

EFEITOS DO TRATAMENTO COM PRESSÃO E VAPOR  
SOBRE A COMPOSIÇÃO E A CINÉTICA DA  
FERMENTAÇÃO "IN VITRO" DO BAGAÇO  
DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* sp. L.)

CELSO DO AMARAL MELLO JÚNIOR

Engenheiro Agrônomo

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: Nutrição Animal e Pastagens.

Piracicaba  
Estado de São Paulo - Brasil  
Novembro - 1987

## INDICE

	PAG.
INTRODUÇÃO.....	1
..	.
.. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. A parede celular das plantas forrageiras.....	4
2.1.1. Composição da parede celular.....	5
2.1.2. Estrutura da parede celular.....	7
2.2. A parede celular e o valor nutritivo das plantas forrageiras.....	9
2.2.1. Composição da parede celular do bagaço de cana..	12
2.2.2. Valor nutritivo do bagaço de cana.....	13
2.3. Métodos de tratamento das forragens lignificadas.....	14
2.3.1. Tratamento com pressão e vapor (processo de auto-hidrólise).....	15
2.3.2. Efeitos do tratamento com pressão e vapor sobre o valor nutritivo do bagaço de cana.....	16
2.4. Uso da técnica de fermentação ruminal "in vitro" em experimentos de nutrição.....	20
2.4.1. Fatores que afetam a técnica de fermentação ruminal "in vitro".....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Plano experimental.....	32
3.2. Metodologia usada para montagem do sistema de fermentação ruminal "in vitro".....	34
3.3. Modificações procedidas na metodologia dos ensaios de fermentação ruminal "in vitro".....	37

3.4. Análises de laboratório.....	51
3.4.1. Análise convencional de Weende.....	51
3.4.2. Análise da composição da fração fibrosa.....	51
3.4.3. Análise dos carboidratos solúveis totais.....	52
3.5. Parâmetros analisados.....	52
3.5.1. Digestibilidade "in vitro" da matéria seca e matéria orgânica.....	52
3.5.2. Digestibilidade "in vitro" da celulose e parede celular.....	53
3.5.3. Curvas de digestibilidade "in vitro" acumulada da celulose e da parede celular em função do período de fermentação.....	53
3.5.4. Taxa de digestão "in vitro" da celulose e da parede celular.....	54
3.6. Análise estatística.....	55
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1. Variação dos componentes químicos.....	55
4.2. Digestibilidade (extensão de degradação) "in vitro"....	61
4.2.1. Digestibilidade "in vitro" da matéria seca (DIVMS) e matéria orgânica (DIVMO).....	62
4.2.2. Digestibilidade "in vitro" da celulose (DIVCEL) e da parede celular (DIVPC).....	63
4.3. Digestibilidade "in vitro" acumulada em função do tempo de fermentação.....	64
4.3.1. Digestibilidade "in vitro" acumulada da celulose (DIVCEL).....	64
4.3.2. Digestibilidade "in vitro" acumulada da	

	parede celular (DIVPC).....	69
4.4. Taxa de digestão "in vitro".....	75	
4.4.1. Taxa de digestão "in vitro" da celulose....	75	
4.4.2. Taxa de digestão "in vitro" da parede 	77	
5. CONCLUSÃO.....	78	
6. LITERATURA CITADA.....	80	
7. APÊNDICE.....	87	

Este trabalho

A meus pais, CELSO e HELENA, e a  
meus avós, TIMOTHEO e NYMPHA,  
com eterno carinho e gratidão; à  
SOFIA, pelo estímulo, apoio e  
amor...  
DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Soares Mattos, pela orientação, apoio, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Celso Boim, pelas sugestões no desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Raul Dantas D'Arce, pelas sugestões e colaborações durante o curso de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Paulo Fernando Machado, pelas sugestões e incentivo.

Ao Prof. Dr. Irineu Umberto Packer, pelo auxílio na análise estatística e interpretação dos resultados.

Ao Engº Agrº Luis Roberto Olival Costa, pela cooperação, incentivo e amizade.

Ao Engº Agrº José Maria Luvizotto, pela cooperação e amizade.

A Técnica de Laboratório Ana Maria Zani de Moura, pela orientação e colaboração nas análises laboratoriais.

Ao funcionário Carlos Cesar Alves, pelo auxílio no preparo dos ensaios "in vitro".

EFEITO DO TRATAMENTO COM PRESSÃO E VAPOR SOBRE A  
COMPOSIÇÃO E A CINETICA DA FERMENTAÇÃO "IN VITRO" DO  
BAGAÇO DE CANA-DE-ACÚCAR (Saccharum sp. L.).

Candidato: CELSO DO AMARAL MELLO JUNIOR

Orientador: PROF. Dr. Wilson Roberto Soares Mattos

RESUMO

Os efeitos do tratamento com pressão e vapor (17 kgf/cm<sup>2</sup> durante 5 minutos) sobre a composição química, extensão e taxa de fermentação do bagaço de cana-de-áçúcar foram avaliados através da utilização da técnica "in vitro". O tratamento determinou uma redução dos níveis da matéria seca (16.8%), fibra bruta (12.7%), fibra em detergente neutro (31%) e hemicelulose (80%) do bagaço "in natura", além de um aumento de cerca de 20 vezes na concentração inicial dos carboidratos solúveis totais.

Houve um aumento de cerca de 18 vezes na concentração inicial de compostos fenólicos do bagaço auto-hidrolisado (0.4-7.2%). A remoção destas substâncias através do desengorduramento com metanol 80% determinou também a extração de outros compostos solúveis nesta solução, acarretando em um aumento proporcional da fração fibrosa desta amostra.

O tratamento com pressão e vapor determinou (em relação ao bagaço "in natura") um aumento de 58% na digestibilidade "in vitro" da matéria seca, 45% na da celulose e 23% na da parede celular.

A curva da digestibilidade "in vitro" acumulada da celulose mostrou que não existe diferença significativa ( $P<0.05$ ) entre as quantidades digeridas durante as primeiras 18 horas de fermentação. Depois disto o bagaço auto-hidrolisado mostrou valores de digestibilidade superiores ( $P<0.05$ ) ao bagaço "in natura", e iguais ao bagaço auto-hidrolisado desengordurado. Entretanto a taxa de digestão da celulose destas amostras foram as mesmas entre 12 e 24 horas de fermentação.

A curva da digestibilidade "in vitro" acumulada da parede celular mostrou valores significativamente superiores ( $P<0.05$ ) para os bagaços "in natura" e auto-hidrolisado desengordurado até as primeiras 12 horas de fermentação, igualando-se ao bagaço auto-hidrolisado após 18 horas. A partir de então, o bagaço auto-hidrolisado apresentou valores significativamente ( $P<0.05$ ) superiores ao bagaço "in natura" e iguais ao bagaço auto-hidrolisado desengordurado. A taxa de digestão da parede celular do bagaço "in natura" (8.46%/h) e auto-hidrolisado (8.37%/h) foram as mesmas após 12 -24 horas de fermentação, sendo significativamente superiores a taxa do bagaço auto-hidrolisado desengordurado (6.46%/h).

EFFECTS OF STEAM-TREATMENT ON SUGAR CANE BAGASSE COMPOSITION  
AND "IN VITRO" FERMENTATION KINETICS.

Candidate: CELSO DO AMARAL MELLO JUNIOR

Adviser: Prof. Dr. Wilson Roberto Soares Mattos

SUMMARY

The effects of steam-treatment (17 kgf/cm<sup>2</sup>, 5 minutes) on sugar cane bagasse chemical composition, extension and rate of cellulose and cell wall degradation were evaluated by the "in vitro" technique. The treatment decreased dry matter (16.8%), crude fiber (12.7%), neutral detergent fiber (31%) and hemicellulose (80%) on the raw bagasse; there was a 18 and 20 fold increase in the fenolic compounds and total soluble carbohydrates in the treated bagasse, respectively; "in vitro" dry matter, cellulose and cell wall digestibilities increased 58, 45 and 13%, respectively. The disappearance curve over time of cellulose showed no difference during the first 18 hours of incubation; from there on the treated bagasse showed significant higher disappearance values, although the rates of cellulose disappearance were the same between 12 and 24 hours for raw, treated and treated-80% methanol extracted bagasses. The disappearance curve over time of cell wall of raw and treated-80% methanol extracted bagasses showed significant higher disappearance values during the first 12 hours of incubation. After 18 hours, raw, treated and treated-80% methanol extracted bagasses showed no difference; from there on the treated bagasse

showed significant higher disappearance values than raw bagasse and no difference as compared to treated-80% methanol extracted bagasse. The rate of cell wall disappearance was the same between 12 and 24 hours for raw (8.46%/h) and treated (8.37%/h) bagasses and significantly higher for the treated-80% methanol extracted bagasse (6.46%/h).

## FIGURAS

pag.

<u>FIGURA Nº1-</u> Representação esquemática da estrutura de uma célula de planta forrageira, mostrando as camadas componentes.....	8
<u>FIGURA Nº2-</u> Representação generalizada do efeito das condições de tratamento sobre a digestibilidade de materiais lignocelulósicos.....	18
<u>FIGURA Nº3-</u> Estágios do crescimento microbiano em ensaios de fermentação.....	26
<u>FIGURA Nº4-</u> Composição da matéria seca das amostras do bagaço e capim rapier.....	58

## GRAFICOS

*pag.*

- GRAFICO №1- Curva de digestibilidade "in vitro" da celulose  
acumulada em função do tempo de fermentação (0.5, 1.0, 1.5 e  
2.0g) (bagáço auto-hidrolisado).....42
- GRAFICO №2- Curva de digestibilidade "in vitro" da celulose  
acumulada em função do tempo de fermentação (0.5, 1.0, 1.5 e  
2.0g) (capim napier).....42
- GRAFICO №3- Curva de digestibilidade "in vitro" da celulose  
acumulada em função do tempo de fermentação (0.2, 0.4 e 0.6g  
~B) (bagáço "in natura").....46
- GRAFICO №4- Curva de digestibilidade "in vitro" da celulose  
acumulada em função do tempo de fermentação (0.2, 0.4 e 0.6g  
~B) (bagáço auto-hidrolisado).....47
- GRAFICO №5- Curva de digestibilidade "in vitro" da celulose  
acumulada em função do tempo de fermentação (0.2, 0.4 e 0.6g  
~B) (bagáço auto-hidrolisado desengordurado).....47
- GRAFICO №6- Curva de digestibilidade "in vitro" da celulose  
acumulada em função do tempo de fermentação (0.2, 0.4 e 0.6g  
~B) (capim napier).....48
- GRAFICO №7- Curvas de digestibilidade "in vitro" da celulose  
acumulada em função do tempo de fermentação (quantidades  
equivalentes de celulose) (diversas amostras).....66
- GRAFICO №8- Curvas de digestibilidade "in vitro" da parede

## QUADROS

QUADRO N°1- Composição da parede celular do bagaço de cana.....	13	pag
QUADRO N°2- Determinação da celulose em diferentes quantidades de amostra, utilizando-se diferentes quantidades da solução acético-nitrica.....	38	
QUADRO N°3- Digestibilidade "in vitro" da celulose do bagaço auto-hidrolisado e capim napier, utilizando-se diferentes quantidades de amostra (0.5, 1.0, 1.5 e 2.0g).....	41	
QUADRO N°4- Digestibilidade "in vitro" da celulose dos diversos tratamentos, utilizando-se diferentes quantidades de amostra (0.2, 0.4 e 0.6g MS).....	44	
QUADRO N°5- Composição química bromatológica das amostras do bagaço e capim napier.....	56	
QUADRO N°6- Composição da fração fibrosa das amostras do bagaço e capim napier.....	57	
QUADRO N°7- Carboidratos solúveis e compostos fenólicos das amostras do bagaço e capim napier.....	59	
QUADRO N°8- Digestibilidade "in vitro" da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), celulose (CEL) e parede celular (PC) das amostras do bagaço e capim napier.....	61	

celular) acumulada em função do tempo de fermentação (quantidades equivalentes de parede celular) (diversas amostras) ..... 71

QUADRO N°9- Digestibilidade "in vitro" da celulose acumulada em função do tempo de fermentação, das amostras do bagaço e capim napier.....	65
QUADRO N°10- Digestibilidade "in vitro" da parede celular acumulada em função do tempo de fermentação, das amostras do bagaço e capim napier.....	70
QUADRO N°11- Composição inicial e residual (após 48 hs de fermentação) da parede celular das amostras do bagaço e capim napier.....	71
QUADRO N°12- Relação entre lignina/celulose e lignina/hemicelulose inicial e residual da parede celular das amostras do bagaço e capim napier.....	72
<u>QUADRO N°13- Taxa de digestão "in vitro" da celulose das amostras do bagaço e capim napier.....</u>	76
QUADRO N°14- Taxa de digestão "in vitro" da parede celular das amostras do bagaço e capim napier.....	77
QUADRO N°15- Resultados parciais das análises bromatológicas (Esquema Weende) das amostras do bagaço e capim napier.....	87
QUADRO N°16- Resultados parciais dos componentes da fração fibrosa das amostras do bagaço e capim napier.....	87
<u>QUADRO N°17- Resultados parciais das digestibilidades "in vitro" (extensão de degradação) das amostras do bagaço e capim napier.....</u>	88

<u>QUADRO Nº18</u> - Resultados parciais das digestibilidades "in vitro" da celulose acumulada em função do tempo de fermentação, das amostras do bagaço e capim napier.....	89
<u>QUADRO Nº19</u> - Resultados parciais das digestibilidades "in vitro" da parede celular acumulada em função do tempo de fermentação, das amostras do bagaço e capim napier.....	90
<u>QUADRO Nº20</u> - Resultados parciais das taxas de digestão "in vitro" da celulose e parede celular potencialmente digestíveis, das amostras do bagaço e capim napier (considerando como indigerível o resíduo obtido após 48 hs de fermentação).....	91
<u>QUADRO Nº21</u> - Análise da variância da digestibilidade (extensão de degradação) "in vitro" da matéria seca (1 e 2 estágios), matéria orgânica (1 e 2 estágios), parede celular (FDN) e celulose (CEL) .....	92
<u>QUADRO Nº22</u> - Análise da variância da extensão de desaparecimento "in vitro" da celulose (interação tempo de fermentação*tratamento).....	93
<u>QUADRO Nº23</u> - Análise da variância da decomposição da interação existente entre tratamento e tempo de fermentação (obtida através de regressão polinomial) na determinação da DIVCEL.....	94
<u>QUADRO Nº24</u> - Análise da variância da extensão de desaparecimento "in vitro" da parede celular (interação tempo de fermentação*tratamento).....	95
<u>QUADRO Nº25</u> - Análise da variância da decomposição da interação	

existente entre tratamento e tempo de fermentação (obtida após regressão polinomial) na determinação da DIVPC.....	95
<u>QUADRO N°26-</u> Análise da variância da taxa de digestão "in vitro" da celulose potencialmente digestível.....	96
<u>QUADRO N°27-</u> Análise da variância da taxa de digestão "in vitro" da parede celular potencialmente digestível.....	96

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de álcool à partir da cana-de-açúcar vem aumentando desde o ano de 1975, quando foram estabelecidas as metas do programa PROALCOOL, que visa uma menor dependência estrangeira em termos energéticos.

Em decorrência desta rápida expansão da indústria sucro-alcooleira, houve um significativo aumento da quantidade de resíduos e subprodutos desta atividade, destacando-se entre estes o bagaço de cana-de-açúcar.

O bagaço de cana é atualmente, quantitativamente falando, um dos maiores resíduos da agro-indústria brasileira, visto que em 1985 havia no país quase oito milhões de toneladas excedentes, havendo previsões de que esta sobra poderá atingir oitenta milhões de toneladas no ano 2000 (AIDAR, 1985).

O aproveitamento deste excedente de bagaço vem sendo bastante estudado, pois seria um fator fundamental para a diminuição dos custos da produção do álcool. Este aproveitamento pode se dar através de diversas maneiras (produção de furfural, chapas aglomeradas, produção de produtos aromáticos à partir de lignina, etc.), sendo no entanto dificultado quando há a necessidade de transportar este subproduto para locais distantes da usina. Esta dificuldade é decorrente da baixa densidade do bagaço de cana, que inviabiliza o seu transporte a média e grande distâncias.

A utilização do bagaço de cana

para fins nutricionais surge atualmente com grande interesse, pois significa uma diversificação no sistema de produção da indústria alcooleira, que se torna possível através da utilização deste subproduto na alimentação de animais ruminantes, configurando-se assim mais um produto a ser comercializado pelas usinas. Este tipo de atividade se torna ainda mais interessante devido ao fato da safra de cana coincidir com a época seca (quando há escassez de forragens), possibilitando o seu uso em rações utilizadas na produção de carne e leite no período de entressafra destes produtos.

A utilização do bagaço de cana na alimentação de ruminantes é possível devido a capacidade destes animais utilizarem alimentos fibrosos como fonte de energia. Entretanto a sua participação na ração deve ser reduzida, em função da sua baixa digestibilidade e baixo consumo, decorrentes do elevado nível de lignina presente em sua fração fibrosa.

Visando contornar os problemas acima, estes subprodutos fibrosos podem sofrer alguns tipos de tratamento que lhes confiram um maior potencial de utilização, sendo que estes tratamentos podem ser de 3 tipos: químico, físico ou biológico. Este procedimento tem despertado interesse dos empresários do setor, pois possibilita a obtenção de um alimento de melhor valor nutritivo.

O tratamento do bagaço de cana com pressão e vapor (auto-hidrólise) é do tipo físico, e vem sendo bastante difundido principalmente pelo fato do vapor a ser utilizado no tratamento ser proveniente das próprias caldeiras

das usinas.

A literatura mostra que este tipo de tratamento pode causar um aumento na formação dos chamados compostos fenólicos, atribuindo a estas substâncias uma considerável queda no consumo voluntário. Entretanto este problema pode ser contornado quando o tratamento é realizado corretamente, isto é, sob condições de tempo e pressão de tratamento corretos, resultando num alimento passível de ser melhor aproveitado pelos microrganismos ruminais.

Em vista das poucas informações existentes sobre o efeito do bagaço de cana auto-hidrolisado no funcionamento do rumen, este experimento visa estudar alguns parâmetros que permitam obter deste subproduto melhores resultados em termos nutritivos.

De uma maneira geral, a avaliação dos alimentos utilizados pelos animais domésticos é feita através de ensaios de digestibilidade ou alimentação, com a finalidade de estimar o total de nutrientes retidos pelo animal, ou seus efeitos sobre a produção animal (carne, leite, lát., etc.).

Contudo, para que este tipo de experimento seja realizado de maneira representativa e correta, é necessário a utilização intensiva de mão de obra, além da exigência de disponibilidade de reagentes e alimentos em quantidades consideráveis.

Dentro deste contexto as técnicas simplificadas de laboratório são bastante úteis, pois podem ser aplicadas a estudos onde são exigidos grande número de

tratamentos e repetições, agilizando a obtenção de resultados.

Baseado nos motivos expostos acima, este experimento utilizou a metodologia "in vitro" para estudar alguns parâmetros relacionados a fermentação microbiana ruminal, sendo que inicialmente foram feitos ensaios preliminares em razão da pouca utilização desta técnica no estudo de subprodutos agroindustriais, particularmente o bagaço de cana tratado com pressão e vapor.

Portanto, este trabalho visa estudar os efeitos provocados pelo tratamento físico com pressão e vapor, sobre a cinética da fermentação ruminal do bagaço de cana-de-açúcar, utilizando-se a técnica "in vitro".

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. A parede celular das plantas forrageiras

Em 1965, por ocasião do IX Congresso Internacional de Pastagens, Van Soest e Moore apresentaram um novo método para análise química das forragens, objetivando facilitar a estimativa do valor nutritivo das plantas forrageiras. Os autores partiram do princípio que toda planta forrageira é composta por inúmeras células vegetais, sendo que as substâncias que compõem estas células podem estar contidas dentro da parede celular ou compondo a parede celular.

Os componentes do chamado conteúdo celular são as substâncias tidas como passíveis de serem utilizadas pelo trato digestivo dos animais vertebrados, incluindo predominantemente carboidratos solúveis, amido, ácidos graxos, proteínas e minerais.

orgânicos, quase toda proteína, lipídios e minerais solúveis.

A parede celular das células vegetais cresce para proporcionar às plantas a estabilidade estrutural indispensável à obtenção de luz e de nutrição apropriada, funcionando também como barreira contra a invasão de doenças e insetos (MAYNARD et alii, 1984, p.102). Embora estas características assegurem a sobrevivência e a propagação dos vegetais, elas impedem sua utilização pelos que os consomem.

#### 2.1.1. Composição da parede celular

A parede celular dos vegetais é compostas basicamente por polissacarídeos, que nada mais são do que anidros polimerizados de um grande número de açúcares simples.

Os principais componentes individuais da parede celular são celulose, hemicelulose e lignina; embora outros componentes estejam presentes em quantidades menores, porém sem importância nutricional (cutina, pectina, cera, minerais e alguns compostos nitrogenados).

A celulose é a substância mais abundante do reino vegetal, além de ser o principal componente estrutural da parede celular das plantas (MAYNARD et alii, 1984, p.100). É um homopolissacarídeo composto por monômeros de D-glucose, monômeros estes unidos através de ligações covalentes beta 1,4. Estas ligações são as responsáveis diretas pelo não aproveitamento total da celulose pelos animais monogástricos, visto que o trato digestivo destes animais não sintetiza a enzima

que é capaz de hidrolisar estas ligações, liberando os monômeros formadores da celulose. A celulose ocorre na natureza principalmente na forma cristalina, organizada em fibras, que são cadeias de celulose presente nas diferentes camadas da parede celular. O restante (celulose amorfa) é componente da matriz da parede celular, que é composta também de hemicelulose e lignina (THEANDER & AMAN, 1984).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo, composto por polímeros de monossacarídeos como glucose, xilose, manose, arabinose e galactose. Xiloglucana é a molécula predominante na hemicelulose, consistindo de uma cadeia de unidades de D-glucose, com vínculos beta 1,4 e com ramificações terminais de unidades xilose com vínculo alfa 1,6. Hemicelulose pode conter igualmente xilanas, glucomananas e galactoglucomananas (MAYNARD et alii, 1984, p.101).

A hemicelulose é muito menos resistente a degradação química que a celulose, além de ser o componente da parede celular mais intimamente associado com a lignina (SULLIVAN, citado por VAN SOEST, 1982, p.112), havendo evidências de vínculos com constituintes fenólicos, possivelmente através de ligações glicosídicas.

VAN SOEST (1974) afirma que a fração lignina é dos componentes da parede celular a de mais difícil definição, sendo que os conceitos diferem de acordo com o ponto de vista. Assim, os botânicos a tem como uma substância plástica e tri-dimensional, composta por monômeros de fenilpropano. Os nutricionistas a tem como uma substância

estrutural, que protege a parede celular da degradação microbiana. A lignina possui elevado peso molecular, sendo um polímero amorfo formado à partir da condensação de monômeros fenilpropano, sendo que sua formação é variável de acordo com a espécie vegetal e provavelmente com a maturidade da planta (VAN SOEST, 1982, p.120).

A lignina é encontrada nas partes lenhosas dos vegetais, sabugos, cascas, ramos, folhas e parcelas fibrosas das raízes. O seu conteúdo aumenta consideravelmente à medida que a planta em crescimento envelhece, sendo que a sua vinculação química reduz a digestibilidade da hemicelulose e principalmente da celulose (MAYNARD et alii, 1984, p.101). A ligação com a hemicelulose é caracterizada pela esterificação do radical acetil da lignina com a xilose da hemicelulose (WAAGEPETERSEN, citado por GOOSSELINK, 1982), sendo que a sua vinculação com a celulose é provável, mas ainda não foi caracterizada (VAN SOEST, 1982, p.124). Nas forragens de gramíneas esta ligação é um éster e nas forragens de leguminosas é um éter, sendo que estas ligações não são quebradas nem pelas enzimas dos microrganismos anaeróbicos, nem pelas enzimas secretadas pelos mamíferos. Somente os microrganismos aeróbicos podem quebrar estas ligações, o que resulta no apodrecimento da forragem (MAYNARD et alii, 1984, p.101).

#### 2.1.2. estrutura da parede celular

A parede celular tem sido dividida tradicionalmente em três componentes: lamela mediana, parede

primária e parede secundária. Uma melhor visualização pode ser conseguida com a figura N°1.

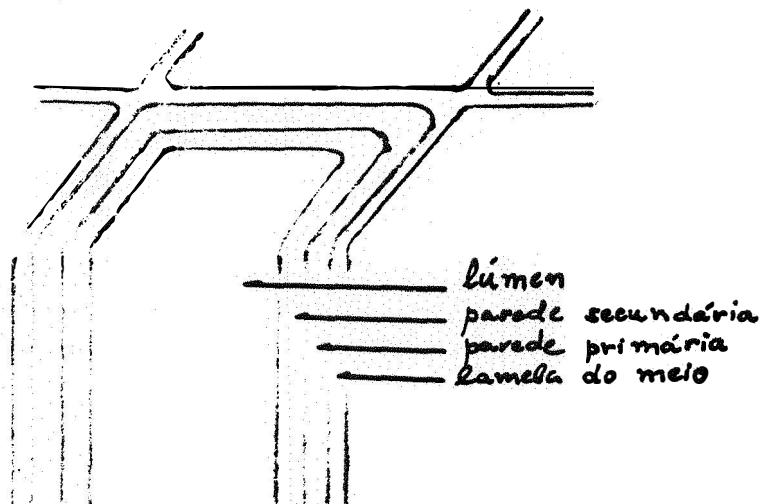


FIG.N°1-Representação esquemática da estrutura de uma célula de planta forrageira, mostrando as camadas componentes. (FONTE: THEANDER & AMAN, 1984).

A lamela mediana é o espaço compreendido entre duas células adjacentes, sendo constituída basicamente por pectina (polímero endurecido de unidades de ácido galacturônico com ligação alfa 1,4 intercalado com unidades de ramnose com ligação alfa 1,2 (VAN SOEST, 1982, p.111)).

A parede primária é a primeira a formar-se numa célula em crescimento, moldando-se e alongando-se até que o crescimento se complete. É portanto a parede exterior da célula, sendo formada basicamente por fibrilas de celulose fracamente ligadas (MAYNARD et alii, 1984, p.102).

A parede secundária forma-se principalmente após o término do crescimento da célula, isto é, quando a parede primária já cessou seu crescimento. Portanto forma-se no interior da parede primária, conferindo-lhe resistência. É formada basicamente por camadas de fibrilas de

celulose perfeitamente organizadas e dispostas em várias direções. Hemicelulose é encontrada nas três camadas, porém em quantidade bem maior na parede secundária (MAYNARD et alii, 1984, p.103).

A rigidez final da célula é alcançada quando o crescimento vegetal está quase completo, ocasião em que ocorre formação de lignina combinada com hemicelulose e celulose, na parede secundária da célula. Quando a lignificação se completa, a célula vegetal morre.

## **2.2 A parede celular e o valor nutritivo das plantas forrageiras**

Num sistema de criação de animais domésticos geralmente tem-se a intenção de maximizar a produtividade. Consequentemente os alimentos são classificados segundo suas capacidades de proverem os nutrientes requeridos para uma eficiente produção animal. Como os diversos alimentos têm características e composições químicas diferentes, suas capacidades de levar um animal a apresentar bom desempenho são variáveis, conferindo a cada alimento um determinado valor nutritivo. ULYATT (1973) chama a atenção para a diferença entre os conceitos de valor nutritivo e valor alimentício. Segundo o referido autor, valor nutritivo de um alimento qualquer é obtido em relação à produção animal alcançada, enquanto que valor alimentício é obtido em relação ao consumo alcançado. A qualidade dos alimentos é consideravelmente restringida por suas características físicas, podendo ser independente de sua composição química. Fatores como densidade calórica, tamanho de

partícula, solubilidade no líquido ruminal, capacidade tampão e propriedades da superfície da fração fibrosa (capacidade de hidratação e trocas de cátion) influenciam os efeitos fisiológicos da ingestão sobre o trato gastrointestinal (VAN SOEST, 1982, p.24). Segundo este mesmo autor, o valor nutritivo dos alimentos é determinado por dois fatores: sua proporção em parede celular e seu grau de lignificação.

Segundo CRAMPTON et alii (1960), cinquenta por cento ou mais da energia potencialmente útil das forragens deve ter como fonte as frações celulose e hemicelulose. A digestão destas frações só é possível por animais ruminantes, sendo que para tanto eles são dependentes da microflora ruminal. No caso da utilização de materiais lignocelulósicos, os ruminantes são ainda mais dependentes, visto que estes alimentos são compostos basicamente por parede celular.

No rumen estes alimentos ficam sujeitos a serem utilizados segundo vários processos: fermentação microbiana, contração ruminal e mastigação devido a regurgitação durante os períodos de ruminação. Esta combinação de quebras físicas e químicas reduz a forragem fibrosa em partículas menores que passam juntas com as células microbianas e alguns produtos finais da digestão, para o orifício reticulo-omasal (TROELSEN & CAMPBELL, 1968).

Uma rápida taxa de fermentação da forragem no rumen é geralmente associada a uma rápida taxa de passagem do resíduo não digerido e vice versa. A taxa de digestão é obviamente dependente da composição da forragem (ULYATT, 1973). A taxa de digestão refere-se a quantidade de alimento que pode

ser digerida por unidade de tempo, sendo que a sua magnitude é essencialmente determinada pela composição da dieta, pois a qualidade, deficiência, excesso e disponibilidade de nutrientes determinam a velocidade de digestão (VAN SOEST, 1982, p.212). Geralmente componentes solúveis como açúcares são fermentados muito mais rapidamente, enquanto substratos menos solúveis são atacados mais lentamente. Forragens com alta resistência física à digestão permanecem no rumen por um tempo mais longo, resultando numa sensação de saciedade por parte do animal, levando-o a um menor consumo. O consumo parece ser mais importante na limitação da produtividade do que a digestibilidade. CONRAD et. alii. (1954) estudaram a relação consumo-digestibilidade com grandes detalhes e consideraram que o consumo das forragens com menos de 67% de digestibilidade era controlado por fatores físicos (capacidade física do rumen), enquanto que o consumo das forragens com mais de 67% de digestibilidade era regulado por mecanismos fisiológicos.

A quantidade relativa de compostos solúveis, celulose, hemicelulose e lignina são aspectos importantes da composição da forragem, tendo influência direta na sua digestibilidade (LECHTERBERG et alii, 1974). VAN SOEST (1982) também enfatiza esta colocação, afirmando que o grau de adaptação dos ruminantes à dietas fibrosas varia de acordo com a quantidade e a proporção dos carboidratos estruturais contidos na parede celular.

A lignina embora não seja um carboidrato estrutural, é considerada como tal pelo fato de estar

intimamente associada a celulose e hemicelulose na formação da parede celular vegetal (MAYNARD et alii, 1984, p.101), sendo um componente indigestível para todas as espécies animais. Os níveis de lignina na parede celular vegetal são decorrentes de uma série de fatores, dentro dos quais se destacam: grau de maturidade e espécie vegetal. A medida que a planta avança no seu estágio de maturação, a deposição de lignina na parede celular vai aumentando, reduzindo consequentemente a digestibilidade das outras frações (celulose e hemicelulose).

SMITH et alii (1972), estudando a relação entre a composição da forragem (seis leguminosas e nove gramineas) e sua taxa de digestão da parede celular, encontraram para as leguminosas maiores porcentagens relativas de conteúdo celular e lignina, e menor porcentagem de hemicelulose. Por conter mais lignina, a parede celular das leguminosas é menos digestível que a das gramineas. Porém sua velocidade de digestão (taxa) é maior, pois sua proporção relativa de parede celular é menor do que em relação às gramineas. Estas apresentam parede celular mais digestível (pois tem menos lignina), porém com menor velocidade de digestão.

#### 2.2.1.composição da parede celular do bagaço de cana

O processamento industrial da cana-de-açúcar visa a máxima extração do caldo, que é composto pelo conteúdo celular rico em açúcares. Portanto, após a moagem e prensagem para extração deste caldo, processa-se uma lavagem do material restante, com o objetivo de extrair as substâncias

soltaneis liberadas nestes processos. Ao final da operação restam basicamente três produtos: caldo (conteúdo celular mais água da lavagem), bagacilho (retido em peneiras e constituído de fragmentos da parede celular finamente moídos) e bagaço.

O bagaço resultante do processo de extração é formado por fragmentos grosseiros da parede celular e por pequenas quantidades de conteúdo celular que não foram extraídos nos processos anteriores. A composição da parede celular do bagaço de cana pode ser melhor observada no quadro Nº1.

QUADRO Nº1-Composição da parede celular do bagaço de cana

CELULOSE	HEMICEL.	LIGNINA	SILICA *	FONTE
----- % M.S. -----				
40.0	29.0	13.0	2.0	JACKSON, 1977
40.3	31.9	11.2	2.4	RANGNEKAR et. alii., 1982
41.3	26.2	11.3	5.4	RANDEL, 1972
41.6	28.5	12.6	---	PATE, 1982
44.9	----	11.4	2.0	CAMPBELL et. alii., 1973
44.7	22.9	14.9	2.7	BURGI, 1975

\* estes valores não foram determinados, mas sim estimados pela diferença entre fibra em detergente ácido e celulose, somado a lignina. Este procedimento fornece valores levemente superestimados.

#### 2.2.2. valor nutritivo do bagaço de cana

Devido a sua elevada proporção de material fibroso (componentes da parede celular), o bagaço de cana é enquadrado na categoria dos alimentos classificados como subprodutos fibrosos de origem vegetal, que geralmente são

utilizados como fonte de volumosos em dietas de animais ruminantes.

Os fatores que limitam o eficaz aproveitamento dos volumosos de baixa qualidade por animais ruminantes são: baixa digestibilidade e baixo consumo voluntário (DONEFER & PATHIRANA, 1976). Sua digestibilidade é inferior a 35% e sua densidade não ultrapassa a 150 kg/m<sup>3</sup>, o que determina uma limitação física do consumo (BURGI, 1985).

Devido aos motivos expostos acima, o bagaço de cana pode ser utilizado nas dietas de animais ruminantes, desde que não ultrapasse certos limites (10-15%), pois nestes casos o desempenho animal fica comprometido (PATE, 1982; RAIZOOK & LIMA, 1977 e VAN HORN et alii, 1980).

### **2.3. Métodos de tratamento das forragens lignificadas**

A utilização de resíduos agro-industriais com objetivos nutricionais, bem como a procura de métodos para melhorar seu valor nutritivo, vem sendo pesquisada com mais intensidade nos últimos 10 a 15 anos (SUNDSTOL & OWEN, 1984). Isto é decorrente das grandes quantidades de resíduos produzidas, sendo que estas têm aumentado proporcionalmente mais rapidamente do que o número de animais domésticos no período de 1970-1981 (KOSSILA, 1984).

Em razão do grande potencial de utilização destes resíduos na alimentação de animais ruminantes, tornou-se necessário estudar diferentes processos de tratamento que melhorassem suas características químicas e físicas, visando obter um alimento de melhor valor nutricional.

O objetivo dos tratamentos é promover a ruptura das ligações entre a lignina e a celulose, ou hemicelulose, permitindo assim o acesso das enzimas microbianas do rúmen à estes carboidratos. Foram desenvolvidos para tal, processos biológicos, químicos e físicos, que de alguma forma contribuem para melhorar o valor nutritivo dos resíduos agro-industriais.

### 2.3.1. tratamento com pressão e vapor (processo de auto-hidrólise)

Desde 1970 vários trabalhos têm sido realizados utilizando o tratamento com pressão e vapor (processo físico), visando melhorar o aproveitamento dos volumosos de baixa qualidade nutritiva (DONEFER & PATHIRANA, 1976).

O princípio deste procedimento consiste em submeter o material lignocelulósico à elevadas pressões e temperaturas, durante um determinado período de tempo, seguido de uma repentina descompressão.

MACHADO (1982), estudando o processo de aplicação de pressão e vapor em resíduos de madeira, seguido de descompressão rápida, como um pré-tratamento para a hidrólise enzimática da celulose, afirma que a ruptura do complexo lignina-polissacárido se processa através de duas etapas distintas:

etapa 1 - denominada auto-hidrólise - ocorre a clivagem de grupos acetil da hemicelulose, sendo que a sua magnitude depende das condições de tratamento, ou

seja, da pressão e do tempo de tratamento utilizados. A liberação dos grupos acetil proporciona um meio ácido que promove a hidrólise da hemicelulose, resultando no rompimento da parede celular.

etapa 2 - denominada descompressão rápida- na etapa anterior houve introdução de água no material lignocelulósico, via vapor. Após decorrido o tempo de tratamento correto, é feito a descompressão rápida, que promove a "abertura" dos fragmentos do bagaço através da vaporização da água contida neste material, que se encontrava na fase líquida devido a pressão à que era submetida. Esta vaporização repentina rompe e afrouxa a estrutura fibrosa da parede celular.

### 2.3.2. efeitos do tratamento com pressão e vapor sobre o valor nutritivo do bagaço de cana

As características comuns deste processo foram descritas por WALKER (1984) como sendo (1) produção de ácido acético, (2) produção de furfural e compostos fenólicos, (3) graus variáveis de solubilização da hemicelulose, (4) redução de até 20% do teor de matéria seca inicial, dependendo das condições do tratamento.

O efeito mais notável na composição química bromatológica do bagaço tratado com pressão e vapor é a redução de certos componentes da fração fibrosa. PATE (1982) encontrou reduções de 43% para 34% na fibra bruta e de 83% para 51% na fibra em detergente neutro (FDN) (parede celular). Houve uma pequena alteração nos teores de fibra em detergente ácido

FDA), celulose e lignina. Isto indica que o tratamento com pressão e vapor proporciona uma solubilização da fração hemicelulose, contribuindo para que haja um aumento da fração de carboidratos solúveis (RANGNEKAR et alii, 1982), não afetando porém os componentes celulose e lignina. Alterações semelhantes na composição do bagaço submetido a tratamento com pressão e vapor foram observadas por CAMPBELL et alii (1973) e CHEONG et alii (1974).

Devido a hidrólise e clivagem dos grupos acetil da hemicelulose da parede celular, há um aumento na concentração de ácidos voláteis, determinando uma diminuição do pH do material (TARKOW et alii e MILLET et alii, citados por RANGNEKAR et alii, 1982).

A utilização do tratamento físico com pressão e vapor tem o objetivo final de aumentar a digestibilidade de materiais lignocelulósicos. A magnitude deste aumento é resultante principalmente de duas variáveis envolvidas no processo: pressão e tempo de tratamento. Quanto maior a pressão utilizada, maior será a digestibilidade do material tratado. Também existe uma relação direta entre o tempo de tratamento e a digestibilidade obtida. Esta relação se mantém até determinado tempo de tratamento (denominado tempo ótimo de tratamento), acima do qual há uma brusca diminuição na digestibilidade. Estas relações podem ser melhor visualizadas na figura №2, que representa de forma generalizada, o efeito das condições de tratamento sobre a digestibilidade de materiais lignocelulósicos.

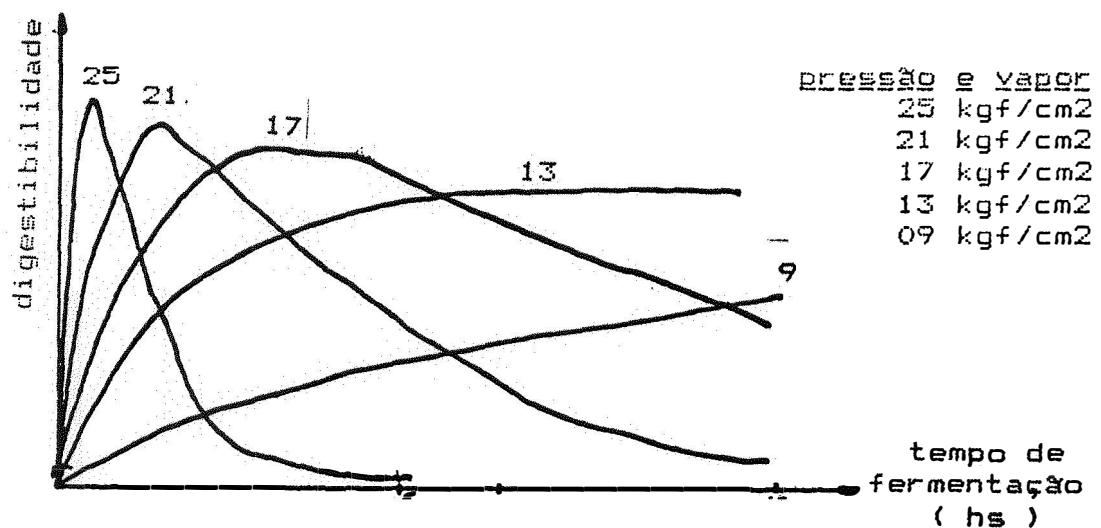


FIGURA N°2- Representação generalizada do efeito das condições de tratamento sobre a digestibilidade de materiais lignocelulósicos.  
FONTE: TAYLOR e ESDALE (sem data)

CAMPBELL et alii (1973), estudando o efeito do tratamento com pressão e vapor sobre a utilização dos nutrientes da cana-de-açúcar (pressão de 28,1 kgf/cm<sup>2</sup> durante 45 segundos), observaram que os animais que recebiam dieta contendo 40% de bagaço tratado, diminuíram drásticamente seu consumo voluntário, após um período inicial de alto consumo. Sua explicação para o fato é de que na decomposição da lignina, há a liberação de compostos fenólicos, que seriam possivelmente os responsáveis pela limitação do consumo. O bagaço "in natura" tinha 0,43% de compostos fenólicos e o bagaço tratado 5,30%, o que significa um aumento de doze vezes na concentração inicial.

Os monômeros fenólicos, assim como a lignina, são derivados do mesmo caminho biossintético e ocorrem no sistema vascular de todas as plantas. Os monômeros fenólicos interferem no crescimento de bactérias aeróbicas e anaeróbicas

(JUNG & FAHEY, 1983).

DAVIDSON et alii (1981) atribuem uma atividade anti-microbiana aos monômeros fenólicos, que se expressaria basicamente através de três maneiras:

. reação dos monômeros fenólicos com a membrana celular microbiana. Esta reação aumenta a permeabilidade desta membrana, resultando na perda dos constituintes desta célula.

. inativação de enzimas essenciais à sobrevivência destes microrganismos.

. destruição ou inativação funcional do material genético destes microrganismos.

JUNG & FAHEY (1984), trabalhando com feno de alfafa e capim "fescue" em diferentes estágios de maturação, observaram que a diminuição da digestibilidade dos carboidratos estruturais durante o avançar da maturação, foi devido basicamente ao aumento da concentração de lignina, no caso do feno de alfafa. Já em relação ao capim "fescue", a diminuição da digestibilidade dos carboidratos estruturais foi devido principalmente ao aumento da concentração de monômeros fenólicos durante o avançar da maturação. Segundo estes mesmos autores, a remoção dos compostos fenólicos solúveis do feno de alfafa aumentou a digestibilidade "in vitro" da celulose e da proteína.

O tratamento físico com pressão e vapor determina um aumento na concentração de compostos fenólicos, que podem ser responsáveis por um decréscimo no consumo voluntário. A magnitude deste aumento é resultado das condições do tratamento. Quanto mais severas forem estas

condições (altas pressões e tempos de tratamento longos) maior será o nível de compostos fenólicos presente no material tratado (HART et alii, 1981).

#### 2.4. Uso da técnica de fermentação ruminal "in vitro" em experimentos de nutrição

A utilização de técnicas simplificadas veio auxiliar alguns tipos de pesquisa onde a condução de ensaios de alimentação não são possíveis, principalmente por falta de amostra em quantidades suficientes. Estas técnicas são muito úteis no estudo dos fatores que interferem no funcionamento do rumen, pois estes estudos requerem grande número de tratamentos e repetições.

As técnicas simplificadas de laboratório tiveram grande aceitação entre os melhoristas de plantas e nutricionistas do campo animal, principalmente pelo fato de poderem ser conduzidas com amostras relativamente pequenas de alimentos, representando grande economia de reagentes e de forragens.

Portanto, a digestibilidade dos alimentos pode ser estimada por sistemas ruminais "in vitro", que simulam o processo digestivo. Seu potencial de utilização é decorrente da sensibilidade dos microrganismos e enzimas a diversos fatores que influenciam a taxa e a extensão de digestão.

Os sistemas de avaliação química são muito mais rápidos e de mais fácil repetição, porém não retratam bem o processo biológico envolvido. Segundo VAN SOEST (1982, p.175), o sucesso de qualquer sistema "in vitro" depende

de forma com que ele reflete as condições do rumen.

BARNES (1965) afirma que para um método laboratorial ser realmente útil na avaliação rotineira de forragens, ele deve ser simples e também ter alto grau de precisão e repetibilidade.

A sequência de todo sistema ruminal "in vitro" se inicia com a fermentação anaeróbica de um substrato sólido, com fluido ruminal filtrado e solução tampão (saliva artificial). Após o tempo de fermentação requerido, processa-se a determinação dos "produtos finais" desejados, que podem ser: produção de gases, produção de ácidos graxos voláteis, desdobramento da celulose, matéria seca residual, fibra em detergente neutro residual, resíduo após digestão com pepsina, etc.

O termo digestibilidade pode causar alguma confusão quando os estudos envolvem esta técnica, pois o desaparecimento de nutrientes seria resultado exclusivamente da fermentação microbiana no rumen, não incluindo o desdobramento e absorção de nutrientes que caracteriza o sistema digestivo como um todo.

JOHNSON (1963) num simpósio sobre digestão microbiana nos ruminantes, discorrendo sobre a técnica de fermentação ruminal "in vitro", afirma que, apesar destas técnicas serem conhecidas a muito tempo, somente naquela época é que começam a ser realmente utilizadas na prática, devido à inexistência de conceitos básicos.

Segundo HUNGATE (1966, p.258), os

princípios da fermentação ruminal foram formulados por ZUNTZ em 1911, sendo que a fermentação da celulose foi demonstrada "in vivo" por seu aluno VON TAPPERHEIMER. Os primeiros trabalhos sobre fermentação ruminal "in vitro" tinham como procedimento incubar o líquido do rumen filtrado com diversos substratos. Tal procedimento resultou em importantes conclusões, como as obtidas por PEARSON & SMITH, citados por JOHNSON (1963), que demonstraram que os microrganismos transformavam o nitrogênio da uréia em nitrogênio proteico.

Em 1948, MARSTON, citado por JOHNSON (1963), conseguiu criar um sistema que era chamado de rumen artificial e que continha, além do leite ruminal, uma solução de minerais composta de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  e traços de outros minerais. Em 1949, McDougall publica a composição da saliva de carneiro e dá uma importante contribuição para o sistema de fermentação ruminal "in vitro". Desde então, todas as soluções basais tiveram como base a solução de McDougall, sendo que a finalidade desta solução é manter, tanto quanto possível, as mesmas condições de pH encontradas no rumen do animal.

Há basicamente dois tipos de sistema "in vitro":

sistemas de fluxo contínuo-

caracterizam-se pela admissão regular de nutrientes, acompanhada da remoção constante dos produtos finais decorrentes da fermentação microbiana anaeróbica. Portanto, as técnicas e os aparelhos necessários para satisfazerem estas exigências são mais complexas, pois o objetivo principal é estudar os processos

microbianos) do rumen - na forma como realmente ocorrem. Para acompanhamento preciso destes processos, é necessário controle sobre a entrada de nutrientes, remoção dos produtos finais da fermentação, controle do pH, concentração dos nutrientes, potencial de oxido-redução, taxa de agitação, etc. Mesmo assim este sistema é passível de críticas, desde que não haja uma avaliação da proliferação microbiana, que pode ser feita através de microscópio ou de técnicas de contagem de bactérias.

**sistemas fechados-** caracterizam-se pela não admissão regular de nutrientes, nem remoção dos produtos finais. Portanto, a principal crítica destes sistemas se refere à proliferação de microrganismos atípicos ao rumen, fato contestado por JOHNSON (1966), que cita trabalhos de DEHORITY et alii e EL SHAZLY et alii, demonstrando que as bactérias que se propagam "in vitro" são realmente representativas das bactérias presentes no rumen, podendo-se assumir que as mensurações feitas "in vitro" são as mesmas que ocorrem no animal hospedeiro. Outra crítica aos sistemas fechados é a eliminação dos protozoários da população microbiana, porém, estes podem ser estudados por intermédio de outras técnicas. Sua principal vantagem é ser uma técnica muito simples, prática e que possibilita a condução de um grande número de experimentos.

#### **2.4.1.fatores que afetam a técnica de fermentação ruminal "in vitro"**

Desde a introdução da metodologia "in vitro", uma grande variedade de técnicas tem sido

desenvolvidas por pesquisadores interessados na bioquímica e microbiologia do rumen. Como os objetivos dos diferentes laboratórios não são os mesmos, há grandes variações quanto a metodologia empregada, decorrentes das modificações feitas nas principais variáveis deste método: quantidade de substrato, quantidade e fonte de inóculo, quantidade de solução tampão e mineral, ajustamento do pH, período de fermentação, tamanho das partículas da amostra e temperatura.

#### . quantidade de substrato-

O problema relativo a quantidade de substrato que deve ser utilizada nos ensaios de cultura de microrganismos "in vitro" já é a muito tempo conhecido, desde quando, em 1919, WAETING & GIERISCH, citados por HUNGATE (1966), incubaram por vários dias um alimento teste juntamente com fluido ruminal, calculando a digestibilidade por diferença com o controle. A digestibilidade do material insolúvel foi de 30%, valor menor do que os 60% obtidos com ensaios de digestibilidade "in vivo". Este fato foi creditado a excessiva quantidade de substrato (alimento) em relação ao inóculo (lícor ruminal), que resultou em elevada acidez.

Os estudos sobre microrganismos e suas ações são um valioso meio para aumentar o conhecimento sobre a digestão dos ruminantes. Segundo SCHNEIDER & FLATT (1975), grande parte das pesquisas "in vitro" tem como propósito procurar maiores informações sobre os fatores que afetam a atividade microbiana, sendo este um tipo de informação das mais valiosas. Dentro desta visão, a quantidade de alimento que é incubada com o

fluído ruminal assume importante papel, devendo ser pequena o suficiente para evitar a inibição da digestão e acumulação dos produtos fermentados.

CHURCH & PETERSON (1960), estudando os efeitos das principais variáveis sobre a fermentação ruminal "in vitro", afirmaram que deve-se encontrar experimentalmente a quantidade de substrato que irá ser acrescentada à fermentação "in vitro". Segundo estes autores, a quantidade de substrato deve ser o suficientemente pequena para que a fermentação não se desenvolva dentro de condições desfavoráveis ao crescimento microbiano, e afirmam que a quantidade de substrato dependerá da capacidade tamponante da solução tampão e da digestibilidade do substrato.

VAN SOEST (1982, p.211) afirma que a máxima taxa de digestão é determinada pelas características dos substratos e por suas propriedades físico-químicas. Os microrganismos somente podem crescer com máxima taxa se o substrato assim permitir, pois a taxa de crescimento no rumen é em muitos casos limitada. A FIGURA N°3 mostra os estágios do crescimento microbiano.

Durante a fase inicial e a fase de crescimento acelerado as bactérias estão se adaptando ao substrato, e portanto são elas (bactérias) o fator limitante da máxima taxa de fermentação. Durante a fase de crescimento exponencial e a fase de crescimento desacelerado as bactérias estão em equilíbrio com o substrato, que agora começa a ser limitante para a máxima taxa de fermentação. Durante a fase

estacionária o número de células é máximo e o substrato começa a se exaurir, sendo logo seguido pela fase de declínio e morte, onde ocorrem fermentações secundárias dos produtos finais resultantes.

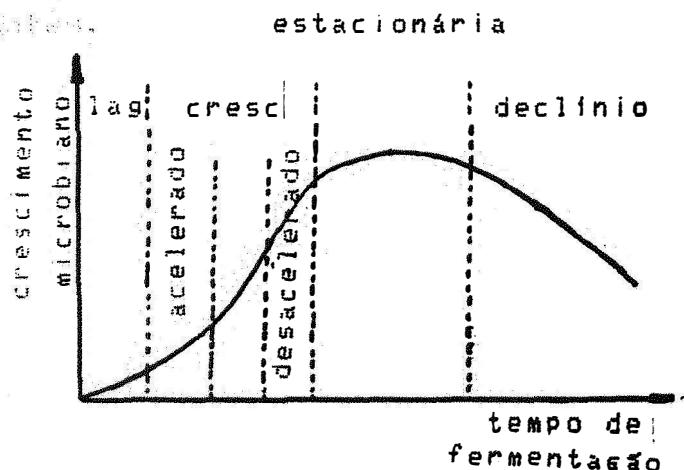


FIGURA N°3- Estágios do crescimento microbiano em ensaios de fermentação. FONTE: VAN SOEST, 1982, pg. 91.

Segundo SCHNEIDER & FLATT (1975), há grande interesse em se estudar a digestão microbiana do rumen através de técnicas "in vitro", havendo porém a necessidade de maiores investigações sobre as condições que garantam a manifestação da máxima atividade microbiana no rumen, conseguindo-se assim tirar maiores vantagens dos processos de digestão da fibra bruta e carboidratos estruturais no rumen.

JOHNSON (1966), discorrendo sobre as técnicas de fermentação ruminal "in vitro", afirma que se o objetivo do estudo for medir o fenômeno de taxa, outras considerações devem ser obedecidas, pois nos sistemas fechados é impossível proporcionar substrato suficiente para manter a máxima taxa de fermentação por longos períodos. Em outras palavras, geralmente o substrato logo se torna limitante, isto é, logo

depois que a máxima taxa de digestão é alcançada. Portanto, segundo o mesmo autor, deve-se estudar qual é a melhor duração do tempo de fermentação em caso do estudo do fenômeno de taxa. Para tanto torna-se necessário a condução de estudos preliminares sobre os níveis de substrato que afetam a taxa e a extensão de digestão.

#### . quantidade e fonte de inóculo

Segundo JOHNSON (1966), a fonte de inóculo para fermentação ruminal "in vitro" representa uma das principais causas da variabilidade dos resultados, sendo que especial atenção deve ser dada a dois fatores: escolha da fonte de inóculo animal e métodos para preparação do inóculo.

A competição entre as diferentes espécies de microrganismos do rumen é ditada predominantemente pela dieta a que está sendo submetido o animal. Portanto, em caso do estudo da digestão microbiana da celulose "in vitro", torna-se importante que seja fornecido ao animal que servirá como fonte de inóculo, uma dieta composta basicamente de carboidratos estruturais (volumosos), pois assim os microrganismos celulolíticos estarão presentes em maior número, tornando as condições experimentais mais representativas. Este fato já vem sendo propagado desde 1948, quando POUNDEN & HIBBS estudaram a influência do acréscimo de grãos numa dieta a base de feno, sobre os microrganismos do rumen. Os autores afirmaram que os tipos de microrganismos ruminais presentes no fluido de animais alimentados com dietas compostas basicamente por forragens são notadamente diferentes dos encontrados em rumen de animais que

recebem dietas ricas em grãos.

Segundo WARNER (1956), para que a população microbiana se mantenha normal em termos de número e atividade, é necessário que na montagem do ensaio "in vitro", o substrato (alimento) em teste receba como inóculo o fluido ruminal retirado de um animal recebendo dieta composta basicamente pelo alimento em questão.

JOHNSON (1966) afirma que a forma de preparação do inóculo é escolhida em razão dos objetivos a que se destinam os estudos. Segundo o autor, no caso da utilização da técnica "in vitro" para estimar o valor nutritivo de diferentes forragens, torna-se necessário a determinação do consumo voluntário e da digestibilidade destas forragens, que é obtido mediante condução de um ensaio de digestibilidade "in vivo". As mesmas amostras são utilizadas nos estudos de fermentação ruminal "in vitro". A correlação e a regressão entre estes dados é obtida, sendo que a regressão deve ser usada para testar qual a precisão da técnica "in vitro" em estimar o valor nutritivo relativo às diferentes espécies, variedades e maturidade das forragens, tendo o ensaio "in vivo" como referência. Neste caso, para evitar problemas relativos a variações de inóculos decorrentes de diferentes dietas, costuma-se utilizar uma dieta padrão para alimentar os animais que servirão como fonte de inóculo.

A retirada do fluido ruminal pode se dar através da utilização de vácuo, ou pela simples retirada de uma quantidade do conteúdo ruminal (obviamente feita após eficiente homogeneização).

Quanto à preparação deste inoculo, diversas técnicas já foram estudadas. Usa-se desde a simples utilização do fluido ruminal, até a separação das células microbianas mediante centrifugação. A técnica a ser empregada é escolhida em função dos objetivos do estudo (JOHNSON, 1966). Caso se pretenda obter máxima atividade microbiana, simplesmente filtrar-se várias vezes o fluido em pano grosso de algodão, mantendo-se assim inalterada a concentração de nutrientes e os fatores de crescimento que estão presentes no fluido ruminal. Quando pretende-se estudar e medir requerimentos de nutrientes necessários para melhorar a atividade microbiana, é recomendável eliciar o licor ruminal (onde estão presentes os nutrientes e os fatores de crescimento), trabalhando-se então somente com as células bacterianas. Isto é obtido através da centrifugação e lavagem das células com tampões fosfatados, obtendo-se uma suspensão de células lavadas que serão utilizadas com sucesso neste tipo de estudo.

#### .solução tampão

Desde a publicação por McDougall (1948) da composição da saliva de carneiro, vários pesquisadores passaram a utilizar esta solução nos seus ensaios "in vitro".

Entretanto, JOHNSON (1963) em uma revisão sobre técnicas "in vitro" cita vários autores que de alguma forma modificaram esta solução de McDougall, como DONEFER et alii (1960), que aumentaram a capacidade tamponante da solução para eliminar ajustes necessários de pH e ANDERSON et alii (1956)

e HALL et alii (1961), que estudaram a substituição do fosfato por várias fontes de fósforo na solução tampão.

As variações nesta solução dependem do tipo de atividade que será estudada, mas sempre dever-se-á manter a sua função básica de eficaz agente tamponante (JOHNSON, 1966).

#### . frascos de fermentação

Geralmente a fermentação é conduzida dentro de tubos de vidro com capacidade variável, existindo desde 10 até 1000 ml. No caso do sistema fechado sem combateamento contínuo de CO<sub>2</sub>, utiliza-se uma válvula de BUNSEN na Tampa do tubo, com a finalidade de manter o meio anaeróbico, mesmo possibilitando o escape dos gases formados durante a fermentação. A escolha do tamanho do tubo a ser utilizado dependerá do método utilizado e dos objetivos a serem estudados.

#### . grau de agitação

Normalmente as fermentações ruminais "in vitro" são conduzidas sem agitação mecânica. Segundo JOHNSON (1966), a opinião de muitos laboratórios é de que a agitação para substratos insolúveis não é necessária e até atrapalha a digestão da celulose. Geralmente a agitação só é feita no momento em que se coloca o inóculo e no momento de remoção dos frascos.

#### . temperatura

Normalmente usa-se 39 graus centígrados, temperatura que pode ser fornecida através de incubadeira ou de banho maria, como é mais usual. A temperatura deve ser uniformizada, pois variações maiores de 0,5 graus centígrados invalidam possíveis comparações entre ensaios de fermentação "in vitro". Isto é decorrente das grande sensibilidade das bactérias do rumen à altas temperaturas principalmente, o que pode acarretar numa diminuição da atividade microbiana.

#### pH

Mesmo contando com a capacidade tamponante da saliva artificial, o pH do sistema "in vitro" geralmente se modifica durante o transcorrer da fermentação, havendo necessidade da sua correção para que fique dentro do intervalo considerado ideal para a manifestação da máxima atividade microbiana. Segundo JOHNSON (1966) este intervalo corresponde a pH entre 6,7 e 7,0, sendo que a digestão da celulose é máxima com pH ao redor de 6,9.

Durante o transcorrer da digestão da celulose, há produção de ácidos com uma taxa muito menor do que em relação a digestão do amido. Portanto, costuma-se ajustar o pH de duas a três vezes durante um período de 24 horas de fermentação, sempre que o substrato for constituído basicamente por celulose. No caso de substrato composto predominantemente por amido, a taxa de produção de ácidos é mais rápida em razão da maior disponibilidade de carboidratos solúveis, o que leva à

necessidade de se ajustar o pH de hora em hora, para um valor ao redor de 6.8. O ajuste do pH é feito através da utilização de uma solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) quando o pH está baixo e com solução de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) quando o pH está alto.

#### .tempo de fermentação

O tempo de duração dos estudos de fermentação ruminal "in vitro" é totalmente dependente dos objetivos estudados, a fim de que apresentem de maneira significativa os processos envolvidos.

Carboidratos solúveis como os açúcares simples, são fermentados rapidamente, minutos após serem misturados com o inóculo. Geralmente seu pico de fermentação ocorre 1 ou 2 horas após o inicio da fermentação. Já a digestão da celulose não só se inicia após longo período de incubação, como também se processa com taxa de digestão menor do que os carboidratos solúveis. Em muitos sistemas "in vitro" entretanto, existe uma distinta diferença entre a digestão da celulose na forma nativa das forragens e a celulose purificada (solka-floc). A digestão da celulose na forma nativa das forragens se inicia muito mais cedo (após cerca de 6 horas de fermentação), enquanto que a digestão da celulose purificada geralmente não se inicia antes de 12 horas ou mais de fermentação. As exatas reações para estas diferenças não são bem conhecidas (JOHNSON, 1966).

#### 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 7.1. Plano experimental

O trabalho experimental foi conduzido junto ao Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, e constou da utilização da técnica laboratorial de fermentação ruminal "in-vitro" para demonstrar as mudanças na composição química e cíclica da fermentação, decorrentes do tratamento físico (com pressão e vapor sobre o bagaço de cana-de-açúcar auto-hidrolisado).

O delineamento experimental adotado foi um fator<sup>7x4</sup> (7 períodos de fermentação e 4 tratamentos) em 3 blocos aleatórios (3 ensaios de digestibilidade "in-vitro"). No caso de interação significativa entre período de fermentação e tratamento, foram realizadas as decomposições, visando estudar o efeito do tempo de fermentação dentro de cada tratamento, através de regressão polinomial.

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado no experimento foi obtido através da Coopersucar, sendo proveniente da Usina Barra Grande, localizada no município de Senador Firmino (SP).

O tratamento físico utilizado foi com pressão e vapor, sendo 17 kgf/cm<sup>2</sup> de pressão, tempo de tratamento de 5 minutos e com temperatura oscilando entre 200-220 graus centígrados.

Parte do bagaço auto-hidrolisado foi submetida a um desengorduramento, com a finalidade de extrair os chamados compostos fenólicos resultantes deste tratamento físico, e que provavelmente pudessem provocar inibição na atividade

microbianas.

Portanto, as amostras que foram submetidas aos diversos tipos de análise química e biológica foram:

bagaço de cana-de-açúcar "in natura"-  
(B.I.N.)

bagaço de cana-de-açúcar tratado com pressão e vapor (auto-hidrolisado)-(B.A.H.)

bagaço de cana-de-açúcar tratado com pressão e vapor e desengordurado-(B.A.H.D.)

. capim napier (padrão)-(N.)

O padrão era constituído por folhas de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) variedade Napier, com 20 dias de crescimento.

Todas as amostras foram secaas em estufa a 58 C durante 8 horas. Em seguida foram moidas em moinho WILEY, malha Nº1, sendo então guardadas em recipiente fechado, para em seguida serem utilizadas.

### 3.2. Metodologia usada para montagem do sistema de fermentação ruminal "in vitro"

Como fonte de inóculo para o sistema "in vitro", utilizou-se uma vaca da raça Jersey, provida de fistula ruminal permanente. Este animal foi mantido dentro de uma baia de 3x6m e recebia uma dieta padrão composta de 20 kg de bagaço de cana auto-hidrolisado, 2 kg de concentrado comercial (22% PB), 1 kg de feno de baixa qualidade e sal mineral a

vontade. O fornecimento desta dieta se dava uma vez ao dia, ao redor das 17 horas.

Nos dias da montagem do sistema "in vitro" o animal era transportado às 7,00 horas para uma baia individual, onde permanecia por 2 horas sem qualquer alimento ou água. Decorrido este tempo, procedia-se a retirada manual do conteúdo ruminal, após introdução do braço até mais ou menos o meio da massa existente no rumen, promovendo-se então a homogeneização dos conteúdos da porções anterior, média e posterior do órgão. Em seguida a amostra homogênea era colocada sobre pano de laboratório ("cheese cloth"), através do qual espremia-se o material para coleta do líquido do rumen, que era imediatamente filtrado através de 3 camadas do mesmo tecido, em um funil de vidro.

Para obtenção do inóculo que seria usado para o estabelecimento da fermentação "in vitro", o líquido ruminal filtrado era recebido diretamente em uma garrafa térmica previamente aquecida a 40 °C com água. Depois de 20 a 30 minutos da coleta o líquido era retirado através de sifão e colocado em um "becker" mantido em banho maria a 38-39 °C, no qual fazia-se borbulhamento constante de gás carbônico, de acordo com o método de TINNIMET (1974).

A solução fosfato-carbonato utilizada tinha a seguinte fórmula (1 litro):

- 4,08 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 8,72 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 1,50 g MgSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O
- 0,50 g KCl

Decorridos cerca de 30 minutos, esta solução era completada com :

20 ml solução (15,73g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> /100ml ou 18,4g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> . H<sub>2</sub>O/100ml

. 10 ml solução (8,0g uréia/100ml)

0,10 g CaCl<sub>2</sub>

. 25 mg Na<sub>2</sub>S . 9H<sub>2</sub>O

A fermentação foi conduzida em tubos de centrifuga de fundo redondo com cerca de 75 ml de capacidade, sendo que a solução foi previamente borbulhada com CO<sub>2</sub> até que o pH atingisse 6,8. Adicionava-se então 10 ml desta solução tampão-mineral em cada tubo de fermentação, que já continham o substrato em estúpore no seu interior. Os tubos eram colocados em banho-maria regulados termostáticamente para 39 °C e permaneciam aí por 15-40 minutos.

Adicionava-se então 12 ml do fluido ruminal nos tubos, tomado-se o cuidado de rodar o tubo para remover partículas aderidas a parede. Em seguida injetava-se CO<sub>2</sub> nos tubos, com a finalidade de eliminar o ar neles contido, sendo estes logo tampados com rólyhas equipadas com válvula de BUNSEN. Os tubos eram novamente colocados no banho-maria, sendo este o término da montagem do ensaio "in vitro".

O controle do pH era feito segundo intervalos de 4 horas durante as primeiras 12 horas de fermentação, sendo repetido após 24 horas para ajustá-lo a uma faixa entre 6,7 e 6,9, faixa esta considerada ideal para máxima atividade microbiana.

O término do tempo de fermentação era obtido pela adição de 1 ml de HCl 6N/tubo.

### 3.3. Modificações procedidas na metodologia dos ensaios de fermentação ruminal "in vitro".

Quando se utiliza a técnica laboratorial de fermentação ruminal "in vitro" para estudar os fenômenos de taxa e extensão, a relação existente entre substrato, inóculo e solução tampão mineral assume grande importância, pois é o resultado desta interação que possibilitará ou não a manifestação da máxima atividade microbiana deste sistema "in vitro".

Visando obter do sistema de fermentação "in vitro" utilizado condições ótimas para o desenvolvimento microbiano, optou-se por manter constante as variáveis inóculo e solução tampão mineral, variando-se então somente a quantidade de substrato utilizado.

Portanto montou-se um ensaio "in vitro" preliminar, onde os componentes e as concentrações da solução tampão eram as mesmas, a fonte e quantidade de inóculo também, variando-se apenas a quantidade de substrato, com o objetivo de se encontrar qual a quantidade que possibilitasse a manifestação da máxima atividade microbiana, isto é, onde o substrato não fosse nem limitante nem inibidor da fermentação da amostra.

Como o método "in vitro" utilizado (TIRKIMET, 1974) preconiza 0.5 g de amostra por tubo de fermentação, o ensaio preliminar constou da utilização de 4

quantidades diferentes de amostra, ou seja: 0.5 , 1.0 , 1.5 e 2.0 g amostra /tubo.

Os tempos de fermentação utilizados para o posterior cálculo da taxa de digestibilidade (desaparecimento) da celulose, foram 0 , 6 , 12 , 15 , 18 e 24 horas, sendo que também tinham caráter exploratório. As amostras usadas inicialmente foram bagaço auto-hidrolisado e capim napier, sendo que cada período de fermentação contava com 2 tubos por amostra, totalizando 96 tubos (48 de bagaço e 48 de capim napier).

Após o encerramento dos vários períodos de fermentação, adicionou-se 1ml de HCl 6N em cada tubo de fermentação, sendo os mesmos guardados em geladeira para posterior análise.

O método utilizado para determinação da celulose foi o de CRAMPTON e MAYNARD (1938), que é padronizado para 1.0 g de amostra, sendo que esta é tratada com 15 ml de uma mistura acético-nítrica, na razão de 5:1. Como foram utilizados pesos de amostra (substrato) maiores que o preconizado no método acima, fez-se um novo teste para verificação das quantidades necessárias da mistura acético-nítrica que deveriam ser colocadas nos tratamentos das amostras com pesos maiores. Os resultados deste teste são apresentados no quadro Nº2.

QUADRO N°2-Determinação da celulose em diferentes quantidades de amostra, utilizando-se diferentes quantidades da solução acético-nitrica.

quantidade de substrato (g) *	quantidade de ác. acét.+ác. glacial (ml)	celulose (%)
0.5	15	51.74
	25	50.86
1.0	15	51.33
	25	50.98
1.5	25	51.41
	30	51.06
2.0	25	51.47
	30	51.23
	40	51.00

\* bagaço auto-hidrolisado

Como se observa nos resultados acima, não houveram diferenças significativas nos teores de celulose quando foram utilizadas várias quantidades da mistura acético-nitrica. Portanto, na determinação dos níveis de celulose dos tubos presentes no ensaio "in vitro" foram utilizados 15 ml da mistura nos tubos que continham 0.5 g amostra, 15 ml para 1.0 g, 25 ml para 1.5 g e 30 ml para 2.0 g.

O cálculo do teor de celulose presente nos tubos referentes aos diversos períodos de fermentação, foi obtido após centrifugação dos tubos a 3.000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado, tendo-se sempre o cuidado para não levantar o material precipitado no fundo do tubo. Os resíduos foram tratados com a adição dos diferentes volumes previamente obtidos da mistura acético-nitrica, sendo os tubos posteriormente colocados em um suporte de aço inoxidável, que era por sua vez mergulhado em banho-maria fervente por 20

minutos. Em seguida transferiu-se o resíduo de cada tubo para um cadrinho cintirizado (porosidade nº2) adaptado a um frasco de filtração conectado a uma trompa de vácuo. Lavou-se os resíduos com água quente (3 vezes). Álcool etílico (1 vez), benzeno (1 vez) e éter etílico (1 vez), sendo todos quentes. Secou-se os cadrinhos em estufa a 100°C por 24 horas, deixando-os esfriar em dessecador e pesando-os em seguida (P). Posteriormente queimou-se os cadrinhos em mufla a 600°C por 3 horas, esfriando-os novamente em dessecador e procedendo nova pesagem (P').

O cálculo realizado para obtenção do teor de celulose de cada tubo foi o seguinte:

$$\% \text{ CEL.} = \frac{P - P' \times 100}{A}$$

onde:

- P - peso do cadrinho mais o resíduo
- P' - peso do cadrinho mais o resíduo mineral (cinzas)
- A - peso da amostra (MS)

Calculados os níveis de celulose de todos os tubos, de acordo com o seu tempo de fermentação, obtiveram-se os resultados apresentados no quadro Nº3.

QUADRO N°3-Digestibilidade "in vitro" da celulose do bagaço auto-hidrolisado e capim napier, utilizando-se diferentes quantidades de amostra(1).

substrato	tempo de fermentação(hr)	digestibilidade da celulose			
		0.5g	1.0g	1.5g	2.0g
		% -----			
BAH	6	0.13	1.37	1.33	2.44
	12	1.86	1.92	0.87	2.82
	15	4.01	2.03	0.93	2.38
	18	9.33	2.63	1.00	2.26
	24	20.89	4.50	2.09	1.58
N	6	9.35	10.56	1.25	1.28
	12	24.74	18.11	11.50	5.69
	15	25.92	22.02	12.14	5.12
	18	29.25	24.36	12.10	6.51
	24	34.20	29.46	12.03	9.13

\* g MS

Para melhor visualização foram traçados os gráficos relativos as curvas de digestibilidade "in vitro" acumuladas da celulose em função do tempo de fermentação (GRAFICOS N°1 (bagaço auto-hidrolisado) e N°2 (capim napier)).

GRAFICO N°1-Curva de digestibilidade "in vitro" da celulose acumulada em função do tempo de fermentação (bagacço auto-hidrolisado).

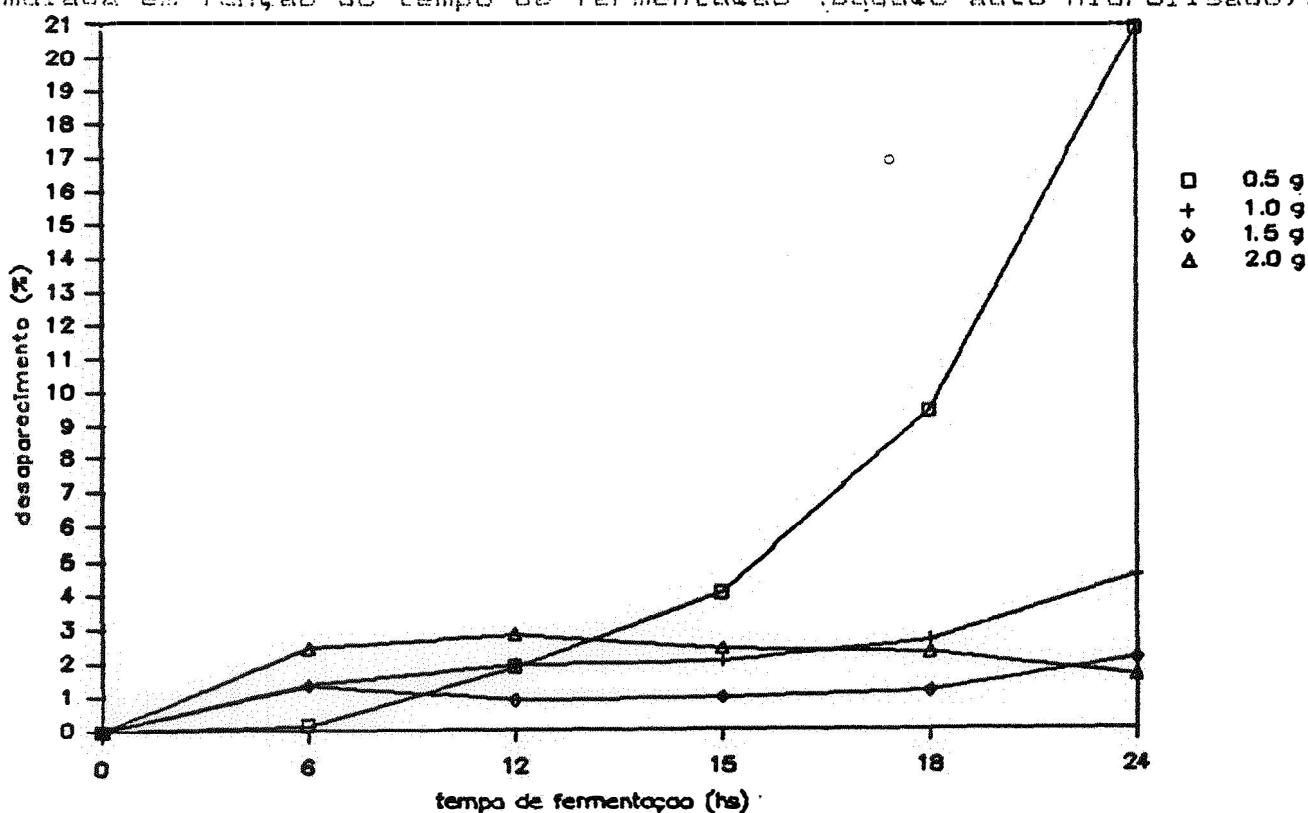
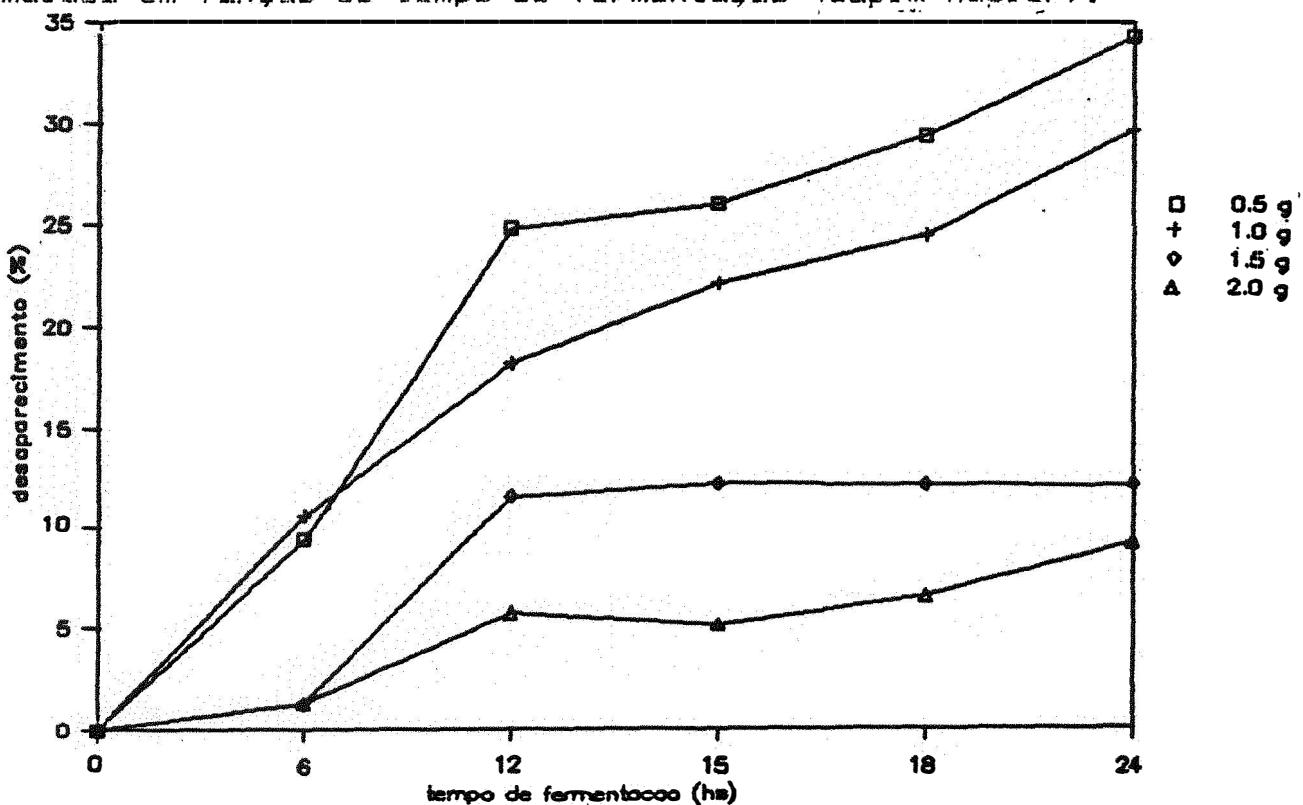


GRAFICO N°2-Curva de digestibilidade "in vitro" da celulose acumulada em função do tempo de fermentação (capim napier).



O ensaio "in vitro" experimental mostrou que os tempos de fermentação utilizados (6, 12, 15, 18 e 24 horas) foram curtos demais, visto que somente a "lag fase" do bagaço auto-hidrolisado durava cerca de 6-15 horas, quando já se estava praticamente na metade do período máximo de fermentação escolhido.

Quanto às quantidades de substrato utilizadas no ensaio "in vitro" experimental, percebeu-se que a utilização de 0.5 g de amostra possibilitava melhores possibilidades de crescimento aos microrganismos presentes nas condições reinantes neste tipo de ensaio "in vitro". Provavelmente, a relação existente entre inóculo, solução tampão-mineral e substrato foi prejudicada nos ensaios que continham muito substrato, não oferecendo condições para um eficiente crescimento da população microbiana presente nestes tubos de fermentação.

Baseado nestes resultados, montou-se outro ensaio "in vitro", utilizando-se exatamente o mesmo procedimento experimental, a mesma técnica, porém, aumentando-se a extensão dos períodos de fermentação, que passaram a ser: 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 e 48 horas. Outra modificação diz respeito às quantidades de substrato utilizadas, que passaram a ser: 0.2, 0.4 e 0.6 g de matéria seca da amostra por tubo de fermentação. As amostras utilizadas neste ensaio foram: bagaço "in natura", bagaço auto-hidrolisado, bagaço auto-hidrolisado desengordurado e capim napier.

A introdução da amostra de bagaço auto-hidrolisado desengordurado se justifica pela presença de

considerável quantidade de compostos fenólicos no bagaço auto-hidrolisado, que são substâncias formadas em decorrência do tratamento com pressão e vapor a que foi submetido o bagaço "in natura". Estes fenóis são tidos como agentes anti-bacterianos e possivelmente estivessem prejudicando a fixação ("attachment") entre os microrganismos e as partículas do substrato. Uma das maneiras de se extrair os fenóis dos alimentos em geral, é promover um desengorduramento com metanol 80% (WALKER, 1984), procedimento que foi efetuado para a obtenção do bagaço auto-hidrolisado desengordurado.

Após o cálculo da porcentagem de celulose presente nos tubos referentes aos diferentes períodos de fermentação, obtiveram-se os resultados contidos no quadro Nº4.

**QUADRO Nº4-Digestibilidade "in vitro" da celulose dos diversos tratamentos, utilizando-se diferentes quantidades de amostra(2).**

substrato	tempo de fermentação ( hs )	digestibilidade da celulose		
		quantidade substrato utilizado (gMS)	0.2	0.4
			----- % -----	
	6	0	7.98	8.39
	12	14.40	17.16	18.40
	18	20.93	22.87	25.71
B.I.N.	24*	24.91	26.65	28.38
	30	35.61	38.14	34.31
	36	37.31	37.57	36.12
	48	40.57	44.81	42.93

	6	0	0	2.12
	12	2.20	0.38	3.17
	18	19.57	16.82	13.74
B.A.H.	24	31.60	26.89	21.22
	30	41.25	34.40	27.15
	36	48.38	37.74	28.14
	48	53.56	43.96	33.33

	6	2.24	1.10	0.17
	12	10.80	10.05	7.52
	18	29.73	27.65	22.45
B.A.H.D.	24	45.83	44.39	27.17
	30	59.62	56.06	39.41
	36	68.01	58.54	45.12
	48	75.61	67.25	52.02

	6	8.19	10.47	13.49
	12	23.05	22.76	21.89
	18	39.47	41.09	37.82
N.	24	41.28	42.08	40.39
	30	48.86	46.82	43.28
	36	49.17	46.35	45.03
	48	52.39	51.70	47.24

Para melhor visualização foram traçados os gráficos das digestibilidades "in vitro" acumuladas da celulose em função dos diferentes períodos de fermentação, para todas as amostras estudadas (GRAFICOS N°3 (B.I.N.), N°4

(B.A.H.), Nº5 (B.A.H.D.) e Nº6 (N.).

Confirmando os resultados obtidos no ensaio anterior, o aumento da quantidade de substrato utilizado caracterizou uma redução da extensão da digestibilidade "in vitro" da celulose para todas as amostras, com exceção do baúço "in natura", onde os resultados foram bastante próximos para as 3 quantidades de substrato utilizadas.

GRAFICO Nº3-Curva da digestibilidade "in vitro" da celulose acumulada em função do tempo de fermentação (baúço "in natura").

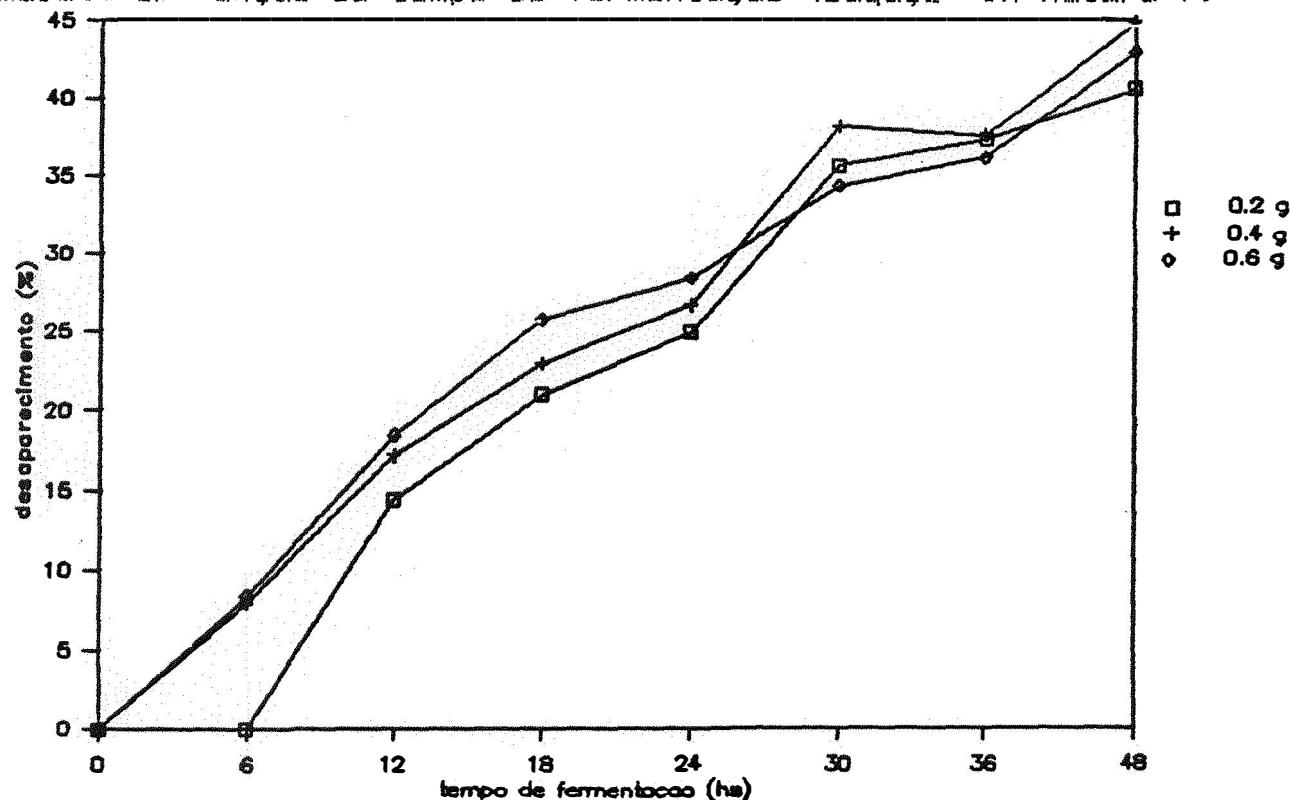


GRAFICO N°4-Curva da digestibilidade "in vitro" da celulose acumulada em função do tempo de fermentação (bagaço auto-hidrolisado)

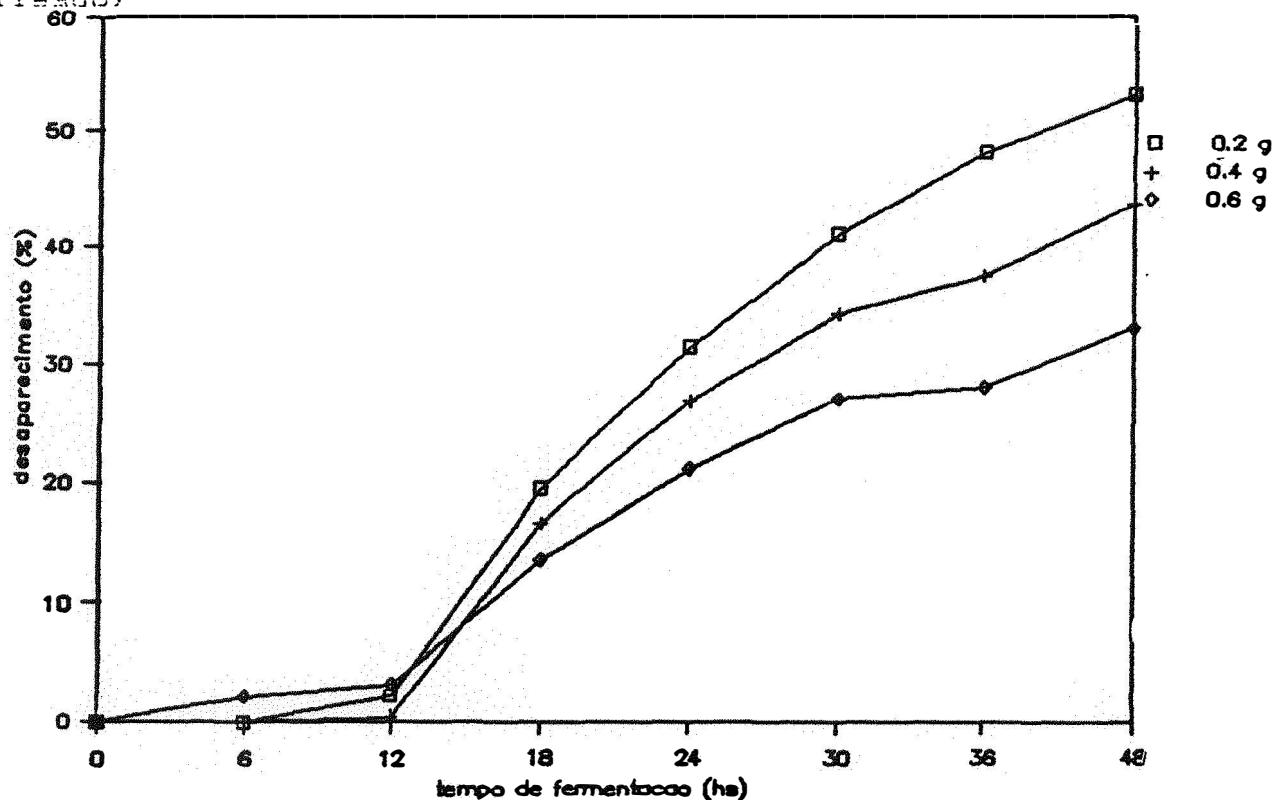


GRAFICO N°5-Curva da digestibilidade "in vitro" da celulose acumulada em função do tempo de fermentação (bagaço auto-hidrolisado desengordurado).

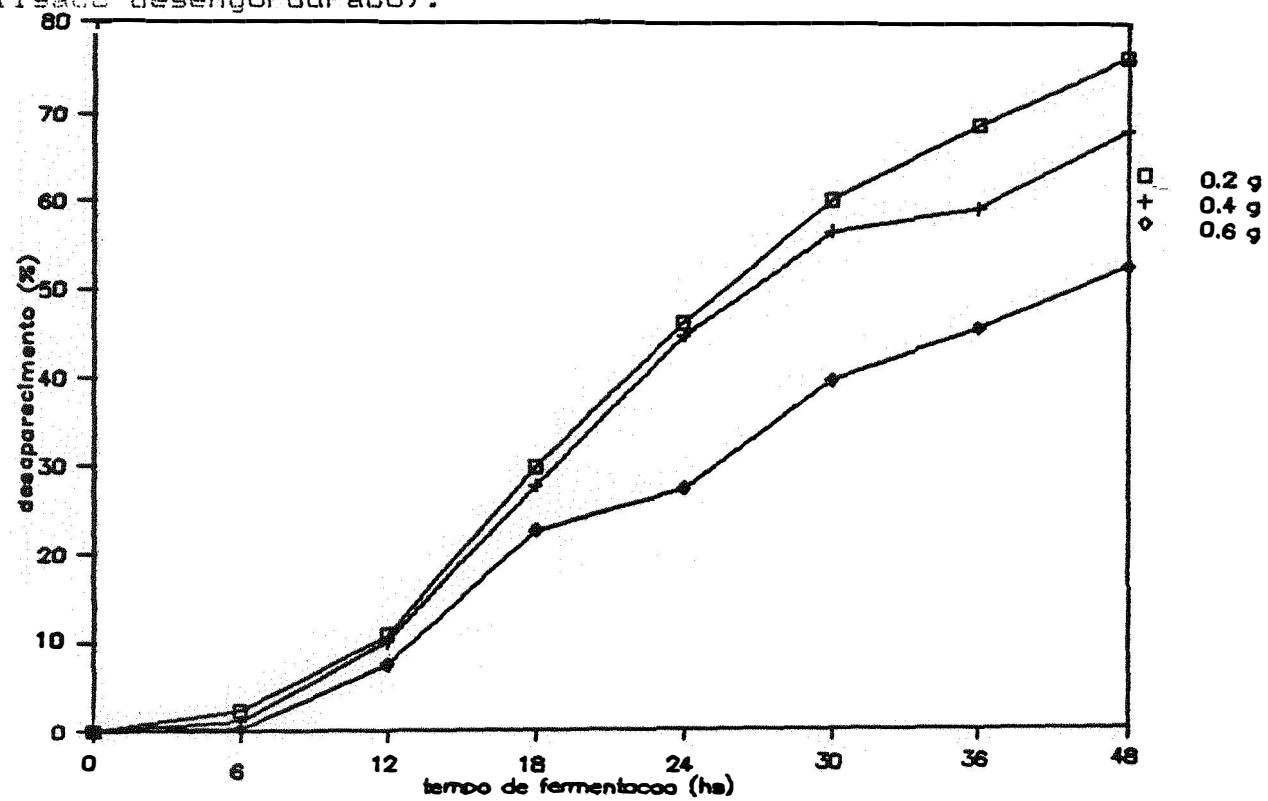
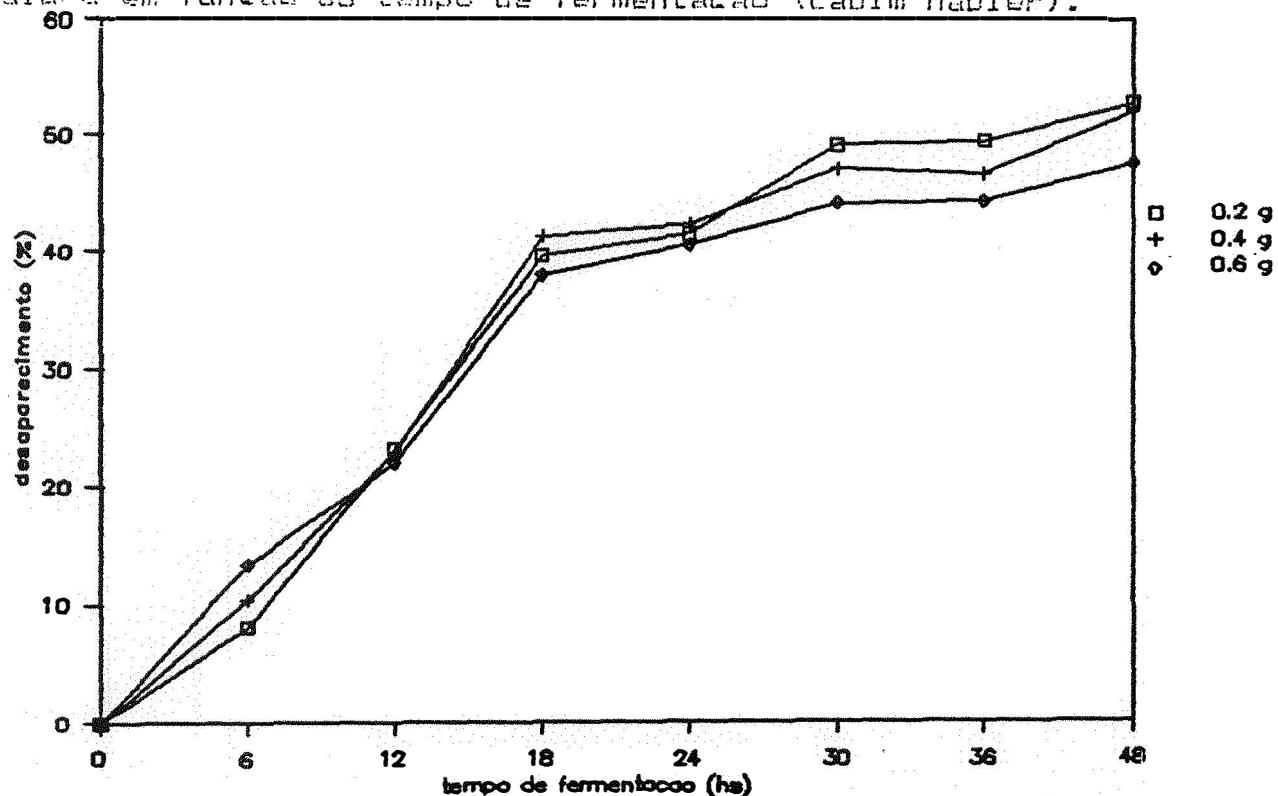


GRAFICO N°6-Curva da digestibilidade "in vitro" da celulose acumulativa em função do tempo de fermentação (cabim napier).



Os períodos de fermentação escolhidos para este ensaio também foram mais representativos para o estudo da marcha da fermentação "in vitro", sendo bem caracterizados os períodos: (1) "lag fase", ou seja, o tempo requerido para a fixação ("attachment") entre os microrganismos e as partículas de substrato; (2) fase máxima de fermentação, onde o crescimento microbiano é máximo, resultando em maior fermentação da celulose presente, o que significa que os microrganismos estão em equilíbrio com o substrato e (3) fase estacionária, onde a fermentação é desacelerada em virtude do início da baixa disponibilidade de substrato.

A duração da "lag fase" do bagaço auto-hidrolisado foi ligeiramente maior do que a do "in natura",

indicando uma provável consequência do tratamento físico a que foi submetido tal amostra. A extração com metanol 80 % aparentemente removeu compostos químicos responsáveis pelo retardamento do inicio da fermentação da celulose, ou seja, compostos solúveis e provavelmente compostos fenólicos.

A respeito da extensão de fermentação atingida pelas diferentes amostras, observou-se que o tratamento físico com pressão e vapor resultou numa maior extensão de digestibilidade da celulose, embora a magnitude deste aumento seja bastante influenciada pela quantidade de amostra utilizada.

Estes resultados evidenciam que a quantidade de substrato utilizado nestes ensaios "in vitro" é particularmente mais importante quando se utiliza como substrato qualquer material submetido a algum tipo de tratamento, visto que estes são capazes de influenciar o desenvolvimento normal da população microbiana presente nos tubos de ensaio. Isto foi caracterizado pelas variações decorrentes do aumento da quantidade de substrato utilizado das amostras de bagaço auto-hidrolisado e bagaço auto-hidrolisado desengordurado. Por sua vez, o capim napier e o bagaço "in natura" quase não apresentaram diferenças no que diz respeito a extensão de digestibilidade da celulose, mesmo com quantidades diferentes de substrato.

Os resultados dos ensaios "in vitro" anteriores mostraram que as quantidades de substrato utilizadas influenciaram a extensão da digestibilidade da celulose das amostras, sendo que no caso dos bagaços auto-hidrolisados, quanto

raior, a menor quantidade de substrato, menor era a quantidade de celulose fermentada nestas amostras.

Portanto, continuando no objetivo de se identificar quais as condições que levassem a máxima atividade microbiana no sistema "in vitro" utilizado, montou-se um novo ensaio de fermentação, utilizando-se o mesmo procedimento experimental, a mesma técnica e os mesmos períodos de fermentação (0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 e 48 horas). Entretanto, neste ensaio procurou-se oferecer iguais quantidades de celulose aos microrganismos, já que o objetivo era conseguir máxima atividade microbiana na fermentação da celulose destas amostras. A quantidade de substrato a ser utilizada neste novo ensaio foi escolhida da função do ensaio anterior, onde 0.2, 0.4 e 0.6 g MS das 15 amostras correspondiam a diferentes quantidades de celulose, conforme:

	celulose presente no substrato (g)		
	substrato (g MS)		
	0.2	0.4	0.6
E.M.N.	0.0898	0.1797	0.2696
E.A.H.	0.0899	0.1799	0.2698
E.G.-D.	0.1168	0.2337	0.3505
N.	0.0582	0.1164	0.1746

Como mostra o quadro acima, quantidades de substrato variando entre 0.2-0.4g MS apresentam níveis de celulose entre 0.0582-0.2337g. Procurando utilizar uma

quantidades de celulose uniforme para todas as amostras testadas, optou-se por usar 0.1500 g de celulose/tubo, visto que os melhores resultados de extensão de desaparecimento da celulose foram obtidos quando os níveis de celulose das amostras se encontravam nesta faixa.

Portanto, foi montado um novo ensaio "in vitro" onde as quantidades de substrato foram escolhidas em função da sua porcentagem de celulose, de maneira tal que todos os tubos apresentassem 0.1500 g de celulose. Portanto as quantidades de substrato utilizadas neste novo ensaio foram:

- . 0.3337 g MS de bagaço "in natura"
- . 0.3335 g MS de bagaço auto-hidrolisado
- . 0.2567 g MS de bagaço auto-hid. desengordurado
- 0.5153 g MS de capim napier

Para efeito de comparação, incluiu-se no ensaio "in vitro" a amostra de celulose de algodão pura, que foi incubada utilizando-se 0.1500 g de MS. O ensaio constou da utilização de 16 tubos por amostra, pois foram utilizados 8 períodos de fermentação, sendo representados por duplicata.

Uma vez padronizadas as quantidades de substrato a serem utilizadas, deu-se início ao experimento propriamente dito, pois não foram mais efetuadas modificações na bactecologia empregada, podendo-se considerar que as repetições efetuadas foram bastante uniformes.

### 3.4. Análises de laboratório

#### 3.4.1. Análise convencional de Weende-

As amostras sècas e moídas foram utilizadas na determinação da matéria sèca (M.S.), proteína bruta (P.B.), fibra bruta (F.B.), extrato etéreo (E.E.), matéria mineral (M.M.) e extrativo não nitrogenado (E.N.N.) pelos métodos propostos pela "Association of Official Agricultural Chemists" (AOA.A.C., 1965).

#### 3.4.2. análise da composição da fração fibrosa-

As amostras sècas e moídas foram utilizadas na determinação da fibra em detergente neutro (F.D.N.), fibra em detergente ácido (F.D.A.), lignina em detergente ácido (LIG.) pelo método proposto por GOERING & VAN SOEST (1970). Celulose foi obtida pelo método proposto por CRAMPTON & MAYNARD (1938). Hemicelulose foi obtida através da diferença entre F.D.N. e F.D.A.. Os níveis de compostos fenólicos foram obtidos pelo método proposto por SWAIN & HILLIS (1959).

#### 3.4.3. análise dos carboidratos solúveis totais-

Utilizou-se o método colorimétrico de CUBOIS et alii (1956), que foi modificado para determinação de carboidratos solúveis. Como glucose, xilose e seus respectivos polímeros representam grande parte dos carboidratos solúveis das pleitas, desenvolveu-se modificações que promovessem a mesma intensidade de cor, com base no peso destes dois monossacarídeos (JOHNSON, 1966).

### 3.5. Parâmetros analisados

#### 3.5.1. digestibilidade "in vitro" da matéria sèca e matéria lignificada (48 horas de fermentação)-

Para os cálculos dos coeficientes de

digestibilidade "in vitro" (extensão de degradação) dos parâmetros acima, utilizaram-se as seguintes fórmulas:

$$\text{dig (MS)} = \frac{\text{MS da amostra} - (\text{MS do resíduo} - \text{MS do blank})}{\text{MS da amostra}} \cdot 100$$

$$\text{dig (MO)} = \frac{\text{MO da amostra} - (\text{MO do resíduo} - \text{MO do blank})}{\text{MO da amostra}} \cdot 100$$

onde:

. dig = digestibilidade

. MS = matéria seca

. MO = matéria orgânica

### 3.5.2. digestibilidade "in vitro" da celulose e parede celular (48 horas de fermentação)-

Para os cálculos dos coeficientes de digestibilidade "in vitro" (extensão de degradação) dos parâmetros acima, utilizaram-se as seguintes fórmulas:

$$\text{dig(FDN)} = \frac{\text{FDN da amostra} - (\text{FDN do resíduo}-\text{FDN do blank})}{\text{FDN da amostra}} \cdot 100$$

$$\text{dig(CEL)} = \frac{\text{CEL da amostra} - (\text{CEL do resíduo}-\text{CEL do blank})}{\text{CEL da amostra}} \cdot 100$$

onde:

. dig = digestibilidade

. FDN = fibra em detergente neutro=parede celular

. CEL = celulose

### 3.5.3. curvas de digestibilidade "in vitro" acumulada da celulose e da parede celular em função do período de fermentação-

Para a obtenção destas curvas utilizou-se 8 diferentes períodos de fermentação (0,6,12,18,24,30,36 e 48 horas), sendo que a digestibilidade "in vitro" de cada período foi obtida em relação ao tempo zero. Os cálculos foram os mesmos especificados no item anterior.

#### 3.5.4. taxa de digestão "in vitro" da celulose e da parede celular-

Obtidas através da utilização do modelo proposto por WALDO et alii (1972), que separa teoricamente os resíduos em duas frações: potencialmente digestíveis e indigestíveis. Através de um artifício matemático consegue-se converter a curva de desaparecimento acumulado em uma função linear, cuja declividade representa a taxa de digestão da fração potencialmente digestível. A quantidade de resíduo indigestível em 48 horas é usada como fator de correção no modelo de WALDO et alii (1972). Os valores corrigidos (resíduos potencialmente digestíveis) são obtidos através da diferença entre os resíduos e estes valores indigestíveis, em cada período de fermentação estudado.

As taxas de digestão são regressões das transformações logarítmicas naturais das porcentagens de celulose e parede celular potencialmente digestíveis, que permaneceram nos tubos de ensaio após os seguintes períodos de fermentação: 12, 18 e 24 horas. Tal procedimento teve por objetivo conseguir as taxas de digestão em um período de tempo onde a atividade microbiana do sistema "in vitro" utilizado era máxima, não havendo portanto limitação de enzimas microbianas que

da fermentação, nem limitação de substrato

### 3.6. Análise estatística

As amostras estudadas foram analisadas através da análise da variância, sendo utilizado o teste F para a verificação da significância.

A comparação entre as médias foi levada a efeito com o teste de Tukey, que permite a utilização de um único valor ( $\Delta$ ) para o estudo da significância de todas as diferenças (GOMES, 1963).

Análises de regressão polinomial foram levadas a efeito, de modo a se obter informações sobre a possível associação entre as variáveis estudadas (tempo, tratamento e blocos (repetições)). Para tanto, determinou-se a equação de regressão polinomial, sendo a significância da associação considerada ao nível de 5%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Variação dos componentes químicos

A composição química bromatológica das amostras do bagaço e do capim napier (utilizado como padrão de comparação) estão representadas no quadro N°5.

QUADRO Nº5-Composição química bromatológica das amostras do bagaço "in sapim napier.

	BIN	BAH	BAHD	N
%				
Materia seca	43.27	36.00	-----	24.10
Proteína bruta	1.58	1.61	1.25	15.68
Fibra bruta	47.36	41.34	52.89	30.54
Extrato etéreo	0.99	2.92	1.10	3.65
Materia mineral	4.58	3.59	4.60	11.85
Extrativo não nitrog.	45.57	52.61	40.38	38.28

Houve um decréscimo no teor de matéria seca do bagaço, resultante da introdução de vapor d'água ao meio no momento do tratamento. A quantidade de água adicionada fica na dependência das condições do tratamento, sendo o excesso perdido por drenagem. Nesta perda, substâncias solúveis são carregadas junto ao efluente, o que contribui para diminuir a digestibilidade do material tratado. Neste experimento o tratamento causou uma redução de 16.8% no teor de matéria seca, resultado que se encontra dentro das variações encontradas por CHEONG et alii (1974), que foi de 5-25% e por WALKER (1984), que foi de 1-20%.

O processo de auto-hidrólise triplicou os níveis do extrato etéreo em relação ao bagaço "in natura", resultado também encontrado por MARCOS et alii (1984). Este aumento também é dependente das condições do tratamento, sendo que quanto mais severas forem estas condições em termos de pressão e duração do tratamento, maiores serão as quantidades de substâncias solúveis em solvente orgânico (éter sulfúrico).

Quanto aos níveis de proteína bruta e matéria mineral, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos estudados, indicando que o processo de auto-hidrólise não modifica a quantidade destes componentes.

O tratamento com pressão e vapor determinou uma redução de 12.7% no teor de fibra bruta (47.36-41.34%), sendo que esta redução foi compensada por um aumento nos níveis de extractivos não nitrogenados da ordem de 15.4% (45.57-52.61% respectivamente). Portanto, o processo de auto-hidrólise resultou no rompimento da estrutura da parede celular do bagaço "in natura", fato comprovado pelas modificações observadas nos componentes da fração fibrosa do bagaço auto-hidrolisado, analisado pelo método proposto por GOERING & VAN SOEST, 1970. Tais modificações são apresentadas no quadro Nº6.

QUADRO Nº6-Composição da fração fibrosa das amostras do bagaço e capim trigo.

	BIN	BAH	BAHD	N
-----% M.S.-----				
F.D.N.	94.82	64.92	86.43	74.16
F.D.A.	63.39	58.65	74.47	38.96
CELULOSE	44.94	44.97	58.42	29.11
HEMICELULOSE *	31.43	6.27	11.96	35.20
LIGNINA	14.00	11.50	18.30	6.20

\* HEMICELULOSE = F.D.N. - F.D.A.

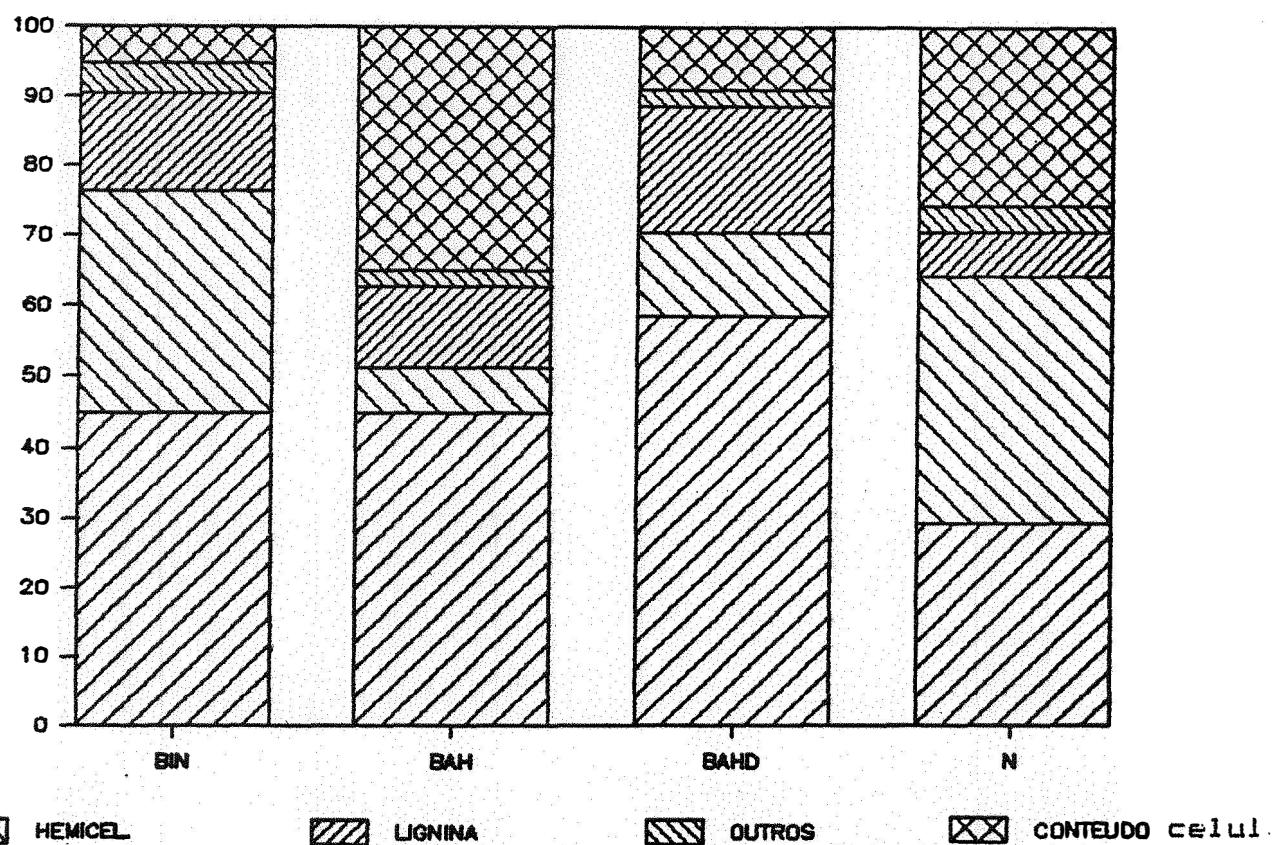
Observa-se que o tratamento utilizado (pressão de 17 kgf/cm<sup>2</sup> durante 5 minutos) causou uma redução de 31.0 % na fração fibra em detergente neutro (F.D.N.), 7.4 % na fração fibra em detergente ácido (F.D.A.), 80.0 % na

fração hemicelulose é 17.0 % na fração lignina. O teor de celulose manteve-se praticamente inalterado. Tais modificações podem ser melhor observadas na figura N°4.

A redução observada na fração F.D.N. é explicada pela quase que completa hidrólise da hemicelulose do bagaço "in natura", resultado da solubilização deste polissacarídio estrutural até seus açúcares formadores (CAMPBELL et alii, 1973; RANGNEKAR et alii, 1982; PATE, 1982; MARCOS et alii, 1984). A intensidade desta solubilização é maior quando o material é tratado mais severamente, isto é, sob condições de alta pressão e/ou maior tempo de tratamento (WALKER, 1984).

FIGURA N°4-Composição da matéria seca das amostras do bagaço e do capim Napier.

### COMPOSICAO DAS AMOSTRAS (%)



A solubilização observada em parte da lignina do bagaço auto-hidrolisado pode ser a explicação para a redução encontrada no teor de F.D.A. desta amostra, mostrando que possivelmente a lignina do bagaço tenha uma constituição química que seja possível de ser parcialmente hidrolisada pelo tratamento com pressão e vapor.

No quadro N°7 estão representados os resultados das análises de carboidratos solúveis totais e compostos fenólicos.

QUADRO N°7-Carboidratos solúveis e compostos fenólicos das amostras de bagaço e capim napier.

	padrão glicose	xilose	compostos fenólicos
% M.S.			
B.I.N.	0.84	0.35	0.40
B.A.H.	18.90	6.42	7.20
B.A.H.D.	7.56	2.60	0.80
N.	4.39	1.55	—

Notar-se que o bagaço auto-hidrolisado apresentou maior concentração de carboidratos solúveis que o bagaço "in natura" (cerca de 20 vezes), o que confirma que estes açúcares simples são resultantes da solubilização da hemicelulose. A concentração de carboidratos solúveis encontrada na amostra do capim napier foi cerca de 4 vezes menor que em relação ao bagaço auto-hidrolisado. A amostra de bagaço auto-hidrolisado desengordurado apresentou uma concentração intermediária de carboidratos solúveis quando

comparada com as outras duas amostras de bagaço (B.I.N. e B.A.H.). Tal fato pode ser explicado pela extração destes açúcares solúveis durante o desengorduramento com metanol 80 %, visto que as substâncias solúveis em água (inclusive os açúcares simples) também foram extraídos durante tal processo.

Quanto aos níveis dos compostos fenólicos, nota-se que o tratamento com pressão e vapor determinou um aumento de cerca de 18 vezes em relação a concentração encontrada para a amostra de bagaço "in natura" (0.40-7.20 %), resultado que confirma os dados apresentados por CAMPBELL et alii (1973). Estes autores trabalharam com bagaço de cana auto-hidrolisado (pressão de 28.1 kgf/cm<sup>2</sup> durante 45 segundos) e observaram um aumento de 12 vezes na concentração de fenóis, que são formados provavelmente à partir da ruptura das ligações químicas existentes entre a lignina e a hemicelulose e/ou entre as unidades formadoras da lignina (moléculas de fenilpropeno). Também HART et alii (1980) e WALKER (1984) confirmaram tais modificações, sendo que estes trabalhos foram realizados com a utilização de diferentes condições de tratamento. Segundo estes autores, a intensidade de formação dos compostos fenólicos é dependente das condições empregadas em termos de pressão e tempo de tratamento, sendo maiores quanto mais severas forem estas condições.

A extração realizada no bagaço auto-hidrolisado com uma solução de metanol 80 % (objetivando remover as substâncias que poderiam inibir a digestão "in vitro" da celulose) determinou importantes modificações na constituição

química do material), conforme mostraram os quadros anteriores. A extração (desengorduramento) reduziu drasticamente os níveis de compostos fenólicos do bagaço auto-hidrolisado (7.20-0.80 %). Entretanto também foram extraídas diversas substâncias solúveis em solução de metanol 80 %, fato comprovado pela redução de 23.2 % no teor de extractivos não nitrogenados. Isto acarretou num aumento proporcional da fração fibrosa, como pode ser observado na constituição química da amostra do bagaço auto-hidrolisado desengordurado.

#### 4.2 Digestibilidade (extensão de degradação) "in vitro"

No quadro N°8 encontram-se os resultados da digestibilidade "in vitro" da matéria seca (1 e 2 estágios), matéria orgânica (1 e 2 estágios), parede celular (P.C.) e celulose (CEL.). Também estão presentes os contrastes entre as médias dos tratamentos, estabelecidos pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

**QUADRO N°8-Digestibilidade "in vitro" da matéria seca (M.S.), matéria orgânica (M.O.), celulose (CEL.) e parede celular (P.C.) das amostras do bagaço e capim napier.**

	DIVMS	DIVMS	DIVMO	DIVMO	DIVCEL	DIVPC
	(1)	(2)	(1)	(2)		
B.I.N.	32.58	34.96	37.68	39.97	35.28	35.83
B.A.H.	a	b	a	b	a	b
	51.49	54.59	54.80	58.32	52.09	44.05
B.A.H.D.	b	c	b	c	a	b
	42.63	46.25	47.55	51.23	57.50	45.69
N.	a	a	a	a	a	a
	54.02	61.51	56.46	64.56	60.96	62.34

medias de uma mesma coluna, seguidas por letras distintas, diferem entre si ao nível de 5%  
DIVMS(1) - digestibilidade aparente "in vitro" da M.S. (48 horas de fermentação)  
DIVMS(2) - digestibilidade aparente "in vitro" da M.S. (48 horas de fermentação + 48 horas com pepsina ácida)  
DIVMO(1) - digestibilidade aparente "in vitro" da M.O. (48 horas de fermentação)  
DIVMO(2) - digestibilidade aparente "in vitro" da M.O. (48 horas de fermentação + 48 horas com pepsina ácida)  
DIVCEL - digestibilidade aparente "in vitro" da celulose  
DIVPCD - digestibilidade aparente "in vitro" da parede celular (T.C.N.)

#### 4.2.3. digestibilidade "in vitro" da matéria seca DIVMS e matéria orgânica (DIVMO).

Comparando-se os resultados da DIVMS (1 e 2 estágios) e DIVMO (1 e 2 estágios) para cada amostra estudada, observa-se que a utilização da técnica "in vitro" com 2 estágios não é justificada, visto a proximidade dos valores obtidos. A única exceção é o trigo, que por apresentar elevado teor proteíco, sobre a ação da pepsina de forma mais acentuada, a ponto de ser detectada diferença quanto ao procedimento utilizado.

Com relação aos efeitos dos tratamentos (auto-hidrólise e desengorduramento do bagaço auto-hidrolisado), observa-se que tais procedimentos promoveram importantes modificações nas digestibilidades "in vitro" da M.S. e M.O.. O processo de auto-hidrólise determinou um aumento significativo ( $P<0.05$ ) de 58% na DIVMS (32.58-51.49%) em relação ao bagaço "in natura", fato que pode ser explicado pelo aumento da concentração de compostos solúveis (decorrentes da solubilização da hemicelulose) e pelo rompimento e afrouxamento da estrutura da fração fibrosa do bagaço (decorrente da hidrólise suíça da hemicelulose e da rápida descompressão que se processa

ao final do processo (MACHADO, 1982)). Este rompimento e afrouxamento da estrutura da fração fibrosa permite um aumento da superfície de exposição desta fração ao ataque dos microrganismos ruminais, o que contribui para aumentar a digestibilidade do bagaço. As modificações decorrentes do processo de auto-hidrólise conferem ao bagaço uma DIVMS próxima a do napier.

A amostra de bagaço auto-hidrolisado desengordurado apresentou valores intermediários de DIVMS e DIVMO, quando comparada com as amostras de bagaço "in natura" e bagaço auto-hidrolisado. O valor significativamente superior ( $P<0.05$ ) em relação ao bagaço "in natura" pode ser explicado pelo rompimento e afrouxamento da fração fibrosa durante o tratamento com pressão e vapor, ao passo que o valor significativamente inferior ( $P<0.05$ ) em relação ao bagaço auto-hidrolisado pode ter sido devido à remoção de compostos solúveis promovida durante a extração com metanol 80% (desengorduramento).

#### 4.2.2. digestibilidade "in vitro" da celulose (DIVCEL) e da parede celular (DIVPC)

O processo de auto-hidrólise determinou um significativo aumento ( $P<0.05$ ) de 45% na DIVCEL do bagaço "in natura" (35.28-52.09%), o que comprova que a modificação causada na estrutura física da fração fibrosa tornou a celulose mais acessível ao ataque dos microrganismos.

O desengorduramento da amostra do bagaço auto-hidrolisado não modificou estatisticamente ( $P<0.05$ ) sua DIVCEL em relação a amostra não desengordurada (52.09-57.5% respectivamente). Portanto, a extração dos compostos fenólicos

feita via desengorduramento) não removeu um possível efeito inibidor de crescimento que estas substâncias costumam apresentar para bactérias em geral.

O processo de auto-hidrólise determinou um significativo aumento ( $P<0.05$ ) de 23% na DIVPC do bagaço "in natura" (35,83-44,05%). Tal fato vem reforçar os efeitos das importantes modificações promovidas pelo tratamento com pressão de vapor na estrutura química e física da fração fibrosa do bagaço, tendo em vista que a parede celular do bagaço "in natura" é composta de celulose, hemicelulose e lignina, enquanto que a parede celular do bagaço auto-hidrolisado é composta somente por celulose e lignina.

4 exemplo da DIVCEL, o desengorduramento não modificou significativamente ( $P<0.05$ ) a DIVPC desta amostra em relação ao bagaço auto-hidrolisado (45,69-44,05% respectivamente) possivelmente pelos mesmos motivos expostos anteriormente.

#### 4.3. Digestibilidade "in vitro" acumulada em função do tempo de fermentação

##### 4.3.1. digestibilidade "in vitro" acumulada da celulose (DIVCEL)

No quadro N°9 encontram-se os resultados médios das DIVCEL acumuladas em função do tempo de fermentação, bem como os contrastes entre as médias dos tratamentos, estabelecidas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A partir destes valores obtiveram-se

as curvas da digestibilidade "in vitro" da celulose acumulada em função do tempo de fermentação, que podem ser observadas no gráfico N° 7.

QUADRO N°9-Digestibilidade "in vitro" da celulose acumulada em função do tempo de fermentação, das amostras do bagaço e capim napier.

	DIVCEL (%)							
	tempo de fermentação							
	0	12	18	24	30	36	48	
B.I.N.	1.73 A**	11.56 B	22.56 C	26.83 CD	31.96 DE	33.70 DE	35.86 E	
B.A.H.	1.60 A	12.06 B	25.16 C	38.40 D	45.06 DE	48.70 E	52.03 E	
B.A.H.D.	1.90 A	12.00 B	28.03 C	39.96 D	48.66 E	53.73 EF	57.46 F	
N.	3.13 A	21.13 B	34.80 C	46.53 D	53.03 DE	57.03 EF	60.93 F	
CEL.pura	1.96 A	08.93 A	28.10 B	49.86 C	66.96 D	77.10 E	91.30 F	

Médias de uma mesma coluna, seguidas por letras distintas, diferem entre si ao nível de 5%.

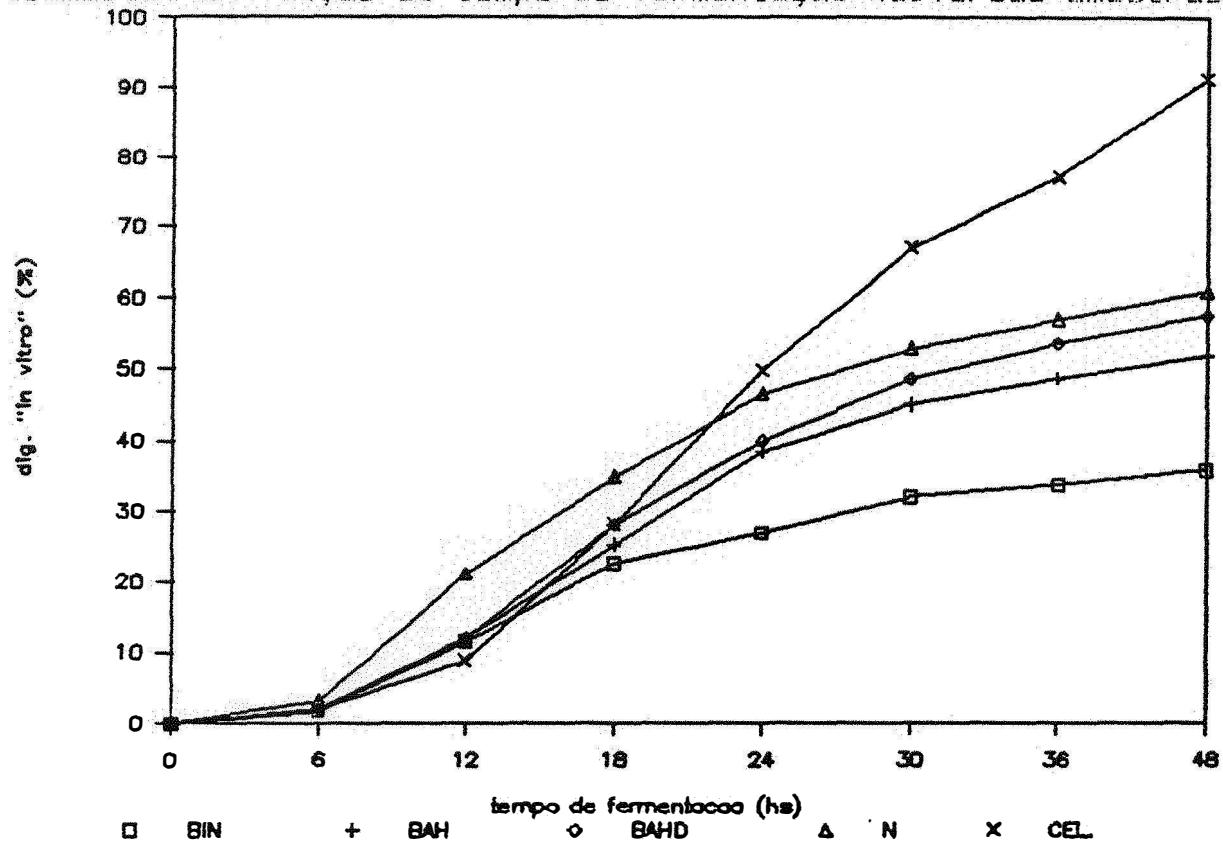
\* efeito do tratamento em cada período de fermentação (letras minúsculas).

\*\* efeito do período de fermentação em cada tratamento (letras maiúsculas).

Considerando-se que o objetivo principal dos ensaios preliminares tenha sido alcançado, ou seja, fornecer condições para a manifestação da máxima atividade microbiana em ensaios "in vitro" que utilizam como substrato um sub-produto fibroso, percebe-se que o tratamento com pressão e

vapor realmente interfere na taxa da digestão do referido substrato, que ainda é pouco estudado em termos de cinética da fermentação ruminal "in vitro".

GRAFICO N°7-Curvas das digestibilidades "in vitro" da celulose acumulada em função do tempo de fermentação (diversas amostras).



Com relação ao efeito dos tratamentos em cada período de fermentação, os contrastes mostram que até 18 horas de fermentação não ocorreram diferenças significativas ( $P<0.05$ ) entre os valores de DIVCEL relativos às 3 amostras do bagaço, que apresentaram o mesmo comportamento da amostra de celulose de algodão puro. O napier entretanto, apresentou neste mesmo período, valores significativamente superiores ( $P<0.05$ ). Tal fato indica que o tempo requerido para a

Fixação das bactérias celulolíticas ao substrato (lag time) em celulose (napier) é menor. Este comportamento era esperado, tendo em vista entre outros motivos, o menor teor de lignina do napier. Este componente da parede celular funciona como um agente cimentante, incrustando-se aos demais componentes e agindo como uma barreira física que dificulta o contacto entre estes componentes e os microrganismos ruminais. A amostra de celulose pura, embora absolutamente livre de lignina, não apresentou digestibilidade superior ao napier até que se atingisse 18-24 horas de fermentação, sendo que tal comportamento também foi observado por JOHNSON (1966).

Decorridas as primeiras 18 horas de fermentação, observa-se uma mudança de comportamento da taxa de fermentação da celulose das amostras do bagaço, visto que começa a haver maior velocidade de degradação das amostras submetidas ao tratamento com pressão e vapor. Este fato fica caracterizado pelos valores de DIVCEL significativamente superiores ( $P<0.05$ ) para os bagaços auto-hidrolisado e auto-hidrolisado desengordurado, o que confirma que as modificações promovidas na estrutura da fração fibrosa realmente tornaram a celulose mais suscetível ao ataque dos microrganismos, porém estes só começaram a se beneficiar destas modificações após decorridas pelo menos 18 horas de fermentação.

A remoção dos compostos fenólicos aparentemente não trouxe benefício a atividade microbiana dos ensaios "in vitro" que continham amostras do bagaço auto-hidrolisado desengordurado, visto que não houveram diferenças

significativas ( $P<0.05$ ) entre os valores de DIVCEL encontrados nos diferentes períodos de fermentação, quando se compararam os resultados do bagaço auto-hidrolisado e auto-hidrolisado desengordurado. Aparentemente, os compostos fenólicos não influenciaram a atividade microbiana a ponto de serem perceptíveis nos ensaios "in vitro" de digestão da celulose.

Com relação ao efeito dos períodos de fermentação sobre a DIVCEL de cada tratamento estudado, nota-se que os valores da amostra de bagaço "in natura" não apresentaram diferenças significativas ( $P<0.05$ ) entre as quantidades de celulose digeridas entre 18 e 24 horas de fermentação (22.56-26.83% respectivamente). Isto não ocorreu com a amostra de bagaço auto-hidrolisado, que apresentou quantidade significativamente superior ( $P<0.05$ ) de celulose sendo digerida entre estes dois períodos (25.16-38.40% respectivamente), caracterizando realmente uma atividade microbiana mais intensa após 18 horas de fermentação.

Através de regressão polinomial entre tempo de fermentação (X) e digestibilidade "in vitro" da celulose (Y), obtiveram-se as equações que melhor representavam o fenômeno, sendo para todos os tratamentos encontrada uma equação de regressão quadrática. A única exceção foi a amostra de celulose de algodão puro, que apresentou uma equação de regressão cúbica. As referidas equações são apresentadas a seguir:

$$\text{B.I.N.} \quad Y = -0,02513.X^2 + 2,15039.X - 9,95551$$

$$\text{B.A.H.} \quad Y = -0,03299.X^2 + 3,03050.X - 17,17121$$

B.A.H.D.  $Y = -0,03372 \cdot X^2 + 3,20890 \cdot X - 18,34394$

N.  $Y = -0,04015 \cdot X^2 + 3,51065 \cdot X - 15,74077$

CEL/pura  $Y = -0,00210 \cdot X^3 + 0,13869 \cdot X^2 - 0,04473 \cdot X - 7,87100$

#### 4.3.2. Digestibilidade "in vitro" acumulada da parede celular (DIVPC)

No quadro N°10 encontram-se os resultados médios das DIVPC acumuladas em função do tempo de fermentação, bem como os contrastes entre as médias dos tratamentos, estabelecidas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A partir destes resultados traçaram-se as curvas da digestibilidade "in vitro" da parede celular acumulada em função do tempo de fermentação, que podem ser observadas pelo gráfico N°8.

Com relação ao efeito dos tratamentos em cada período de fermentação, os contrastes mostram que o processo de auto-hidrólise modifica a taxa da DIVPC do bagaço "in natura", visto que aconteceram importantes modificações na composição da parede celular dos bagaços, conforme mostra o quadro N°11, que apresenta a composição inicial e residual (ao final das 48 hs de fermentação) da parede celular das amostras estudadas.

SUADRO Nº10-Digestibilidade "in vitro" da parede celular cumulada em função do tempo de fermentação, das amostras do esgoto e capim napier.

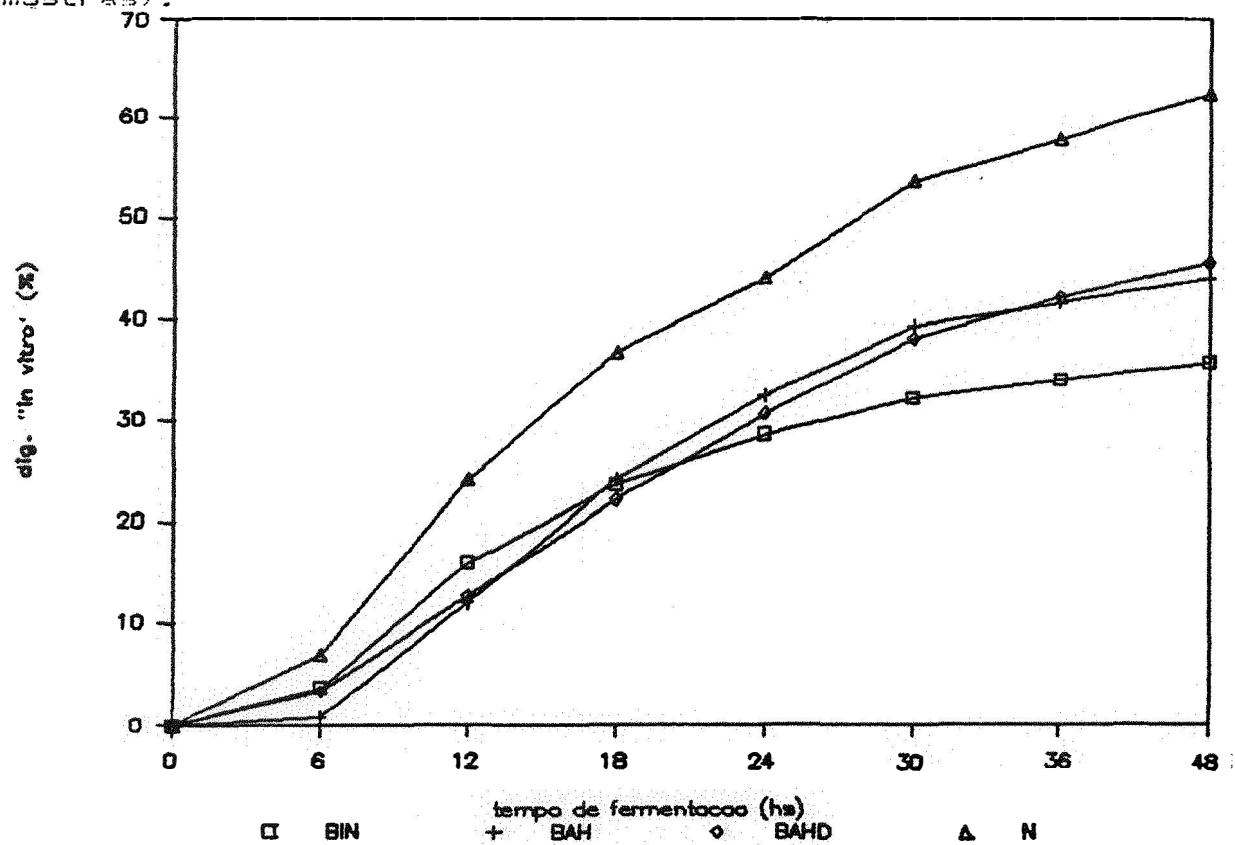
	DIVPC (%)							
	tempo de fermentação (hs)							
	6	12	18	24	30	36	48	
B...N.	ab*	b	b	b	c	c	c	
	3.70	16.03	23.60	28.53	32.10	33.96	35.80	
	A**	B	C	D	DE	E	E	
B.A.H.	b	c	b	b	b	b	b	
	0.80	12.06	24.16	32.33	39.33	41.66	44.00	
	A	B	C	D	E	EF	F	
B.A.H.D.	ab	bc	b	b	b	b	b	
	3.40	12.76	22.13	30.53	38.10	42.10	45.63	
	A	B	C	D	E	EF	F	
N.	a	a	a	a	a	a	a	
	7.00	24.10	36.76	44.06	53.60	57.90	62.33	
	A	B	C	D	E	EF	F	

Médias de uma mesma coluna, seguidas por letras distintas, diferem entre si ao nível de 5%.

efeito do tratamento em cada período de fermentação (letras minúsculas).

\*\* efeito do período de fermentação em cada tratamento (letras maiúsculas).

GRAFICO N°8-Curvas da digestibilidade "in vitro" da parede celular acumulada em função do tempo de fermentação (diversas amostras).



A partir destes resultados foram calculadas as seguintes relações entre lignina/celulose (L/C) e lignina/hemicelulose (L/H), que estão representadas no quadro N°12.

QUADRO N°11-Composição inicial e residual (após 48 hs de fermentação) da parede celular das amostras do bagaço e capim napier.

	inicial			residual		
	C	H	L*	C	H	L
B.I.N.	49.7	34.8	15.5	49.7	26.2	24.1
B.A.H.	71.7	10.0	18.3	61.4	05.8	32.8
B.A.H.D.	65.9	13.5	20.6	51.5	10.5	38.0
N.	41.3	49.9	08.8	42.8	33.8	23.4

\* considerando que toda lignina inicial permaneceu indigestível

QUADRO N°12-Relações entre lignina/celulose e lignina/hemicelulose inicial e residual da parede celular das amostras do bagaço e capim napier.

	L/C . 100		L/H . 100	
	inicial	residual	inicial	residual
B.I.N.	31.2	48.5	44.5	91.9
B.A.H.	25.5	53.4	183.0	565.5
B.A.H.D.	31.2	73.7	152.6	362.0
N.	21.3	54.6	17.6	69.2

Estas modificações são as responsáveis pelas diferenças encontradas nas quantidades de parede celular digeridas após os diferentes períodos de fermentação, como fica evidenciado após as 6 primeiras horas. Embora os contrastes não mostrem diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) houve neste período uma menor digestão da parede celular do bagaço auto-hidrolisado, que talvez pudesse ser detectada ao nível de 10%.

A maior digestibilidade inicial da parede celular do bagaço "in natura" deve ser decorrente da sua maior quantidade inicial de hemicelulose, visto que entre os polissacarídeos estruturais (celulose e hemicelulose) que compõem a parede celular, é a hemicelulose que apresenta mais fácil digestão (VAN SOEST, 1982). Esta hipótese é reforçada pelos resultados obtidos nos ensaios de digestibilidade "in vitro" da celulose (DIVCEL), que conforme foi discutido anteriormente, não

apresentaram diferenças significativas ( $P<0.05$ ) entre as quantidades digeridas nas 6 primeiras horas de fermentação.

O desengorduramento da amostra do bagaço auto-hidrolisado modificou a composição da sua parede celular, devendo ser portanto o responsável pelo aumento da DIVPC obtida após 6 horas de fermentação (0.80-3.40%), embora esta diferença não tenha sido detectada a nível de 5% de probabilidade. A maior concentração de carboidratos solúveis na amostra de bagaço auto-hidrolisado deve ser a responsável pela menor atividade inicial dos microrganismos celulolíticos, visto que quando estas substâncias foram extraídas (desengorduramento) estes apresentaram uma maior atividade, caracterizando um menor "lag fase".

Decorridas as primeiras 18 horas de fermentação, as 3 amostras de bagaço estudadas não apresentaram mais diferenças significativas ( $P<0.05$ ) entre os valores de DIVPC obtidos neste período, fato que não se modificou até que se atingisse 24 horas de fermentação. A partir de então, as amostras do bagaço auto-hidrolisado e auto-hidrolisado desengordurado começaram a apresentar valores de DIVPC significativamente superiores ( $P<0.05$ ) ao bagaço "in natura", sem que esta situação se alterasse até o término do período de fermentação estudado. Tal comportamento já era esperado, tendo em vista as modificações ocorridas na fração fibrosa durante o tratamento com pressão e vapor, assunto já discutido anteriormente.

Nota-se também um comportamento bastante similar quanto as curvas de DIVPC acumuladas entre as amostras do bagaço auto-hidrolisado e auto-hidrolisado

desengordurado, mostrando que a extração dos compostos fenólicos (e consequente extração de compostos solúveis na solução de metanol 80%) não modificou a quantidade de parede celular a ser degradada.

Com relação ao efeito dos períodos de fermentação sobre a DIVPC de cada tratamento, nota-se que no caso do bagaço "in natura" a quantidade acumulada de parede celular digerida entre 24 e 30 horas não é significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) em relação ao total digerido em 48 horas. No caso dos bagaços auto-hidrolisados tais quantidades são significativamente diferentes, reforçando a idéia de que as principais diferenças a nível de degradação da parede celular do bagaço auto-hidrolisado se processam após decorridas pelo menos 18-24 horas de fermentação ruminal "in vitro".

Através de regressão polinomial entre tempo de fermentação (X) e digestibilidade "in vitro" da parede celular (Y), obtiveram-se as equações que melhor representavam o fenômeno. Todos os tratamentos estudados apresentaram uma curva de digestibilidade "in vitro" em função do tempo de fermentação que pode ser representada por uma equação de regressão quadrática.

As referidas equações são apresentadas a seguir:

$$\text{B.I.N. } Y = -0,02435 \cdot X^2 + 2,02821 \cdot X - 6,18319$$

$$\text{B.A.H. } Y = -0,03073 \cdot X^2 + 2,69734 \cdot X - 14,78292$$

$$\text{B.A.H.D. } Y = -0,02235 \cdot X^2 + 2,24404 \cdot X - 10,15110$$

$$N. \quad Y = -0,03330.X^2 + 3,08243.X - 9,24683$$

#### 4.4. Taxa de digestão "in vitro"

Obtidas considerando-se as porcentagens (celulose e parede celular) potencialmente digestíveis presentes entre 12-24 horas de fermentação. Nestes cálculos considerou-se que o resíduo remanescente após 48 hs de fermentação era indigerível (1).

Para efeito de comparação, também foram calculadas as taxas usando-se o resíduo remanescente após 30 hs de fermentação como indigerível (2).

##### 4.4.1. Taxa de digestão "in vitro" da celulose

No quadro N°13 encontram-se os resultados médios destas taxas(1), onde nota-se que não houve diferença significativa ( $P<0.05$ ) entre os tratamentos estudados, fato que pode ser creditado ao elevado coeficiente de variação (21,03%).

As taxas de digestão obtidas referem-se as quantidades de substrato que podem ser digeridas "in vitro" por unidade de tempo, sendo que a velocidade de digestão é dependente da composição do substrato utilizado. Estas taxas foram obtidas a partir das digestibilidades "in vitro" acumuladas em função do período de fermentação, mais especificamente entre 12 e 24 horas, período em que há máxima atividade microbiana, pois não há nem a limitação de enzimas microbianas que caracterizam o início da fermentação (lag fase)

nem há a falta de substrato que caracteriza o final. Estas taxas são relativas às frações potencialmente digestíveis, sendo portanto constantes. Os resultados obtidos estão dentro da faixa obtida por GILL et alii (1969), que trabalhando com alfafa, timothy e bromegrass encontraram taxas variando entre 6.0-11.1% / h.

QUADRO Nº13-Taxa de digestão "in vitro" da celulose das amostras do bagaço e capim napier.

B.I.N.	3	taxa de digestão da celulose (%/h)	
		(1)*	(2)**
B.A.H.	3	8.27 <sup>a</sup>	11.54 <sup>a</sup>
B.A.H.D.	3	8.43 <sup>a</sup>	12.32 <sup>a</sup>
N.	3	8.29 <sup>a</sup>	11.97 <sup>a</sup>
CEL.pura	3	8.68 <sup>a</sup>	13.39 <sup>a</sup>
		5.93 <sup>a</sup>	9.95 <sup>a</sup>

médias de uma mesma coluna, seguidas por letras distintas, diferem entre si ao nível de 5%.

\* considerando-se indigerível resíduo obtido após 48 hs de fermentação.

\*\* considerando-se indigerível resíduo obtido após 30 hs de fermentação.

Notase que o processo de auto-hidrólise e o desengorduramento do bagaço auto-hidrolisado não modificaram a taxa de digestão "in vitro" da celulose potencialmente digestível em relação ao bagaço "in natura". Entretanto, como as amostras do bagaço têm quantidades diferentes

de celulose potencialmente digestíveis, tem-se quantidades diferentes de celulose sendo digeridas em função do tempo de fermentação, porém com a mesma velocidade relativa.

#### 4.4.2. Taxa de digestão "in vitro" da parede celular

No quadro N°14 encontram-se os resultados médios destas taxas, bem como a extensão de digestão.

QUADRO N°14-Taxa de digestão "in vitro" da parede celular das amostras do bagaço e capim napier.

taxa de digestão da parede celular (%/h)			
		(1)*	(2)**
B.I.N.	3	8.46 a*	13.25 a
B.A.H.	3	8.37 a	10.04 a
B.A.H.D.	3	6.46 b	10.06 a
N.	3	6.22 b	9.34 a

médias de uma mesma coluna, seguidas por letras distintas, diferem entre si ao nível de 5%

\* considerando-se indigerível resíduo obtido após 48 hs de fermentação.

\*\* considerando-se indigerível resíduo obtido após 30 hs de fermentação.

Nota-se que os bagaços "in natura" e auto-hidrolisado apresentam valores significativamente superiores ( $P<0.05$ ) aos relativos ao bagaço auto-hidrolisado desengordurado e napier - quando considera-se indigerível o resíduo obtido após 48 hs de fermentação - embora tenha sido encontrada uma grande variação entre as repetições de todos os tratamentos, fato também constatado por SMITH et alii (1970) trabalhando com alfafa e

orchardey-ess. Entretanto, de acordo com as médias das taxas obtidas, o processo de auto-hidrólise não modifica a taxa de digestão "in vitro" da parede celular do bagaço, mas modifica evidentemente sua extensão de digestão. Portanto, maior quantidade de parede celular é degradada pelos microrganismos ruminais num intervalo de 48 horas, porém com a mesma velocidade de digestão.

Por outro lado o desengorduramento não modifica a extensão de digestão "in vitro" da parede celular do bagaço auto-hidrolisado, mas modifica a sua taxa de digestão (considerando-se indigerível resíduo obtido após 48 hs de fermentação). Esta começa a se processar mais lentamente. Provavelmente a extração quase completa dos compostos solúveis teria de alguma forma determinado uma menor atividade da populaçāo micobiana envolvida na digestão da parede celular, visto que há uma grande interrelação entre as bactérias envolvidas no processo de fermentação ruminal.

Entretanto quando considerou-se como indigerível o resíduo obtido após 30 horas de fermentação, não houveram diferenças significativas entre os valores de taxa de digestão da parede celular para os diversos tratamentos.

## 5. CONCLUSÕES

Nas condições em que este trabalho foi realizado, e tendo-se em conta os resultados obtidos, podem ser estabelecidas as seguintes conclusões:

- i. O tratamento com pressão e vapor determinou substanciais modificações na composição química do bagaço "in

naturais", nas quais se destacam redução de 16.8% na matéria seca e 12.7% da fibra bruta, com consequente aumento de 15.4% nos níveis dos extensivos não nitrogenados.

2. Houve um rompimento da estrutura da fração fibrosa do bagaço "in natura", evidenciado pela redução de 31% nos níveis da fração fibra em detergente neutro (FDN) e solubilização de 39% da hemicelulose inicial até seus açúcares formadores.

3. O tratamento com pressão e vapor determinou um aumento, de 18 vezes, na concentração inicial de compostos fenólicos do bagaço "in natura". A remoção destas substâncias através do desengorduramento da amostra do bagaço auto-hidrolisado extraiu também outros compostos solúveis em metanol 20% (inclusive compostos solúveis em água), fato que determinou um aumento proporcional da fração fibrosa desta amostra.

4. O tratamento com pressão e vapor determinou (em relação ao bagaço "in natura") um aumento de 58% na digestibilidade "in vitro" da matéria seca, 45% na digestibilidade "in vitro" da celulose e 23% na digestibilidade "in vitro" da parede celular.

5. O tratamento com pressão e vapor modificou a cinética da fermentação ruminal "in vitro" da celulose e da parede celular do bagaço "in natura" após 18 horas de fermentação, quando se observa um aumento na velocidade de degradação do bagaço auto-hidrolisado em relação ao "in natura".

6. A exemplo de outros trabalhos publicados sobre cinética da fermentação, foi encontrada uma grande variação entre as respetivas das taxas de digestão "in vitro" da celulose e da parede celular.

## 6. LITERATURA CITADA

AIDAR Bagaço de cana. Uma fonte de energia e alimento.

Revista do Alcohol. março-abril, ano 4, n° 28. 1985.

ANDERSON, R.; CHENG, E.; BURROUGHS, W. A laboratory technique for measuring phosphorus availability of feed supplements fed to ruminants. J. Animal Science. 15:489. 1956.

A.O.A.C. Official Methods of Analysis. Association of Official Agricultural Chemists. Tenth edition. Washington, D.C., 1965.

BARNES, R.F. Use of "in vitro" rumen fermentation technique for estimating forage digestibility and intake. Agron. Journal. 57:213. 1965.

BURGI R. Produção do bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum sp. L.*) auto-hidrolisado e a avaliação do seu valor nutritivo para ruminantes. Piracicaba, 1985. 61p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

CAMPBELL, C.M.; WAYMAN, O.; STANLEY, R.W.; KARMSTRA, L.D.; OLBRISH, S.E.; HO-A, E.B.; NAKAYAMA, T.; KOHLER, G.O.; WALKER, H.G.; GRAHAM, R. Effects of pressure treatment sugar cane bagasse upon nutrient utilization. Proc. Western Sect. Am. Soc. Animal Science. 24: 178-184. 1973.

CHEONG, Y.W.Y.; D' ESPAIGNET, J.T.; DEVILLE, P.J.; SANSONCY, R. ; PRESTON, T.R. Effect of steam treatment on cane bagasse in relation to its digestibility and furfural production.

International Soc. Sugarcane Techn. Proc. XV Congress. 3: 1887-1894. 1974.

CHURCH, D.C. & PETERSEN, R.G. Effect of several variables "in vitro" rumen fermentation. J. of Dairy Science. 43(81). 1960.

CRAMPTON, E.W. & MAYNARD, L.A. The relation of cellulose and lignin content to the nutritive value for animal feeds. J. Nut. 15: 383-395. 1938.

CRAMPTON, E.W.; DONEFER, E.; LLOYD, L.E. A nutritive value index for forages. J. Animal Science. 19: 538. 1960.

DAVIDSON, P.M. & BRANDEN, A.L. Antimicrobial activity of non-halogenated phenolic compounds. Journal of Food Protection. Vol. 44, August. 1981.

DONEFER, E.; CRAMPTON, E.W.; LLOYD, L.E. Prediction of the nutritive value index of a forage from "in vitro" rumen fermentation data. J. Animal Science. 19: 545. 1960.

DONEFER, E.; PATHIRANA, K.K. Composition and digestibility of untreated and treated bagasse samples. Proc. Primera Reunión Internacional sobre la Utilización de la Caña de Azúcar en Alimentación Animal. Veracruz, México. 1976.

DUBOIS, M.; GILES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. ; SMITH, F. Tolorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350. 1956.

ELLIOTT, S.B.; CONRAD, H.R. ; HIBBS, J.W. Relative of "in vitro"

cellulose disappearance as a possible estimator of digestible dry matter intake. J. Dairy Science. Vol. 52. N. 10. 1687-1690. 1969.

DOERING, H.K. & VAN SOEST, P.J. Forage fiber analyses (Apparatus, reagents, procedures and some applications). Washington, D.C. Agric. Res. Research Service, USDA. 19p. Agriculture Handbook, n 579. 1970.

FERREIRA, F.P. Curso de Estatística Experimental. II edição. Ed. da Sociedade Brasileira de Estatística. 466p. 1985.

HOESSEL, G.B.J. Ruptura da lignina da palha através de tratamento com uma solução de uréia. Holanda, Bureau de Agronomia e Indústria Holandesa de Adubos. Relatório n 17. 68p. 1982.

HILL, J.W.; BAXTER, H.D.; HOBBS, C.S. Effect of phosphorus in different chemical forms on "in vitro" cellulose digestion by rumen microorganisms. J. Animal Science. 20: 817. 1961.

HORN, M.R.; WALKER, H.G.; GRAHAM, R.P.; HANNI, P.J.; BROWN, A.H. KOMLEK, G.O. Steam treatment of residues for increased ruminant digestibility. I. Effects of Process Parameters. Journal of Animal Science. Albany, N.Y. 51(2): 402-408. 1981.

HUNNATE, R.E. The Rumen and its Microbes. Academic Press. New York. 572p. 1966.

JACKSON, M.G. Review Article: The alkali treatment of straws. Animal Feed Science and Technology, (2). 106-130. 1977.

JOHNSON, R.R. Symposium on microbial digestion in ruminants: "in vitro" rumen fermentation techniques. J. Animal Science. 22: 792-

800. 1963.

JOHNSON, R.R. Techniques and procedures for "in vitro" and "in vivo" rumen studies. *J. Animal Science*. 25: 855-875. 1966.

JUNG, H.G. & FAHEY, G.C. Nutritional implications of phenolic monomers and lignin: a review. *J. of Animal Science*, Albany, N.Y. 57(1). 1983.

JUNG, H.G. & FAHEY, G.C. Influence of phenolic acids on forage structural carbohydrate digestion. *Can. J. Animal Science*. 64 (Suppl.). 1984.

KOSSILA, V.L. Location and potential feed use. In: SUNDSTOL, L. & OWEN, E. Straw and Other Fibrous By-products as Feed. New York, Elsevier Science Publishing Company Inc. 603p. 1984.

LECHTERBERG, V.L.; COLENBRANDER, V.F.; BAUMAN, C.H. ; RHYKED, C.L. Effect of lignin on rate of "in vitro" cell wall and cellulose disappearance in corn. *J. of Animal Science*, vol. 39, n 6 . 1165-1169. 1974.

MACHADO, O.L.T. Descompressão rápida como pré-tratamento de madeira para hidrólise enzimática. Rio de Janeiro. 1982. U.F.R.J./Instituto de Química. 80p. (Tese de Mestrado).

MARCOS, A.C.M.; LEME, P.R. ; BOIN, C. Efeito do tempo de tratamento a pressão e vapor na composição química e na digestibilidade "in vitro" da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar. *Zootecnia*. Nova Odessa, SP. 22(4): 383-395. 1984.

MAYNARD, L.A.; LOOSLI, J.K.; HINTZ, H.F.; WARNER, R.G. Os carboidratos e seu metabolismo. In: Nutrição Animal (Animal Nutrition). Trad. Antônio B. Neiva Figueiredo Filho. 3<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro. Livraria Freitas Bastos. 736p. 1984.

MCDougall, E.H. Studies on Ruminant Saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. Biochem. J. 43: 99. 1948.

PATE, F.M. Value of treating bagasse with steam under pressure for cattle feed. Tropical Agric. (Trinidad). vol.59, n. 4. October. 1982.

POUDEN, W.D. & HIBBS, J.W. The influence of the ratio of grain to hay in the ration of dairy calves on certain rumen micro-organisms. J. of Dairy Science. 31: 1051. 1948.

RANDELL, P.F. Ad libitum feeding of either a complete ration based on sugar cane bagasse or a conventional concentrates mixture to dairy cows. J. Agric. Univ. Puerto Rico. Rio Piedras, Porto Rico. 54(3): 429-443. 1970.

RANGNEKAR, D.V.; BADVE, V.C.; KHARAT, S.T.; SOBALE, B.N. ; JOSHI, A.L. Animal Feed Science and Technology. 7: 61-70. 1982.

SCHNEIDER, B.H. & FLATT, W.P. Estimating digestibilities of feed samples without animals. In: The Evaluation of Feeds through Digestibility Experiments. The University of Georgia Press. Athens. 1975.

SMITH, L.W.; GOERING, H.K.; WALDO, D.R. ; GORDON, C.H. "In vitro" digestion rate of forage cell wall components. J. of Dairy

Science. vol. 54. n 1. 71-76. 1970.

SMITH, L.W.; GOERING, H.K. & GORDON, C.H. Relationships of forage compositions with rates of cell wall digestion and indigestibility of cell walls. J. of Dairy Science, vol. 55.n 8. 1140-1143. 1972.

SUNDSTOL, F. & OWEN, E. Straw and other fibrous by-products as feed. Elsevier Science Publishing Company Inc. New York. 603p. 1984.

SWAIN, T. & HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus* Domestic. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agric. 10. January. 64-68. 1959.

TAYLOR, J.D. & ESDALE, W.J. Increased utilization of crop residue as animal feed through autohydrolysis. Ottawa. Canada. Stake Technology. 16p.s.d.

THEUNER, O. & AMAN, P. Anatomical & chemical characteristics. In: SUNDSTOL, F. & OWEN, E. Straw and other fibrous by-products as feed. Elsevier Science Publishing Company Inc. New York. 603p. 1984.

TINNINER, P. Forage Evaluation using various laboratory techniques. Phd Thesis. Michigan State University. 1974.

TRSELSEN, J.E. & CAMPBELL, J.B. Animal Prod. 10.289-296. 1968.

ULVATT, N.J. The feeding value of herbage. In: BUTLER, G.M. & BAILEY, R.W. Chemistry and Biochemistry of Herbage. Vol.3. Academic Press. London and New York. 1973.

JAN HORN, H.H.; MARSHALL, S.P.; FLOYD, G.T.; OLALOKU, E.A.; WILCOX, C.J.; WING, J.M. Complete rations for growing dairy replacements utilizing by-product feedstuffs. *J. Dairy Sci.* 63: 1465-1474. 1980.

JAN SOEST, P.J. Physico-chemical aspects of fibre digestion. In: McDONALD, I.W. & WARNER, A.C.I. *Digestion and metabolism in the ruminant. Division of Animal Physiology*. Sidney. Australia. 590p. 1975.

JAN SOEST, P.J. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Corvallis. Oregon. E.U.A. O e K Books Inc. 374p. 1982.

HALDO, D.R.; SMITH, L.W.; COX, E.L. Model of cellulose disappearance from the rumen. *J. of Dairy Science*. vol. 55. n i. 1972.

WALKER, H.G. Physical Treatment. In: SUNDSTOL, F. & OWEN, E. *Straw and other fibrous by-products as feed*. Elsevier Science Publishing Company Inc. New York. 603p. 1984.

WARNER, A.C.I. Criteria for establishing the validity of "in vitro" studies with rumen microorganisms. *J. of Dairy Science*. 31: 1051. 1948.

**7. APENDICE**

**QUADRO N°15-Resultados parciais das análises bromatológicas (Esquema Weende) das amostras do bagaço e capim napier.**

	M.S.	P.B.	F.B.	E.E.	M.M.	E.N.N.
----- % M.S. -----						
B.I.N.	43.91	1.67	47.45	0.90	4.37	45.57
	42.63	1.49	47.26	1.08	4.79	
B.A.H.	35.11	1.51	41.62	3.13	3.51	52.61
	36.90	1.72	41.07	2.71	3.67	
B.A.H.D.	-----	1.16	53.16	1.18	4.62	40.38
	-----	1.35	52.63	1.02	4.58	
N.	23.90	14.58	30.53	3.32	11.88	38.28
	24.30	16.78	30.55	3.98	11.81	

M.S.: matéria seca; P.B.: proteína bruta; F.B.: fibra bruta; E.E.: extrato etéreo; M.M.: matéria mineral; E.N.N.: extrativo não nitrogenado.

**QUADRO N°16-Resultados parciais dos componentes da fração fibrosa das amostras do bagaço e capim napier.**

	F.D.N.	F.D.A.	CEL.	HEM.	LIG.	FENOL
----- % M.S. -----						
B.I.N.	95.04	63.56	44.83	31.43	13.68	0.32
	94.60	63.23	45.05		14.31	0.47
B.A.H.	63.97	58.12	45.15	6.27	12.13	7.50
	65.87	59.18	44.80		10.87	6.90
B.A.H.D.	86.58	75.01	58.42	11.96	19.11	0.87
	86.29	73.93	58.41		17.49	0.71
N.	73.42	39.59	29.11	35.20	5.89	-----
	74.90	38.33	29.11		6.51	-----

F.D.N.: fibra em detergente neutro; F.D.A.: fibra em detergente ácido; CEL.: celulose; HEM.: hemicelulose; LIG.: lignina; FENOL: compostos fenólicos.

QUADRO N°17-Resultados parciais das digestibilidades "in vitro"  
(extensão de degradação) das amostras do bagaço e capim napier.

	DIVMS(1)	DIVMS(2)	DIVMO(1)	DIVMO(2)	DIVCEL	DIVPC
	--- % M.S. ---					
B.I.N.	31.40	32.63	35.76	37.11	35.41	37.19
	32.70	36.18	39.00	41.54	36.68	35.12
	33.66	36.07	38.30	41.28	35.42	35.48
B.A.H.	53.14	55.17	56.15	58.46	45.52	50.42
	50.02	53.32	53.53	57.88	41.97	55.56
	51.31	55.30	54.72	58.62	44.68	50.29
B.A.H.D.	42.05	45.77	47.12	49.94	46.37	60.99
	42.50	46.40	47.51	51.20	43.75	55.51
	43.34	46.58	48.02	52.56	46.97	56.02
N.	55.21	62.30	59.64	64.34	64.04	62.50
	51.88	60.24	56.24	64.22	60.43	60.11
	54.99	61.99	59.52	65.12	62.20	60.29

DIVMS(1): digest. "in vitro" da matéria seca (48 hs fermentação)

DIVMS(2): digest. "in vitro" da matéria seca (48 hs fermentação + 48 hs com pepsina ácida)

DIVMO(1): digest. "in vitro" da matéria orgânica (48 hs fermentação)

DIVMO(2): digest. "in vitro" da matéria orgânica (48 hs fermentação + 48 hs com pepsina ácida)

DIVCEL: digestibilidade "in vitro" da celulose

DIVPC: digestibilidade "in vitro" da parede celular (F.D.N.)

QUADRO Nº18-Resultados parciais das digestibilidades "in vitro" da celulose acumulada em função do tempo de fermentação das amostras do bagaço e capim napier.

	DIVCEL (%)						
	tempo de fermentação (hs)						
	6	12	18	24	30	36	48
B.I.N.	3.25*	12.51	22.16	26.96	32.97	34.32	37.19
	1.43**	11.95	21.11	27.16	32.19	33.17	35.12
	0.64***	10.37	24.58	26.53	30.93	33.74	35.48
CV (%)	75.6	9.5	7.8	1.2	3.2	1.7	3.1
B.A.H.	1.74	12.23	23.29	38.58	41.38	47.15	50.42
	0.71	11.20	25.99	38.69	48.69	52.04	55.56
	2.42	12.81	26.41	38.11	45.37	47.07	50.29
CV (%)	53.1	6.7	6.7	0.8	8.1	5.8	5.7
B.A.H.D.	3.18	10.16	25.04	36.08	44.80	51.34	60.99
	1.48	12.46	28.88	42.02	50.78	55.36	55.51
	1.29	13.58	30.38	41.96	50.58	54.69	56.02
CV (%)	52.5	14.4	9.8	8.5	6.9	4.0	5.2
N.	4.88	21.14	34.98	47.06	53.00	56.80	62.50
	1.70	19.28	36.96	50.05	55.15	59.30	60.11
	2.93	23.14	32.64	42.64	51.03	55.08	60.29
CV (%)	50.6	9.1	6.2	8.0	3.9	3.7	2.2
CEL.pura	4.34	09.67	31.61	49.54	68.21	81.27	93.84
	1.02	06.20	21.31	41.73	61.27	70.18	92.33
	0.60	11.07	31.47	58.44	71.54	80.00	87.80
CV (%)	103.5	27.90	20.00	16.7	7.8	7.8	3.4

\* 1' repetição (média das duplicatas)

\*\* 2' repetição (média das duplicatas)

\*\*\* 3' repetição (média das duplicatas)

CV: coeficiente de variação

**QUADRO N°19-Resultados parciais das digestibilidades "in vitro" da parede celular acumulada em função do tempo de fermentação das amostras do bagaço e capim napier.**

		DIVPC (%)						
		tempo de fermentação (hs)						
		6	12	18	24	30	36	48
B.I.N.		4.30*	16.49	23.62	29.18	32.55	34.11	35.41
		4.35**	17.05	25.20	27.99	33.22	34.76	36.68
		2.58***	14.77	22.03	28.68	30.66	33.11	35.42
CV (%)		26.7	7.4	6.7	2.1	4.1	2.4	2.0
B.A.H.		0.19	12.64	23.07	34.11	39.64	43.68	45.52
		1.59	12.36	24.34	29.71	38.13	39.02	41.97
		0.85	11.33	25.21	33.21	40.34	42.43	44.68
CV (%)		79.9	5.7	4.4	7.2	2.8	5.8	4.2
B.A.H.D.		3.15	13.20	23.15	30.19	37.82	42.49	46.37
		3.73	13.68	23.15	29.52	37.42	41.00	43.75
		3.42	11.55	20.26	32.02	39.15	42.90	46.97
CV (%)		8.4	8.7	7.5	4.2	2.3	2.3	3.4
N.		7.40	21.72	37.51	44.96	55.01	58.60	64.04
		8.58	25.47	33.33	40.33	49.52	53.92	60.43
		5.16	25.22	39.56	47.03	56.32	61.22	62.20
CV (%)		24.6	8.7	8.6	7.8	6.7	6.4	3.2

\* 1ª repetição (média das duplicatas)

\*\* 2ª repetição (média das duplicatas)

\*\*\* 3ª repetição (média das duplicatas)

CV: coeficiente de variação

QUADRO N°20-Resultados parciais das taxas de digestão "in vitro" da celulose e parede celular potencialmente digestíveis das amostras do bagaço e capim napier (considerando-se indigerível resíduo obtido após 48 hs de fermentação).

	taxa de digestão ( % / h )	
	celulose	parede celular
B.I.N.	7.31*	9.26
	8.89**	6.79
	8.58***	9.32
CV (%)	10.10	17.00
B.A.H.	7.87	8.82
	8.06	7.35
	9.36	8.90
CV (%)	9.60	10.40
B.A.H.D.	5.94	5.97
	9.69	6.22
	9.22	7.19
CV (%)	24.60	10.00
N.	8.20	6.64
	11.64	4.61
	6.21	7.41
CV (%)	31.50	23.20
CEL. pura	4.43	—
	5.34	—
	8.01	—
CV (%)	31.40	

\* 1ª repetição (média das duplicatas)

\*\* 2ª repetição (média das duplicatas)

\*\*\* 3ª repetição (média das duplicatas)

QUADRO Nº21-Análise da variância da digestibilidade (extensão de degradação) "in vitro" da matéria seca ( 1 e 2 estágios), matéria orgânica (1 e 2 estágios), parede celular (F.D.N.) e celulose (CEL.).

causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
D.I.V.M.S. (1)				
blocos	2	5.2316	2.6158	
trat.	3	849.5223	283.1741	169.0413 *
resíduo	6	10.0510	1.6751	
total	11			
C.V.= 2.86 %				
D.I.V.M.S. (2)				
blocos	2	12.9353	6.4676	
trat.	3	1176.7077	392.2359	134.2383 *
resíduo	6	17.5316	2.9219	
total	11			
C.V.=3.46 %				
D.I.V.M.O. (1)				
blocos	2	2.3002	1.1501	
trat.	3	755.3554	251.7851	102.0315 *
resíduo	6	14.8063	2.4677	
total	11			
C.V.=3.16 %				
D.I.V.M.O. (2)				
blocos	2	7.6800	3.8400	
trat.	3	1000.7168	333.5723	225.0048 *
resíduo	6	8.8950	1.4825	
total	11			
C.V.=2.27 %				
D.I.V.P.C.				
blocos	2	10.5046	5.2523	
trat.	3	1111.1961	370.3987	198.0414 *
resíduo	6	11.2218	1.8703	
total	11			
C.V.=2.91 %				
D.I.V.CEL.				
blocos	2	10.1840	5.0920	
trat.	3	1105.2300	368.4100	68.6365 *
resíduo	6	32.2053	5.3675	

total 11  
C.V.=4.48 %

QUADRO Nº22- Análise da variância da extensão de desaparecimento "in vitro" da celulose (interação tempo de fermentação\*tratamento).

causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
tempo	6	42114.5256	7019.0876	862.3452
trat.	4	6123.4234	1530.8558	188.0766
blocos	2	79.4584	39.7292	4.8810
tempo*trat.	24	5115.6544	213.1522	26.1873 **
resíduo	68	553.4882	8.1395	
total	104	53986.5501		

C.V.=8.12 %

QUADRO N°23-Análise da variância da decomposição da interação existente entre tratamento e tempo de fermentação (obtida através de regressão polinomial) na determinação da D.I.V.CEL.

causas da

variação

G.L.

S.Q.

Q.M.

F

bagaço "in natura"

reg. linear	1	2442.7664	2442.7664	300.1113 **
reg. quadrát.	1	409.2342	409.2342	50.2773 **
reg. cúbica	1	7.1080	7.1080	0.8732
desvios reg.	3	11.3606	3.7868	0.4652
resíduo	68	553.4882	8.1395	

bagaço auto-hidrolisado

reg. linear	1	6027.4583	6027.4583	740.5164 **
reg. quadrát.	1	705.0002	705.0002	86.6143 **
reg. cúbica	1	12.5392	12.5392	1.5405
desvios reg.	3	34.9453	11.6484	1.4311
resíduo	68	553.4882	8.1395	

bagaço auto-hidrolisado desengordurado

reg. linear	1	7425.4336	7425.4336	912.2677 **
reg. quadrát.	1	736.7451	736.7451	90.5144 **
reg. cúbica	1	22.8011	22.8011	2.8012
desvios reg.	3	31.3758	10.4586	1.2849
resíduo	68	553.4882	8.1395	

capim napier

reg. linear	1	6983.4366	6983.4366	857.9652 **
reg. quadrát.	1	1044.6089	1044.6089	128.3377 **
reg. cúbica	1	12.3897	12.3897	1.5221
desvios reg.	3	3.7110	1.2370	0.1519
resíduo	68	553.4882	8.1395	

celulose pura

reg. linear	1	20511.2044	20511.2044	2519.9485 **
reg. quadrát.	1	413.9733	413.9733	50.8596 **
reg. cúbica	1	293.2252	293.2252	36.0248 **
desvios reg.	3	100.8637	33.6212	4.1306
resíduo	68	553.4882	8.1395	

QUADRO N°24-Análise da variância da extensão de desaparecimento "in vitro" da parede celular (interação tempo de fermentação \* tratamento)

causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
tempos	6	18021.8582	3003.6430	937.8064
trat.	3	3221.6429	1073.8809	335.2903
blocos	2	20.5266	10.2633	3.2044
tempo*trat.	18	732.7371	40.7076	12.7099 **
resíduo	54	172.9533	3.2028	
total	83	22169.7183		C.V.=5.90 %

QUADRO N°25-Análise da variância da decomposição da interação entre tratamento e tempo de fermentação (obtida após regressão polinomial) na determinação da D.I.V.P.C.

causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
bagaço "in natura"				
reg. linear	1	1979.2499	1979.2499	617.9673 **
reg. quadrát.	1	384.2311	384.2311	119.9658 **
reg. cúbica	1	22.4151	22.4151	6.9985
desvios reg.	3	1.3759	0.4586	0.1432
resíduo	54	172.9533	3.2028	
bagaço auto-hidrolisado				
reg. linear	1	4173.1509	4173.1509	1302.9536 **
reg. quadrát.	1	611.8946	611.8946	191.0475 **
reg. cúbica	1	0.0649	0.0649	0.0202
desvios reg.	3	8.9628	2.9876	0.9328
resíduo	54	172.9533	3.2028	
bagaço auto-hidrolisado desengordurado				
reg. linear	1	4133.7165	4133.7165	1290.6412 **
reg. quadrát.	1	323.7439	323.7439	101.0803 **
reg. cúbica	1	9.0672	9.0672	2.8310
desvios reg.	3	2.1234	0.7078	0.2209
resíduo	54	172.9533	3.2028	
capim napier				
reg. linear	1	6364.8000	6364.8000	1987.2368 **
reg. quadrát.	1	718.6471	718.6471	224.3781 **
reg. cúbica	1	7.5266	7.5266	2.3500
desvios reg.	3	13.6241	4.5413	1.4179
resíduo	54	172.9533	3.2028	

**QUADRO N°26-Análise da variância da taxa de digestão "in vitro" da celulose potencialmente digestível.**

causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
trat.	4	15.2369	3.8092	1.3710
blocos	2	10.7551	5.3775	1.9355
resíduo	8	22.2275	2.7784	
<b>total</b>	<b>14</b>	<b>48.2195</b>		
CV = 21.03%				

**QUADRO N°27-Análise da variância da taxa de digestão "in vitro" da parede celular potencialmente digestível.**

causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
trat.	3	13.0522	4.3507	10.3606
blocos	2	8.2021	4.1011	9.7661
resíduo	6	2.5196	0.4199	
<b>total</b>	<b>11</b>			
CV = 8.77%				