
PROTOCOLO PARA O ESTUDO DA BIOHIDROGENAÇÃO RUMINAL DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS DE SUPLEMENTOS LIPÍDICOS MISTURADOS COM FORRAGEIRAS USANDO UMA ABORDAGEM *IN VITRO*



Julián Andrés Castillo Vargas

Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colômbia

Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colômbia

1. Resumo

A biohidrogenação ruminal de ácidos graxos insaturados da dieta tem um efeito importante na qualidade composicional final da carne e do leite de ruminantes. Assim, diversas abordagens metodológicas têm sido desenvolvidas para compreender e modular esse processo bioquímico que ocorre no rúmen. Portanto, no presente capítulo, é apresentado um protocolo para realizar um ensaio *in vitro* para entender a biohidrogenação de ácidos graxos poliinsaturados no rúmen. O protocolo permite avaliar os efeitos de diferentes relações entre os ácidos linoleico e alfa-linolênico em suplementos sobre a produção de intermediários de ácidos graxos derivados da biohidrogenação desses ácidos graxos insaturados no rúmen, usando uma abordagem *in vitro*. Neste protocolo, propõem-se os passos experimentais para simular a escala laboratorial, o processo de fermentação ruminal e, assim, a biohidrogenação de ácidos graxos insaturados, os quais são posteriormente separados, identificados e quantificados usando cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama (GC-FID).

2. Introdução

A compreensão do processo de biohidrogenação de ácidos graxos insaturados (UFA) no rúmen fornece informações valiosas sobre a utilização de suplementos lipídicos pelo ruminante (Harvatine e Allen, 2006; Vargas et al., 2012; Vargas et al., 2018; Vargas et al., 2019). Para isso, várias estratégias experimentais foram propostas usando abordagens *in vivo*, *in situ* e *in vitro* (Enjalbert et al., 2003; Baldin et al., 2018; Vargas et al., 2018). Cada uma possui vantagens e limitações profundamente discutidas em diferentes revisões (Fievez et al., 2007; Jenkins et al., 2008 e Dewanckele et al., 2020); no entanto,

Essas características permitiram o desenvolvimento de múltiplos ensaios *in vitro* explorando os efeitos de diferentes misturas lipídicas na cinética de biohidrogenação...

a abordagem *in vitro* tem ganhado atenção especial nos últimos anos por ser econômica, rápida, não requerer de operadores especializados para conduzir o ensaio e fornecer resultados potencialmente aplicáveis em condições *in vivo*. Essas características permitiram o desenvolvimento de múltiplos ensaios *in vitro* explorando os efeitos de diferentes misturas lipídicas na cinética de biohidrogenação de UFA no rúmen, cujos resultados têm sido utilizados para desenhar estratégias nutricionais para melhorar a produção de ruminantes e a qualidade dos produtos derivados (Ferlay et al., 2017).

Tilley e Terry (1963) desenvolveram um protocolo de ensaio *in vitro* que tem sido amplamente utilizado para avaliar a digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes de diferentes alimentos e forragens para ruminantes. Este método envolve duas etapas gerais: a primeira inclui a fermentação da forragem ou ração em inóculo ruminal sob condições anaeróbicas para simular a digestão ruminal. A segunda envolve uma digestão do conteúdo não degradado na primeira etapa com uma mistura de pepsina e HCl para simular a digestão no trato digestório posterior. A partir das etapas supracitadas, a primeira etapa desse processo (fermentação ruminal) é comumente utilizada para entender a biohidrogenação *in vitro* de UFA apresentando resultados bem-sucedidos (Ribeiro et al., 2007; Vargas et al., 2012 e Vargas et al., 2018). Assim, o objetivo deste capítulo é apresentar um protocolo geral para realizar um ensaio *in vitro* baseado no método de Tilley e Terry (1963) que envolve a separação, identificação e quantificação de UFA precursores, intermediários e produtos da biohidrogenação ruminal, usando cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama (GC-FID).

3. Reagentes

3.1. Dióxido de carbono (CO_2 ; cilindro de gás).

3.2. *Preparação de tampão McDougall (McDougall, 1948) (Sigma Aldrich®):*

3.2.1. *No dia anterior da análise:* preparar uma pré-solução em água destilada, incluindo os seguintes sais: NaHCO_3 (9,80 g/L), Na_2HPO_4 (2,77 g/L), KCl (0,57 g/L), NaCl (0,47 g/L) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,12 g/L). Manter a pré-solução em balão volumétrico de 1 L sob refrigeração.

3.2.2. *No dia da análise:* adicionar a pré-solução a um béquer de 1 L e, em seguida, adicionar 0,16 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, dissolvendo este sal sob agitação contínua com aquecimento suave quando necessário. Quando o $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ estiver dissolvido e a solução atingir a temperatura ambiente, adicionar 1,0 g de ureia à mistura. Dissolver a ureia e transferir a mistura total para o balão volumétrico de 1 L. Completar a pré-solução para 1 L com água destilada. Finalmente, transferir o tampão preparado para um frasco de plástico ou vidro e mantê-lo a 39 °C em banho-maria termostatado até a preparação do inóculo.

3.3. *Solução de HgCl_2 (2% p/v; Sigma Aldrich®):* pesar 2 g de HgCl_2 e dissolvê-lo em 100 mL de água destilada.

3.4. Metanol (Sigma Aldrich®).

- 3.5. Tolueno (Sigma Aldrich®).
- 3.6. Ácido sulfúrico a 99,9% (Sigma Aldrich®).
- 3.7. Dimetilsulfóxido (Sigma Aldrich®).
- 3.8. Hexano (Sigma Aldrich®).
- 3.9. Diclorometano (Sigma Aldrich®).
- 3.10. Nitrogênio 5,0.
- 3.11. Hélio 5,0 (para a análise de ácidos graxos por GC-FID).
- 3.12. Mistura padrão comercial de ácidos graxos (Nu-Check® Prep, GLC-603).
- 3.13. Padrão interno (ácido graxo cis-10-17:1, 19:0 ou 23:0; Sigma Aldrich®).

4. Equipamento

4.1. Equipamento de laboratório

- a. Banho de água termostatado.
- b. Balança analítica.
- c. Sistema de gaseificação para CO₂ (composto por cilindro de gás CO₂ ligado a tubo plástico e ponteira de pipeta).
- d. Pipetas automáticas para transferência de líquido viscoso com ponteiras capilares (SOCOREX®).
- e. Micropipetas com ponteiras.
- f. Ultrafreezer.
- g. Agitador magnético com aquecimento.
- h. Potenciômetro.
- i. Termômetro digital.
- j. Liofilizador.
- k. Cromatógrafo gasoso equipado com amostrador automático, detector de ionização de chama e coluna.

4.2. Materiais

- a. Tubos de plástico de 100 mL com rolhas de borracha contendo um furo. O furo é essencial para a regulação da pressão interna do gás durante a incubação *in vitro*.
- b. Gaze ou pano para coar.
- c. Garrafa térmica.
- d. Balão volumétrico de 1 L.
- e. Béquer de 1L.
- f. Frasco de vidro ou plástico de 1 L.
- g. Proveta, pipeta graduada ou bureta de pelo menos 50 mL.
- h. Balas Safe-Lock Eppendorf® de 2 mL
- i. Suporte para balas Eppendorf®.
- j. Micro espátula.
- k. Suporte para tubos de ensaio.
- l. Tubos com tampa de rosca de 16 x 160 mm.
- m. Vials com insertos de vidro, septos e tampas plásticas.

5. Procedimento

5.1. Atividades a serem realizadas no dia anterior do ensaio *in vitro*

5.1.1. Em tubos de plástico de 100 mL, pesar cuidadosamente 500 mg de uma forragem seca e moída (por exemplo, capim kikuyu), usando balança analítica.

5.1.2. Selar os tubos com rolhas de borracha com um orifício e mantê-los em um suporte para tubos de ensaio (Figura 1).

5.1.3. Preparar as misturas de lipídios que deseja testar (tratamentos) usando pipetas de transferência automática de líquido viscoso e mantê-las em recipientes de vidro sob refrigeração.



Figura 1. Tubos com tampas de borracha com um orifício, dentro do banho termostático a ser usado nas incubações *in vitro*. Atenção: todo o corpo do tubo deve estar submerso na água a 39 °C no dia da análise. Fonte: Autor.



5.2. Atividades a serem realizadas no dia do ensaio *in vitro*

5.2.1. Pré-aquecer o tampão McDougall a 39 °C em banho-maria termostático, conforme indicado na seção 3.2.2 da seção de reagentes.

5.2.2. Adicionar as misturas lipídicas aos tubos plásticos de 100 mL preparados no dia anterior da análise e que contêm as amostras de forragem. Para a adição dos lipídios, usar as pipetas de transferência automática de líquido viscoso.

5.2.3. Coleta de líquido ruminal

De um ruminante fistulado (bovino, ovino ou caprino), coletar pelo menos 50 mL de líquido ruminal, filtrando-o através de três camadas de gaze ou pano convencional. Fazer a coleta em uma garrafa térmica pré-aquecida a 39 °C e transportá-la para o laboratório o mais rápido possível.

Nota:

- a. Para o pré-aquecimento da garrafa térmica, encha-a com água pré-aquecida a 39 °C, e esvazie-a no momento da coleta do líquido ruminal.
- b. A amostra de líquido ruminal deve ser composta por líquido ruminal de três regiões ruminais: anterior e metade do saco ventral e do saco craniano (Zijderveld et al., 2011).

5.2.4. Preparação do inóculo

Em frasco plástico ou de vidro mantido a 39 °C em banho termostatado, misturar o líquido ruminal coletado na etapa 5.2.3 com o tampão McDougall na proporção 1:4, para constituir o inóculo a ser utilizado durante a incubação *in vitro*. Depois disso, ajustar o pH do inóculo para 6,8 borbulhando CO₂. Manter a garrafa com o inóculo fechada e a 39 °C em um banho termostatado (Figura 2).

Figura 2. Inóculo preparado para incubações *in vitro*. Atenção: duas mangueiras foram ajustadas ao recipiente do inóculo, uma para borbulhar CO₂ e outra para servir o inóculo nos tubos de incubação. Fonte: Autor.

**5.2.5. Preparação dos sistemas de incubação e ensaio *in vitro***

5.2.5.1. Colocar os tubos plásticos de 100 mL com a mistura de forragem e lipídios no banho termostatado a 39 °C, utilizando o suporte apropriado. Assegurar-se de que os tubos estejam equilibrados a 39 °C, colocando-os no banho termostatado pelo menos 15 min antes do ensaio *in vitro*.

5.2.5.2. Tomar um tubo de 100 mL do banho de incubação e adicionar 50 mL de inóculo pré-aquecido a 39 °C usando uma proveta, pipeta graduada ou bureta de 50 mL, equilibrada a 39 °C. Gasear o tubo com CO₂, selá-lo com a rolha de borracha e colocá-lo de volta ao banho termostatado a 39 °C. Repetir este processo com os outros tubos. Os tubos devem ser agitados manualmente a cada 2 horas.

5.2.5.3. Para avaliar as alterações das concentrações de ácidos graxos ao longo do tempo (por exemplo, 0, 2, 4, 6, 8 e 16 h), interrompa a biohidrogenação de UFA em momentos diferentes. Para isso, retirar o tubo plástico do banho termostatado e adicionar 500 µL de uma solução de HgCl₂ a 2% m/v e colocar o tubo em banho de gelo (Figura 3). Atenção: solução tóxica, manipule com luvas de nitrilo.

Figura 3. Banho de gelo para tubos de incubação após adição de solução de HgCl₂ 2% m/v para interromper a biohidrogenação de ácidos graxos. Fonte: Autor.



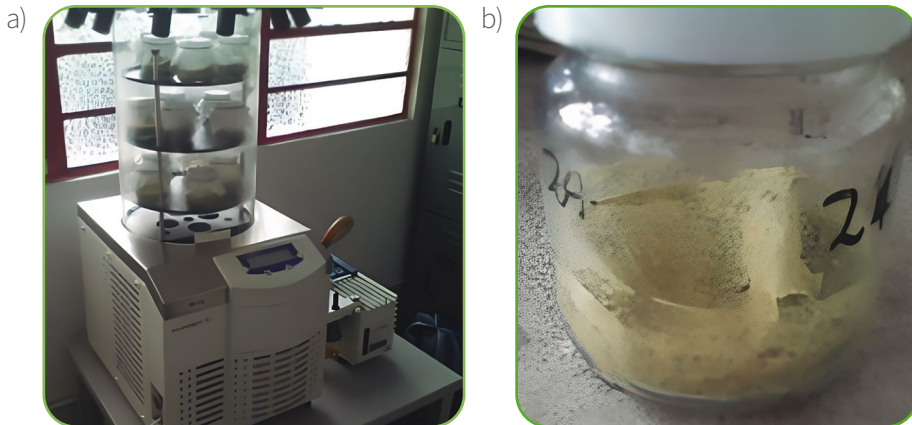
5.2.5.4. Transferir o conteúdo de cada tubo para um frasco de vidro de 100 mL e congelar a -60 °C em ultrafreezer.

5.3. Atividades a serem realizadas após o dia do ensaio *in vitro*

5.3.1. Preparação de sistemas de incubação para análise de ácidos graxos usando GC-FID

5.3.1.1. Colocar o frasco de vidro de 100 mL com o inóculo congelado a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ em uma bandeja do liofilizador, cobrindo a boca do frasco com uma toalha de papel absorvente e ajustando-o com um elástico (Figura 4a). O tempo de liofilização é de 48h, podendo variar de acordo com o tipo e número de amostras no liofilizador. No entanto, o processo só pode ser interrompido quando toda a água for retirada do frasco (Figura 4b).

Figura 4. Liofilização do conteúdo de incubação. a) configuração dos frascos no liofilizador (atenção: a boca do frasco foi coberta com uma toalha de papel absorvente e ajustada à boca com um elástico). b) sistema de incubação resultante liofilizado. Fonte: Autor.



5.3.1.2. Após a liofilização, colocar o frasco com o conteúdo liofilizado em ultrafreezer a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise dos ácidos graxos.

5.3.2. Extração, metilação e quantificação de ácidos graxos de sistemas de incubação liofilizados (Figura 5; Garcés e Mancha, 1993; Yamasaki et al. 1999):

5.3.2.1. Pesar 50 mg de sistema de incubação liofilizado e uma quantidade apropriada de padrão interno (caso for usar esse método de quantificação) em um tubo de tampa de rosca de 16 x 160 mm.

5.3.2.2. Adicionar ao tubo as seguintes quantidades de reagentes: 2148 μL de metanol, 990 μL de tolueno, 66 μL de ácido sulfúrico a 99,9% m/m, 1000 μL dimetilsulfóxido (DMSO) e 2 mL de hexano.

5.3.2.3. Selar o tubo e aquecê-lo a 80 °C durante 2 horas em banho-maria.

5.3.2.4. Após as 2 h, deixar o tubo equilibrar à temperatura ambiente e recuperar a camada de hexano (camada superior da mistura) em um tubo Safe-Lock Eppendorf® de 2 mL.

5.3.2.5. Evaporar o hexano sob fluxo de nitrogênio e redissolver o resíduo resultante em 500 µL de diclorometano.

5.3.2.6. Transferir 250 µL de solução de diclorometano para um vial cromatográfico com um inserto de vidro apropriado, septo e tampa plástica.

5.3.2.7. Injetar a mistura em um GC-FID usando as seguintes condições cromatográficas:

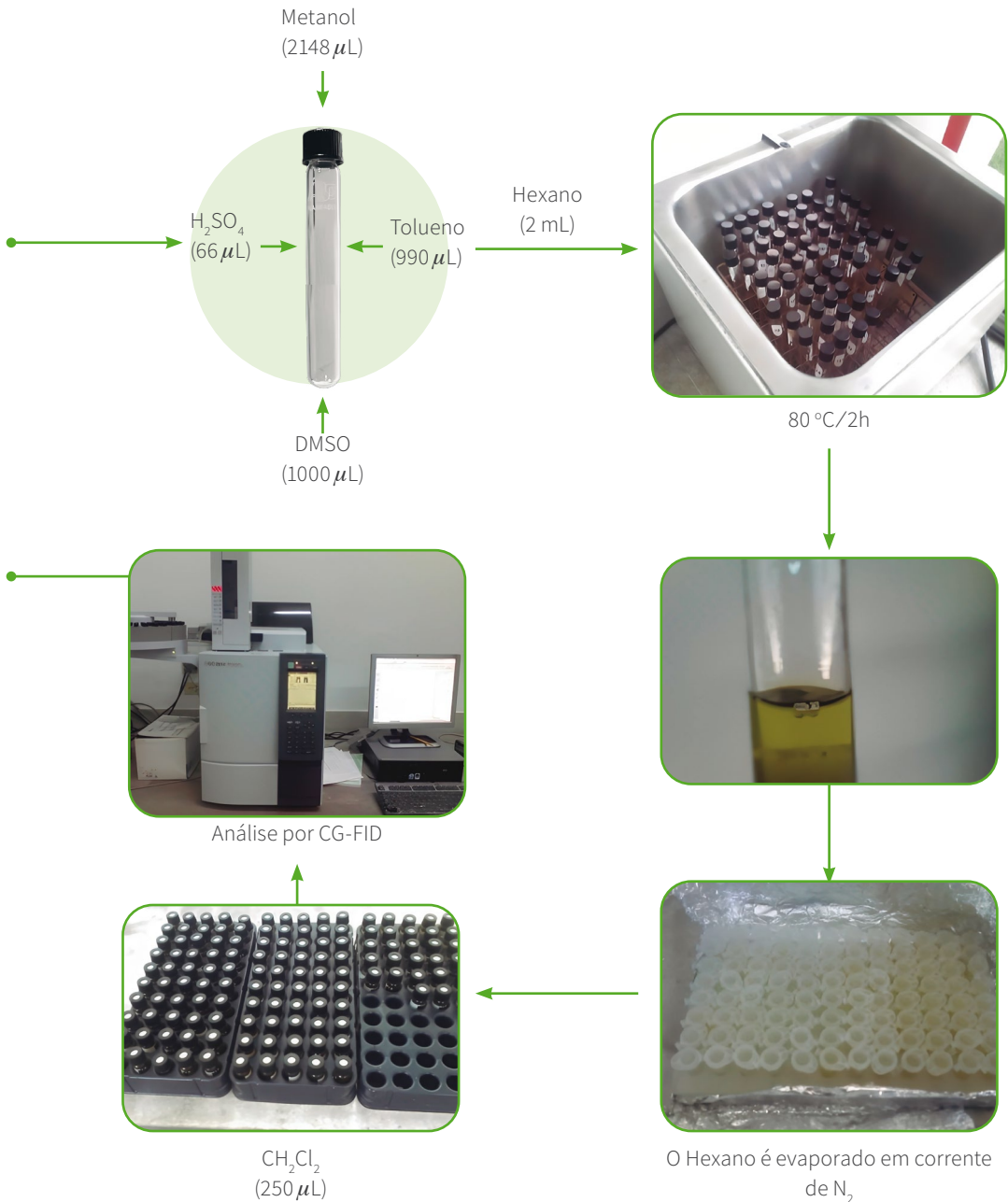
- a. Equipamento: Cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2014 (Shimadzu Manufacturing, Inc., Canby, OR, EUA) com amostrador automático.
- b. Coluna: capilar de sílica fundida (Rt-2560, 100 mx 0,25 mm id x 0,2 µm de espessura de filme; Restec®, Inc, Belefonte, PA, EUA).
- c. Gás carreador: Hélio 5,0.
- d. Fluxo do gás carreador: 1,12 mL/min.
- e. Programa cromatográfico:
- f. Temperaturas do detector e do injetor: 260 e 270 °C, respectivamente.
- g. Modo Split: 30:1.
- h. Volume de injeção: 1,0 µL.
- i. Programa de temperatura: A temperatura do forno é programada em um valor inicial de 140 °C permanecendo por 5 min, e após esse tempo, deve ser aumentada 4 °C/min por mais 5 min, até uma temperatura de 220 °C. Em seguida, deve ser aumentada 2 °C/min por 10 min, até uma temperatura final de 240 °C.

5.3.2.8. *Identificação de ácidos graxos:* Os ácidos graxos nas amostras podem ser identificados por comparação de seus tempos de retenção com os observados em padrões comerciais como Nu-Check® Prep (Elysian, MN, EUA; GLC-603).

5.3.2.9. *Quantificação de ácidos graxos:* A quantificação pode ser feita por comparação direta das áreas de pico para obter as proporções relativas de ácidos graxos. A concentração de ácidos graxos ou quantidades absolutas podem ser obtidas usando curvas de calibração apropriadas preparadas a partir de padrões comerciais (método padrão externo) ou usando ácidos graxos cis-10-17:1, 19:0 ou 23:0 como padrão interno (método padrão interno). Para este método, uma quantidade apropriada de

ácidos graxos precisa ser adicionada no início da extração de ácidos graxos e do procedimento de metilação (Seção 5.3.2.1).

Figura 5. Esquema de extração e quantificação de ácidos graxos nos sistemas de incubação. Fonte: Autor.



5.3.3. Análise da cinética de ácidos graxos

Finalmente, as concentrações de ácidos graxos podem ser calculadas em função do tempo para definir possíveis mudanças de precursores, intermediários e produtos associados à biohidrogenação ao longo do tempo, bem como os efeitos do tratamento nessas mudanças. A associação entre a concentração de ácidos graxos e o tempo pode ser ainda analisada sob diferentes abordagens estatísticas e de modelagem matemática. Para um maior entendimento e uso dessas abordagens, sugere-se a revisão dos trabalhos publicados por Ribeiro et al. (2007); Moate et al. (2008); Jenkins et al. (2008) e Vargas et al. (2018).

6. Tempo de análise

- a. Preparação do material: 40 min.
- b. Preparação de soluções e inóculo: 30 min.
- c. Preparação de sistemas de incubação: 5 min por tubo de incubação.
- d. Desenvolvimento das incubações: depende dos pontos de tempo definidos no experimento.
- e. Extração e metilação de ácidos graxos: 50 h por amostra (incluindo liofilização, bem como extração e metilação de ácidos graxos. Este tempo pode variar dependendo do liofilizador utilizado e do número de amostras simultaneamente liofilizadas).
- f. Análise cromatográfica de ácidos graxos: 50 min por amostra.

7. Comentários adicionais

Tomar especial cuidado de manter a temperatura a 39 °C em todos os instrumentos e inóculo usados durante as incubações *in vitro* para evitar a morte potencial de microrganismos no inóculo devido a choque térmico.

8. Agradecimentos

O autor agradece à Divisão de Investigación de Bogotá (DIB) da Universidad Nacional de Colombia e ao Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación

(Colciencias) pelo financiamento derivado do Projeto “Efecto de la suplementación de vacas lactantes con fuentes ricas en ácidos grasos insaturados sobre el perfil de la leche, transcripción de enzimas lipogénicas, actividad SRBP1 y su relación con diferentes componentes del perfil de ácidos grasos en leche” (código: 1115-452-21319) administrado pela Universidad de Antioquia.

9. Referências

- Baldin, M; Rico, DE; Green, MH; Harvatine, KJ. (2018). Technical note: An in vivo method to determine kinetics of unsaturated fatty acid biohydrogenation in the rumen. *J. Dairy Sci.* 101(5): 4259-4267. doi: 10.3168/jds.2017-13452
- Dewanckele, L; Toral, PG; Vlaeminck, B; Fievez, V. (2020). Invited review: Role of rumen biohydrogenation intermediates and rumen microbes in diet-induced milk fat depression: An update. *J Dairy Sci.* 103(9): 7655-7681. doi: 10.3168/jds.2019-17662
- Enjalbert, F; Eynard, P; Nicot, MC; Troegeler-Meynadier, A; Bayourthe, C. (2003). In vitro versus in situ ruminal biohydrogenation of unsaturated fatty acids from a raw or extruded mixture of ground canola seed/canola meal. *J. Dairy Sci.* 86(1): 351-9. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(03)73613-3
- Ferlay, A; Bernard, L; Meynadier, A; Malpuech-Brugère, C. (2017). Production of trans and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. *Biochimie.* 141: 107-120. doi: 10.1016/j.biochi.2017.08.006
- Fievez, V; Vlaeminck, B; Jenkins, T; Enjalbert, F; Doreau, M. (2007). Assessing rumen biohydrogenation and its manipulation in vivo, in vitro and in situ. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 109(8): 740-756. doi: 10.1002/ejlt.200700033
- Garcés, R; Mancha, M. (1993). One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal. Biochem.* 211(1): 139-143. doi: 10.1006/abio.1993.1244
- Harvatine, KJ; Allen, MS. (2006). Fat Supplements Affect Fractional Rates of Ruminal Fatty Acid Biohydrogenation and Passage in Dairy Cows. *J. Nutr.* 136(3): 677-685. doi: 10.1093/jn/136.3.677
- Jenkins, TC; Wallace, RJ; Moate, PJ; Mosley, EE. (2008). Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.* 86(2): 397-412. doi: 10.2527/jas.2007-0588
- McDougall, EI. (1948). Studies on Ruminant Saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43: 99-109.

- Moate, PJ; Boston, RC; Jenkins, TC; Lean, IJ. (2008). Kinetics of ruminal lipolysis of triacylglycerol and biohydrogenation of long-chain fatty acids: new insights from old data. *J Dairy Sci.* 91(2): 731-42. doi: 10.3168/jds.2007-0398
- Ribeiro, CVDM; Eastridge, ML; Firkins, JL; St-Pierre, NR; Palmquist, DL. (2007). Kinetics of fatty acid biohydrogenation in vitro. *J. Dairy Sci.* 90(3): 1405-16. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(07)71626-0
- Tilley, JMA; Terry, RA. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Crassl. Soc.* 18: 104-111. doi: 10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x
- Vargas, JAC. (2019). Using multivariate factor analysis to characterize the unbranched fatty acid profile in bovine rumen fluid. *Rev. Colomb. Cienc. Pecua.* 32(3): 175-183. doi: 10.17533/udea.rccp.v32n3a02
- Vargas, JAC; Olivera-Angel, M; Ribeiro, CVDM; Caicedo, EED. (2018). In vitro rumen biohydrogenation kinetics of mixed linoleic and alfa-linolenic acids. *Rev. Colomb. Cienc. Pec.* 31(3): 213-222. doi: 10.17533/udea.rccp.v31n3a06
- Vargas, JAC; Olivera, M. (2017). Polyunsaturated fatty acid type and ratio in lipid supplements alter the in vitro dry matter digestibility of kikuyu grass (*Cenchrus clandestinus*). *Livest. Res. Rural. Dev.* 29: 129. <http://www.lrrd.org/lrrd29/7/jcfc29129.html>
- Vargas, JAC; Olivera, M; Pabón, ML; Carulla, JE. (2012). Reducción de la biohidrogenación del ácido linoleico y alfa linolénico por la adición de diferentes proporciones de ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico. *Rev. Colomb. Quim.* 41: 395-408.
- Yamasaki, M; Kishihara, K; Ikeda, I; Sugano, M; Yamada, K. (1999). A recommended esterification method for gas chromatographic measurement of conjugated linoleic acid. *JAOCS.* 76: 933-938. doi: 10.1007/s11746-999-0109-0
- Van Zijderveld, SM; Fonken, B; Dijkstra, J; Gerrits, WJ; Perdok, HB; Fokkink, W; Newbold, JR. (2011). Effects of a combination of feed additives on methane production, diet digestibility, and animal performance in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94(3): 1445-54. doi: 10.3168/jds.2010-3635

