**AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE MONITORAMENTO
COMPUTADORIZADO DE DIGESTÃO “IN VITRO” E
PRODUÇÃO DE GÁS COMPARADA COM OS MÉTODOS “IN
VIVO” E “IN SITU”**

FÁBIO PRUDÊNCIO DE CAMPOS
Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Max Lázaro Vieira Bose

**Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura “Luiz de
Queiroz”, da Universidade de
São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Agronomia,
Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens.**

PIRACICABA
Estado de São Paulo -Brasil
Outubro - 1996

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Campos, Fábio Prudêncio de

Avaliação do sistema de monitoramento computadorizado de digestão "in vitro" e produção gás comprada com os métodos "in vitro" e "in situ" / Fábio Prudêncio de Campos. - - Piracicaba, 1996.

61p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1996.
Bibliografia.

1. Bovino - Alimentação 2. Digestão "in vitro" - Monitoramento - Avaliação
I. Título

CDD 636.2084

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE MONITORAMENTO
COMPUTADORIZADO DE DIGESTÃO “IN VITRO” E
PRODUÇÃO DE GÁS COMPARADA COM OS MÉTODOS “IN
VIVO” E “IN SITU”**

FÁBIO PRUDÊNCIO DE CAMPOS

Aprovada em: 03.12.1996

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Max Lázaro Vieira Bose
Prof. Dr. Celso Boin
Prof. Dr. Jane Maria Bertocco Ezequiel

ESALQ/USP
ESALQ/USP
FCAVJ/UNESP

Prof. Dr. Max Lázaro Vieira Bose
Orientador

Dedico

**Ao meu pai Prudêncio de Campos (*in memoriam*),
à minha mãe Iracy e a minhas irmãs**

**À minha namorada e amiga, Patrícia Sarmento,
pelo total apoio em meus trabalhos.**

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Max Lázaro Vieira Bose pela amizade, ensinamentos e orientação no decorrer do curso de mestrado;
- Ao Prof. Celso Boin, coordenador do projeto e pela atenção prestada a mim no decorrer do curso de mestrado;
- Ao Prof. Dante P. D. Lanna, elaborador do projeto, pela orientação técnica durante fase experimental e análise dos dados;
- Ao Prof. Wilson Mattos pela liberação de reagentes para as análises necessárias;
- Ao Prof. Sila Carneiro pela conceção de equipamentos (monitor de computador) na fase de desenvolvimento experimental;
- Ao grande amigo Jozivaldo Prudêncio Gomes de Moraes pela concessão de todos seus dados e amostras experimentais;
- Ao laboratorista Carlos César Alves, pela grande amizade e apoio nas realizações de todas as análises;
- Ao Engenheiro Eletrônico Juarez Rano Amaral, que auxiliou nos na montagem do equipamento;
- A Prof^a. de inglês Fernanda Bacelar pela grande amizade, ensinamentos e grande atenção prestada na correção do “Summary” deste trabalho;
- Ao funcionários do setor de meteorologia pelo fornecimento dos dados de pressões barométricas diariamente;
- Ao Clube de Práticas Zootécnicas (CPZ), pelo auxílio prestado para o desenvolvimento desta pesquisa;
- Aos moradores da Vila Estudantil, em especial, Cristina Batista, Cláudia Lira e Marcelo Alves, meus companheiros de casa, e Paulo Cesar, Francisco Casimiro, Elton Lúcio pela grande amizade preservada durante o tempo de convivência.
- A CAVE e ao Serviço Social por terem cedido moradia e atenção no meu tempo de permanência no mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO	VI
SUMMARY	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Componentes e Esquema do Sistema “in vitro”/gás	10
3.1.1. Montagem do Equipamento	11
3.2. Meio de Cultura	12
3.3. Preparo do Meio de Cultura	13
3.4. Calibração dos Sensores	14
3.5. Tipo e Preparo do Inóculo	15
3.6. Procedimento da Inoculação	15
3.7. Manipulação dos Dados	16
3.8. Processamento do Resíduo dos Frascos	17
3.9. Testes Preliminares no Sistema	17
3.10. Experimento - Comparação do método de produção de Gás “in vitro” com os métodos “in vivo” e “in situ”	19
3.10.1. Esquema de Execução das Análises dos Alimentos	19
3.10.2. Delineamento Experimental	22

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Teste Preliminares no Sistema	23
4.2. Experimento	28
4.2.1. Avaliação dos Alimentos	28
4.2.2. Análise dos Alimentos pelo Método de Digestão “in vitro” pela produção de gás comparada com “in vivo” e “in situ”	30
5. CONCLUSÕES	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
7. APÊNDICE	54

AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE MONITORAMENTO COMPUTADORIZADO DE DIGESTÃO “IN VITRO” E PRODUÇÃO DE GÁS COMPARADA COM OS MÉTODOS “IN VIVO” E “IN SITU”

Autor: Fábio Prudêncio de Campos
Orientador: Max Lázaro Vieira Bose

RESUMO

O experimento teve por objetivo avaliar o sistema de monitoramento computadorizado de digestão “in vitro” através da produção contínua de gás e compará-lo com os resultados obtidos nos métodos “in vivo” e “in situ”, utilizando-se de mesmas amostras de alimentos. Foi utilizado líquido ruminal de bovinos fistulados no rúmen. Utilizaram-se diversas silagens de milho: alta MS inoculada, baixa MS inoculada, alta MS não inoculada e baixa MS não inoculada; feno de alfafa, silagem de milho com 41,9 % MS e 35 % de grãos. Realizaram-se comparações dos métodos de digestibilidade apenas para silagens inoculadas com produto comercial a base de lactobacilos e estreptococos, por apresentarem maior quantidade de dados e devido à disponibilidade de mesmas amostras dos alimentos utilizados em testes anteriores de digestibilidade “in vivo” e “in situ”, realizados no Departamento de Zootecnia.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 para avaliar alimentos dentro de cada método, e 3x4 para avaliar diferentes métodos com mesmos alimentos.

No sistema de digestibilidade computadorizada são obtidos dois tipos de digestibilidade “in vitro”- pelo resíduo de MS e pela produção de gás. Os resultados obtidos nesse sistema foram comparados com os resultados obtidos nos

métodos “in vivo” e “in situ” por meio de teste de comparação de médias e por correlações entre produção de gás (A+D) em relação ao potencial de degradação (A+B) obtidas “in situ”.

Não foram encontradas diferenças significativas ($P>0,05$) de digestibilidade “in vitro”/gás da MS das silagens de milho inoculadas e não inoculadas com alta e baixa MS, entre os três sistemas avaliados (“in vitro”/gás, “in vivo” e “in situ”). Quando avaliadas isoladamente as digestibilidades das silagens de milho em função dos teores de matéria seca (alta e baixa MS), independente da inoculação com lactobacilos, estas diferiram significativamente ($P<0,05$) nos sistemas “in vitro”/gás e “in situ”. Quanto à inoculação das silagens, os resultados não se mostraram significativos. Quando se avaliaram os mesmos alimentos (silagens de milho: alta MS inoculada, baixa MS inoculada; alta MS não inoculada e baixa MS não inoculada) pelo gás produzido na fermentação (digestibilidade aparente), os resultados da taxa de degradação (A+D) foram: 21,5; 22,6; 22,1 e 20,9 ml de gás/100 mg MS, respectivamente, não diferiram significativamente entre si ($P>0,05$).

As correlações obtidas na produção de gás em relação ao potencial de degradação obtido “in situ” se mostraram altas para silagem de milho com alta MS inoculada ($R^2= 0,99$), com alta MS não inoculada ($R^2= 0,98$), com baixa MS inoculada ($R^2= 0,94$) e com baixa MS não inoculada ($R^2= 0,93$).

Concluiu-se que o sistema computadorizado de produção de gás “in vitro” apresentou resultados semelhantes aos demais métodos utilizados na avaliação das silagens de milho. A digestibilidade pela produção de gás apresentou alta correlação com a digestão “in situ”.

EVALUATION OF COMPUTERIZED MONITORING SYSTEM OF “IN VITRO” DIGESTION AND PRODUCTION OF GAS COMPARED WITH THE “IN VIVO” AND “IN SITU” METHODS

Author: Fábio Prudêncio de Campos
Adviser: Max Lázaro Vieira Bose

SUMMARY

The aim of this research work is to evaluate the system of “in vitro” digestion through accumulative production of gas by computerized monitoring and compare it with the results obtained by the “in vivo” and “in situ” methods of digestion, using identical feed samples. Ruminant liquid of animals fistulated at the rumen was used. Several corn silage: high/low dry matter inoculated/non inoculated, hay of alfalfa, corn silage with 41,9 % DM and 35 % grain.

Comparisons among methods were carried out only for inoculate silage for the base product of lactobacillus and streptococcus due to the greater quantity of data and to the availability identical feed samples used in the previous experiments. The experimental delineation used was completely randomized in factorial scheme 2x2 to evaluate feed samples in each method, and 3x4, to evaluate the methods with identical feed samples.

Two types of digestion “in vitro” - related to the residue of dry matter and by the production of gas are obtained through a system of digestibility. The results obtained were compared to the results from the “in vivo” and “in situ” methods by means of average comparison tests and by correlations between the production of gas (A+D) related to the potential of degradation (A+B) obtained “in situ”. No significant difference ($P>0,05$) of digestibility “in vitro”/gas of the high/low inoculate/ non inoculate dry matter of corn silage in the three systems

evaluated. But when the digestibility of corn silage was evaluated isolately basing on the contents of dry matter (high or low) independently of the inoculation with lactobacillus, it differed significantly ($P < 0,05$) in the “in vitro”/gas and “in situ” systems. The results obtained by the inoculation of silages showed no significant differences among them. When equal feeds (corn silage) were evaluated: high DM inoculate, low DM inoculate, high DM non inoculate and low DM non inoculate by gas production on fermentation (apparent digestibility), the results of rate of degradation (A+D) were: 21,5; 22,6; 22,1 and 20,9 ml of gas/100 mg DM, respectively. No significant difference was observed among them ($P > 0,05$). The correlations obtained on the production of gas in relation to the potential of degradation obtained “in situ”, showed themselves highly correlated to corn silage: high DM inoculate ($R^2 = 0,99$), high DM non inoculate ($R^2 = 0,98$), low DM inoculate ($R^2 = 0,94$) and low DM non inoculate ($R^2 = 0,93$).

It can be concluded that the computerized system of accumulative production of gas in the “in vitro” digestion showed identical results to the other methods used in the evaluation of silage corn. The digestibility by the production of gas showed a high correlation with the “in situ” digestion.

1 - INTRODUÇÃO

A eficiência da produção bovina intensiva é em grande parte atribuída ao balanceamento adequado da ração. A formulação de rações mais eficientes e de custo mínimo depende do valor nutritivo dos ingredientes. O surgimento de novas técnicas de avaliação de alimentos é um processo constante. No caso de bovinos, a simples digestão ruminal progrediu para a degradação das diversas frações alimentares, inclusive solúveis e insolúveis. Entretanto, a amostragem de material contido no rúmem, por mais freqüente que seja, sempre deixa intervalos que poderiam fornecer dados significativos. Seria, pois, ideal a medição contínua do processo digestivo, conforme estudo que vem sendo realizado, recentemente, pela Universidade de Cornell, com o sistema de “Monitoramento Computadorizado da Produção de Gás na Digestão “in vitro”.

Visando melhor conhecimento das necessidades nutricionais de bovinos e do valor nutritivo de alimentos para arraçãoamento mais eficiente, procurou-se planejar, montar, adaptar e testar um sistema de monitoramento computadorizado da produção de gás contínua de digestão “in vitro”, conforme o desenvolvido e implantado na Universidade de Cornell, uma vez que não há produção industrial do equipamento completo; testar e comparar o sistema de digestibilidade “in vitro” computadorizada com utilização de mesmas amostras de alimentos (diversas silagens de milho) utilizadas nos métodos “in vivo” e “in situ”, realizados em experimentos anteriores, bem como avaliar outros alimentos com o propósito de obter dados para aplicação em cálculos de rações.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

As metodologias tradicionais de avaliação nutricional de alimentos e das necessidades dos animais vêm se complementando com o surgimento de novas técnicas, evoluindo rápida e constantemente. Um exemplo de aplicação no novo sistema de avaliação de ração é o proposto pela Universidade de Cornell, baseado em análises mais pormenorizadas do alimento e na fisiologia ruminal, com uso de simulação e predição de produção animal (Fox et al., 1990).

A técnica de digestão “in vitro” proposta por Tilley e Terry (1963) tem sido largamente utilizada para predizer a digestibilidade “in vivo”. Essa técnica tem por objetivo simular as condições normais do rúmen, como atmosfera anaeróbica, temperatura de incubação constante, e pH ótimo, conforme proposto por Warner (1956) como rúmen artificial. Nesta técnica as principais fontes de erros são: quantidade de amostra, tempo de fermentação, infusão de nitrogênio e inóculo, espécie animal, tipo de dieta e pH, além das diferenças entre as marchas analíticas adotadas por diversos laboratórios.

A digestibilidade “in vitro” da matéria seca é altamente correlacionada com a digestibilidade “in vivo” (Marten e Barnes, 1980). O sistema “in vitro” é útil para rotina de avaliação de forragens, e produz resultados com alta precisão e repetibilidade (Barnes, 1965). Muitos fatores podem influenciar sobre a digestibilidade “in vitro” da MS, incluindo a fonte e a atividade do inóculo. Diversos estudos têm indicado que no método “in vitro” a digestibilidade da MS

ou da fibra se inicia na própria forragem, independente da fonte de inóculo ruminal (Quicke et al., 1959; Marinucci et al., 1992). Entretanto, outros estudos indicam que há efeitos significativos da fonte de inóculo sobre a digestibilidade da MS (Church e Peterson, 1960; Bezeau, 1965, Nelson et al., 1972; Grant et al., 1974).

Cherney et al. (1993), estudando a influência de vacas doadoras e fonte de fibra sobre a digestibilidade “in vitro” de MS de silagem de milho, e feno de alfafa, com período de incubação de 48 horas, acrescentando solução de extração de NDF (fibra em detergente neutro), concluíram que a fonte de fibra na dieta de vaca doadora de líquido ruminal e método de filtração do líquido podem afetar a digestibilidade “in vitro”.

Templeton e Dyer (1965), estudando o efeito da porcentagem de concentrado na ração de ruminantes, concluíram que esse aumenta a atividade da amilase no fluído ruminal.

Goering e Van Soest (1970) sugeriram sistemas de análises baseados na solubilidade das diferentes frações dos alimentos em soluções detergentes, e denominaram o sistema de “somativo”. Com o intenso uso desse método surgiram modificações para aperfeiçoamento da tecnologia (Van Soest, Robertson e Lewis, 1991).

Aspecto importante na avaliação de alimentos é a disponibilidade dos substratos em fornecer energia originada de carboidratos, nitrogênio de fonte proteica e não-proteica (Russel e Hespell, 1981) em quantidades suficientes para o crescimento e desenvolvimento da flora microbiana que, por sua vez, proporciona a produção de ácidos graxos voláteis, principal fonte de energia para os ruminantes (Church, 1976).

Têm sido feitos estudos para comparar o método “in vitro” com o “in situ” para determinação da digestibilidade dos alimentos. O método “in vitro” é comumente utilizado pela conveniência, ou quando grande escala de testes de alimentos é requerida (Udén, 1992). Entretanto, a acumulação de produtos finais da fermentação e da dieta do animal doador do líquido ruminal podem afetar a digestibilidade “in vitro” da matéria seca (Cherney et al., 1993).

O método “in situ” é usado rotineiramente para estudar os efeitos do ambiente ruminal (Udén e Van Soest, 1984; Nocek, 1988; Udén, 1992). Meyer e Mackie (1986) afirmam que a frequência de alimentação do animal hospedeiro e os poros do saco de náilon têm papel importante na interpretação dos resultados pois, no rúmen, os sacos de náilon são continuamente agitados e comprimidos pelo conteúdo ruminal durante as contrações. Esse mecanismo do rúmen favorece a desobstrução dos poros dos sacos de náilon por essa ação física ou pressão de gases (Marinucci et al., 1992).

Nocek et al. (1979) observaram decréscimo na digestibilidade da matéria seca associada com a produção e acumulação de gases no saco de náilon.

Graham e Aman (1984) afirmam que os métodos “in vitro” e “in situ” produziram resultados similares com a cinética da degradação ruminal dos constituintes de palhas.

Nelson et al. (1973), trabalhando com a digestibilidade de cinco forragens (silagem de milho e fenos: de alfafa, capim pensacola bahia, capim coastal bermuda e de centeio) “in situ” e “in vitro”, encontraram diferenças significativas entre as técnicas quando avaliaram os fenos, mas não para silagem de milho.

Em nutrição animal, a incubação de amostras de alimentos com líquido ruminal tamponado com CO_2/HCO_3 é usada para predizer o valor nutritivo dos alimentos (Beuvink e Spoelstra, 1992).

A digestibilidade é derivada do desaparecimento da matéria seca (Tilley e Terry, 1963) ou a produção total de gás (Menke et al., 1979), após um período de incubação. Para se obter informação sobre a taxa de degradação de alimentos, a quantidade de gás produzido “in vitro” tem sido obtida em função do tempo de fermentação (Meer et al., 1988; Xiong et al., 1990). O método de produção de gás “in vitro” (Menke et al. 1979) é semelhante ao método de Tilley e Terry (1963) na adição de solução tampão de CO_2 -bicarbonato/fosfato ao líquido ruminal. A diferença principal é que o método de digestibilidade “in vitro” pela produção de gás fornece duas formas de digestibilidade: a aparente, que é o volume total de gás produzido ao final da digestão, e a supostamente verdadeira, que é aquela medida pelo desaparecimento da MS em função do resíduo da digestão (Blummel e Orskov, 1993).

Trei et al. (1970) afirmam que a produção de gás foi altamente correlacionada com o desaparecimento da MS de grãos de milho “in vitro”, produção de ácidos graxos voláteis e digestão de amido. No sistema utilizado por Trei et al. (1970), manométrico, o amido representou a grande porção do substrato; consequentemente, a maior porção do gás produzido. Portanto, a técnica de produção de gás “in vitro” oferece uma rápida estimativa da taxa de digestão e pode ser útil para estimar a digestibilidade dos alimentos pelos bovinos.

Hale (1973) menciona que a maior parte da digestão de carboidratos ocorre no rúmen. Em termos de utilização pelo animal, os tipos de processamento dos alimentos e a maneira de predizer sua digestibilidade parecem ter pequena

influência sobre a digestão dos mesmos. As técnicas utilizadas de digestão “in vitro”, como a de produção de gás, digestão enzimática, desaparecimento da MS e produção de ácidos graxos voláteis, parecem ser bons indicadores para a predição da digestibilidade.

Khazaal et al. (1995), estudando a degradação da matéria seca “in situ” ou produção de gás “in vitro”, constataram que a “performance” dos animais pode ser predita com eficiência. Khazaal et al. (1993), em estudos de comparação do método de digestão “in vitro” pela produção de gás com o método “in situ”, avaliando a ingestão e a digestibilidade de nove fenos de leguminosas, concluíram que a predição de ingestão e digestibilidade foi mais precisa no método “in situ”, quando comparado com o método de produção de gás. Entretanto, consideraram que o método de produção de gás apresenta a vantagem de predizer com eficiência a “performance” do animal em comparação com outras técnicas laboratoriais de digestão “in vitro”. Portanto, este método constitui um potencial importante para o futuro.

Taya et al. (1980) relataram em seus trabalhos que a produção de gás tem efeito linear com a digestão de celulose por cultura pura de *Ruminococcus albus*, e Menke e Steingass (1988) afirmam que a quantidade de gás produzida pela fermentação representa a digestibilidade dos alimentos e, de maneira direta, energia para os ruminantes. A produção de gás tem sido medida manométricamente, alternativa encontrada para medição da produção de gás por meio do aumento da pressão em sistema fechado (McBee, 1953; Hungate¹, 1966, citado por Pell e Schofield, 1993), ou volumetricamente (Shibata² et al., 1961 citados por Pell e Schofield, 1993; Menke e Steingass, 1988). A digestão

¹ HUNGATE, R.E. The rumen and its microbes. **Academic Press**, New York, NY, 1966.

² SHIBATA, F.; OGIMOTO, F.; FURUSAKA, C. Studies on rumen fermentation II, Studies on “in vitro” gas formation in rumen. **Japany journal Zootechy Science**, v.32, p.159, 1961.

anaeróbia da celulose e demais constituintes das fibras pelos microrganismos ruminais (*Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*) produz AGV, CO₂, CH₄ e traços de H₂ (Hungate, 1966, citado por Pell e Schofield, 1993). A medida da evolução do gás “in vitro” pode prover informações quantitativas sobre a taxa e extensão da digestão de celulose (Hungate, 1966 citado por Pell e Schofield, 1993; Menke e Steingass, 1988).

Um sistema automático, em que a produção de gás é registrada graficamente num mapa, foi descrito por Wilkins (1974). Trabalhando nesta linha, Pell e Schofield (1993) descreveram uma técnica para facilitar os estudos de digestão “in vitro” através da medição contínua da produção de gás. Assim constataram o desaparecimento da fibra, pela medida da pressão do gás produzido num frasco de volume fixo. A pressão do gás na película semicondutora de um sensor foi transformada em energia elétrica (milivolts) e essa foi recebida por placas conectadas em computador com “software” apropriado que monitora e armazena os dados medidos nos tempos programados. Neste sistema, foram requeridos: computador, sensor de pressão, placa interface e A/D (placa analógico/digital), conector interface, reostato e termostato, aquecedores, estufa de madeira, frascos de vidro de 50 ml, fonte de energia elétrica de 12 V, ventoinha, misturador magnético, barras magnéticas agitadoras, e “software” apropriado que monitorou continuamente a produção de gás.

Um fator complicante no sistema de digestão “in vitro” pela produção de gás está no fato que, inicialmente, o modelo matemático foi baseado na digestão da fibra de substrato puro (celulose purificada, e celulose bacteriana - Cellulon), enquanto que o alimento apresenta uma mistura de componentes (Schofield et al., 1994). Por exemplo, FDN (Goering e Van Soest, 1970) inclui hemicelulose, celulose e lignina e esses componentes possuem diferentes taxas de digestão, bem

como variam de alimento para alimento (Van Soest, 1982). Mas o modelo matemático descrito para digestão de substrato puro pode ser também simplificado para digestão de alimentos (Schofield et al., 1994). Com as técnicas recentes de medidas computadorizadas de pequenos volumes de gases, Schofield et al. (1994) adequaram o modelo em função da quantidade de gás produzido e qualidade das curvas obtidas com os dados de produção de gás.

O modelo de produção de gás, em relação à digestão da fibra e crescimento microbiano assume que a produção de massa celular bacteriana e de gás é proporcional à quantidade de substrato digerido (Schofield et al., 1994).

A produção de gás é gerada diretamente do metabolismo de carboidrato por oxidação (CO_2) ou redução (CH_4) dos produtos finais, e também pela reação dos AGV com o tampão bicarbonato. Propionato e acetato são produzidos pelos caminhos alternativos (Van Soest, 1994).

Os pontos críticos do método de produção de gás são: 1) pequena quantidade de amostra (100 mg), tornando maiores os erros experimentais, 2) dificuldades na conservação e padronização de alimentos para correção dos desvios causados pelas mudanças na atividade microbiana do líquido ruminal, 3) o alimento pode ter baixa produção de gás, mas na digestão “in vivo” pode ter alta digestibilidade, e 4) pH dos alimentos e do líquido ruminal, no processo de digestão, poderá influenciar negativamente sobre o crescimento microbiano, acarretando menor taxa de degradação do alimento ao final da incubação (Menke et al., 1979).

Diversas variáveis, incluindo quantidade da amostra, quantidade de inóculo, tamanho do recipiente, e tipo de sensor de pressão, têm sido investigadas para determinar a faixa de produção de gás que pode ser medida adequadamente e com facilidade de repetição dos resultados (Pell e Schofield, 1993). Nesta técnica

de produção de gás foi necessária a modificação no método de análise de NDF para permitir a determinação da extensão da digestão ao final da incubação, em função de pequenas quantidades de amostras e, conseqüentemente, pouco resíduo. Existe uma grande relação linear entre o desaparecimento do NDF e a produção de gás (Taya et al., 1980; Menke e Steingass, 1988).

Blummel e Orskov (1993) descrevem que o sistema é basicamente semelhante ao descrito por Tilley e Terry (1963), onde o substrato é incubado com líquido ruminal. A diferença está no fato de que a produção de gás é reflexo da fermentação total do substrato e conseqüentemente desaparecimento da MS. E esse sistema de produção de gás oferece a vantagem de fornecer dados de dois tipos de digestibilidades dos alimentos com apenas uma incubação, na qual o volume de gás produzido pode ser indicador da digestibilidade aparente do alimento pela perda de MS, e o resíduo que sobra pode ser quantificado para se calcular a digestibilidade verdadeira do alimento, medida após tratamento do resíduo com detergente neutro para remoção dos microrganismos que podem ser em quantidade relativamente grande após 24 ou 48 horas de incubação. Essa diferença pode ser considerada uma estimativa para o crescimento microbiano e quantificar a contribuição da lise microbiana no volume de gás e obter assim uma taxa constante de produção de gás que possa ser descontada do gás produzido na fermentação de alimentos incubados.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Componentes e Esquema do Sistema “in vitro”/gás (Figura 1).

- **Frascos de incubação:** 16 frascos de vidros de 50 ml, tampa de borracha e lacre de alumínio.

- **Estufa:** caixa de madeira compensada, de espessura de 20 mm, com as seguintes dimensões 60 x 60 x 70 cm, contendo suporte para os frascos de incubação, três lâmpadas de 90W, termostato para controle da temperatura interna (39°C) e ventoinha de circulação do ar no interior da estufa.

- **Misturador:** 4 motores de 48 rpm instalados abaixo do suporte dos frascos de incubação, acoplados a um suporte metálico com duas barras magnéticas de 1,0 x 1,0 cm que movimentam as barras magnéticas agitadoras no interior dos frascos incubatórios.

- **Sensores de pressão:** em número de 16, com circuitos fechados, diafragmas sensíveis a uma faixa de pressão de 0 a 103,4 Kpa (0 para 15 psi), requerendo fonte de corrente elétrica alternada (AC) e conversor de energia elétrica para 12V (C). Esses sensores são colados em bloco de madeira em formato de “U” (1 x 1cm) onde são encaixados conectores de três pontos, nos quais são ligados o fio terra, o ponto de medição de pressão e o de impulso elétrico. Os sensores possuem dois pontos de leitura, um que lê a pressão interna dos frascos e o outro a pressão atmosférica, fazendo, portanto, leituras por diferencial de pressão, as quais são transformadas em milivolts e enviadas para a

placa interface que possui amplificador programável que direciona os sinais de cada sensor para seu respectivo receptor no computador. No ponto onde é lida a pressão interna dos frascos, são conectadas agulhas hipodérmicas em tubos de borracha, as quais são fixadas por presilhas plásticas e cola silicone.

- **Placas interface e Analógico/Digital:** componentes que apresentam amplificador programável para os sensores e para leitura dos 16 canais.

- **Computador:** IBM 80386, 40 Mhz, com 4 Megabytes de memória, estabilizador de voltagem e um “Nobrek” - equipamento essencial na queda de energia elétrica.

- **Programa:** “Signal View - 1.3 - aquisição e monitoramento de dados”, adquirido da “Real Time Devices”, sendo suporte do amplificador programável característico das placas interface e A/D.

A versão utilizada do software é a de 16 canais para Windows 3.1.

3.1.1 - Montagem do equipamento

Para a construção da estufa foi necessária a aquisição de quatro folhas de madeira compensada de 20 mm de espessura, cortadas em tamanhos de 60 x 60 x 70 cm, além de parafusos, fios, bocais de lâmpadas, dobradiças, pregos, colas etc. Foi efetuada a montagem da estufa com uma plataforma interna para suporte dos frascos de incubação e dos motores agitadores; pintada internamente com tinta seladora, várias vezes, e externamente com tinta esmalte sintético a fim de diminuir perda de calor pelas laterais da mesma, além das instalações elétricas de lâmpadas, ventoinhas, e pequenos motores de 48 rpm.

Os sensores foram colados em blocos de madeira em formato de “U” confeccionados no tamanho de 1 x 1 cm; foram conectados os fios nos respectivos pontos de medição dos sensores; conectadas agulhas hipodérmicas de

20 x 1””; foi feita uma adaptação na parte de encaixe metálico da agulha para facilitar o acoplamento da agulha ao sensor via tubo de borracha, bem como a construção e instalação da placa de recepção dos sensores para o micro-computador, com o auxílio de um engenheiro eletrônico. Foi instalado o “software” de gerenciamento dos dados (Signal View), com funcionamento via Windows ou DOS, configurada a placa, e o programa instalado no computador. Também foram montadas planilhas eletrônicas a fim de se transformar as leituras dos sensores de milivolts para ml de gás produzido e também corrigir os dados em função da pressão barométrica do dia, correção do gás metano e CO₂ produzido e solubilizado na solução por meio de constante dos gases. Foi necessária, posteriormente, a aquisição de um estabilizador de voltagem e um equipamento que provesse energia elétrica na sua falta (“Nobrek”).

3.2 - Meio de cultura

Preparo do substrato: moagem do volumoso através de peneira de 1 mm, após secagem em estufa de 60 °C.

Componentes da solução nutritiva para manutenção das condições de incubação dos microrganismos:

- **mistura tampão:** 4,0 g de (NH₄)HCO₃, 35,0 g de NaHCO₃, por litro de água destilada;

- **mistura de macro minerais:** 5,7 g Na₂HPO₄ anidro, 6,2g KH₂PO₄ anidro, 0,6 g MgSO₄ + 7H₂O completados em 1 litro de água destilada, é recomendado que se diluam primeiramente os fosfatos em 800 a 900 ml de água a fim de evitar precipitado insolúvel;

- **mistura de micro minerais:** 13,2 g $\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$, 10,0 g $\text{MnCl}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $\text{CoCl}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$, 8,0 g $\text{FeCl}_3 + 6\text{H}_2\text{O}$ completados em 100 ml de água destilada.

Figura - 1

Esquema do sistema de digestão “in vitro” computadorizada, pela produção de gás contínua.

A sigla AC indica fonte de corrente elétrica alternada, e C indica conversor de energia elétrica para 12 Volts e A/D conversor analógico/digital. Conforme Pell e Schofield - 1993.

3.3 - Preparo do meio de cultura

Para cada simulação da digestibilidade foi preparada uma solução nutritiva que apresentava 0,4 g de caseína como fonte de proteína, 80 ml de H_2O destilada, 40 ml de solução tampão, 40 ml de solução de macro mineral, 20 μl de solução de micro mineral, 200 μl de resazurin a 0,1 % (corantes, indicador de presença de oxigênio) e solução digestora de 3,0 ml de HCl 1N. Estes componentes foram sendo colocados em balão volumétrico de fundo redondo,

boca fechada com papel alumínio e aquecido em bico de Bunsen evitando atingir a fervura; promoveu-se resfriamento do balão em recipiente com gelo até temperatura de 39°C, adicionando-se 100 mg de cisteína-HCl como fonte de aminoácido e ao mesmo tempo injetando-se fluxo constante de CO₂ dentro do balão, a fim de se evitar entrada de oxigênio; mediu-se o pH, que deveria estar em torno de 6,8 a 6,9, e se necessário corrigir-se-ia com adição de NaOH ou HCl. Após todos esses procedimentos obteve-se uma solução denominada de mistura média. Os frascos incubatórios, nesta fase, já deveriam estar com 100 mg de amostra de alimento previamente pesada, mais 0,5 ml de água destilada para evitar perda de amostra por dispersão ao ser injetado CO₂. O branco foi constituído por um frasco incubatório com mistura média e sem amostra de alimentos. Em seguida foram adicionados 8 ml de mistura média dentro de cada frasco com fluxo constante de CO₂, fechou-se com tampa de borracha lubrificada com vaselina em pasta, lacrou-se a tampa com anel de alumínio e vazou-se rapidamente cada frasco a fim de deixar a pressão interna de todos frascos padronizadas.

3.4 - Calibração do sensores

Consistiu em colocar os frascos cuidadosamente dentro da estufa (para não espalhar amostra pela parede do frasco), conectar os sensores aos frascos, esperar a temperatura da estufa e do frasco se estabilizarem, programar o número de leituras no tempo, que neste caso foram 4 leituras para 0 ml de CO₂ e 4 leituras para 10 ml de CO₂ injetado em cada frasco. O objetivo desta calibração foi obter projeção linear das leituras de 0 e 10 ml de CO₂, e consequentemente, obter o coeficiente **b** da equação linear ($Y = a \pm bx$) que possibilitaria a correção e transformação dos dados lidos, em volume de gás produzido e em função da

Pressão barométrica do dia. O CO₂ injetado serviu para padronizar a curva do gás que tinha alta solubilidade em água.

3.5 - Tipo e preparo do inóculo

Utilizou-se líquido ruminal de vacas holandesas e de novilhos nelore, fistulados no rúmen, alimentados com alimentos diferentes dos testados. O líquido ruminal foi coletado após calibração dos sensores, filtrado em 2 panos de queijo dobrados em quatro camadas e colocado em garrafa térmica. Foi filtrado novamente no pano e em uma camada de aproximadamente 2 cm de lã de vidro inserida em funil de vidro, com a injeção contínua de CO₂ no processo de transferência para frasco de 200 ml (reservatório), o qual foi fechado com tampa de borracha e colocado na estufa para manter temperatura (39°C).

3.6 - Procedimento da inoculação

Após a calibração, foram injetados 2 ml de fluido ruminal em cada frasco, sempre tomando-se o cuidado de evitar a entrada de ar.

A retirada de líquido ruminal do recipiente de reserva se processou da seguinte maneira: enchimento de 4 a 5 frascos com CO₂ gasoso e vedação dos mesmos; coleta de 3 ml de CO₂ com seringa e injeção rápida do mesmo no reservatório de líquido ruminal, retirada de 2 ml do líquido ruminal do frasco reservatório e aplicação no frasco incubatório, lentamente para não causar morte dos microorganismos; fechamento da estufa, aguardando 15 minutos para que a temperatura da mesma se estabilizasse. Após esse procedimento, executou-se o programa “Signal View” que gerenciou as leituras do gás nos frascos, no tempo estipulado. Essas leituras foram armazenadas em planilhas específicas do “software” e gravadas na “memória” do computador. Foi programada leitura a cada 4 minutos no período total de 48 horas de incubação, sendo eliminados

quatro leituras a cada 20 minutos, devido ao “software” não aceitar maior tempo de leitura.

3.7 - Manipulação dos dados

As leituras efetuadas pelo programa “Signal-View” foram convertidas em planilhas do Microsoft Excel 4.0, e efetuadas as devidas transformações: subtração da primeira leitura das demais, subtração do branco de todas leituras, correção da pressão atmosférica do dia para 760 mmHg, cálculos em função do volume exato do frasco incubatório, cálculo do volume de líquido no frasco e do CO₂ solubilizado no líquido, tanto o gás usado na calibração como o da fermentação. O CO₂ dissolvido na mistura média acarretará aumento na pressão, que é governada pela Lei Henry’s, ou seja, “qualquer que seja o estado da fração molar do gás dissolvido, esse será proporcional à pressão parcial em equilíbrio na fase líquida” sendo portanto necessária a correção dos dados que foi feita pela seguinte fórmula: $F_c = F_b * (P_{at} / P) / ((V_f - 0,371 * V_s) / (V_f - 0,371 * V_{fi}))$ onde, F_c = fator de correção; F_b = fator b da equação linear obtida entre o volume zero e 10 ml de CO₂ no processo de calibração inicial; P_{at} = pressão barométrica do dia; P = pressão atmosférica ao nível do mar (760 mmHg); V_f = volume do frasco; 0,371 = valor obtido em função Lei de Henry’s; V_s = volume da solução; V_{fi} = volume da solução + inóculo. Portanto, dos gases provenientes da fermentação anaeróbia da celulose, apenas o CO₂ tem significativa solubilidade em meio líquido sob pressão atmosférica.

Após essas transformações, procedeu-se a análise através do programa estatístico “Table Curve”, versão 2.0, “Jandel, Scientific, San Rafael, CA”, o qual forneceu os valores da degradabilidade correspondentes às diferentes frações analisadas, segundo modelo logístico de dois compartimentos, a seguir, conforme proposto por Schofield et al. (1994):

$$y = A / (1 + \text{Exp} (2 + 4 * B * (C - t))) + D / (1 + \text{Exp} (2 + 4 * E * (C - t)))$$

Onde:

$y = (A+D)$ Volume total de gás (taxa de degradação)

A e D = Taxa de degradação rápida-parte solúvel, Taxa de degradação lenta-parte insolúvel, respectivamente;

B e E = Constantes de degradações rápida e lenta, respectivamente;

C = “lag time” (h), tempo de colonização das bactérias.

3.8 - Processamento do resíduo dos frascos

Terminado o período de incubação, mediu-se o pH da solução de cada frasco, injetaram-se 20 ml de solução detergente neutro, fechou-se, lacrou-se e colocou-se o frasco em autoclave por 60 minutos à temperatura de 120°C, a uma pressão de 1 atm. Posteriormente filtrou-se em cadinhos de fundo poroso previamente tarado, obtendo-se, assim, o resíduo da MS, conseqüentemente, a digestibilidade da MS e ou NDF (Pell e Schofield, 1993).

3.9 - Testes Preliminares no Sistema

Como o objetivo era testar o sistema de monitoramento computadorizado da produção de gás contínua “in vitro”, o experimento foi precedido de testes preliminares do sistema de monitoramento a fim de se averiguar o funcionamento do mesmo. Foram realizadas inúmeras tentativas até que o sistema funcionasse adequadamente. A primeira avaliação foi efetuada da seguinte maneira: foram adicionados 8 ml de solução nutritiva aos 16 frascos de incubação, com pH inicial de 6,9. Logo em seguida, os frascos foram fechados, lacrados e vazados. Iniciaram-se as leituras, a cada 2 minutos, após a temperatura da estufa se estabilizar (39°C), sendo a primeira leitura considerada tempo zero.

Após 90 minutos, foram adicionados 5 ml de CO₂ a cada 10 minutos por meio de seringa plástica, até completar 20 ml nos frascos. Em seguida aguardaram-se 10 minutos de leitura, perfurando e vazando logo após todos os frascos incubatórios; aguardaram-se outros 10 min e novamente injetaram-se 20 ml de CO₂, e procederam-se mais 25 minutos de leitura; logo em seguida os frascos foram vazados, somando um total de 4 horas de teste dos sensores. Ao final mediu-se o pH de cada frasco. O objetivo do teste foi verificar a resposta dos sensores a níveis crescentes e decrescentes de gás. Outro teste realizado foi para se verificar a influência da adição ou não de barras magnéticas agitadoras, no interior dos frascos incubatórios, sobre a digestão de feno de alfafa incubada com 2 ou 3 ml líquido ruminal. Essas barras tinham por função movimentar as amostras dos alimentos no meio líquido, a fim de proporcionar maior contato entre microrganismos e partículas de alimentos.

Testou-se ainda a influência de diferentes quantidades de amostra (50, 60, 70, 80, 100 e 110 mg de feno de alfafa) e silagem de milho com 41,9 % MS e 35 % de grãos; silagem de milho com 37% MS inoculada com lactobacilos, e folhas de capim-elefante colhido com 45, 55, 65, 75, 85 e 95 dias, a fim de se determinar o efeito sobre os coeficientes de variação e repetibilidade das mensurações, bem como o efeito sobre o pH após 48 horas de incubação.

Os testes foram realizados no Departamento de Zootecnia - Setor de Ruminantes, no Laboratório de Bromatologia, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), município de Piracicaba-SP.

3.10 - Experimento - Comparação do Sistema de Produção de Gás com os Métodos “in vivo” e “in situ”

Alimentos utilizados: silagem de milho com alto e baixo teores de matéria seca com e sem inoculante (produto comercial a base de lactobacilos e estreptococos). Foram feitas as análises bromatológicas de cada alimento (MS, EE, MM, PB, FDN, FDA, celulose e lignina). Foram avaliadas as taxas de degradação da MS e do FDN das silagens, através do Método de Monitoramento Computadorizado da Produção Contínua de Gás na Digestão “in vitro”, pelo resíduo da digestão de cada alimento encubado, bem como o desaparecimento da MS pela produção total de gases.

3.10.1 - Esquema de execução das análise dos alimentos

O esquema a seguir representa triplicatas de branco e alimentos, e duplicatas de rodadas em dias diferentes (A-B; C-D; E-F). O branco foi constituído de mistura média e líquido ruminal. O feno de alfafa esteve presente em todas as análises como um referencial padrão do potencial de crescimento dos microrganismos (Tabela 1). As amostras de silagens de milho com alta ou baixa MS, inoculadas ou não, foram submetidas a digestão “in vitro” pelo desaparecimento de MS e ou FDN pela produção de gás neste experimento, e seus resultados comparados com os obtidos previamente por digestão “in vivo” e “in situ” por Moraes (1995), Moraes et al. (1996ab).

As silagens foram produzidas com milho, cultivar 3210 da Pioneer Sementes Ltda, plantada no início da estação chuvosa (outubro de 1993), foram colhidas aproximadamente aos 90 dias após semeadura objetivando conseguir teores mais baixos de MS (28 a 33%), e o restante colhido por volta de 110 dias, com teores mais elevados de MS (35 a 40%). As silagens foram armazenadas em 12 silos tipo poço, tendo cada um a capacidade para 12 toneladas, onde foram

distribuídos 4 tipos de silagens (tratamentos): inoculada com alta MS, não inoculada com alta MS, inoculada com baixa MS, não inoculada com baixa MS, com 3 repetições.

Tabela 1 - Esquema de ordem execução das análises dos alimentos

Sensores	Alimentos (duplicatas de rodadas)					
	A	B	C	D	E	F
1	BR	BR	BR	BR	BR	BR
2	BR	BR	BR	BR	BR	BR
3	BR	BR	BR	BR	ALF	ALF
4	ALF	ALF	ALF	ALF	ALF	ALF
5	ALF	ALF	ALF	ALF	P1S8	P1S8
6	ALF	ALF	ALF	ALF	P1S8	P1S8
7	P1S1	P1S1	P2S3	P2S3	P1S8	P1S8
8	P1S1	P1S1	P2S3	P2S3	P2S8	P2S8
9	P1S1	P1S1	P2S3	P2S3	P2S8	P2S8
10	P2S1	P2S1	P1S7	P1S7	P2S8	P2S8
11	P2S1	P2S1	P1S7	P1S7	SIL JP	SIL JP
12	P2S1	P2S1	P1S7	P1S7	SIL JP	SIL JP
13	P1S6	P1S6	P2S7	P2S7	SIL JP	SIL JP
14	P1S6	P1S6	P2S7	P2S7	SIL JP	SIL JP
15	P1S6	P1S6	P2S7	P2S7	SIL JP	SIL JP
16	P1S6	P1S6	P2S7	P2S7	SIL JP	SIL JP

BR = Branco; **ALF** = Alfafa padrão, **Sil JP** = Silagem de milho com 41,94 % de MS e 35 % grãos; **P1** e **P2** = Períodos de avaliação digestão “in vivo” e “in situ”; **S1** = Silagem de milho com alta MS inoculada, **S3** e **S6** = Silagem de milho com alta não MS inoculada, **S7** = Silagem de milho com baixa MS inoculada e **S8** = Silagem de milho com baixa MS não inoculada.

O processo de enchimento dos silos deu-se de forma alternada de modo que os silos com o mesmo teor de MS, com e sem inoculação eram enchidos simultaneamente. O inoculante utilizado foi o produto comercial “1174” da Pioneer Sementes Ltda, contendo *Lactobacillus plantarum* e *Streptococcus faecium*, e foi preparado diariamente numa suspensão aquosa ($9,0 \times 10^{10}$ unidades formadoras de colônias (UFC)/grama do produto) e aplicado uniformemente com

pulverizador costal-manual com bico para baixa pressão a uma dosagem de 1 ppm. As carretas advindas da área de colheita recebiam duas aplicações, uma na parte superior da mesma, e outra após o descarregamento, antes da distribuição e compactação.

A avaliação da aditivação do inoculante bacteriano sobre a digestibilidade “in vivo” em bovinos se procedeu da seguinte forma: 8 bovinos machos castrados da raça Nelore com 350 Kg de PV, adaptados em gaiolas metabólicas de 1,0 m de largura e comprimento ajustáveis ao tamanho do animal. A alimentação era fornecida a cada 12 horas, metade pela manhã e a outra pela tarde, em cochos individuais. Os animais foram sorteados equitativamente nos 4 tipos de silagens, com 8 períodos de coletas de 7 dias, sendo 4 períodos com fornecimento de $60\text{g/kg PV}^{0,75}$ e 4 períodos de $80\text{g/kg de PV}^{0,75}$. Após cada período de fornecimento mais alto seguia-se a adaptação de 7 dias com fornecimento mais baixo e posterior coleta de 7 dias, no qual os animais recebiam o mesmo tipo de tratamento. No final de cada período de coleta, os animais recebiam outro tratamento, sendo submetidos a novo intervalo de 15 dias de adaptação. Nos períodos de coleta foram amostradas 10% do total diário de fezes e alimentos, e armazenados e analisados posteriormente. As pesagens dos animais ocorriam no início e final de cada período.

Na avaliação da aditivação do inoculante bacteriano sobre a degradabilidade “in situ” das silagens inoculadas ou não, foram utilizados 3 bovinos machos castrados da raça Nelore, fistulados, com peso vivo médio de 600 kg, colocados em gaiolas individuais onde receberam alimentação e água individualmente. Os animais foram submetidos aos 4 tratamentos (silagem de milho: Inoculada com alta MS, Não inoculada com alta MS, Inoculada com baixa MS e Não inoculada com baixa MS) durante 4 períodos, sendo que em cada

período uma das silagens não foi avaliada. Cada animal recebeu por dia 60 g/kg de PV^{0,75}. As coletas constaram de 4 períodos, com 15 dias de adaptação e 4 de coletas. Os tempos de incubação no rúmen foram de 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas.

As comparações dos dados de digestibilidade das silagens de milho avaliadas no sistema “in vitro”/gás com os dados do “in situ” se deu no tempo 48 horas, nos dois primeiros períodos de avaliação dos alimentos, bem como nos dois períodos no teste “in vivo”.

3.10.2 - Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado para comparação dos dados obtidos foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2 (4 tratamentos - silagens com alta e baixa MS; inoculadas ou não). Para comparação dos diferentes sistemas utilizou-se o esquema fatorial 3x4, para 3 sistemas (“in vitro/gás”, “in vivo” e “in situ”) e 4 alimentos (Silagens com alta e baixa matéria seca inoculadas ou não). As tabelas de análises de variância dos métodos de digestão avaliados estão presentes no apêndice. Foram feitas correlações entre resultados dos métodos de digestão “in situ” com o “in vitro”/gás. Para os demais alimentos (feno de alfafa, silagem de milho com 41,9% de MS e 35% de grãos) foi avaliada apenas a produção de gás. Foi utilizado o programa SANEST para análise estatística dos resultados experimentais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Testes Preliminares do Sistema

Os resultados dos testes efetuados nos sensores, com níveis crescentes de injeção de CO₂ e posteriormente decrescentes (frascos vazados) se mostraram eficientes nas leituras, apresentando poucas variações entre elas, com exceção de um sensor que apresentou muita oscilação, talvez por mau contato nas partes elétricas, vazamento do gás ou pelo excesso de pressão no frasco que provocaria variações na película semicondutora que promove a leitura, caracterizando um dos problemas encontrados no sistema (Figura 6 - Apêndice). As leituras de pH efetuadas ao final do teste evidenciaram o efeito da solubilidade do CO₂ na solução dos 16 frascos incubatórios, com aumento do pH inicial de 6,9 para 7,2 (CV=0,5 %). Mas, no processo de transformação das leituras de milivolts para ml de gás, há um fator (0,371 = valor obtido em função da Lei de Henry's) que tenta minimizar a influência tanto do CO₂ como do CH₄.

Foram feitos testes com e sem a adição de barras magnéticas associadas com 2 ou 3 ml de líquido ruminal adicionados em frascos incubatórios contendo amostras de feno de alfafa (Tabela 2). Obtiveram-se menores coeficientes de variação para produção total de gases com a utilização 2 ml de líquido ruminal (5,2 % e 1,3 % com e sem a barra magnética, respectivamente) em relação ao uso de 3 ml de líquido ruminal. E outro trabalho utilizando 2 ml de

líquido ruminal com e sem barra magnética foram obtidos 2,1% e 4,2% respectivamente (Pell e Schofield, 1993). Quando se utilizaram 3 ml de líquido ruminal associado ou não com a utilização de barra magnética agitadora, obtiveram-se maiores coeficientes de variação (22,3 % para produção total de gases com barra e de 11,8 % sem barra magnética). Essa variação pode ter ocorrido devido ao movimento giratório e saltitante da barra magnética agitadora e também pela rotação que, sendo de 48 rpm, causou aderência de partículas de amostras na parede dos frascos, deixando assim provavelmente amostras de alimento fora do alcance dos microrganismos ou pela quantidade e espécie de microrganismos do inóculo.

Os resultados mostraram que 2 ml de líquido ruminal e sem barra magnética agitadora no interior dos frascos incubatórios são os mais indicados por causarem menores variações dos dados dos alimentos analisados.

Tabela 2. Valores médios da produção total de gás em função dos volumes de líquido ruminal (2 ou 3 ml) por frasco incubatório com ou sem barra magnética agitadora.

Volume de líquido ruminal	Volume de gás (ml)	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação
3 ml - C.B.	22,36	4,98	22,27
3 ml - S.B.	16,79	1,98	11,82
2 ml - C.B.	20,19	1,05	5,20
2 ml - S.B.	18,69	0,24	1,27

C.B. - com barra magnética agitadora; S.B. - sem barra magnética agitadora

Observaram-se diferenças nas taxas de produção de gás do padrão (feno de alfafa), em diferentes análises de amostras no sistema. Estas diferenças podem ser resultantes de diferentes quantidades e espécies de microrganismos do inóculo, em função dos animais doadores estarem consumindo alimentos

diferentes dos testados. Várias repetições das análises foram efetuadas para se avaliar os fatores citados acima.

Foi observado que alguns fatores afetam os dados de leituras dos sensores como: maus contatos, queda de energia elétrica, vazamento de gases se os frascos não eram adequadamente fechados ou pelo próprio perfuramento da tampa de borracha no processo de calibração (injeção de CO₂), pela punção inicial e final para padronizar a pressão interna dos frascos e ainda no processo de injetar líquido ruminal nos frascos.

Para cada rodada avaliou-se a repetibilidade dos dados de volume total de gás ao final da digestão (48 horas), quando o volume de gás se torna praticamente constante por não haver mais substrato disponível para fermentação, bem como o pH final para diferentes tipos e quantidades de amostra (Tabela 3). Quanto menor a quantidade de amostra de alfafa (50 a 80 mg), maior foi o coeficiente de variação dos resultados analisados; quando se utilizaram pelo menos 90 a 100 mg de amostra, os coeficientes de variação foram menores, confirmando as recomendações de proporcionalidade na relação líquido:amostra (Goering e Van Soest, 1970).

Trei et al. (1970), trabalhando com digestibilidade de milho processado “in vitro” pela produção de gás, método manométrico, e desaparecimento de MS, observaram que, quando aumentaram a quantidade de amostra de 1,0 para 2,0 g, não houve diferença significativa no desaparecimento de MS, mas sim um decréscimo progressivo da produção de gás por grama de MS; quando aumentaram para 3,0 g, a quantidade de gás produzida foi significativamente ($P < 0,05$) menor que as outras.

Houve relação inversa entre quantidade de amostra e pH. Como o pH

tem papel fundamental sobre a taxa de crescimento microbiano, é importante não exceder a quantidade de material digestível passível de ser tamponada pelo sistema (Tabela 3; Figura 2). Orskov³ (1975), citado por Grant e Weidner (1992), e El-Shazly et al. (1961), afirmam que a quantidade de carboidrato disponível diminui o pH e conseqüentemente pode reduzir a digestão da fibra. Schofield e Pell (1995), trabalhando com 3 forragens (alfafa, capim timóteo e silagem de milho), constataram que a única variável que afetou a fermentação nos frascos foi o pH. Stewart⁴ (1977), citado por Grant e Weidner (1992), constatou que a digestão da fibra foi inibida quando o pH abaixou de 6,9 para 6,0, e a população de microrganismos celulolíticos decresceu simultaneamente de 10^6 para 10^3 /ml de líquido ruminal.

Os resultados sugerem que a quantidade ao redor de 100 mg de amostra proporciona redução do coeficiente de variação e manutenção do pH adequado.

Constatou-se que a calibração dos sensores e o branco foram identificados como pontos críticos no sistema, pois todos os demais dados são condicionados a eles. Outros pontos que merecem mais estudos no sistema são: 1) mau contato entre as partes elétricas dos sensores resultante do manuseio dos mesmos, 2) amostras de alimentos aderidas nas bordas do frasco incubatório por tombamento do frasco no processo de enchimento com solução nutritiva e pelo transporte para estufa.

³ ORSKOV, E.R.; FRASER, C. The effects of processing of barley-based supplement on rumen pH, rate of digestion, and voluntary intake of dried grass in sheep. **Bristh Journal Nutrition**, v.34, p.493, 1975.

⁴ STEWART, C. S. Factors affeting the cellulolytic activity of rumen contests. **Applied Enviroments Microbiology**, v.33, p.497, 1977.

Tabela 3 - Valores médios do volume de gás produzido, coeficiente de variação (CV) e pH para diferentes quantidades de amostras de alimentos.

Forragens	Amostras (mg)	Volume de Gás (ml)	Coeficiente Variação (%)	pH Médio	Coeficiente Variação (%)
Feno de Alfafa	50	15,8	4,1	6,5	0,8
	60	18,8	2,7	6,4	0,1
	70	17,1	10,2	6,4	0,9
	80	18,1	3,4	6,4	0,3
	90	17,5	1,6	6,3	0,3
	100	17,4	0,5	6,3	0
	110	17,4	2,0	6,3	0,4
Sil.Mil. Inoc.	100	17,5	0,6	6,3	0,4
Sil. Milho	100	20,4	3,0	6,2	1,1
FCE - 45 dias	100	-	2,8	6,3	3,3
FCE - 55 dias	100	-	1,8	6,6	3,2
FCE - 65 dias	100	-	2,0	6,5	0,3
FCE - 75 dias	100	-	2,6	6,5	1,1
FCE - 85 dias	100	-	3,2	6,5	0,3
FCE - 95 dias	100	-	2,3	6,5	0,4

Sil. Milho = Silagem com 41,9% MS e 35 % de grãos, FCE = Folhas de Capim-Elefante

Sil. Mil.Inoc. = Silagem de Milho com 37 % MS e inoculada com lactobacilos

Os problemas observados relativos a volume de inóculo, peso de amostra, uso ou não de barras magnéticas agitadoras foram solucionados, mas sugerem-se cuidados com os contatos dos sensores, a padronização da dieta dos animais doadores, bem como a raça bovina, fatores aos quais inicialmente não foi dada importância e que ao final podem ter contribuído para aumentar o coeficiente de variação entre as repetições.

Figura - 2

Influência da quantidade de amostra (mg) no pH médio no fluído da digestão “in vitro” após 48 horas de incubação.

4.2 - Experimento

4.2.1 - Avaliação dos alimentos

Na tabela 4 são apresentados os valores médios da composição bromatológica dos alimentos utilizados na digestibilidade “in vitro”/gás, “in vivo” e “in situ”.

De modo geral, as silagens com alta e baixa matéria seca inoculadas ou sem inoculação apresentaram valores semelhantes entre si quanto aos teores de FDN, FDA, celulose, lignina e CHO; quanto a PB, os teores mais elevados foram encontrados nas silagens com baixo teor de MS.

Morais (1995) afirma que altos teores de MS podem ser responsáveis

por diminuição na qualidade da silagem com aumentos no teor de fibra e diminuição na concentração de carboidratos solúveis, devido à presença de mais oxigênio na massa em função da menor compactação do material ensilado.

Tabela 4. Composição bromatológica dos alimentos, feno de alfafa, silagem de milho com alta, baixa matéria seca inoculada ou não.

Alimentos	Frações (% MS)								
	MS	FDN	FDA	CEL	LIG	CHO	PB	EE	MM
F. Alfafa	87,8	33,8	25,8	21,2	5,2	33,5	20,9	3,6	8,2
A MS I	37,2	61,1	35,2	28,6	6,5	24,4	7,7	1,4	5,4
B MS I	30,3	60,3	36,4	28,9	7,5	19,6	10,2	2,8	7,1
A MS N I	38,4	60,5	34,5	27,5	6,9	24,7	7,6	1,6	5,6
B MS N I	29,3	58,4	34,2	27,8	6,4	23,2	9,7	2,2	6,5
Sil. Milho *	41,9	36,5	21,6	15,4	6,3	47,4	6,6	2,6	6,9

MS - matéria seca, FDN - fibra em detergente neutro, CEL - celulose, LIG - lignina, CHO - carboidrato solúvel, PB - proteína bruta, EE - extrato etéreo, MM - matéria mineral

F. Alfafa - Feno de Alfafa

* - Silagem de milho com 41,9 % de MS e 35% de grãos (Pereira - 1995)

AMSI - Alta matéria seca inoculada; AMSNI - Alta matéria seca não inoculada

BMSI - Baixa matéria seca inoculada; BMSNI - Baixa matéria seca não inoculada

Obs.: silagens inoculadas ou não - amostras obtidas de experimentos "in vivo" e "in situ"

(Morais, 1995; Morais et al., 1996 ab).

Segundo Mahanna et al. (1995), menor qualidade de silagens pode ocorrer nos dois extremos: baixos teores de MS, os quais aumentam os níveis de amônia, aminas e ácido butírico, e altos teores de MS, em que a atividade da fermentação é reduzida e a compactação dificultada, podendo aumentar as perdas por aeração, bolores e aquecimento, implicando na indisponibilidade de formas nitrogenadas para a população microbiana ruminal. Orskov et al. (1980) constataram que deficiência de proteína degradável na dieta limitaria a atividade microbiana, afetando, assim, a ingestão e a digestibilidade dos nutrientes.

Os teores de FDN que ficaram acima de 58 %, com base na MS, são considerados altos para silagem de milho. Moraes (1995) explica que provavelmente a possível degradação do conteúdo celular do material, por ação de microrganismos de fermentação aeróbica, levou a aumento na proporção de parede celular.

No sistema “in vitro”/gás, o feno alfafa que foi utilizado como padrão foi considerado alimento ideal na visualização da eficiência do inóculo utilizado e consequentemente melhor curva de digestão. Quanto ao teor de FDN da silagem de milho, com 41,9 % de MS e 35% de grãos, está muito baixo em relação às demais silagens avaliadas e essa diferença está relacionada com o estágio de crescimento da planta por ocasião de sua colheita para ensilagem.

4.2.2. Análise dos alimentos pelo método da digestão “in vitro” pela produção de gás e comparação com “in vivo” e “in situ”

Na tabela 5 é mostrada a digestibilidade (desaparecimento da MS) das silagens com alta e baixa matéria seca inoculadas ou não. Foi observado que, em cada método de avaliação dos alimentos, houve pequena variação, mas significativa. Não foi possível analisar estatisticamente a silagem de milho com 41,9 % MS com 35 % de grãos devido à insuficiência de dados obtidos pelo método “in situ”. Mas, avaliando em termos numéricos, pode-se observar que no método “in vitro”/gás a digestibilidade da MS dessa silagem foi superior (78,3%) ao método “in situ” (68,9 %). Essa diferença deve-se ao fato de que no método “in vitro”/gás, a parte solúvel e insolúvel do alimento está incluída na digestibilidade da MS, enquanto que no “in situ” a parte solúvel foi lavada inicialmente e, portanto, não avaliada no processo de digestão.

Comparando os dados de digestibilidade entre os métodos (Tabela 5), pode-se constatar que apenas a silagem com baixa matéria seca não inoculada apresentou valores “in situ” significativamente ($P<0,05$) superiores aos demais sistemas. Blummel e Orskov (1993) ressaltam que a extensão e a taxa de degradação são baseadas no desaparecimento da MS, assumindo assim que todas as perdas ocorreram pela fermentação. Isto pode nem sempre ser o caso. Pearce et al. (1987) observaram diferentes níveis de fermentação das frações solúveis de palha de trigo, frações essas que podem ser perdidas no saco de náilon e consequentemente superestimar a digestibilidade.

Tabela 5. Comparação de dados médios de digestibilidade da matéria seca (MS) de silagem de milho com alta e baixa MS, inoculada ou não, obtidos pelos métodos de digestão “in vitro”/gás, “in situ”, e “in vivo”, no período 48 h.

Alimentos	“in vitro” ^x (%)	“in vivo” ^y (%)	“in situ” ^y (%)
Alta MS Inoculada	65,0 ^{bA}	67,2 ^{aA}	66,4 ^{bA}
Baixa MS Inoculada	66,6 ^{aA}	68,0 ^{aA}	67,6 ^{bA}
Alta MS não Inoculada	65,5 ^{bA}	65,5 ^{aA}	68,9 ^{aA}
Baixa MS não Inoculada	68,2 ^{aB}	65,7 ^{aB}	72,3 ^{aA}
Coefic. de Variação (%)	3,5	7,4	3,6
Silagem de milho *	78,3	-	68,9

a, b, A,B - Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si ($P<0,05$), pelo teste Tukey.

x - Método de digestibilidade “in vitro”/gás computadorizada (Pell e Schofield - 1993)

*Silagem de milho com 41,9 % de MS e 35% de grãos, dados obtidos de Pereira (1995)

y - Dados e alimentos obtidos dos experimentos realizados por Moraes (1995) e Moraes et al., (1996ab).

Hanna et al. (1973), citados por Thiago e Gill (1990), observaram que os microrganismos do rúmen degradam, em primeiro lugar, o parênquima, seguido pelo floema, células da epiderme e feixes vasculares. Por outro lado, a cutícula, que cobre a epiderme, e os tecidos lignificados dos feixes vasculares

(xilema) não sofrem qualquer degradação, mesmo após 72 horas de fermentação “in vitro” (Akin⁵ et al., 1974, citados por Thiago e Gill (1990). Por isto, também a digestibilidade “in vivo” tem-se mostrado estar mais proximamente relacionada com a digestibilidade “in vitro” do que com qualquer determinação química da parede celular (Van Soest et al., 1967).

Quanto à digestibilidade, as silagens com alta MS, com ou sem inoculação (Tabela 5) não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) entre os diferentes métodos analisados. Geralmente silagens de milho com alta matéria seca apresentam altos teores de amido (alta MS inoculada = 22,3 % ou sem inoculação = 23,3 % contra baixa MS inoculadas = 15,2 % ou sem inoculação = 16,2%) devido à maior proporção de grãos, quando comparadas com silagens de baixa matéria seca (Morais 1995). Enquanto que Pereira (1995) trabalhando com silagem de milho com 41,9 % de MS e 35% de grãos encontrou teores de 24,9 % de amido na matéria seca.

As digestibilidades das silagens de milho com alta ou baixa matéria seca se apresentaram significativamente diferentes ($P<0,05$) nos métodos “in vitro”/gás e “in situ”, quando avaliadas separadamente do efeito do inóculo; já “in vivo” não houve diferença significativa quanto ao teor de MS (Tabela 6). Analisadas as silagens de milho, independentemente do teor da matéria seca, apenas no método “in situ” houve diferença significativa ($P<0,05$) quanto à inoculação (Tabela 6). Mas, para ambos fatores, matéria seca e inoculação, analisadas conjuntamente, a interação se mostrou não significativa (Tabela 12 a 14 - Apêndice).

⁵ Akin, D.E.; Burdick, D.; Michaels, G.E. Rumen bacterial interrelationship with plant tissue during degradation revealed by transmission electronic microscopy. Applied Microbiology, v.27, p.1149-1156, 1974.

Tabela 6. Efeito isolado dos tratamentos na comparação da digestibilidade da matéria seca (MS) de silagem de milho, obtida pelos métodos de digestão “in vitro”/gás, “in situ”, e “in vivo”, no período de 48 h.

Matéria seca	“in vitro”¹ (%)	“in vivo” (%)	“in situ” (%)
Silagem Alta MS	65,2 ^b	66,4 ^a	66,4 ^b
Silagem Baixa MS	67,4 ^a	66,9 ^a	72,3 ^a
Inoculação			
Silagem Inoculada	65,8 ^a	67,6 ^a	67,0 ^b
Silagem não Inoculada	66,8 ^a	65,6 ^a	70,6 ^a

a, b - Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem entre si ($P < 0,05$), pelo teste Tukey.

1- Método de digestibilidade “in vitro”/gás computadorizada (Pell e Schofield - (1993).

Na tabela 7 é mostrada a digestibilidade da MS e do FDN bem como o pH dos diferentes alimentos analisados pelo resíduo da incubação por 48 h no sistema de digestibilidade “in vitro”/gás. Não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) na digestibilidade do FDN das silagens com alta ou baixa MS, inoculadas ou não, e bem como o pH no final da digestão (Tabela 15 e 16 - Apêndice). Foi observado que não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) na digestibilidade do FDN e nem quanto ao pH que foi igual a 6,2 ao final da incubação, das silagens de milho com alta ou baixa MS inoculadas ou sem inoculação.

Grant e Mertens (1990) constataram que com o decréscimo no pH da solução tampão de 6,8 para 5,8 em digestão “in vitro” houve aumento no “lag-time” (tempo de colonização) e decréscimo na taxa de digestão do NDF. Grant e Weidner (1992) constataram que o abaixamento do pH exerce efeito negativo sobre a digestão do NDF entre pH de 6,2 a 5,8, evidenciando aumento do “lag-time” (tempo de colonização) e decréscimo na taxa de digestão.

Tabela 7. Médias da digestibilidade da matéria seca (MS) e do NDF, e pH ao final da digestão (48 h) de feno de alfafa e silagens de milho, com alta ou baixa MS, inoculadas ou não, em função do resíduo, no sistema “in vitro”/gás.

Alimentos	Digestibilidade (%) ¹					pH
	DMS	DNDF			CV	
		CV		CV		
Alfafa	76,5	4,2	57,0	6,5	6,25	0,7
Alta MS Inoculada	65,0	3,8	57,7 ^a	3,0	6,19 ^a	2,0
Baixa MS Inoculada	66,6	3,7	59,7 ^a	3,3	6,25 ^a	1,4
Alta MS não Inoculada	65,5	3,3	57,4 ^a	3,1	6,25 ^a	0,3
Baixa MS não Inoculada	68,2	3,0	58,1 ^a	1,7	6,19 ^a	2,1
Silagem de Milho*	78,3	6,4	62,9	8,2	6,25	1,2

a, b - Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste Tukey (P<0,05)

¹ - Digestibilidade verdadeira com base em 100 mg de matéria seca

CV - Coeficiente de variação em percentagem

DMS: Digestibilidade da matéria seca; pH inicial da mistura média 6,90

DNDF: Digestibilidade da fibra em detergente neutro total

* - Silagem de milho com 41,9 % de MS e 35% de grãos (Pereira, 1995)

Os resultados avaliados da digestibilidade do FDN das silagens de milho avaliados pelo sistema “in vitro”/gás (Tabela 7) ficaram próximos aos resultados obtidos por Moraes (1995); Moraes et al. (1996a): alta MS inoculada - 57,7 x 58,0 %; baixa MS inoculada - 59,7 x 55,0 %; alta MS não inoculada - 57,4 x 54,0 %; baixa MS não inoculada - 58,6 x 52,0 %.

Danley et al. (1973) constataram que o avanço da maturidade e a ensilagem afetam o valor nutritivo das forragens, através de uma interação complexa dos constituintes por alteração de um ou mais de seus componentes simples, e esta magnitude dos efeitos é diferente de espécie para espécie de plantas forrageiras.

Na tabela 8 são mostrados os dados relativos à cinética da digestão de alfafa, de silagem de milho com alta e baixa matéria seca inoculada ou sem

inoculação. Nesta tabela pode-se observar que quanto maior a quantidade de carboidratos solúveis no alimento, maior sua taxa de degradação rápida (fração A), fato observado nos resultados de digestão do feno de alfafa utilizada como padrão nas análises. Isso ocorreu devido, provavelmente, a presença de carboidratos solúveis prontamente disponíveis para os microrganismos fermentadores. Caso não ocorrido nas silagens que, inicialmente, já sofreram fermentação no seu processo de confecção. Segundo Stefanon et al. (1996), a fração solúvel em água, dos carboidratos, não é bem definida quimicamente devido às diferentes proporções de pectina, frutanas e amido contidas nos alimentos. Entretanto, esta fração tem alto valor nutricional para os microrganismos do rúmen. Consequentemente, essas frações solúveis dos alimentos contribuem muito para a produção dos ácidos graxos voláteis, fonte de energia para os ruminantes.

Comparando os dados obtidos (Tabela 8) na cinética da digestão de alfafa com os dados obtidos por Stefanon et al. (1996) observam-se, respectivamente, os seguintes valores das frações $A = 12,9$; $B = 0,12$; $C = 2,2$; $D = 7,6$; $E = 0,037$; $A+B = 20,54$ ml gás/ 0,1 g MS contra 9,5; 0,17; 1,5; 10,7; 0,031 e 20,3. Essa variação é devida provavelmente aos diferentes pontos de colheita das alfafas avaliadas, bem como a sua composição bromatológica (Tabela 4) que foi 20,9 % de PB; 33,8% de FDN; 25,8% de FDA contra 22,5; 34,6; 22,0%, respectivamente, obtidos por Stefanon et al. (1996). Além disto, o inóculo utilizado neste trabalho foi obtido de animais consumindo alimentos diferentes dos analisados pelo sistema, por não haver maior disponibilidade dos mesmos.

Tabela 8. Análise das curvas de produção de gás “in vitro” (ml/100 mg MS) de feno de alfafa, silagem de milho no período total de 48 h obtidas por triplicatas de amostras.

Alimentos	Parâmetros da cinética de digestão						
	A	B	C	D	E	A+D	R ²
Feno de Alfafa	12,9	0,12	2,2	7,6	0,037	20,5	0,98
Alta MS Inoculada	6,9	0,16	7,6	13,3	0,039	20,1	0,99
Baixa MS Inoculada	10,3	0,20	7,4	12,1	0,040	22,4	0,99
Alta MS não Inoculada	10,7	0,16	7,4	12,8	0,042	23,5	0,99
Baixa MS não Inoculada	8,0	0,11	4,8	12,9	0,035	20,8	0,99
Silagem de Milho*	7,4	0,12	5,6	15,7	0,042	23,2	0,99
Coeficiente de Variação (%)							
Feno de Alfafa	2,3	8,4	28,7	6,5	9,0	3,2	1,56
Alta MS Inoculada	6,1	18,0	11,5	6,3	8,4	5,2	0,07
Baixa MS Inoculada	6,4	2,6	5,9	9,5	4,3	2,2	0,00
Alta MS não Inoculada	2,7	7,0	12,8	5,8	10,8	1,9	0,02
Baixa MS não Inoculada	8,2	13,5	32,9	8,1	7,4	3,5	0,50
Silagem de Milho*	5,2	2,2	7,4	3,0	6,3	0,8	0,34

A+D - ml total de gás = $a/(1+EXP(2+4*b*(c-t)))+d/(1+EXP(2+4*e*(c-t)))$, A - ml de gás de degradação rápida, B - constante de degradação rápida, C - Tempo de colonização (lag time), D - ml de gás de degradação lenta, E - constante de degradação lenta, R² - coeficiente de determinação.

* - Silagem de milho com 41,9 % de MS e 35% de grãos (Pereira, 1995)

As silagens de milho com alta ou baixa matéria seca inoculadas ou sem inoculação, mostraram-se similares quanto aos parâmetros D, E e A+D da cinética de digestão. Foi observado que a silagem com alta matéria seca não inoculada apresentou maior taxa de degradação rápida (fração solúvel: A = 10,7 ml de gás), quando comparada com a silagem inoculada (6,9 ml de gás). Ambas apresentaram constantes de degradação da fração rápida semelhantes (B = 0,16/h), taxa de degradação lenta (D = 13,3 contra 12,8 ml de gás), constantes de degradação da fração lenta (E = 0,039 contra 0,042/h), “lag time” (C = 7,6 contra 7,4 h) praticamente semelhantes. A silagem com alta matéria seca sem inoculação,

porém, apresentou maior produção total de gás em relação à alta MS inoculada ($A+D = 23,5$ contra $20,1$, respectivamente); pode-se verificar também que houve maior coeficiente de variação para silagem com alta MS inoculada ($A+D = 5,2 \%$) em relação a alta MS não inoculada ($A+D = 1,9 \%$). Nestas condições, pode-se deduzir que, apesar de ambas terem alta matéria seca, há consequentemente maiores proporções de grãos, e portanto mais amido, o inoculante de certa forma interferiu sobre o crescimento microbiano, produzindo menos gás, fato ocorrido também na digestibilidade pelo resíduo no método “in situ” (Tabela 6). Quanto à fração solúvel (A) da silagem com alta MS, a variação ocorrida se deve provavelmente à interferência do inoculante utilizado na silagem, o qual deprimiu a digestibilidade da fração solúvel ou se utilizou desse substrato para seu crescimento no processo de fermentação de silagem nos silos. Caso que não ocorreu para a fração solúvel (A) da silagem com baixa MS, onde neste caso, o inoculante respondeu melhor devido provavelmente a melhor compactação da silagem no silo que promoveu melhor ambiente para a ação do inoculante, melhorando assim a digestibilidade da fração solúvel.

Para Moraes (1995), o efeito da inoculação na digestibilidade ou na composição da parede celular pode ser devido ao menor pH, que aumentaria a quantidade de hidrólises ácidas dos constituintes da parede celular.

As variações dos dados de digestibilidade “in vitro” (ml de gás produzido) dentro de triplicatas (Tabela 8) era esperada devido a efeitos de inóculos, tipo de alimento a ser colocado para ser digerido (volumoso natural ou fermentado), tipo de alimento ingerido pelo animal doador (especificidade dos microrganismos) bem como categoria animal utilizada. Schofield e Pell (1995) encontraram diferenças significativas ao usarem diferentes inóculos de líquido ruminal e relataram que a diferença encontrada pode ter sido em função das diferentes

quantidades e espécies de microrganismos no inóculo. Nesta mesma linha de pesquisa, Nelson et al. (1973) encontraram diferença significativa ($P < 0,01$) na digestibilidade da matéria seca “in vitro” de alimentos com inóculos de vacas consumindo alimentos diferentes dos analisados. Jung e Varel (1988) mostraram claramente que a fonte de forragem tem efeito significativo sobre a população microbiana ruminal e subsequente atividade fibrolítica do inóculo ruminal.

Os coeficientes de variação dos dados comumente obtidos nos ensaios experimentais dão idéia da precisão dos experimentos. De maneira geral pode-se dizer que os coeficientes de variação obtidos, de acordo com a tabela 8, foram de valores de baixo a médio, salvo algumas exceções (“lag-time”- tempo de colonização para alfafa $CV = 28,7\%$; da silagem de milho com baixa MS não inoculada $CV = 32,9\%$), mostrando assim a precisão do método. A mesma análise foi feita com os dados da tabela 9, avaliando-se a repetibilidade dos dados nos diferentes dias de análises das amostras de alimentos. No cômputo geral, os coeficientes de variação dos dados foram considerados de valor de baixo a médio, com exceção da silagem de milho com baixa MS inoculada que apresentou valores considerados altos, segundo Gomes (1990).

Para certos alimentos e parâmetros da cinética de digestão avaliados, houve coeficiente de variação considerado relativamente alto, mas essa variação pode ser explicada por problemas de quantidades e tipo de amostras, tipo e quantidade de microrganismo do inóculo (potencial de fermentação), como é observado nas amostras de silagem de milho com baixa MS inoculada (Tabela 9). Quando avaliada a repetibilidade das análises (rodadas) em dias diferentes, os coeficientes de variação foram relativamente altos ($A=22,9$; $B=32,4$; $D= 23,9$; $E=27,7$) quando comparados com os dados da tabela 8. Quando foram analisadas apenas as triplicatas das amostras de alimentos em mesma rodadas, as variações foram

menores (A=6,4; B=2,6; D=9,5; E=4,3). Mesmo ocorrendo estas grandes variações mostradas nas tabelas 8 e 9, os resultados foram relativamente semelhantes (22,4 ml de gás - CV 2,2% contra 22,3 ml de gás - CV 2,4%) para a extensão de degradação da MS (produção média de gás - A+D) e coeficiente de variação.

Tabela 9. Comparação de análises (medidas em dias diferentes) da produção de gás acumulativa “in vitro” (ml/100 mg MS) de feno de alfafa, silagem de milho com alta ou baixa MS, inoculada ou não no período de 48 h.

Alimentos	Parâmetros da cinética de digestão						
	A	B	C	D	E	A+D	R ²
Feno de Alfafa	12,5	0,12	2,4	8,6	0,036	21,2	0,99
Alta MS Inoculada	8,6	0,19	6,9	12,7	0,040	21,3	0,99
Baixa MS Inoculada	9,3	0,18	9,1	13,0	0,070	22,3	0,99
Alta MS não Inoculada	10,8	0,14	8,7	11,6	0,071	22,5	0,99
Baixa MS não Inoculada	7,4	0,11	6,3	13,5	0,036	20,9	0,99
Silagem de Milho *	7,8	0,14	5,5	15,4	0,043	23,2	0,99
Coeficiente de Variação (%)							
Feno de Alfafa	13,0	10,0	5,6	18,5	17,2	2,2	1,29
Alta MS Inoculada	7,8	9,1	4,9	2,9	2,6	5,1	0,04
Baixa MS Inoculada	22,9	32,4	6,2	23,9	27,7	2,4	0,01
Alta MS não Inoculada	7,8	3,1	2,6	5,2	4,67	2,0	0,34
Baixa MS não Inoculada	18,5	12,0	11,6	7,5	9,0	3,2	1,32
Silagem de Milho *	10,7	8,3	5,1	9,0	3,3	7,6	0,32

A+D - ml total de gás = $a/(1+EXP(2+4*b*(c-t)))+d/(1+EXP(2+4*e*(c-t)))$, A - ml de gás de degradação rápida, B - constante de degradação rápida, C - Tempo de colonização, D - ml de gás de degradação lenta, E - constante de degradação lenta, A+D - ml total de gás, R² - coeficiente de determinação.

* - Silagem de milho com 41,9 % de MS e 35% de grãos (Pereira, 1995)

A importância do tipo de alimento ingerido pelo animal doador de líquido ruminal é citada por Nelson et al. (1973) que, trabalhando com digestibilidade de MS “in vitro” de feno de alfafa e silagem de milho, encontraram diferença significativa ($P<0,01$) na digestibilidade da matéria seca quando utilizaram dois animais como fonte doadores de inóculo ruminal. Entretanto, esta diferença e

possíveis variações são aceitáveis e controladas quando comparadas com dados “in vivo”.

Quando se avaliaram os parâmetros da cinética da digestão (Tabela 10) de oito repetições de cada alimento, obtidas de todas as rodadas das análises com descarte dos piores dados, mesmo assim o coeficiente de variação aumentou, e isso se deve provavelmente pela heterogeneidade da fonte de inóculo, e pH do líquido ruminal. Talvez, o alto coeficiente de variação da digestibilidade da fração solúvel (A) da silagem de milho com baixa MS inoculada ou sem inoculação não evidenciou a diferença de 7,6 contra 8,2 ml de gás/100 mg amostra.

Avaliando os resultados das tabela 10 e 11, foi observado que a fração solúvel (A - taxa de degradação rápida) apresentou melhor resultado em silagens com teor de MS alto do que com teor de MS baixo (10,5 contra 7,9 ml de gás, respectivamente). Essa diferença pode estar no fato de que a silagem com alta MS continha maior proporção de amido fermentescível do que a silagem com baixa matéria seca. Quanto à inoculação não houve efeito sobre a digestibilidade dos alimentos estudados (figura 3, 4, 5). Mesmo tendo ocorrido diferenças, como na constante de degradação rápida (B) para inoculante e interações para constante de degradação lenta (E) e “lag-time”- tempo de colonização (C), nas diversas silagens estudadas, essas não contribuíram para diferenciar ($P > 0,05$) a máxima produção de gás ($A+D = \text{ml}/100\text{mg}$ de MS) dos tratamentos estudados (Tabelas 17 a 22 - Apêndice).

Sanderson (1993) verificou que a inoculação com bactérias lácticas não afetou a deterioração ou digestibilidade da fibra de silagem de milho. Variáveis resultantes a partir deste estudo e outros efeitos relativos à estabilidade aeróbica e digestibilidade da fibra da silagem sugerem que os inoculantes bacterianos deveriam ser vistos primeiramente como auxiliares da fermentação. Portanto, os

resultados obtidos no presente experimento estão de acordo com os obtidos por Moraes (1995); Moraes et al. (1996ab), cujas amostras foram submetidas à digestão “in vitro”/gás neste trabalho.

Tabela 10. Produção média de gás acumulativa “in vitro” (ml/100 mg MS) de silagem de milho com alta ou baixa MS inoculada ou não no período total de 48 h obtida de oito repetições por alimento.

Alimentos	Parâmetros da cinética de digestão					
	A	B	C*	D	E*	A+D
Alta MS Inoculada	10,1 ^a	0,16 ^a	7,4 ^a	11,7 ^b	0,037 ^b	21,9 ^a
Baixa MS Inoculada	7,6 ^b	0,21 ^a	9,1 ^a	15,2 ^a	0,039 ^b	22,4 ^a
Alta MS não Inoculada	10,8 ^a	0,14 ^b	8,7 ^a	11,6 ^b	0,071 ^a	22,8 ^a
Baixa MS não Inoculada	8,2 ^b	0,12 ^b	6,2 ^b	12,8 ^a	0,033 ^b	21,0 ^a
Coefic. de Variação (%)	32,9	27,5	21,6	18,3	58,7	7,9

a, b - Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem entre si ($P < 0,05$), pelo teste Tukey.

A+D - ml total de gás = $a/(1+\text{EXP}(2+4*b*(c-t)))+d/(1+\text{EXP}(2+4*e*(c-t)))$, A - ml de gás de degradação rápida, B - constante de degradação rápida, C - Tempo de colonização, D - ml de gás de degradação lenta, E - constante de degradação lenta.

* - houve interação (MS x Inoculação)

Na tentativa de comparar os dados dos sistemas, foram realizadas correlações entre os métodos de digestibilidade (figuras 5 a 12 - Apêndice). A produção de gás (A+D) correlacionada com o potencial de degradação (A+B) obtido “in situ” se mostraram altas para silagem de milho com alta MS inoculada ($R^2 = 0,99$), com alta MS não inoculada ($R^2 = 0,98$), com baixa MS inoculada ($R^2 = 0,94$), e com baixa MS não inoculada ($R^2 = 0,93$).

Tabela 11. Efeito isolado dos tratamentos na produção média de gás acumulativa “in vitro” (ml/100 mg MS) de silagem de milho no período total de 48 h obtidos por oito repetições de cada alimento.

Matéria seca	Parâmetros da cinética de digestão ¹					
	A	B	C	D	E	A+D
Silagem Alta MS	10,5 ^a	0,15 ^a	-	11,7 ^b	-	21,9 ^a
Silagem Baixa MS	7,9 ^b	0,17 ^a	-	14,0 ^a	-	22,4 ^a
Inoculação						
Silagem Inoculada	8,9 ^a	0,18 ^a	-	13,5 ^a	-	22,8 ^a
Silagem não Inoculada	9,5 ^a	0,13 ^b	-	12,2 ^a	-	21,0 ^a

a, b - Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem entre si ($P < 0,05$), pelo teste Tukey.

A+D - ml total de gás = $a/(1+\text{EXP}(2+4*b*(c-t)))+d/(1+\text{EXP}(2+4*e*(c-t)))$, A - ml de gás de degradação rápida, B - constante de degradação rápida, C - Tempo de colonização, D - ml de gás de degradação lenta, E - constante de degradação lenta.

1- Método de digestibilidade “in vitro”/gás-computadorizada (Pell e Schofield- 1993).

Figura 3.

Produção média de gás acumulativa (ml/100 mg de MS) em 48 horas de incubação de Feno de alfafa; AMSI - Silagem de milho com alta MS inoculada; AMSNI - Silagem de milho com alta MS não inoculada; Branco.

Figura 4.

Produção média de gás acumulativa (ml/100 mg de MS) em 48 horas de incubação de Feno de alfafa; BMSNI - Silagem de milho com baixa MS não inoculada; BMSI - Silagem de milho com baixa MS inoculada; Branco.

Figura 5.

Produção média de gás acumulativa (ml/100 mg de MS) em 48 horas de incubação de Feno de alfafa; Silagem de milho com 41,9% MS e 35 % grãos; Branco.

Blummel e Orskov (1993), comparando a digestibilidade “in vitro” pelo processo de produção de gás com o método de digestão “in situ”, utilizando palha tratada com amônia, encontraram baixa correlação ($R = 0,29$) entre a taxa de produção de gás “in vitro” e a taxa de degradação da MS (desaparecimento da MS) obtida “in situ”. Khazaal et al. (1995), comparando a predição da ingestão diária de MS e digestibilidade aparente dos fenos de gramíneas com fenos de leguminosas nos métodos “in situ” e “in vitro”/gás, constataram que os parâmetros da degradação da MS “in situ” foram melhores que “in vitro”/gás. Entretanto, no “in vitro”/gás a predição de ingestão diária de alimentos e digestibilidade da MS foi melhor que por qualquer outra técnica de análise dos componentes da fibra ou da digestibilidade “in vitro” de Tilley e Terry.

Tratando-se de um único experimento, os dados obtidos não asseguram resultados definitivos quanto ao método testado.

5. CONCLUSÕES

- O método é prático, rápido e fornece todos os dados de cinética de digestão, incluindo tempo de colonização, taxa e extensão da degradação dos alimentos avaliados.
- O método da produção de gás “in vitro”, ao contrário do “in situ”, permite estudo da fração solúvel dos alimentos.
- Há a necessidade de se utilizar pelo menos 90 mg de amostra para minimizar o coeficiente de variação dos dados. O sistema não consegue manter o pH com aumentos crescentes de amostra; portanto, a quantidade de material adicionado a ser digerido deve ser sempre conferida em função da capacidade tamponante do meio.
- O sistema “in vitro”/gás apresentou resultados semelhantes aos demais métodos utilizados na avaliação das silagens de milho.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BARNES, R.F. Use of "in vitro" fermentation techniques for estimating forage digestibility and intake. **Agronomy Journal**, v.57, n.1, p.213-216, 1965.
- BEUVINK, J.M.W.; SPOELSTRA, S.F. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms "in vitro". **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.37, p.505-509, 1992.
- BEZEAU, L.M. Effect of source of inoculum on digestibility of substrate "in vitro" digestion trials. **Journal of Animal Science**, v.24, n.3, p.823-825, 1965.
- BLUMMEL, M.; ORSKOV, E.R. Comparison of "in vitro" gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v.40, n.3, p.109-119, 1993.
- CHERNEY, D.J.R., SICILIANO, J.J.; PELL, A.N. Technical note: Forage "in vitro" dry matter digestibility as influenced by fiber source in the donor cow diet. **Journal of Animal Science**, v.71, n.5, p.1335-1338, 1993.
- CHURCH, D.C. **Digestive physiology and nutrition of ruminants**. In: Digestive Physiology. 2 Ed., Oregon, O.U.S., Bookstores, v.1, 349p, 1976.
- CHURCH, D.C.; PETERSEN, R.G. Effect of several variables on "in vitro" rumen fermentation. **Journal of Dairy Science**, v.43, n.1, p.81-92, 1960.

- DANLEY, M.M.; VETTER, R.L. Changes in carbohydrate and nitrogen fractions and digestibility of forages: Maturity and ensiling. **Journal of Animal Science**, v. 37, n.4, p.994-999, 1973.
- EL-SHAZLY, K.; DEHORITY, B.A.; JOHNSON, R.R. Effect of starch on the digestion of cellulose "in vitro" and "in vivo" by rumen microorganisms. **Journal Animal Science**, v.20, n.1, p.268-273, 1961.
- FOX, D.G.; SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; RUSSEL, J.B.; VAN SOEST, P.J. **A model for predicting requirements and feedstuff utilization**. The Cornell net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets research: Cornell, 1990 128 p.
- GOERING, K.H.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analysis** (apparatus, reagents, procedures, and some application), Washington: ARS-USDA, (USDA **Agricultural Handbook**, 379 p.), 1970.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 13 ed. Piracicaba, Livraria Nobel, 1990 467 p.
- GRAHAM, H.; AMAN, P. A comparison between degradation of "in vitro" and in sacco of constituents of untreated and ammonia treated barley straw. **Animal Feed Science and Technology**, v.10, p.199, 1984.
- GRANT, R.J.; MERTENS, D.R. Impact of forage type, corn starch addition and buffer pH upon "in vitro" digestion kinetics of neutral detergent fiber. **Journal of Animal Science**, v.68, (suppl. 1), p.589-588, 1990.
- 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. **Journal of Dairy Science**, v.57, n.2, p.1201-1205, 1974.

- GRANT, R.J.; WEIDNER, S.J. Digestion kinetics of fiber: Influence of “in vitro” buffer pH varied within observed physiological range. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.2, p.1060-1068, 1992.
- HALE, W.H. Influence of processing on the utilization of grains (starch) by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.37, n.4, p.1075-1081, 1973.
- JUNG, H.G.; VAREL, V.H. Influence of forage type on ruminal bacterial populations and subsequent “in vitro” fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.2, p.1526-1535, 1988.
- KHAZAAL, M.T.; DENTINHO, M.T.; RIBEIRO, J.M.; ORSKOV, E.R. A comparison of gas production during incubation with rumen contents “in vitro” and nylon bag degradability as predictors of apparent digestibility in vivo and the voluntary intake of hays. **Animal Production**, v.57, p. 105-112, 1993.
- KHAZAAL, M.T.; DENTINHO, M.T.; RIBEIRO, J.M.; ORSKOV, E.R. Prediction of apparent digestibility and voluntary intake of hays fed to sheep: comparison between using fibre components, “in vitro” digestibility or characteristics of gas production or nylon bag degradation. **Animal Science**, v.61, n.3, p. 527-538, Dec., 1995.
- MAcBEE, R.H. Manometric method for the evaluation of microbial activity in the rumen with application to utilization of cellulose and hemicelluloses. **Applied Microbiology**, v.1, p.106-116, 1953.
- MAHANNA, B. **Troubleshooting silage problems.** Pioneer Hi-bred International, 1995.

- 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. **Journal of Animal Science**, v.70, n.1, p.296-307, 1992.
- MARTEN, G.C.; BARNES, R.F. **Prediction of energy digestibility of forages with "in vitro" rumen fermentation and fungal enzymes systems**. In: PIGDEN, W.J.; BALCH, C.C.; GRAHAM, M. (Ed.) Standardization of analytical methodology for feeds. International Development Research Center, Ottawa: p. 61-128, 1980.
- MEER, V.J.M.; WEVER, G.; BEDIYE, S. Rumen bacteria for evaluation of enzymatically changed animal feeds and genetic varieties of fodder plants. **Analitic Chemistry Acta**, v.213, p.177-185, 1988.
- MENKE, K.H.; RAAB, L.; SALEWZKI, A.; STEINGASS, H.; FRITZ, D.; SCHNEIDER, W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor "in vitro". **Journal of Agriculture Science**, v.93, n.1, p.217-222, 1979.
- MENKE, K.H.; STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and "in vitro" gas production using rumen fluid. **Animal Research Development**, v.28, n.1, p.7-55, 1988.
- MEYER, J.H.F.; MACKIE, R.I. Microbiological evaluation of the intraruminal in sacculus digestion technique. **Applied Environment and Microbiology**, v.51, p.622, 1986
- MORAIS, J.P.G. Avaliação do efeito de inoculante bacteriando sobre a qualidade de silagem e desempenho animal. Piracicaba, 1995. 77p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- MORAIS, J.P.G.; BOIN, C.; CAMPOS, F.C.; FARIA, C.P.; ROCHA, M.H.M. Efeito de inoculante bacteriano em silagem de milho quanto a digestibilidade “in vivo” e fermentação. In: 33º REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Fortaleza, 1996a. Anais, p.425.
- MORAIS, J.P.G.; BOIN, C.; CAMPOS, F.C.; FARIA, C.P.; ROCHA, M.H.M. Efeito na degradação “in situ” e na taxa de passagem de silagem inoculada com aditivo microbiano. In: 33º REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Fortaleza, 1996b. Anais, p.428.
- NELSON, B.D.; ELLZEY, H.D.; MONTGOMERY, C.; MORGAN, E.B. Factors affecting the variability of an “in vitro” rumen fermentation technique for estimating forage quality. **Journal of Dairy Science**, v.55, n.3, p.358-366, 1972.
- NOCEK, J.E. “in situ” and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: A review. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.3, p.2051-2069, 1988.
- NOCEK, J.E.; CUMMINGS, K.A.; POLLAN, C.E. Ruminal disappearance of crude protein and dry matter in feeds and combined effects in formulated rations. **Journal of Dairy Science**, v.62, n.10, p.1587-1598, 1979.
- ORSKOV, E.R.; MILLS, C.C.; ROBINSON, J.J. The use of whole blood for the protection of organic materials from degradation in the rumen. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.39, p.60A, 1980.
- PEARCE, G.R.; SIMPSON, R.G.; DOYLE, P.T. **Source of variation in the nutritive value of wheat and rice straw.** In: WORKSHOP ON PLANT BREEDING AND THE NUTRITIVE VALUE OF THE CROP RESIDUES,

- Addis Ababa, 1987. Proceeding , edited by J.D. Reed and others. ILCA, 1987, p.195-221.
- PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion “in vitro”. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.4, p.1063-1073, 1993.
- PEREIRA, J.R.A. Avaliação das sub-brações dos carboidratos e das proteínas da silagem de milho, farelo de algodão e milho, usando a metodologia do CNCPS e “in situ”, com bovinos da raça nelore. Piracicaba, 1995. 94 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- QUICKE, G.V.; BENTLEY, O.G.; SCOTT, H.W.; MOXON, A.L. Cellulose digestion “in vitro” as a measure of the digestibility of forage cellulose in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.18, n.1, p.275-287, 1959.
- RUSSEL. J.B.; HESPELL, R.B. Microbial rumen fermentation. **Journal of Dairy Science**, v.64, n.6, p.1153-1169, 1981.
- SANDERSON, M.A. Aerobic stability and “in vitro” fiber digestibility of microbially inoculated corn and sorghum silages. **Journal of Animal Science**, v.71, n.2, p.505-514, 1993.
- SCHOFIELD, P.; PELL, A.N. Validity of using accumulated gas pressure readings to measure forage digestion “in vitro”: A comparasion involving three forages. **Journal of Dairy Science**, v.78, n.10, p.2230-2238, 1995.
- SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from “in vitro” gas production. **Journal of Animal Science**, v. 72, n.11, p.2980-2991, 1994.

- STEFANON, B.; PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Effect of maturity on digestion kinetics of water-soluble and water-insoluble fractions of alfafa and brome hay. **Journal of Animal Science**, v.74, n.5, p.1104-1115, 1996.
- TAYA, M.; OHMIYA, K.; KOBAYASHI, T.; SHIMIZU, S. Monitoring and control of a cellulolytic anaerobe culture by using gas evolved as an indicator. **Journal Fermentation and Technology**, v 5, p. 463- 470, 1980.
- TEMPLETON, J.A.; DYER, J.A.. Effect of diet on bovine rumen amylase activity. **Journal of Animal Science**, v.24, n.3, p.905-906., 1965 (Abstr.).
- THIAGO, L.R.L.S.; GILL, M. **Consumo voluntário: Fatores relacionados com a degradação e passagem da forragem pelo rúmen**. Campo Grande: EMBRAPA, CNPGC, 1990 65p. (EMBRAPA, CNPGC-Documento - 43).
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two technique for the “in vitro” digestion of forage crops. **Journal of the British Grassland Society**, v.18, p.104-111, 1963.
- TREI, J.; HALE, W.H.; THEURER, B. Effect of grain processing on “in vitro” gas production. **Journal of Animal Science**, v.30, n.5, p.825-831, 1970.
- UDÉN, P. The influence of leaf and stem particle size “in vitro” and of sample size in sacco on neutral detergent fiber fermentation kinetics. **Animal Feed. Science and Technology**, v.37, p.85-94, 1992.
- UDÉN, P.; VAN SOEST, P.J. Investigations of the “in situ” bag technique and a comparison of the fermentation in heifers, sheep, ponies and rabbits. **Journal of Animal Science**, v.58, n, 1, p.213-221, 1984.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2 ed., Ithaca: Cornell Press / Constock Publish, 1994. 476p.

- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Corvallis: O&B Books, 1982.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.4, p.3853-3597, 1991.
- VAN SOEST, P.J.; WINE, R.H. Use of detergent in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-Wall constituents. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.50, p.50-55, 1967.
- WARNER A.C.I. Criteria for establishing the validity of "in vitro" studies with rumen micro-organisms in so-called artificial rumen systems. **Journal of General Microbiology**, v. 14, p.733-748, 1956.
- WILKINS, J.R. Pressure transducer method for measuring gas production by microorganisms. **Applied Microbiology**, v.27, p.135-141, 1974.
- XIONG, Y.; BARTLE, S.J.; PRESTON, R.L.; MENG, Q. Estimating starch availability and protein degradation of steam-flaked and reconstituted sorghum grain through a gas production test. **Journal of Animal Science**, v.68, n.6, p.3880-3885, 1990.

APÊNDICE

Figura 6.

Resposta do teste aplicado aos 16 sensores mediante aplicação de CO₂ nos frascos incubatórios com intuito de verificar as variações das leituras.

Figura 7.

Relação entre o potencial de degradação da MS do alimento (A+B) com a produção total de gás em digestibilidade “in vitro” (ml/100 mg de MS).

Figura 8.

Relação entre o potencial de degradação da MS do alimento (A+B) com a produção total de gás na digestibilidade “in vitro” (ml/100 mg de MS).

Figura 9.

Relação entre o potencial de degradação da MS do alimento (A+B) com a produção total de gás na digestibilidade “in vitro” (ml/100 mg de MS).

Figura 10.

Relação entre potencial de degradação da MS do alimento (A+B) com a produção total de gás na digestibilidade “in vitro” (ml/100 mg de MS).

Tabela 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA - Experimento “in vivo”

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
MS	1	3,2705882	3,2705882	0,1336	0,71725
INÓCULO	1	49,3385181	49,3385181	2,0152	0,15935
MS*INOC	1	1,0697428	1,0697428	0,0437	0,82974
RESÍDUO	44	1077,2811610	24,4836628		
TOTAL	47	1130,9600102			
MÉDIA GERAL = 66,631874					
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 7,426 %					

Tabela 13 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA - Experimento “in vitro”/gás

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
MS	1	55,8092515	55,8092515	10,2615	0,00285
INÓCULO	1	13,7117482	13,7117482	2,5211	0,11571
MS*INOC	1	2,9558471	2,9558471	0,5435	0,52846
RESÍDUO	44	239,3032796	5,4387109		
TOTAL	47	311,7801264			

MÉDIA GERAL = 66,324165

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 3,561 %

Tabela 14 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA - Experimento “in situ”

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
MS	1	64,2612776	64,2612776	10,7135	0,00242
INÓCULO	1	152,5665368	152,5665368	25,4356	0,00006
MS*INOC	1	14,2482090	14,2482090	2,3754	0,12667
RESÍDUO	44	263,9180857	5,9981383		
TOTAL	47	494,9941091			

MÉDIA GERAL = 68,781876

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 3,561 %

Tabela 15 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA - FDN (“in vitro”/gás)

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
MS	1	8,9249046	8,9249046	3,1925	0,08984
INÓCULO	1	4,1774375	4,1774375	1,4943	0,23785
MS*INOC	1	2,0093529	2,0093529	0,7188	0,58640
RESÍDUO	16	44,7293584	2,7955849		
TOTAL	19	59,8410534			

MÉDIA GERAL = 58,216000

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 2,872 %

Tabela 16 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA - pH ("in vitro"/gás)

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
MS	1	0,0000050	0,0000050	0,0005	0,98059
INÓCULO	1	0,0000450	0,0000450	0,0044	0,94656
MS*INOC	1	0,0198451	0,0198451	1,9342	0,18075
RESÍDUO	16	0,1641599	0,0102600		
TOTAL	19	0,184054			

MÉDIA GERAL = 6,223500
 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 1,628 %

Tabela 17 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA - Fração A ("in vitro"/gás)

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
MS	1	51,4608250	51,4608250	5,6326	0,02336
INÓCULO	1	3,2134127	3,2134127	0,3517	0,56454
MS*INOC	1	0,0493148	0,0493148	0,0054	0,94015
RESÍDUO	28	255,8131183	9,1361828		
TOTAL	31	310,5366709			

MÉDIA GERAL = 9,19687
 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 32,866 %

Tabela 18 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA - Fração B ("in vitro"/gás)

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
MS	1	0,0022781	0,0022781	1,2021	0,28203
INÓCULO	1	0,0225781	0,0225781	11,9140	0,00211
MS*INOC	1	0,0075031	0,0075031	3,9592	0,05365
RESÍDUO	28	0,0530625	0,0018951		
TOTAL	31	0,0854219			

MÉDIA GERAL = 0,158438
 COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 27,476 %

Tabela 19 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA - Fração C ("in vitro"/gás)

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
MS	1	1,3489486	1,3489486	0,4654	0,50743
INÓCULO	1	5,2894348	5,2894348	1,8249	0,18471
MS*INOC	1	34,3412825	34,3412825	11,8479	0,00215
RESÍDUO	28	81,1586096	2,8985218		
TOTAL	31	122,1382756			

MÉDIA GERAL = 7,869062

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 21,635 %

Tabela 20 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA - Fração D ("in vitro"/gás)

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
MS	1	41,7469497	41,7469497	7,5685	0,01001
INÓCULO	1	12,5876677	12,5876677	2,2821	0,13861
MS*INOC	1	10,4081612	10,4081612	1,8869	0,17747
RESÍDUO	28	154,44539	5,5159070		
TOTAL	31	219,1881749			

MÉDIA GERAL = 12,834063

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 18,300 %

Tabela 21 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA - Fração E ("in vitro"/gás)

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
MS	1	0,0023978	0,0023978	3,3873	0,07305
INÓCULO	1	0,0014988	0,0014988	2,1173	0,15344
MS*INOC	1	0,0032200	0,0032200	4,5488	0,03957
RESÍDUO	28	0,0198206	0,0007079		
TOTAL	31	0,0269372			

MÉDIA GERAL = 0,045344

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 58,676 %

Tabela 22 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA - Fração A+D (“in vitro”/gás)

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
MS	1	0,5180752	0,5180752	0,1719	0,68431
INÓCULO	1	3,0694256	3,0694256	1,0185	0,32281
MS*INOC	1	11,918981	11,9189815	3,9548	0,05377
RESÍDUO	28	84,3864086	3,0138003		
TOTAL	31	99,8928908			
MÉDIA GERAL = 22,029688					
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 7,880 %					