



Avaliação do uso de diferentes tipos de sacos de tecido para incubação *in vitro* de amostras vegetais

Thays Paulina Martins¹, Diego Barcelos Galvani², Sueli Freitas dos Santos³

¹Aluna do curso de graduação em Zootecnia – Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE, Brasil. Bolsista PIBIC/CNPq. e-mail: thays_zootecnia@yahoo.com.br

²Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, Brasil. e-mail: diego.galvani@embrapa.br

³Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, Brasil. Bolsista de Pós-doutorado da Capes. e-mail: sfsantoszootecnia@gmail.com

Resumo: Avaliou-se o potencial de uso de sacos de tecido com diferentes características e porosidades para acondicionamento de amostras em ensaios de produção de gases *in vitro*. Para isso, amostras de feno de capim coastcross (*Cynodon* sp.), secas em estufa de ventilação forçada e trituradas (1 mm) foram incubadas durante 96 horas em frascos de vidro com 160 mL de capacidade, contendo 72 mL de meio de cultura e 8 mL de inóculo ruminal. O substrato foi incubado, em quadruplicata, diretamente no frasco de fermentação (controle) ou acondicionado em 3 tipos de saco de tecido: ANKOM filter bag (modelo F57, porosidade = 25 µm); saco de poliéster (3,5 × 8,0 cm) com porosidade de 25 µm; saco de poliéster (3,5 × 8,0 cm) com porosidade de 40 µm. Os valores de degradabilidade da matéria seca não diferiram entre os tratamentos após 96 horas de incubação (P>0,05). A produção acumulada de gases, no entanto, foi 12% inferior ao controle quando o substrato foi incubado em saco de poliéster com porosidade de 40 µm (P<0,05). O acondicionamento de amostras em sacos de tecido alterou a cinética fermentativa do substrato incubado, sobretudo no tocante à taxa de produção de gases (P<0,05). A magnitude de tais alterações foi significativamente maior quando do uso de sacos ANKOM F57 (P<0,05). O acondicionamento de amostras em sacos de tecido não é adequado para estimativa dos parâmetros da cinética fermentativa quando utilizado o método de produção de gases *in vitro*.

Palavras-chave: cinética fermentativa, degradabilidade, porosidade

Assessment of using different bag types to enclose feed samples during *in vitro* fermentation

Abstract: It was evaluated the use of different bag types to enclose feed samples for *in vitro* fermentation, using the gas production technique. For this purpose, samples of coastcross hay (*Cynodon* sp.), dried in a forced ventilation oven and milled (1 mm screen), were incubated for 96 hours in glass bottles (160 ml capacity) containing 72 ml of culture medium and 8 mL of ruminal inoculum. Substrate was incubated in quadruplicate, directly in the bottle fermentation (control) or enclosed in 3 types of cloth bag: ANKOM filter bag (model F57, porosity = 25 µm); polyester bag (3.5 × 8.0 cm) with a porosity of 25 µm; polyester bag (3.5 × 8.0 cm) with a porosity of 40 µm. Dry matter degradability did not differ among treatments after 96 hours of incubation (P>0.05). Total gas production, however, was 12% lower for the substrate incubated in 40-µm polyester bags in comparison to the control (P<0.05). Enclosing samples in cloth bags altered the fermentation kinetic of the incubated substrate, mainly in regard to the rate of gas production (P<0.05). Such alterations were significantly greater when using ANKOM F57 filter bags (P<0.05). Enclosing samples in cloth bags is not appropriate to estimate fermentation kinetic parameters by using the gas production technique.

Keywords: fermentation kinetic, degradability, porosity

Introdução

A técnica de produção de gases *in vitro* tem sido amplamente utilizada na pesquisa com nutrição de ruminantes, com objetivo principal de estimar os parâmetros de cinética fermentativa dos alimentos, além de permitir a estimativa da degradabilidade do material incubado mediante quantificação do resíduo presente nos frascos ao final do período de incubação (Mauricio et al., 1999). Esse último procedimento, todavia, muitas vezes torna-se laborioso e lento, pois, a depender do número de amostras e unidades experimentais, exige o uso de grande quantidade de cadinhos para filtração dos resíduos.

Visando reduzir o tempo despedido nesse processo tem sido proposta que a incubação seja feita após acondicionamento das amostras em sacos de tecido com porosidade uniforme e conhecida. O uso de sacos pré-fabricados, todavia, pode elevar os custos analíticos, o que estimula o uso de materiais sintéticos similares para confecção de sacos de incubação. Um exemplo de material alternativo é o tecido de poliéster, que possui porosidade uniforme e é de fácil manipulação.

Objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial de uso de sacos de tecido com diferentes características e porosidades para acondicionamento de amostras em ensaios de produção de gases *in vitro*.



Material e Métodos

O ensaio foi conduzido na Embrapa Caprinos e Ovinos, em Sobral, CE, Brasil. Amostras de feno de capim coastcross (*Cynodon* sp.) foram secas em estufa de ventilação à 60°C e trituradas em moinho de facas provido de peneira com poros de 1 mm de diâmetro. A cinética de fermentação e a degradabilidade do substrato foram avaliadas *in vitro*, conforme Maurício et al. (1999). Para isso, 800 mg de substrato foram incubados em frascos de vidro (volume total = 160 mL; *head space* = 80 mL), contendo 72 mL de meio de cultura (Theodorou et al., 1994) e 8 mL de inóculo ruminal. O substrato foi incubado diretamente no frasco de fermentação (controle) ou acondicionado em 3 tipos de saco de tecido: ANKOM filter bag (modelo F57, porosidade = 25 µm; ANKOM); saco de poliéster (3,5 × 8,0 cm) com porosidade de 25 µm (pol25); saco de poliéster (3,5 × 8,0 cm) com porosidade de 40 µm (pol40). Controles negativos representados por frascos contendo somente meio de cultura e inóculo foram incluídos no ensaio como padrões. Cada frasco foi selado com rolha de borracha butílica, agitada manualmente e incubado em estufa de ventilação forçada a 39°C. Foram utilizados quatro frascos por tratamento.

O tempo total de incubação foi de 96 horas, sendo o volume de gases contido nos frascos de incubação mensurado com auxílio de seringa plástica (20 mL), conectada à transdutor de pressão, nos tempos 2, 4, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 72 e 96 horas após a inoculação. Após cada leitura, a pressão interna de gases nos frascos de incubação foi zerada, sendo eles agitados e retornados à estufa. Ao final do período de incubação a fermentação foi paralisada por imersão dos frascos em água gelada (4°C). O conteúdo final dos frascos do tratamento controle foi determinado mediante filtração em cadinhos porimizados. Os sacos de tecido, por sua vez, foram lavados em água corrente até completa remoção dos fluidos de incubação. Os resíduos foram utilizados para cálculo da degradabilidade da matéria seca, após secagem em estufa à 105°C

A produção cumulativa de gases foi utilizada para estimativa dos parâmetros de cinética fermentativa utilizando o procedimento NLIN do SAS (Statistical Analyses System, Cary, USA) de acordo com o modelo proposto por France et al. (2000): $G = a [1 - \exp(-k(t-L))]$, em que, G (mL) é o volume acumulado de gases no tempo *t*; *a* (mL) é a máxima produção de gases estimada; *k* (/hora) é a taxa de acúmulo de gases; e *L* (horas) é o tempo de colonização microbiana. Os parâmetros estimados, assim como os dados de degradabilidade, foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento GLM do SAS. O modelo estatístico adotado incluiu o efeito fixo de tratamento (controle, ANKOM, pol25, pol40) e o erro aleatório residual. Diferenças entre as médias foram testadas pelo teste de Tukey, sendo declaradas significativas quando $P < 0,05$.

Resultados e Discussão

Não foram observadas diferenças significativas dos valores de degradabilidade da matéria seca entre os tratamentos, após 96 horas de incubação ($P > 0,05$; Tabela 1), sendo o valor médio obtido de 63,2%. A produção acumulada de gases nesse mesmo período, no entanto, foi 12% inferior ao controle quando o substrato foi incubado em saco de poliéster com porosidade de 40 µm ($P < 0,05$), sugerindo que a degradabilidade do substrato foi superestimada por um possível escape de partículas do interior do saco. Lindberg & Knutsson (1981) observaram que mais de 12% das partículas de fenos de gramíneas podem escapar do interior de sacos de tecido com porosidade superior a 36 µm.

O acondicionamento de amostras em sacos de tecido alterou a cinética fermentativa do substrato incubado, sobretudo no tocante à taxa de produção de gases. O uso de sacos de poliéster com porosidade de 25 ou 40 µm para acondicionamento das amostras durante a incubação resultou em valores de taxa de produção de gases semelhantes entre si, mas 45% menores ao observado para o tratamento controle, onde o substrato foi deixado livre no frasco. O uso de saco ANKOM F57, por sua vez, resultou em taxa de produção de gases 69% inferior à do tratamento controle, diferindo ainda dos valores obtidos quando a incubação foi procedida em sacos de poliéster. Além disso, a incubação em sacos ANKOM F57 alterou as estimativas de produção assintótica de gases e de tempo de colonização bacteriana ($P < 0,05$).

Os resultados obtidos quando as amostras foram incubadas em sacos ANKOM F57 podem estar relacionadas ao fato de estes serem revestidos com um composto surfactante que, potencialmente, pode interferir na digestibilidade do substrato. Além disso, a grande quantidade de substrato incubado, necessária para o ensaio de produção de gases, eleva demasiadamente a razão substrato: área de superfície do saco de incubação (S:A), que deve ser de 10 mg/cm² em ensaios de degradação (Vanzant et al., 1998). Segundo estes autores, o aumento da razão S:A reduz a taxa de degradação em função da inadequada mistura do substrato e do acúmulo de produtos da fermentação no interior do saco de incubação. Saliencia-se que, no presente estudo, as dimensões dos sacos de poliéster foram maiores do que aquelas dos sacos ANKOM F57 devido às características de flutuação dos primeiros. Assim, as razões S:A obtidas foram de 28,6 e 34,2 mg/cm², respectivamente, para os sacos de poliéster e ANKOM F57, o que confirma uma relação inversa entre a razão S:A e a taxa de produção de gases. Adicionalmente, a seletividade microbiana imposta pelo acondicionamento do substrato em sacos de tecido (Meyer & Mackie, 1986) pode explicar, em parte, a variação encontrada na cinética fermentativa do substrato avaliado.



Tabela 1. Degradabilidade e parâmetros da cinética fermentativa de feno de coastcross, incubado segundo diferentes métodos de acondicionamento do substrato

| | Tratamento [#] | | | | | Valor de P |
|-----------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------|------------|
| | Controle | ANKOM | Pol25 | Pol40 | EPM | |
| Degradabilidade, % | 64,6 | 61,9 | 62,0 | 64,4 | 0,40 | 0,06 |
| Produção de gases, mL | 170 ^a | 166 ^a | 164 ^{ab} | 151 ^b | 1,13 | 0,001 |
| a, mL [†] | 172 ^b | 243 ^a | 184 ^b | 180 ^b | 2,96 | 0,001 |
| k, /hora [§] | 0,041 ^a | 0,013 ^c | 0,024 ^b | 0,021 ^b | 0,0004 | 0,001 |
| L, horas [‡] | 4,08 ^a | 1,45 ^b | 3,77 ^a | 4,20 ^a | 0,083 | 0,001 |

[#]Controle – amostras pesadas diretamente nos frascos de incubação; ANKOM – amostras acondicionadas em sacos ANKOM F57; Pol25 – amostras acondicionadas em sacos de poliéster com porosidade de 25 µm; Pol40 – amostras acondicionadas em sacos de poliéster com porosidade de 40 µm.

[†]Assíntota; máxima produção de gases estimada.

[§]Taxa de acúmulo de gás.

[‡]Tempo de colonização.

Médias, na mesma, seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Conclusões

O acondicionamento de amostras em sacos de tecido com 25 µm de porosidade pode ser utilizado para estimativa da degradabilidade da matéria seca após 96 horas de incubação *in vitro*. Este procedimento, entretanto, não é adequado para estimativa dos parâmetros da cinética fermentativa quando utilizado o método de produção de gases *in vitro*.

Referências Bibliográficas

FRANCE, J.; DIJKSTRA, J.; DHANOA, M.S.; LOPEZ, S.; BANNINK, A. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: derivation of models and other mathematical considerations. **British Journal of Nutrition**, v.83, n.2, p.143-150, 2000.

LINDBERG, J.E.; KNUTSSON, P.G. Effect of bag pore-size on the loss of particulate matter and on the degradation of cell-wall fiber. **Agriculture and Environment**, v.6, n.2-3, p.171-182, 1981.

MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, n.4, p.321-330, 1999.

MEYER, J.H.; MACKIE, R.I. Microbiological evaluation of the intraruminal in sacco digestion technique. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, n.3, p.622-629, 1986.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, n.3-4, p.185-197, 1994.

VANZANT, E.S.; COCHRAN, R.C.; TITGEMEYER, E.C. Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuff evaluation. **Journal of Animal Science**, v.76, n.10, p.2717-2729, 1998.