

COMPATIBILIDADE DE RESULTADOS ENTRE OS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE E PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO OBTIDOS POR MÉTODOS IN VIVO E IN VITRO PARA ESTUDOS NUTRICIONAIS EM GATOS

FERNANDO GONZÁLEZ¹, LUCAS B. F. HENRÍQUEZ², AMANDA CARELLI², PAMELA SEZEROTTO², ALINA S. KOMARCHEUSKI², ISABELA MARTINS², JOYCE C. P. FRANCISCO², MÁRCIA GOMES¹, VANDERLY JANEIRO², RICARDO S. VASCONCELLOS²

¹Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), SP, Brasil ²Universidade Estadual de Maringá (UEM), PR, Brasil
Contato: fernando.gonzalez@usp.br / Apresentador: LUCAS B. F. HENRÍQUEZ

Resumo: Para reduzir o uso de animais na pesquisa científica, métodos substitutivos têm sido desenvolvidos, dentre eles aqueles que simulam digestão e fermentação intestinal. Neste trabalho avaliou-se a compatibilidade de resultados de digestibilidade e produtos de fermentação intestinal obtidos por métodos in vitro em relação aos obtidos em animais (in vivo). Resultados de dezenove ensaios de digestibilidade e produtos de fermentação foram usados como referência. Para a comparação dos coeficientes de digestibilidade (CDA) da matéria seca (MS) e orgânica (MO), utilizou-se dois métodos in vitro: 1- simulando apenas as etapas de digestão no estômago e intestino delgado (DIV); 2- a DIV seguida por uma etapa de fermentação no intestino grosso (DIV+FIV). Os resultados de DIV+FIV foram ainda comparados com as concentrações de produtos de fermentação nas fezes dos gatos. As médias dos CDAs obtidos para a DIV MO foram semelhantes aos obtidos in vivo ($p > 0,05$). Dentre os parâmetros fermentativos, foram obtidas correlações significativas entre os métodos in vitro e in vivo para o pH, ácido acético e butírico ($r = 0,60$; $0,54$ e $0,58$ respectivamente). Diante dos resultados, foi observado que os métodos in vitro apresentam elevado potencial de validação como métodos substitutivos em gatos.

Palavras-Chaves: Felino; metabólitos de fermentação; correlação

COMPATIBILITY OF RESULTS BETWEEN DIGESTIBILITY COEFFICIENTS AND FERMENTATION PRODUCTS OBTAINED BY IN VIVO AND IN VITRO METHODS FOR NUTRITIONAL STUDIES IN CATS

Abstract: To reduce the use of animals in scientific research, substitute methods have been developed, among them those that simulate digestion and intestinal fermentation. In this study, the compatibility of digestibility results and intestinal fermentation products obtained by in vitro methods concerning animals (in vivo) was obtained. Nineteen results of digestibility tests and fermentation products were used as a reference. For comparison of the coefficients of digestibility (ADC) of dry (DM) and organic matter (OM), two in vitro methods were used: 1- Simulating only stomach digestion and small intestine (DIV); 2- DIV followed by a fermentation step in the large intestine (DIV+FIV). The results of in vitro fermentation were also compared to the fermentation product concentrations in cat feces. The average of the ADCs obtained for the DIV OM was similar to those obtained in vivo ($p > 0.05$). Among the fermentative parameters, significant correlations were obtained between in vitro and in vivo methods for pH, acetic and butyric acid ($r = 0.60$; 0.54 and 0.58 respectively). With these results, it can be observed that in vitro digestion and fermentation methods have a high validation potential as substitute methods in cats.

Keywords: Feline; fermentation metabolites; correlation

Introdução: O conhecimento da influência de um alimento sob a digestibilidade e produtos de fermentação (PF) é fundamental na determinação da qualidade nutricional. Os métodos mais empregados para a estimar estas propriedades são os in vivo, que apesar de serem referência, apresentam alguns fatores limitantes, como custo elevado, devido a manutenção dos animais e da infraestrutura. Associado a isso, também há a tendência mundial na redução de estudos com uso de animais, porém, que dependem da validação de métodos substitutivos. Modelos in vitro que simulam a digestão e fermentação, podem apresentar vantagens, como a reprodutibilidade, redução dos custos e maior possibilidade de padronização, tornando importante investir em pesquisas neste campo. Diante disso, o objetivo deste estudo foi comparar os resultados de digestibilidade e fermentação in vitro com dados obtidos em ensaios com gatos, além de avaliar seu potencial preditivo.

Material e Métodos: Foram utilizados os dados de 19 ensaios de digestibilidade e determinação de parâmetros fermentativos em gatos, utilizando alimentos secos extrusados, como referência para a avaliação dos métodos in vitro. Estes ensaios foram realizados com 6 animais cada. Na primeira parte do estudo, foram comparados e correlacionados os coeficientes de digestibilidade (CDA) da matéria seca (MS) e orgânica (MO) por dois métodos in vitro: 1- mono compartimental simulando as etapas de digestão gástrica e intestino delgado (DIV) (HERVERA et al., 2007); 2- a DIV seguida pela fermentação em inóculo fecal de gato, simulando a fermentação no intestino grosso (DIV+FIV). Por este último, primeiro as amostras foram digeridas (MEINER et al., 2021) e, posteriormente, passaram por processo fermentativo (WILLIAMS et al., 2005), para posterior determinação dos CDAs. Os parâmetros fermentativos dos estudos in vivo foram usados como referência para a comparação com os mesmos parâmetros determinados no in vitro (FIV). Foram analisadas as seguintes variáveis: pH (WALTER et al., 2005), amônia (VIEIRA, 1980), lactato (PRYCE, 1969), acetato, propionato, butirato, isobutirato, valerato, isovalerato e 4-metilvalerato (ERWIN et al., 1961). A análise estatística da digestibilidade, foi realizada por análise de variância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey e correlação de Pearson entre os métodos in vivo e ambos in vitro. Para PF, foi realizado teste T student e correlação de Pearson entre os resultados in vitro e in vivo. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultado e Discussão: Em relação aos resultados da digestibilidade, apenas CDA da MO pela DIV apresentou semelhança com o método *in vivo* (Tabela 1). Estes resultados são compatíveis com outro estudo realizado por Ponciano Neto et al. (2015), no qual também foi utilizado uma metodologia adaptada de Hervera et al. (2007) em gatos, e foram observados valores semelhantes em relação ao ensaio com animais. No presente estudo, também houve correlação significativa e positiva entre os CDAs da MS e MO *in vivo* e *in vitro* por ambas as metodologias (DIV e DIV+FIV) (Tabela 2). Os maiores CDAs da MS observados para as metodologias DIV e DIV+FIV podem estar relacionadas à fácil solubilização da matéria mineral que, possivelmente, ocasionou na perda deste componentes durante a filtragem, gerando resultados superestimados (SOUTAR et al., 2021). Para os parâmetros fermentativos, os valores de pH, ácido acético e butírico apresentaram correlação positiva e significativa (Tabela 3). Estudos comparando metabólitos de fermentação *in vivo* e *in vitro* não são comuns, por conta da dificuldade de simular estes processos devido à dinâmica do trato gastrointestinal, de absorção e secreção de compostos, que não ocorre *in vitro* (DEN BESTEN et al., 2013). Apesar das correlações observadas neste estudo para alguns parâmetros fermentativos, a razão molar de ácidos graxos voláteis diferiu entre metodologias, além de ocorrer aumento de ácidos graxos de cadeia ramificada para a metodologia *in vitro*. Uma das possíveis justificativas para essas diferenças, pode estar associado ao substrato utilizado na FIV (HESTA et al., 2001).

Tabela 1. Digestibilidade (%) da matéria seca e orgânica determinados pelos métodos *in vivo* e *in vitro*.

Parâmetro	<i>In vivo</i>	DIV	DIV+FIV	Desvio-padrão	Valor p*
CDMS	80,42 ^c	84,97 ^b	87,43 ^a	2,211	0,0001
CDMO	84,96 ^b	84,53 ^b	87,61 ^a	2,027	0,0001

Legenda: CDMS: Coeficiente de digestibilidade da matéria seca; CDMO: Coeficiente de digestibilidade da matéria orgânica; VIV: Metodologia *in vivo*; DIV: Digestibilidade *in vitro* (Hervera et al., 2007); FIV: Digestibilidade *in vitro* (Meineri et al., 2021) associado a fermentação *in vitro* (Williams et al., 2005). ^{abc} Médias seguidas por letras em comum na linha não diferem pelo teste Tukey a 5%. *Valores com p≤0,05 são considerados com significância

Tabela 2. Correlação de Pearson (r) entre o método *in vivo* e metodologias *in vitro* para coeficiente de digestibilidade da matéria seca e orgânica.

Parâmetro	DIV	DIV+FIV
<i>In vivo</i> MS	0,609 (p=0,006)	0,584 (p=0,009)
<i>In vivo</i> MO	0,789 (p=0,0001)	0,659 (p=0,002)

Legenda: MS: Matéria seca; MO: Matéria orgânica; DIV: Digestibilidade *in vitro* (Hervera et al., 2007); FIV: Digestibilidade *in vitro* (Meineri et al., 2021) associado a fermentação *in vitro* (Williams et al., 2005). *Valores com p≤0,05 são considerados com significância

Tabela 3. Correlação de Pearson (r) dos parâmetros fermentativos entre as metodologias *in vivo* e FIV.

Parâmetro	r	Valor - p*
pH	0,596	0,007
Amônia	0,169	0,489
Lactato	-0,193	0,429
Acético	0,541	0,017
Propiônico	0,345	0,148
Butírico	0,576	0,009
Isobutírico	0,344	0,149
Valérico	0,414	0,078
Isovalérico	0,302	0,209
4 metil valérico	0,148	0,544

Legenda: FIV: Digestibilidade *in vitro* (Meineri et al., 2021) associado a fermentação *in vitro* (Williams et al., 2005). *Valores com p≤0,05 são considerados com significância

Conclusão: O método de Hervera et al. (2007) apresentou elevada capacidade preditiva para CDA da MO e, a adição de uma etapa fermentativa não melhorou a predição do método *in vitro*. A respeito dos PF, a FIV apresentou resultados distintos do método *in vivo*, mas com coeficiente de correlação significativo entre os métodos. Estes resultados demonstram potencial para validação destas técnicas futuramente.

Referências Bibliográficas: DEN BESTEN, et al. The role of SCFA in the interplay between diet, gut microbiota, and host metabolism. *J. Lip. Res.*, 54:2325–2340, 2013. ERWIN, et al. VFA Analyses of Blood and Rumen Fluid by Gas Chromatography. *J. D. Sci.* 44:1768–1771, 1961. HERVERA, et al. Prediction of digestible energy content of extruded dog food by *in vitro* analyses. *J. Ani. Phy. Ani. Nut.*, 91:205–209, 2007. HESTA, et al. The effect of oligofructose and inulin on

faecal characteristics and nutrient digestibility in healthy cats. *J. Ani. Phy. Ani. Nut.*, 85:135–141, 2001. MEINERI, et al. Effects of “fresh mechanically deboned meat” on nutritional value, palatability, shelf-life microbiological risk and digestibility in dog food. *PLoS ONE*, 16: e0250351, 2021. PONCIANO NETO, et al. 2015. Digestibilidade in vitro da matéria orgânica em alimentos para gatos. XIV CBNA PET, SP. PRYCE. A modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. *Analist*, 91:1121-1151, 1969. SOUTAR, et al. Comparisons of in Vitro and in Vivo Digestibility Assays for Phosphorus in Feline Diets and Associations with Nutrient Content. *J. Agri. F. Chem.*, 69:10688–10699, 2021. VIEIRA. Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídeos em rações para ruminantes. Tese, Universidade Federal de Viçosa, 1980. WALTER, et al. Biological response of rats to starch. *Rev. Inst. Ad. Lutz*, 64:252-257, 2005. WILLIAMS, et al. An in vitro batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric. *Ani. F. Sci. Tech.*, 123:445–462, 2005.