermentação ruminal. Uma segunda geração dos métodos foi desenvolvida, incorporando estimativas da cinética de degradação do retículo-rúmen (VALENTIN *et al.*, 1999).

Muitos métodos estimam a digestibilidade ou degradabilidade para prever o valor nutritivo dos alimentos. Técnicas *in vitro* permitem a avaliação rotineira da fermentação no rúmen empregando a fração líquida do conteúdo ruminal como inóculo, como a desenvolvida por Tilley e Terry (1963), ou do método de produção de gases (MENKE *et al.*, 1979). Diversos estudos têm indicado que, no método *in vitro*, a digestibilidade da MS ou da fibra inicia-se na própria forragem, independentemente da fonte de inóculo ruminal (MARINUCCI *et al.*, 1992). Entretanto, outros estudos indicam que há efeitos significativos da fonte de inóculo sobre a digestibilidade da MS (NELSON *et al.*, 1973; GRANT *et al.*, 1974). Atualmente, metodologias de avaliação dos alimentos para ruminantes objetivam rapidez, baixo custo e confiabilidade. Uma técnica *in vitro* rápida segura e de boa precisão foi desenvolvida por Pell, Schofield e Stone (1994). Ela avalia a digestibilidade do alimento *in vitro* quanto à produção cumulativa de gases, (CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>).

A técnica de produção de gases foi descrita a partir dos anos 40 (QUIM apud GETACHEW *et al.*, 1998). Um método manométrico para mensuração de microrganismos ruminais foi descrito por McBee em 1953. Posteriormente esse método foi modificado por Hungate (PELL *et al.*, 2000). A técnica com se-

ringas graduadas impulsionou as técnicas existentes, permitindo mensuração mais acurada dos gases oriundos do processo fermentativo (MENKE *et al.* apud PELL *et al.*, 1994).

A técnica de produção de gases mede tanto a digestibilidade de uma forragem como os parâmetros cinéticos da digestão, baseada na liberação dos produtos de fermentação. Trata-se de uma técnica simples, confiável e de baixo custo, tornando-a atrativa para qualquer laboratório envolvido em estudos de forragem para ruminantes. A sua investigação envolve um animal canulado no rúmen e permite trabalhar com várias amostras por corrida. O seu potencial para uso na pesquisa com ruminantes é muito amplo e essa pesquisa vem despertando grandes interesses em muitos laboratórios espalhados pelo mundo.

O método com a inclusão de sistema computadorizado de monitoramento automático da digestão apresentou aumento de sua praticidade e de sua precisão. Com esse sistema, são obtidas estimativas do tempo de colonização, a taxa de degradação e a extensão da degradação mais rapidamente que em outras técnicas.

O método de Menke *et al.* (1979) consiste na medida direta do volume de gás sob condições normais de pressão atmosférica, necessitando de constante assistência do técnico de laboratório. No entanto, Valentin *et al.* (1999), comparando as técnicas de degradabilidade *in vitro* e a produção de gases pelo método de Menke *et al.* (1979), concluíram que as correlações entre os resultados das duas metodologias não foram suficientemente fortes para prever parâmetros de degradabilidade, provenientes dos parâmetros de produção de gases. Por outro lado, Pell e Schofield (1993) e Theodorou *et al.* (1994) aperfeiçoaram a metodologia de produção de gases que são acumulados em frascos de volume fixo, conhecido e calculado segundo as variações na pressão, o que a tornou mais precisa, confiável e segura.

Considerando as vantagens da técnica de produção de gases, como sua simplicidade de uso e a possibilidade de processar grande número de amostras em curto espaço de tempo, é importante testar esta técnica com fontes alternativas de alimentos para ruminantes, buscando validar correlações entre a degradabilidade *in situ* e os parâmetros de produção de gases (BARCELOS *et al.*, 2001). A técnica com monitoramento computadorizado de produção de gases para avaliar *in vitro* a degradação de

forragens, desenvolvida por Pell e Schofield (1993), baseia-se no fato de os produtos da fermentação resultarem da fermentação dos carboidratos (solúveis e insolúveis). Portanto, as taxas de degradação, calculadas com base na produção de gases, refletem as taxas das frações solúveis e insolúveis.

Segundo estes mesmos autores, nas condições em que os nutrientes não sejam limitantes, a produção de gases pode ser a medida direta do crescimento microbiano e, em alguns aspectos, pode ser o melhor índice para medir a energia metabolizável produzida.

A técnica de produção de gases considera a conversão de todas as principais fontes ricas de energia metabolizável, como pectinas, amido, celulose e hemicelulose, em CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>. Assim, esse método pode ser utilizado para determinar a importância de algumas dessas diferentes frações do alimento quanto a fornecer energia aos microorganismos (PELL e SCHOFIELD, 1993).

A técnica de produção de gases (MENKE *et al.*, 1979; PELL e SCHOFIELD, 1993; THEODOROU *et al.*, 1994) consiste basicamente em medir a produção total de gás liberada pela fermentação de uma amostra incubada em líquido ruminal tamponado. As vantagens dessa técnica sobre as outras técnicas *in vitro*, como a de Tilley e Terry (1963) para a avaliação de alimentos, foram destacadas por Blümmel e Ørskov (1993), e Makkar *et al.* (1995). Outros métodos *in vitro* são baseados em mensurações gravimétricas que seguem o desaparecimento do substrato (componentes que podem ou não contribuir para a fermentação), enquanto a mensuração de gás se concentra no surgimento de produtos de fermentação (substâncias solúveis, mas não fermentáveis, não contribuem para a produção de gases). Essa diferença no princípio do método faz com que essa técnica apresente alta correlação com a digestibilidade *in vivo*. Além disso, o método de produção de gases tem como vantagem determinar a cinética de fermentação em uma única amostra, sendo necessária uma quantidade relativamente pequena, permitindo que um maior número de amostras possa ser avaliado ao mesmo tempo. Esse método apresenta como desvantagem o baixo peso da amostra a ser incubada, o que dificulta a homogeneidade do material.

Um modelo matemático de interpretação para a produção acumulada de gases foi proposto por France *et al.* (1993). Esse

modelo estima a degradação ruminal dos alimentos pela microbiota e a produção de gases, expressando seus resultados numa curva específica, tendo sido usado correntemente para estimativas de avaliações semelhantes.

Theodorou *et al.* (1994) apresentaram a simplificação do método de determinação da cinética de fermentação de alimentos em ruminantes pela técnica de produção de gases, usando um transdutor para leitura. O método do transdutor de leitura, acoplado a uma seringa para verificação da pressão cumulada de gases, através da técnica semi-automática, foi utilizado por Maurício *et al.* (1998) propondo-se alterações na técnica anterior. Resultados semelhantes com utilização da técnica semi-automática de produção de gases e leitura através de transdutor acoplado foram obtidos em estudos posteriores de avaliação de alimentos para ruminantes por Maurício *et al.* (1999b), comparando os resultados com os obtidos por Theodorou *et al.* (1994). A medida da pressão foi usada para estimação da produção acumulada de gás, por meio de uma função quadrática derivada simultaneamente da medida da pressão e do volume dos gases para obtenção da avaliação final. Os autores implementaram modificações na técnica a fim de reduzirem-se os erros operacionais e a redução no volume de material utilizado (frascos). A etapa da mensuração do volume de gases na seringa foi abolida e a leitura passou a ser realizada apenas com um transdutor de pressão. Esse é diretamente conectado com uma agulha hipodérmica a um mostrador digital que, por sua vez, está ligado a um computador. Essa conexão entre o mostrador e o computador permite o registro da pressão dos gases existentes nos frascos automaticamente. No momento da leitura, os frascos são retirados da estufa, ventilada a 39°C, para introdução manual das agulhas, conectadas ao transdutor, nas tampas de borracha dos frascos. Após a leitura, o transdutor é removido, mas a agulha permanece no frasco, inserida na tampa de borracha, permitindo a saída dos gases do interior do mesmo frasco e igualando-se as pressões, do frasco e a atmosférica. Após a estabilização, a agulha é retirada, e os frascos retornam à estufa ventilada, permanecendo lá até a próxima leitura. Os frascos são retirados da estufa em horários pré-determinados para leitura da pressão dos gases e determinação gravimétrica da degradação da matéria orgânica

e da matéria seca. O processo de fermentação para as leituras gravimétricas é interrompido pelo abaixamento rápido da temperatura dos frascos a 4°C, obtido pela manutenção dos mesmos em freezer comum. O material é então filtrado em cadinhos de vidro com porosidade um micra (1µ). O resíduo da filtragem é seco em estufa e, posteriormente, calcinado, para determinação da degradação da matéria seca e da matéria orgânica. Conclui-se que a técnica utilizada é mais simples, de baixo custo operacional e de alta capacidade de avaliação da produção cumulativa de gás, facilitando sua utilização em sistemas de complexidade variável e utilizações impróprias.

Em sua revisão, Getachew *et al.* (1998) estabeleceram associações entre a fermentação ruminal e a produção de gases, referenciando que essas avaliações quantitativas advêm dos anos 1940. Os autores descrevem a técnica para avaliação de alimentos pela produção cumulativa de gás, ressaltando suas vantagens e desvantagens, com ênfase para a estequiometria e origem dos gases produzidos. Salienta-se, nesse estudo, a consideração da incorporação do substrato pela microbiota para mensuração e acurácia eficazes. Salienta-se ainda que, quando se incuba alimentos *in vitro* em líquido ruminal tamponado, ocorrem fermentação dos carboidratos em AGV's, gases diversos (principalmente CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>) e células microbianas. Para Blümmel e Ørskov (1993), os gases produzidos e mensurados na técnica *in vitro* de produção de gases são oriundos de duas fontes: da produção direta de gases (CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>), com base na fermentação microbiana dos substratos utilizados (1); e da produção indireta, quando os gases produzidos são oriundos da reação entre os AGV's e a solução tampão (CO<sub>2</sub>, liberado com base no bicarbonato presente no tampão) (2).



(1)



(2)

A produção de gases é basicamente o resultado da fermentação microbiana dos açúcares em acetato, propionato e butirato (WOLIN, 1983). Outras substâncias podem, no entanto, ser meta-

bolizadas ou influenciar no metabolismo da microbiota alterando seu crescimento e, em conseqüência, a produção de gases. Como exemplo citam-se o amido, a glicose e a arabinose, que possuem produções de gases similares. O volume de gases produzido do malato e do citrato é, aproximadamente  $\frac{1}{3}$  e  $\frac{2}{3}$  do produzido por esses açúcares, respectivamente (PELL *et al.*, 2000). Além da produção diferenciada de gases entre os açúcares e ácidos orgânicos, os últimos são intermediários de vias metabólicas, influenciando o desenvolvimento da microbiota (MARTIN, 1998; LOPEZ *et al.*, 1999).

As produções direta e indireta de gases estão diretamente relacionadas à produção de AGVs. Experimentos de Blümmel e Ørskov (1993), Getachew *et al.* (1993) e Getachew *et al.* (2000) relacionam correlação acentuada entre a produção de AGV's e o volume dos gases produzido *in vitro*.

Gizzi *et al.* (1998) compararam os parâmetros de fermentação ruminal obtidos com técnica *in vitro* com culturas estritamente anaeróbicas e com a técnica *in vivo*, analisando a composição da microbiota, os parâmetros bioquímicos do fluido ruminal e a degradabilidade do alimento. Nos tempos de incubação estudados, os resultados de degradabilidade e os parâmetros do fluido ruminal foram similares em ambas as técnicas.

A estimação da cinética da degradação ruminal da matéria seca e da FDN foi estudada por Malafaia *et al.* (1999) através da técnica semi-automática de produção de gases. Os autores estimaram a produção cumulativa de gás de algumas forrageiras tropicais e da silagem de milho e encontraram um coeficiente de variação em ambas as variáveis – MS e FDN –, especialmente após 12 horas de incubação. Uma forte correlação linear foi encontrada entre a produção cumulativa de gás e a degradação da FDN.

Olivera (1998) utilizou a técnica semi-automática de produção de gases *in vitro* para estimar as frações solúveis e insolúveis de forragens. O autor comparou amostras integrais, lavadas em sacos de náilon, e lavadas e filtradas em papel de filtro n. 1 (Whatman). A produção de gases foi significativamente mais alta nas forragens integrais. A taxa de produção de gases na fração insolúvel foi similar nas amostras provenientes dos sacos de náilon e nas amostras filtradas em papel de filtro, sugerindo diferenças entre os métodos.

A estimativa de digestão de carboidratos não-fibrosos (CNF) e da fração insolúvel em detergente neutro (FDN) foi avaliada pela técnica semi-automática *in vitro* de produção de gases no capim elefante e Tifton 85, em idades diferentes de corte, feno de alfafa e de Coast cross, silagens de milho, sorgo e cana-de-açúcar. O capim elefante e o capim tifton 85 apresentaram pequena e elevada produção de gases, respectivamente. O feno de alfafa, as silagens de milho e sorgo, e a cana-de-açúcar apresentaram elevado volume de gás oriundo dos CNF (CABRAL *et al.*, 2000).

Campos *et al.* (2000a) realizaram testes preliminares de um sistema computadorizado de monitoramento da produção de gases *in vitro*. O objetivo foi de facilitar os estudos da degradação das frações solúveis e insolúveis das forragens, quantificados pela produção de CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, provenientes do metabolismo microbiano ruminal, medidas por um sensor de pressão. Avaliou-se a quantidade de amostra (50 a 110mg de feno de alfafa), além da quantidade de fluido ruminal (2 a 3mL), com ou sem barras magnéticas agitadoras no frasco, para 100 mg de feno de alfafa. Concluíram que 100mg de amostra em 2 mL de fluido ruminal, sem barra magnética agitadora, proporcionaram menores coeficientes na variação da produção de gases e, em consequência, maior precisão na curva de digestão. O mesmo sistema de monitoramento computadorizado da produção de gases foi usado por Campos *et al.* (2000b), comparado aos métodos *in vivo* e *in situ*, para a matéria seca de silagens de milho com alto/baixo teores de matéria seca, com/sem inoculante. A digestibilidade das silagens com alto teor de matéria seca, com/sem inoculantes não apresentou diferenças entre os métodos utilizados. Quanto ao efeito do inóculo, separadamente, diferiu nos métodos *in vitro*/gás e *in situ*, mas não no *in vivo*. Não houve diferenças na digestão da FDN das silagens com alta ou baixa MS, inoculadas ou não. O desaparecimento da MS e FDN quantificada pelo resíduo no sistema *in vitro*/gás foi semelhante aos demais métodos avaliados. Em trabalho semelhante de comparação, Campos *et al.* (2000c) avaliaram a digestibilidade da MS das silagens pelo gás produzido na fermentação, através dos resultados da extensão da degradação (A + D), e não encontraram diferença entre os tratamentos analisados.



A digestibilidade *in vitro* da matéria seca de quatro volumosos exclusivos e suas combinações na proporção de 50% na MS, pela produção de gases, foi avaliada por Campos *et al.* (2001). Avaliou-se cana-de-açúcar; cana-de-açúcar + silagem de milho; cana-de-açúcar + capim elefante com 60 dias; cana-de-açúcar + capim elefante com 180 dias; silagem de milho; silagem de milho + capim elefante com 60 dias; silagem de milho + capim elefante com 180 dias; capim elefante com 60 dias e capim elefante com 180 dias. Os autores concluíram que a associação de volumosos, em alguns casos, pode diminuir a digestibilidade da MS de volumosos de melhor qualidade. Sugeriram também que a proporção de 50% de MS de associação de volumosos ao capim elefante, com 60 dias, pode ser uma alternativa viável em nutrição de ruminantes, porém com menores taxas de degradação.

Gonçalves *et al.* (2001) estudaram a cinética de degradação ruminal de carboidratos de amostras de feno de alfafa, capim elefante, feno de Tifton 85 e silagem de milho fornecidas a cabras, em diferentes proporções concentrado:volumoso. Os autores utilizaram a técnica de produção cumulativa de gases *in vitro*, para a degradabilidade da FDN em diferentes pH, comparando os resultados com as técnicas *in vivo* e *in situ* para a degradabilidade específica e a fração potencialmente digerível (c). Observou-se a interferência do pH sobre parâmetros de cinética da degradação ruminal dos carboidratos. O comportamento da FDN foi similar nas três técnicas, concluindo-se que a técnica de produção cumulativa de gases *in vitro* é eficiente para estimar as taxas de degradação ruminal da FDN.

Rodrigues *et al.* (2002) avaliaram quatro genótipos de sorgo pela técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases, de acordo com o proposto por Maurício (1999a), e concluíram que os compostos fenólicos presentes no sorgo podem influenciar negativamente a degradabilidade do alimento.

Azevêdo *et al.* (2003) verificaram a composição químico-bromatológica, o fracionamento de carboidratos fibrosos e não-fibrosos e a cinética da degradação *in vitro* de três variedades de cana-de-açúcar. Os resultados obtidos pela técnica gravimétrica mostraram diferenças no tempo de colonização e degradabilidade efetiva da FDN entre as variedades estudadas. A produção máxima de gás dos CNF também apresentou diferenças entre as

variedades. Relata-se também a obtenção de resultados melhores pela técnica de produção de gases em relação à técnica gravimétrica. O fracionamento e cinética da degradação *in vitro* dos carboidratos da cana-de-açúcar com diferentes ciclos de produção, em três idades de corte, também foram estudados por Fernandes *et al.* (2003). Os parâmetros cinéticos não apresentaram diferenças entre as variedades, e a curva de produção cumulativa de gases mostrou-se adequada.

Maurício *et al.* (2003) estabeleceram equação para estimação do volume de gases produzidos nos frascos, com a utilização da técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases, por meio dos dados de pressão e volume obtidos manualmente, durante a fermentação de diferentes substratos, com base em 1036 dados de pressão e volume:  $V = -0,004 \text{ (s.e. } 0,06) + 4,43P \text{ (s.e. } 0,043) + 0,051 P^2 \text{ (s.e. } 0,007)$ , com  $R^2 = 0,99$ . Essa equação embasa a técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases do Laboratório de Nutrição do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG.

A avaliação de dietas em vacas leiteiras com silagens de girassol, silagens de milho e associações foi feita por Leite *et al.* (2004), pela técnica “*in vitro*” semi-automática de produção de gases. Os resultados foram comparados aos obtidos pela digestibilidade através da coleta total de fezes e os autores constataram que a técnica de produção de gases estimou de forma precisa a digestibilidade “*in vivo*” ( $r^2 = 0,93$ ). Eles verificaram ainda que aumento na adição de silagem de girassol promoveu aumento na taxa de produção de gases.

Em experimento relativo à textura de grãos, Pereira *et al.* (2004) testaram a degradabilidade ruminal de dois híbridos dentados e dois híbridos duros de milho. Os autores concluíram que a utilização de híbridos dentados, pode reduzir a queda na digestão ruminal do amido em situações de colheita tardia de grãos comparados à utilização de híbridos duros.

## MATERIAL

Podem-se utilizar como substrato alimentos volumosos (cana-de-açúcar; silagens de milho, sorgo, resíduo de milho, capins

etc.) ou concentrados diversos – protéicos, energéticos, acrescidos ou não de outros alimentos.

Os substratos devem ser pré-secos em estufas de ventilação forçada a 60°C por 48 horas. Depois devem ser moídos em moinho mecânico com peneira de 5 mm (forrageiras) e 1 mm (concentrados), para determinação da matéria seca (MS) em estufa a 105°C (AOAC, 1990), proteína bruta (PB) pelo método de Kjeldhal (AOAC, 1990) e componentes da parede celular, pelo método de detergentes (VAN SOEST *et al.*, 1991).

### Coleta do Inóculo e Preparo do Meio de Cultura

Para coleta do líquido ruminal (inóculo), utiliza-se uma vaca não lactante, ou um bovino macho, provida de cânula ruminal permanente e adaptada às dietas balanceadas.

A coleta será realizada manualmente no saco ventral do rúmen, quatro horas após a alimentação. O líquido ruminal deve ser filtrado em gaze tipo queijo e acondicionado em garrafas térmicas pré-aquecidas com água a 39°C. O inóculo será composto por uma amostra de líquido ruminal retirado da vaca citada. O meio a ser utilizado deve ser o “tampão de McDougal” (MCDUGAL, 1949; MAURÍCIO *et al.*, 2001).

Depois de preparada, a solução tampão será colocada em banho-maria e adicionada, para cada litro de tampão, uma solução redutora preparada momentos antes, composta de 891 mg de HCl mais cisteína e 891 mg de sulfeto de sódio (Na<sub>2</sub>S), 5,7 mL de NaOH 1 N e água destilada até o volume de 77 mL; esse volume é calculado para manter uma relação solução tampão:solução redutora de 26:2. Então, a solução será borbulhada com CO<sub>2</sub>, para atingir pH entre 6,8 – 6,9.

### Incubação

Para as incubações, toma-se uma amostra de aproximadamente 1g de alimento a ser analisado, pesando-se em balança digital um grama (1g) de matéria seca da mistura, conforme os tratamentos propostos. As amostras dos substratos acrescidos ou não de concentrados energéticos, em triplicata, serão colocadas em frascos de vidro com capacidade de 160mL, no volume de

um grama, acrescentados nesses 90mL de meio de cultura tamponado (preparado de acordo com Maurício et al., 1999a). Então, os frascos serão aspergidos novamente com CO<sub>2</sub>, imediatamente tampados com rolha de borracha e colocados em banho-maria a 39oC (MALAFAIA, 1997). Para cada tempo dos tratamentos serão incubados dois frascos “brancos”, apenas com inóculo e solução tampão, para funcionar como “controle”, quantificando-se assim a produção de gases oriunda da fermentação produzida pelo inóculo. Para evitar contaminações e/ou fermentação antes da adição do inóculo, os frascos serão mantidos em geladeira comum a uma temperatura de 4°C. Cinco horas antes da inoculação, os frascos serão retirados da geladeira e levados para estufa de ventilação forçada a 39oC. A inoculação será realizada através da injeção de 10mL de líquido ruminal em cada frasco, sob aspersão contínua de CO<sub>2</sub>, para manter-se anaerobiose. Após a inoculação, os frascos serão novamente fechados com tampas de borracha siliconizada. A fim de garantir-se pressão uniforme em todos os frascos, inserir-se-á uma agulha (25x0,7mm) em cada um dos vidros, perpassando-se as tampas de borracha, possibilitando-se assim o equilíbrio entre a pressão interna dos frascos e a pressão atmosférica. Após o procedimento, as agulhas serão retiradas e o material é novamente levado à estufa de ventilação forçada a 39 °C, sendo retirado apenas nos tempos de leitura.

### Coleta de Dados

O volume de gases é estimado através da equação proposta por Maurício et al. (1999). As leituras de pressão e volume dos gases são obtidas por meio de um transdutor (0-1 kgf/cm<sup>2</sup>) acoplado a uma seringa metálica (20mL), nos seguintes tempos: 2, 4, 6, 8, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 48, 72 e 96 horas após o início da incubação. Com o somatório do volume de gás para cada tempo de leitura, são construídas as curvas de produção cumulativa dos gases oriundos da degradação da MS e MO, para cada tempo de incubação, método esse denominado “curva de subtração”.

Para análise da degradação da MS e MO, retiram-se os frascos em triplicata nos tempos 2, 6, 12, 24, 48 e 96; elas são obtidas por diferença de peso das amostras, antes e depois de incubadas. Os resíduos de fermentação são obtidos através de filtragem do

conteúdo dos frascos em cadinhos de porosidade 1  $\mu$  (Pirex - Vidrotec®), forrados com lã de vidro. Os cadinhos serão secos por 24 horas em estufa a 100 °C e pesados para cálculo dos valores da degradabilidade da matéria seca (DMS).

A produção cumulativa de gases e a degradabilidade da matéria seca (DMS) são determinadas com produção de equações de regressão. O modelo de France et al. (1993) é utilizado para relatar o potencial máximo de produção de gases (A), tempo de colonização (Lag), taxa de produção de gases ( $\mu$ ), e os valores de degradabilidade efetiva, para as taxas de passagem de 0,02/h, 0,05/h e 0,08/h.

Após a filtração do material incubado em cadinhos de vidro de 1  $\mu$ , retira-se com pipeta 5mL do líquido nos tempos 2, 6, 12, e 24 horas pós-incubação, sendo armazenados em vidro âmbar de 90mL, perfazendo-se três repetições por tratamento, e acondicionados em freezer vertical para análise posterior. As leituras são realizadas por cromatografia de camada líquida com base em padrões pré-determinados para os ácidos, acético, propiônico e butírico.

### Manipulação dos Dados

Os valores do volume acumulado de gases e taxa de degradação são submetidos à análise estatística de acordo com os parâmetros de France et al. (1993), determinando-se o potencial máximo de produção de gases (A), o tempo de colonização (L), e a taxa de produção de gases ( $\mu$ ), através do programa MLP (Ross, 1980), assim exposto:

$$\mu = b + c / z (\sqrt{t})$$

segundo a qual:

$\mu$  = taxa de produção de gases (mL/h)

t = tempo de incubação

“b” e “c” = constantes

Calculam-se ainda taxas de degradabilidade efetiva da matéria seca para as taxas de passagem de 2%/H, empregando-se a equação proposta por France et al. (1993).

$$Y = A - B \times Q_t \times Z \sqrt{t}$$

Segundo a qual:

Y = produção de gases (mL)

T = tempo de incubação

A = valor assintótico do pool de gases (mL)

B =  $A(bt + c\sqrt{t})$  (sem valor biológico)

Q = e-b

Z = e-c

As médias verificadas são tratadas por contrastes ortogonais de acordo com o pacote estatístico SAS® (1999)

## Referências

AOAC: Association of Official Analytical Chemists. Official methods of the Association of Official Analytical Chemist. 15. ed. Washington, 1990. V.1.

AZEVEDO, J. A. G. et al. Composição químico-bromatológica, fracionamento de carboidratos e cinética da degradação in vitro da fibra de três variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). R. Bras. Zootec., v.32, n. 6, p.1443-1453, 2003.

BARCELOS, A.F. et al. Avaliação da casca e da polpa desidratada de café (*Coffea arabica* L.) pela técnica de degradabilidade in vitro de produção de gases. R. Bras. Zootec., Viçosa, v. 30, n. 6, p. 1829-1836. 2001.

BLÜMMEL, M.; ØRSKOV, E. R. Comparison of gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. Anim. Feed Sci. Techn., v. 40, p.109-119, 1993.

CABRAL, L.S. et al. Frações de carboidratos de alimentos volumosos e suas taxas de degradação estimadas pela técnica de produção de gases. R. Bras. Zootec., v. 29, n. 6, p. 2087-2098, 2000. Supl. 1.

CAMPOS, F.P. et al. Avaliação do sistema de monitoramento computadorizado de digestão in vitro. 1. Testes preliminares. R. Bras. Zootec., v. 29, n. 2, p. 525-530, 2000a.

CAMPOS, F.P. et al. 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 forragem. R. Bras. Zootec., v. 29, n. 2, p. 531-536, 2000b.

CAMPOS, F.P. et al. Avaliação do sistema de monitoramento computadorizado de digestão in vitro. 3. Desaparecimento da matéria seca e/ou FDN pela produção de gases. R. Bras. Zootec., v. 29, n. 2, p. 537-544, 2000c.

CAMPOS, F.P. et al. Digestibilidade in vitro/gás de volumosos exclusivos ou combinados avaliados pelo resíduo remanescente da digestão da matéria seca e produção de gases. R. Bras. Zootec., v. 30, n. 5, p.1579-1589, 2001.

FERNANDES, A. M. et al. Fracionamento e cinética da degradação *in vitro* dos carboidratos constituintes da cana-de-açúcar com diferentes ciclos de produção em três idades de corte. R. Bras. Zootec., v. 32, n. 6, p.1778-1785, 2003. Supl. 1.

FOX, D.G. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle requirements and diet adequacy. J. Anim. Sci., v. 70, n. 12. p. 3578-3596. 1992.

FRANCE, J. et al. A model to interpret gas accumulation profiles with “*in vitro*” degradation of ruminants feeds. J. of Theoretical Biol., v. 163, p. 99-111. 1993.

GETACHEW, G. et al. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. Anim. Feed Sci. Tech., n. 72, p.261-281, 1998.

GETACHEW, G. et al. Stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production in presence and absence of polyethylene glycol for tannin containing browses. In Gas Production: Fermentation Kinetics for feed evaluation and to asses microbial activity. Br. Soc. Anim. Sci., p. 46-47, 2000.

GIZZI, G.; ZANCHI, R.; SCIARAFFIA, F. Comparison of microbiological and fermentation parameters obtained with an improved rumen *in vitro* technique with those obtained *in vivo*. Anim. Feed Sci. Tech., n. 73, p. 291-305, 1998.

GONÇALVES, A.L. et al. Cinética de degradação de alguns volumosos usados na alimentação de cabras leiteiras por intermédio da técnica de produção de gases sob diferentes níveis de pH. R. Bras. Zootec., v. 30, n. 6, p.1904-1912, 2001.

GRANT, R.J.; VAN SOEST, P.J.; McDOWELL, R. E. Influence of rumen fluid source and fermentation time on *in vitro* true dry matter digestibility. J. Dairy Sci., v. 57, n. 2, p.1201-1205, 1974.

LEITE, L.A. et al. Avaliação de dietas para vacas leiteiras contendo silagens de girasol e de milho pela técnica “*in vitro*” semi-automática de produção de gases. In: ANAIS DA 41ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41. Campo Grande, Anais... 2004.

LOPEZ, S. et al. Influence of sodium fumarate addition on rumen fermentation *in vitro*. Br. J. Nutr., v. 81, p. 59-64, 1999.

MAKKAR, H. P.S.; BLÜMMEL, M.; BECKER, K. *In vitro* effects and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. J. Sci. Food Agric., London, v. 69, n. 4. p. 481-493. 1995.

MALAFAIA, P.A.M. Taxas de digestão das frações protéicas e de carboidratos de alimentos por Técnicas “*in situ*” “*in vitro*” e de produção de gases. 1997. 85 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MALAFIA, P.A.M.; VALADARES FILHO, S.C.; VIEIRA, R.A.M. Kinetic parameters of ruminal degradation estimated with a non-automated system to measure gas production. *Livestock Prod. Sci.*, n. 58, p.65-73, 1999.

MARINUCCI, M. T.; DEHORITY, B. A.; LOERCH, S.C. In vitro and in vivo studies of factors affecting digestion of feeds in synthetic fiber bags. *J. Anim. Sci.*, v.70, n.1, p. 296-307. 1992.

MARTIN, S. A. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. *J. Anim. Sci.*, v. 76, p. 3123-3132, 1998.

MAURÍCIO, R.M. et al. Semi-automation of in vitro gas production technique using a pressure transducer. OCCASIONAL MEETING OF BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE. Proceedings... 1998.

MAURÍCIO, R.M. et al. The potential nutritive value for ruminants of some tropical feedstuffs as indicated by in vitro gas production and chemical analysis. *Br. Soc. An. Prod.*, n. 16, p. 47-55. 1999a.

MAURÍCIO, R. M. et al. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Tech.*, v. 79, n. 4, p. 321-330, 1999b.

MAURÍCIO, R.M. et al. Obtenção da equação quadrática entre volume e pressão para a implantação da técnica in vitro semi-automática de produção de gases para avaliação de forrageiras tropicais. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba, Anais...Piracicaba: SBZ, 2001. p. 1345-1346. 2001.

MAURÍCIO, R. M. et al. Relação entre pressão e volume para implantação da técnica in vitro semi-automática de produção de gases na avaliação de forrageiras tropicais. *Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.*, v. 55, n. 2, p.1013-1020, 2003.

McDOUGAL, E.I. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical J.*, London, v.43, n.1. p. 99-109. 1949.

MENKE, B. K. H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agric. Sci.*, Cambridge, v.93, n.1. p. 217-223. 1979.

NELSON, B. D. et al. Factors affecting the variability of an in vitro rumen fermentation technique for estimating forage quality. *J. Dairy Sci.*, v. 55, n. 3, p. 358-366. 1973.

OLIVERA, R.M.P. Use of in vitro gas production technique to assess the contribution of both soluble and insoluble fractions on the nutritive value of forages. University of Aberdeen, Scotland. 1998, Thesis (MSc.). 110 p.

PELL, A. N.; MOLINA, D.O.; SCHOFIELD, P. Measurement of gas production in vitro. In *Gas Production: Fermentation Kinetics for feed evaluation and to*



asses microbial activity. Br. Soc. Anim. Sci., p.1-12, 2000.

PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. J. Dairy Sci., Champaign, v. 76, n. 4. p.1063-1073. 1993.

PELL, A.N.; SCHOFIELD, P.; STONE, W.C. Rates of digestion of feeds measured in vitro with computers. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE, 1994, Ithaca. Proceedings... Cornell, p. 74-81. 1994.

RODRIGUES, J.A.S. et al. Avaliação das silagens de quatro genótipos de sorgo pela técnica "in vitro" semi-automática de produção de gases. In: XXIV CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24, 2002. Anais... Florianópolis, 2002

ROSS, G.J.S. Maximum Likelihood Program. Harpenden: Rothamsted Experimental Station. 1987: official methods of analysis. 13th ed. Washington: AOAC, 1980. 1015 p.

RUSSELL, J. B. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluation for cattle diets: Ruminal fermentation. J. Anim. Sci., v. 70, n.12. p. 3551-3581. 1992.

SNIFFEN, C.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. J. Anim. Sci., v. 70, n.7, p. 3562-3577, 1992.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Techn., Amsterdam, v.48. p.185-197. 1994.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the digestion of forage crops. J. Br. Grassland Soc., Aberystwyth, v.18. p.104-111. 1963.

VALENTIN, S. F. et al. Comparison of the in vitro gas production technique and the nylon bag degradability technique to measure short and long term processes of degradation of maize silage in dairy cows. Anim. Feed Sci. Techn., v. 78, n. 1-2, p.81-99. 1999.

VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B., LEWIS, B.A., Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci., v.74, p.3583-3596. 1991.

*Abstract: in the present study sought tried to show, the application of the semi-automated in vitro gas production technique for evaluation of foods. It is a technique no invasive that reproduces the model of fermentation of the microbiological population of the digestive tubule effi-*

*ciently. Besides it is cheap, accessible and of easy execution, being able to, with minimum resources, to be implanted quickly and efficiency. In spite of recent, that technique comes if diffusing with good acceptance for simulation laboratorial of the kinetics of the digestion, as well as of the quality of the foods.*

Key words: *in vitro* gas production, foods, animals

PAULO CESAR MOREIRA

Professor Doutor no Departamento de Zootecnia da Universidade Católica de Goiás (UCG). E-mail: paulocesar.zoo@ucg.br

RONALDO BRAGA REIS

Professor PhD. na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas de Minas Gerais.

ROBERTO DE CAMARGO WASCHECK

Professor Doutor no Departamento de Zootecnia da UCG.

ROGÉRIO MARTINS MAURÍCIO

Professor PhD na PUCMinas.

ALBERTO CORREA MENDONÇA

Professor Mestre no ICB da Universidade Federal de Goiás (UFG).

APÓSTOLO FERREIRA MARTINS

Professor Mestre no ICB da UFG.

ALECSSANDRO REGAL DUTRA

Professor Doutor no Departamento de Zootecnia da UCG.

PAULO ROBERTO DE SOUZA

Professor Adjunto, ICB/UFG.

SÉRGIO RENATO ARTIAGA DA ROSA

Engenheiro Agrônomo Doutorando, EA da UFG.

OTÁVIO CORDEIRO DE ALMEIDA

Professor Doutor no Departamento de Zootecnia da UCG.