

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

NANCY RODRIGUES SIMÕES

**Uso de inóculo de fezes como substituição do
conteúdo ruminal de bubalinos na técnica *in vitro*
de produção de gases**

“Versão Corrigida”

Pirassununga

2012

NANCY RODRIGUES SIMÕES

Uso de inóculo de fezes como substituição do conteúdo ruminal de bubalinos na técnica *in vitro* de produção de gases

“Versão Corrigida”

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia

Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Raul Franzolin Neto

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

S593u	<p>Simões, Nancy Rodrigues</p> <p>Uso de inóculo de fezes como substituição do conteúdo ruminal de bubalinos na técnica <i>in vitro</i> de produção de gases / Nancy Rodrigues Simões. -- Pirassununga, 2012. 31 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Zootecnia.</p> <p>Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Raul Franzolin Neto.</p> <p>1. Bubalinos 2. Concentrado 3. Gramíneas 4. Inóculos 5. Leguminosas 6. Produção de gases <i>in vitro</i>. I. Título.</p>
-------	--

Dedicatória

A Deus, Nossa Senhora Aparecida e Nossa Senhora das Graças pela minha fé e benção por meus dias de vida e luta.

Ao meu esforço e dedicação em todos estes anos de estudos.

Aos meus avós maternos, Íres Michellin Nardelli e Carlos Nardelli (*in memorian*), que sempre me apoiaram e me ajudaram.

Aos meus avós paternos, Joana B. O. R. Simões (*in memorian*) e Joaquim Rodrigues Simões (*in memorian*), saudades.

Aos meus pais, Maria Ana Nardelli Rodrigues Simões e Benedito Rodrigues Simões, que sempre apoiaram nas realizações de meus sonhos.

A minha irmã gêmea, Nayra Rodrigues Simões por tudo sempre.

Aos meus tios, Maria José Luzetti Nardelli e José Antônio Nardelli, pela confiança ao meu trabalho.

Aos meus primos Renan, Willian e Kauã Nardelli, pela amizade, amor, por existirem.

A todos meus familiares, que sempre me apoiaram e confiaram em meu trabalho.

A minha amiga Sílvia L. Piva por seus conselhos nos momentos necessários.

Aos meus amigos irmãos de todas as horas, Kelly T. Gabolli e Reginaldo A. Marqui.

A todas minhas colegas e amigas de pós-graduação, em especial, a Dra. Teresa C. Alves, Dra. Ana C. Alves, Ms. Liliane M. Romualdo, Ms. Fernanda F. da Silva.

A minha amiga Glaziela Baptistella, por sua amizade e companhia.

A todos meus amigos do HOVET/USP, pelo apoio em tudo sempre.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, Nossa Senhora Aparecida e Nossa Senhora das Graças por suas bênçãos e pela fé e por ter dado forças, paciência e muita sabedoria em todos estes anos de estudos.

A todos meus familiares pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Raul Franzolin Neto pela orientação, sabedoria, ensinamento, confiança e paciência.

Ao Prof. Dr. Ives Cláudio da Silva Bueno, pela implantação da metodologia de produção de gases no Laboratório de Metabolismo Ruminal do Departamento de Zootecnia da FZEA/USP, pelo total auxílio nos meus experimentos, pela execução de análises estatísticas, pela sua disposição.

A Prof^a. Dr^a. Catarina Abdalla Gomide, por sua sabedoria, serenidade e por disponibilizar aos pós-graduandos o Laboratório de Bromatologia para as análises dos alimentos usados nos experimentos, muito obrigada.

A minha amiga Dra. Teresa Cristina Alves, pela amizade, auxílio nos meus experimentos, amiga de todas as horas.

A minha amiga Liliane M. Romualdo, pela amizade, companhia nas noites em claro durante as coletas da produção de gases.

Aos funcionários do setor de fistulados da FZEA/USP Alexandre João Bueno do Prado, Lúcio André Zanquetin e Ricardo Galeni pela amizade, disposição e principalmente pelo auxílio dos experimentos.

Aos colegas e amigos de pós-graduação pela amizade.

Aos todos meus animais de estimação, em especial a minha cachorra Dafne, pela companhia pelo amor incondicional.

Aos funcionários do HOVET/USP, em especial ao médico veterinário Ubiraem Mário Schalch, a biomédica Cecília Martins e ao técnico de laboratório Paulo Roberto Costa, pela amizade e auxílio nas horas de dificuldades.

A técnica de laboratório Priscila Sales Maldonado, pela amizade e auxílio na execução dos experimentos.

Ao especialista em laboratório Raphael Jacir Corradini Júnior, do Laboratório de Proteína, pelo apoio e auxílio na execução das análises laboratoriais e pela amizade.

A especialista em laboratório Roseli Sengling Lacerda, as técnicas de laboratório Ms. Caroline Fontanari, Ms. Cláudia Scatolini Bonato e a auxiliar de Laboratório Rosilda Clarete Motta Loura do Laboratório de Bromatologia, pelo apoio na execução das análises laboratoriais e pela amizade.

A estagiária da Colômbia, médica veterinária Diana Carolina Sierra Soto, companheira e muito responsável no auxílio nos experimentos.

Aos estagiários da graduação da USP do Curso de Zootecnia, Daniel de Castro, Henrique Bueno da Silva e Miguel Machado pelo auxílio no preparo dos experimentos e nas coletas.

Aos meus professores mestres e doutores da minha graduação.

A todos de coração, muito obrigada!

“Concedei-nos, Senhor, a serenidade necessária para aceitar as coisas que não podemos modificar coragem para modificar aquelas que podemos e sabedoria para distinguir umas das outras”.

Reinhold Niebuhr

Resumo

SIMÕES, N. S. **Uso de inóculo de fezes como substituição do conteúdo ruminal de bubalinos na técnica *in vitro* de produção de gases**. 2012. 31 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, Brasil, 2012.

Com o objetivo de estudar o uso de inóculo de fezes em substituição do conteúdo ruminal de bubalinos na técnica *in vitro* de produção de gases, este presente trabalho comparou as avaliações realizadas em três ensaios. Foram utilizados três bubalinos da raça Mediterrâneo, machos, adultos, castrados, fistulados no rúmen com média de peso vivo de 450 (\pm 18,7) kg. Estes animais receberam uma dieta basal, composta de silagem de milho (70%) e concentrado (30%). Estes animais foram os doadores dos 2 tipos de inóculos, que foram conteúdo ruminal (CR) e fezes. O primeiro ensaio realizado foi com alimentos concentrados: grão de milho, farelo de soja, farelo de trigo e farelo de algodão; o segundo ensaio foi com leguminosas forrageiras: alfafa (*Medicago sativa* L.), estilosantes pioneiro (*Stylosanthes macrocephala* cv. Pioneiro), soja perene (*Neonotonia wightii*) e leucena (*Leucaena leucocephala*); e o terceiro e último ensaio foi realizado com gramíneas forrageiras: capim braquiarião (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu), capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela), estrela africana (*Cynodon plectostachyus*) e capim mombaça (*Panicum maximum* Jacq. cv. Mombaça). Os valores médios obtidos de produção potencial de gases em cada ensaio foram menores ($P < 0,05$) para as amostras fermentadas com inóculos de fezes que com conteúdo ruminal, sendo respectivamente, para concentrados (140,23 e 194,08 mL.g⁻¹MS), gramíneas (161,99 e 230,25 mL.g⁻¹MS) e leguminosas (141,78 e 170,70 mL.g⁻¹MS). Conclui-se que inóculos de fezes não apresentam condições satisfatórias para substituição do inóculo com conteúdo ruminal para uso na técnica de produção *in vitro* de gases.

Palavras-chaves: búfalos, concentrados, gramíneas, inóculos, leguminosas, produção de gases *in vitro*.

Abstract

SIMÕES, N. S. **Use of faeces as inoculum as alternative for buffalo rumen contents in the *in vitro* gas production technique.** 2012. 31 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, Brazil, 2012.

In order to study the use of faeces as inoculum as alternative for buffalo rumen contents in the *in vitro* gas production technique, the present work evaluations of three tests. We used three Mediterranean buffalos, male, adult, neutered, fistulated in the rumen, with an average live weight of 450 (\pm 18.7) kg. These animals received a basal diet composed of corn silage (70%) and concentrated (30%). These buffalo were the donors of the two types of inocula, rumen content (CR) and faeces. The first test was carried out with concentrate foods: corn grain, soybean meal, wheat bran and cottonseed meal, the second test was with legumes: alfalfa (*Medicago sativa* L.), Pioneiro estilo (*Stylosanthes macrocephala* cv. Pioneiro) , perennial soybean (*Neonotonia wightii*) and leucaena (*Leucaena leucocephala*) and the third and last test was carried out with grasses: Marandu grass (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu), buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela), African Star grass (*Cynodon plectostachyus*) and Mombasa grass (*Panicum maximum* Jacq. cv. Mombasa). The average values of potential production of gas in each test were lower ($P < 0.05$) for samples fermented with an inoculum of faeces with rumen contents, being respectively, for concentrates (140.23 and 194.08 mL.g⁻¹MS), grasses (161.99 and 230.25 mL.g⁻¹MS) and legumes (141.78 and 170.70 mL.g⁻¹MS). It follows that fecal inoculum unsatisfactory condition for replacing the inoculum with rumen technique for use in the *in vitro* production of gases technique.

Keywords: buffalo, concentrated, grasses, inoculum, legumes, gas production *in vitro*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Coleta de líquido ruminal (A), fase sólida do conteúdo ruminal (B) e fezes (C) para preparo dos inóculos.	18
Figura 2 - Preparo dos inóculos: Homogeneização (A), Filtragem (B) e Acondicionamento (C).....	18
Figura 3 - Secagem de material na estufa a 40°C com ventilação forçada.....	20
Figura 4 – Inserção do inóculo no frasco (A), frascos acondicionados em estufa a 39°C (B) e aferição da pressão de gases com transdutor <i>datalogger</i> (C).....	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química bromatológica dos ingredientes e da dieta (% MS) fornecida aos animais doadores de inóculos: matéria seca (MS); matéria mineral (MM); proteína bruta (PB); fibra em detergente neutro (FDN); fibra em detergente ácido (FDA); nutrientes digestíveis totais (NDT).	17
Tabela 2 - Valores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) com base na matéria seca das amostras analisadas.	20
Tabela 3 - Parâmetros do modelo de France et al. (1993) e produções relativas de gases dos inóculos das fezes e do conteúdo ruminal (CR), nos ensaios realizados com concentrados, gramíneas e leguminosas	24
Tabela 4 - Parâmetros do modelo de France et al. (1993) e produções relativas de gases dos concentrados (farelo de algodão, milho em grãos moídos, farelo de soja e farelo de trigo), utilizando como fonte de inóculo conteúdo ruminal e fezes de búfalos.....	25
Tabela 5 - Parâmetros do modelo de France et al. (1993) e produções relativas de gases das gramíneas (braquiária, buffel, estrela, mombaça), utilizando como fonte de inóculo o conteúdo ruminal e fezes de búfalos.....	26
Tabela 6 - Parâmetros do modelo de France et al. (1993) e produções relativas de gases das leguminosas (alfafa, estilosantes, leucena e soja perene), utilizando como fonte de inóculo conteúdo ruminal e fezes de búfalos.....	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Objetivo	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	Animais doadores de inóculo e dieta fornecida	16
3.2	Inóculo	17
3.3	Ensaio e substratos.....	18
3.4	Técnica <i>in vitro</i> de produção de gases	21
3.5	Cinética da fermentação	21
3.6	Análise dos dados	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5	CONCLUSÕES	28
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1 INTRODUÇÃO

Os búfalos surgiram em nosso país com as primeiras criações há mais ou menos 100 anos e vêm ganhando projeção nas últimas décadas. Devido a relativamente recente introdução do búfalo no Brasil e com a grande cultura e desenvolvimento do consumo de carne bovina, o tamanho do rebanho de bubalinos é muito menor que o rebanho de bovinos.

Há uma estimativa mundial de 177 milhões de búfalos, destacando o continente asiático como maior criador. Na América do Sul, o Brasil é o maior produtor com cerca de 3 milhões de cabeças (ABCB, 2011).

Os búfalos apresentam excelentes características zootécnicas, tais como a rusticidade, longevidade, docilidade, adaptabilidade, prolificidade e precocidade. A diversidade de clima e de solo que se encontra na grande extensão territorial brasileira, não foi empecilho para que os búfalos trazidos para o nosso país pudessem se adaptar e desenvolverem.

A bubalinocultura é favorecida pelas condições climáticas e edáficas do Brasil e pode ser viabilizada nas áreas em que a criação de bovinos é problemática, como nas regiões alagadas do Norte. Um exemplo é a Ilha de Marajó, onde se deu a origem da criação em nosso país. Os búfalos são conhecidos também por sua boa capacidade de engorda com forragens grosseiras e de baixa qualidade. Entretanto, a bubalinocultura vem também obtendo grandes avanços tecnológicos em sistemas intensificados de produção de leite.

Com o aumento do consumo de carnes e a crescente tendência de carnes menos gordurosas, com baixos teores de colesterol e com alto valor proteico, o consumo de carnes de búfalos vem aumentando significativamente e tornando esta atividade cada vez mais interessante para os pecuaristas brasileiros. Os búfalos são animais de tríplice aptidão, produzindo carne, leite e tração. O leite é utilizado na produção da famosa “mozzarella” de búfala que é um dos queijos mais apreciados no mundo. A cadeia de produção de carne bubalina ainda não é bem estruturada em nosso país, sendo vendida como carne exótica ou na grande maioria, o produto é comercializado como carne bovina, sendo a carne de búfalo processada da mesma forma que a de bovinos com inspeção federal e características da carcaça.

A nutrição é um dos fatores mais importantes para um eficiente desempenho dos animais. Com a melhora da eficiência alimentar, há um melhor aproveitamento dos nutrientes presentes nos diversos alimentos e conseqüentemente incremento na produção de leite e carne.

Ainda existem poucas pesquisas sobre o metabolismo ruminal dos búfalos, especialmente nas condições brasileiras. Dessa maneira, os dados de pesquisas obtidos com bovinos têm sido utilizados para bubalinos, causando assim uma ineficiência nutricional com a formulação de dietas às vezes inadequadas ao tipo de produção bubalina.

Os microrganismos do rúmen e a síntese proteica microbiana dependem da demanda de nitrogênio e da concentração energética dos concentrados. O metabolismo ruminal depende, portanto, da concentração energética e proteica da dieta, na qual está diretamente relacionada na absorção dos nutrientes. Dados sobre a população microbiana e o metabolismo dos nutrientes no rúmen são essenciais para uma melhor eficiência alimentar nos búfalos.

A melhoria na eficiência alimentar com diminuição da excreção de nutrientes no solo e a redução na emissão de gases para o meio ambiente, como o metano que é um potente poluidor, vem ganhando grande importância na produção animal, especialmente visando uma produção mais racional e eficiente dos ruminantes em geral com melhor preservação do meio ambiente com redução dos fatores que promovem o efeito estufa.

1.1 Objetivo

O objetivo desse trabalho foi substituir o uso de inóculo de conteúdo ruminal com fezes de bubalinos, utilizando a técnica de produção de gases *in vitro*. Para tanto foram realizados três ensaios, utilizando diferentes substratos, para testá-los na fermentação comumente empregados na alimentação de ruminantes os alimentos utilizados foram (concentrados, gramíneas e leguminosas).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A técnica *in vitro* de produção de gases baseia-se no princípio da degradação dos nutrientes dos alimentos pela população de microrganismos presentes no rúmen. Com a simulação *in vitro* do ambiente ruminal é possível determinar o desaparecimento da amostra incubada ao longo do tempo, pela quantificação dos resíduos após a incubação, e da cinética de fermentação, com o mensuramento da pressão dos gases produzidos pela ação microbiana durante o processo de degradação (BUENO, 2002).

A técnica de produção de gases tem a vantagem de ser trabalhada em laboratório, reduzindo a atividade de utilização de animais fistulados no rúmen em experimentos de degradabilidade *in situ*. Além disso, é uma técnica capaz de medir a qualidade dos volumosos, principalmente quando há a necessidade de se obter informações sobre a contribuição dos carboidratos solúveis (CAMPOS, 2000)

Tanto a técnica *in vitro* de produção de gases (THEODORU et al., 1994; WILLIAMS et al., 1995) como a técnica de degradabilidade *in situ* (ORSKOV et al., 1980) têm sido utilizadas como alternativa ao método *in vivo* para a avaliação de alimentos para ruminantes.

A praticidade da medição da produção de gases, usando um equipamento transdutor de baixo custo e a pequena quantidade necessária de material para realização de um ensaio de produção de gases propiciou o desenvolvimento da técnica para uso em pesquisas em nutrição de ruminantes (THEODOROU et al., 1994; PEREZ, 1997; MAURÍCIO et al., 1998).

Pesquisadores têm observado boa relação entre a produção de gases, a digestibilidade e a degradabilidade do alimento em ruminantes (MENKE et al., 1979; THEODOROU et al., 1994; BLUMMEL et al., 1997; MAURICIO et al., 1998; BUENO et al., 1999a; 1999). Como a produção de gases na técnica *in vitro* é proporcional ao ataque microbiano, a determinação da concentração dos gases produzidos em intervalos frequentes permite estimar a quantidade de substrato que foi fermentada na fermentação.

Com a curva de desaparecimento do substrato fermentado no rúmen, Orskov e McDonald (1979) e McDonald (1981) desenvolveram uma equação não linear para

ajuste dos dados obtidos com a técnica de degradabilidade *in situ*. Como a técnica de produção de gases é mais sensível que a técnica de sacos de náilon, o modelo de France et al. (1993) tem sido utilizado como melhor ajuste da cinética fermentativa.

Tendo em vista a precisão da técnica de produção de gases *in vitro*, pequenas variações no preparo do inóculo devido ao ambiente anaeróbico, alimentação dos animais, tempo e forma de amostragem, preparação de amostras, bem como a inoculação nos frascos podem gerar efeitos cumulativos sobre a produção de gases, já que o inóculo tem a função de fornecer a microbiota adequada para fermentar e/ou degradar um alimento ao longo do tempo (ALVES, 2010).

Dessa forma, é importante que o inóculo contenha um nível mínimo de atividade microbiana. De acordo com Rymer et al. (2005), a dieta dos animais doadores só é importante na medida em que produz conteúdo ruminal com boa atividade microbiana e, uma vez que este nível de atividade microbiana seja adequada, a composição da dieta dos animais doadores parece ter pouco efeito nos ensaios *in vitro* de produção de gases.

Nagadi et al.(1996) afirmaram que geralmente isto pode ser conseguido usando uma dieta contendo uma relação de volumoso:concentrado de 60:40, apesar de poder ocorrer alguma influência pelo tipo de volumoso e concentrado utilizados.

Alguns trabalhos realizados com bovinos mostraram produção de gases inferior em amostras fermentadas com o uso de inóculo de fezes em comparação com conteúdo ruminal (GONÇALVES e BORBA, 1996; MAURICIO et al., 2001; CONE et al., 2006). De acordo com Maurício et al. (2001) a menor fermentação (ou seja, uma menor produção de gás) com fezes é resultado de alguns fatores, tais como fornecimento de substratos, a menor população de bactérias, maior tempo de colonização do substrato pelos microorganismo e a ausência de protozoários nas fezes originados principalmente do ceco e colon em relação ao conteúdo ruminal.

A diferença na taxa de produção de gases entre o líquido ruminal e as fezes também pode ser explicada pela diversidade de microorganismos presentes nos dois tipos de inóculos (MAURÍCIO et al., 1998; 2001).

O metano, produto final da fermentação de carboidratos para produção de ácido acético, não pode ser metabolizado pelo animal e nem pelos microorganismos

ruminais, sendo a maior parte removida do rúmen pela eructação dos ruminantes, refletindo em perdas da energia bruta da dieta (MOSS, 1993) e problemas com a poluição ambiental.

As maiores fontes de emissão de metano, considerando as atividades agrícolas são representadas pela fermentação entérica em ruminantes, produção de arroz em terrenos alagados e fermentação de dejetos da pecuária (MARCHESIN, 2010).

De acordo com Harper et al. (1999), a produção de arroz em terrenos alagados contribui com 11% do total do metano liberado para a atmosfera, enquanto que a fermentação entérica em animais contribui com 16% e a fermentação de dejetos dos animais com 17%.

Calabrò et al. (2005) utilizando inóculo de conteúdo ruminal proveniente de búfalos mediterrâneos alimentados com 60% de feno de capim e 40% de concentrado, obtiveram para cinética da produção de gases *in vitro* utilizando o modelo de Morgam, os seguintes valores: produção total de gases 335 mL/g MO; tempo de colonização (h) 4,8 e tempo para atingir metade da assíntota (h) 8,2.

Os autores justificam a menor capacidade de fermentação devido uma associação de vários fatores incluindo: substratos nas fezes com menor valor nutritivo (VAN SOEST, 1994); menor tempo de retenção e, conseqüentemente uma menor população de bactérias e ausência de protozoários (HUNGATE, 1966). Entretanto, tem sido observado uma concentração semelhante de fungos (DAVIDSON et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais doadores de inóculo e dieta fornecida

Todos os ensaios foram realizados nas instalações do Laboratório de Metabolismo Ruminal (LABRUMEN) do Departamento de Zootecnia e as análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório Bromatologia e Proteína, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo no Campus de Pirassununga da USP.

Foram utilizados três búfalos da raça Mediterrâneo, machos, adultos, castrados, com média de peso vivo de 450 (\pm 18,7) kg.

Os animais foram submetidos à cirurgia de implantação de cânulas no rúmem, aproximadamente oito meses antes do início dos ensaios. Durante os experimentos, os animais permaneceram individualmente no galpão experimental no Setor de Fistulados no Campus de Pirassununga, contendo comedouro e bebedouro automático. Foram alimentados duas vezes ao dia, uma vez pela manhã e outra no fim da tarde. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FZEA/USP.

Durante o período experimental 13/04/2010 à 29/06/2010 os animais receberam uma dieta basal, composta de silagem de milho (70%) e concentrado (30%). A ração concentrada foi formulada com uso de milho em grãos (11,94%), farelo de algodão (4,17%), farelo de trigo (4,77%), farelo de soja (8,94%) e mistura mineral (0,18%). A composição química bromatológica dos ingredientes da ração total pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição química bromatológica dos ingredientes e da dieta (% MS) fornecida aos animais doadores de inóculos: matéria seca (MS); matéria mineral (MM); proteína bruta (PB); fibra em detergente neutro (FDN); fibra em detergente ácido (FDA); nutrientes digestíveis totais (NDT).

	Silagem de milho	Milho em grãos	Farelo de algodão	Farelo de trigo	Farelo de soja	Total
MS*	22,35	92,50	94,40	92,40	94,60	43,49
MM ² **	4,04	4,16	8,01	5,60	4,37	4,32
PB**	7,18	9,30	37,88	16,83	49,80	12,97
FDN**	49,89	20,87	31,33	35,14	23,28	42,48
FDA**	6,46	5,64	22,88	10,82	15,47	8,05
NDT***	63,44	85,94	66,02	71,58	80,73	68,05

*% matéria seca natural; **Valores em % da matéria seca; ***dados médios disponibilizados pela CQBAL 3.0 (2010).

3.2 Inóculo

Foram utilizados dois tipos diferentes de inóculos de cada búfalo para uso na fermentação *in vitro* com produção de gases: um preparado com conteúdo ruminal e outro com as fezes dos animais.

As coletas de conteúdo ruminal e das fezes foram realizadas no período da manhã, antes do fornecimento da alimentação aos animais. A fase líquida do conteúdo ruminal foi coletada com o auxílio de bomba de vácuo elétrica adaptada (Figura 1A) e imediatamente acondicionada em garrafas térmicas. A parte sólida do conteúdo ruminal foi coletada manualmente (Figura 1B) e acondicionada em sacos plásticos sendo imediatamente armazenados em caixas térmicas. As fezes foram coletadas diretamente do reto (Figura 1C) e acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e armazenados em caixas térmicas.



Figura 1 - Coleta de líquido ruminal (A), fase sólida do conteúdo ruminal (B) e fezes (C) para preparo dos inóculos.

Os inóculos com conteúdo ruminal foram preparados utilizando-se o mesmo volume das fases líquidas e sólida e homogeneizada em liquidificador por cerca de 10 segundos. Após a homogeneização, o material foi filtrado utilizando-se duas camadas de fralda de algodão e mantido em banho-maria a 39°C com saturação de CO₂ até a utilização de inóculos. Os inóculos com fezes foram preparados diluindo as fezes em solução mineral tamponante de forma que o inóculo tivesse 3% MS. Essas porções foram também homogeneizadas em liquidificador, filtradas e mantidas da mesma forma que o inóculo do conteúdo ruminal (Figura 2).



Figura 2 - Preparo dos inóculos: Homogeneização (A), Filtragem (B) e Acondicionamento (C).

3.3 Ensaio e substratos

Foram avaliados diversos tipos de substratos, separados em três ensaios experimentais de produção in vitro de gases, cada um utilizando quatro representantes de um grupo de alimentos, conforme discriminados a seguir:

- Ensaio 1 – Alimentos concentrados: milho, farelo de soja, farelo de trigo e farelo de algodão;
- Ensaio 2 – Leguminosas forrageiras: alfafa (*Medicago sativa* L.), estilosantes pioneiro (*Stylosanthes macrocephala* cv. Pioneiro), soja perene (*Neonotonia wightii*) e leucena (*Leucaena leucocephala*);
- Ensaio 3 – Gramíneas forrageiras: capim braquiarião (*Brachiariabrizantha* cv. Marandu), capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L. cv. Biloela), estrela africana (*Cynodon plectostachyus*) e capim mombaça (*Panicum maximum* Jacq. cv. Mombaça).

Os ingredientes concentrados utilizados foram obtidos comercialmente e são os mesmos que fizeram parte da ração concentrada da dieta dos animais.

As leguminosas e as gramíneas foram coletadas do Campo Agrostológico da FZEA/USP. Os canteiros que continham as espécies selecionadas passaram por um corte basal em 26/02/2010 na altura adequada para cada espécie. Após 45 dias de crescimento (12/04/2010) foram colhidas quantidade suficiente de amostra de cada espécie de planta para o experimento. Durante o período de crescimento vegetativo, os canteiros foram regados duas vezes por dia, 5 vezes por semana.

As amostras gramíneas e leguminosas foram trabalhadas no Laboratório de Metabolismo Ruminal com secagem em estufa 40°C de circulação forçada de ar por 80 horas, a fim de preservar as qualidades químicas, especialmente o tanino, quando presente (Figura 3). Após a secagem, as amostras foram moídas no moinho de facas com peneira de 1 mm e armazenadas em saquinhos plásticos devidamente identificadas.



Figura 3 - Secagem de material na estufa a 40°C com ventilação forçada.

Foram realizadas em todas as amostras, análises bromatológica de: matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB) segundo AOAC (1980); e fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) segundo Silva e Queiroz (2002). As composições químicas dos ingredientes dos concentrados, das leguminosas e das gramíneas utilizadas como substrato encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) com base na matéria seca das amostras analisadas.

Tipo	Amostra	%MS	%MM	%PB	%FDN	%FDA
Concentrado	Farelo de algodão	95,52	5,95	40,13	39,55	23,77
Concentrado	Farelo de milho	95,15	2,14	9,06	15,94	4,55
Concentrado	Farelo de soja	95,88	6,48	49,44	20,24	10,21
Concentrado	Farelo de trigo	95,10	4,68	16,19	42,12	13,87
Gramínea	Braquiária	22,80	9,37	14,13	63,16	32,08
Gramínea	Buffel	50,23	10,38	13,00	65,78	37,70
Gramínea	Estrela	28,36	7,68	14,44	65,17	35,65
Gramínea	Mombaça	24,68	8,75	15,13	64,71	35,75
Leguminosa	Alfafa	19,52	8,57	22,50	35,88	25,78
Leguminosa	Estilozante	23,90	8,69	15,81	47,75	37,24
Leguminosa	Leucena	20,13	8,01	27,13	37,05	20,24
Leguminosa	Soja perene	19,89	9,99	23,69	37,79	25,49

3.4 Técnica *in vitro* de produção de gases

O perfil cumulativo de gases foi obtido utilizando a metodologia de Theodorou et al. (1994), com o uso de um transdutor e um *datalogger* (PressDATA 800) para medir a pressão no interior dos frascos. Para tanto, um grama de cada substrato foi incubado em frascos de 160 mL com 90 mL de solução mineral tamponante e 10 mL de inóculo (Figura 4A). Em seguida os frascos foram mantidos em estufa a 39°C (Figura 4B). As medidas das produções de gases foram feitas nos tempos de 3, 6, 8, 10, 12, 15, 19, 24, 30, 37, 48 horas após incubação no ensaio utilizando os concentrados. No ensaio com leguminosas, foram feitas medidas das produções de gases em 3, 6, 9, 12, 17, 24, 30, 37, 48, 60, 72, 96 horas e na última rodada, com gramíneas, foram feitas medidas das produções de gases em 3, 6, 9, 12, 22, 29, 36, 48, 60, 72, 96 horas (Figura 4C).



Figura 4 – Inserção do inóculo no frasco (A), frascos acondicionados em estufa a 39°C (B) e aferição da pressão de gases com transdutor *datalogger* (C).

3.5 Cinética da fermentação

O modelo matemático usado para expressar a cinética da fermentação de cada amostra fermentada foi o de France et al. (1993):

$$A = A_f \times \left\{ 1 - e^{[-b \times (t-t_0) - c \times (V_t - V_{t_0})]} \right\} \quad (1)$$

onde A é o volume acumulado de gases produzidos até o tempo t; A_f é o volume assintótico dos gases produzidos; b e c são constantes do modelo; e t_0 representa um tempo de colonização discreto.

3.6 Análise dos dados

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com arranjo fatorial, sendo as fontes de variação os substratos e o tipo de inóculo. Avaliou-se ainda a interação entre inóculo e substrato, no qual não houve efeito de interação. (SAS, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As fontes de variação foram os substratos e os tipos de inóculos avaliou-se a interação entre inóculo e substrato, no qual não houve efeito de interação.

Os valores da produção potencial de gases variaram consideravelmente ($P < 0,05$) entre os inóculos nos três ensaios realizados. Os valores médios obtidos de cada ensaio foram sempre menores nas amostras fermentadas com inóculos de fezes dos animais (140.23, 161.99 e 141.78 mL.g⁻¹MS para concentrados, gramíneas e leguminosas, respectivamente) que com inóculos de conteúdo ruminal (194.08, 230.25 e 170.70 mL.g⁻¹MS para concentrados, gramíneas e leguminosas, respectivamente), (Tabela 3). A diferença entre a taxa de produção de gases de conteúdo ruminal e fezes como fonte de inóculo pode ser explicada pela diversidade de tipos de microrganismos. Resultados semelhantes e sugerem que a população de microrganismos do intestino grosso seja menos diversificada que a do conteúdo ruminal, resultando em uma digestão menos eficiente.

Os valores de produção de gases (PG) observados às 24 e 48 horas para concentrado (PG24 e PG48) e às 24, 48, 72 e 96 horas para gramíneas e leguminosas (PG24, PG48, PG72 e PG96) também foram menores ($P < 0,05$) nos inóculos de fezes que nos inóculos de conteúdo ruminal (Tabela 3).

O tempo de colonização (L) foi maior ($P < 0,05$) para as amostras de concentrado e leguminosas incubada com inóculo de fezes que em conteúdo ruminal (Tabela 3). De acordo com Maurício et al., (2001) isso provavelmente ocorre porque os microrganismos fecais provenientes principalmente do ceco e cólon tem atividade menor do que os microrganismos do rúmen. Os autores justificam a menor capacidade de fermentação devido uma associação de vários fatores incluindo: substratos no intestino têm menor valor nutritivo (VAN SOEST, 1994); menor tempo de retenção e, conseqüentemente uma menor população de bactérias (Kern et al, 1974) e ausência de protozoários (HUNGATE, 1966). Entretanto, tem sido observado uma concentração semelhante de fungos (DAVIDSON et al, 2003).

O tempo para atingir a metade da assíntota ($t_{1/2}$) foi maior ($P < 0,05$) nas amostras com o uso de inóculo de fezes, exceto para o concentrado que apresentaram valores semelhantes para ambos os tipos de inóculos. O ($t_{1/2}$) está

associado com a fase de rápido crescimento de microrganismos que é resultado das interações entre os microrganismos presentes no inóculo e da maneira em que digerem o substrato.

Tabela 3 - Parâmetros do modelo de France et al. (1993) e produções relativas de gases dos inóculos das fezes e do conteúdo ruminal (CR), nos ensaios realizados com concentrados, gramíneas e leguminosas

Parâmetros	Concentrado			Gramínea			Leguminosa		
	Inóculo			Inóculo			Inóculo		
	Fezes	CR	EPM	Fezes	CR	EPM	Fezes	CR	EPM
A (mL.g ⁻¹ MS)	140,23 ^b	194,08 ^a	9,837	161,99 ^b	230,25 ^a	9,904	141,78 ^b	170,70 ^a	6,936
b (h ⁻¹)	0,119 ^a	0,109 ^a	0,0070	0,025 ^b	0,052 ^a	0,0035	0,025 ^a	0,034 ^a	0,0028
c (h ^{-1/2})	-0,461 ^a	-0,376 ^a	0,0357	-0,066 ^a	-0,213 ^b	0,0156	-0,121 ^a	-0,112 ^a	0,015
L (h)	4,55 ^a	2,99 ^b	0,340	3,29 ^b	4,25 ^a	0,267	6,48 ^a	3,34 ^b	0,52
tmeio (h)	20,31 ^a	18,90 ^a	1,133	59,49 ^a	32,85 ^b	5,014	66,52 ^a	41,77 ^b	3,40
PG24 (mL.g ⁻¹ MS)	89,63 ^b	121,27 ^a	4,753	34,78 ^b	79,09 ^a	2,114	18,87 ^b	49,23 ^a	1,31
PG48 (mL.g ⁻¹ MS)	130,98 ^b	176,17 ^a	5,245	69,13 ^b	162,88 ^a	3,051	52,43 ^b	99,33 ^a	1,98
PG72 (mL.g ⁻¹ MS)				92,55 ^b	202,88 ^a	3,312	78,58 ^b	129,01 ^a	1,72
PG96 (mL.g ⁻¹ MS)				108,91 ^b	219,59 ^a	3,729	97,07 ^b	145,65 ^a	1,56

A: produção potencial de gases; b e c: constantes do modelo; L: tempo de colonização; (t^{1/2}): tempo no qual a metade de A é atingida; PG24: produção de gases em 24 horas; PG48: produção de gases em 48 horas; PG72: produção de gases em 72 horas; PG96: produção de gases em 96 horas Valores médios de cada parâmetro seguidos por letras diferentes sobrescritos, entre fezes e CR em cada ensaio, diferem entre si (P<0,05)

A produção potencial de gases (A) foi maior (P<0,05) no milho que nos demais concentrados (Tabela 4). Não houve diferença no tempo de colonização entre os ingredientes dos concentrados. O (t^{1/2}) foi menor (P<0,05) para o farelo de trigo que para o farelo de algodão. A produção de gases em 24 horas foi maior (P<0,05) para amostras com os substratos o milho em grãos moídos e farelo de trigo, seguido do farelo de soja e farelo de algodão. Já, a produção de gases em 48 horas de incubação diferiu (P<0,05) entre todos os concentrados testados, com o milho em grãos produzindo maior quantidade de gases, seguido do farelo de trigo, farelo de soja e farelo de algodão. Os grãos de milho produzem mais gases, devido ele ser um alimento concentrado energético (<20%PB), em comparação ao farelo de

algodão que produziu menos gases, devido ao teor de taninos e a ele ser um alimento concentrado proteico (>20%PB) (NRC, 1996).

Tabela 4 - Parâmetros do modelo de France et al. (1993) e produções relativas de gases dos concentrados (farelo de algodão, milho em grãos moídos, farelo de soja e farelo de trigo), utilizando como fonte de inóculo conteúdo ruminal e fezes de búfalos

Parâmetros*	Concentrado				EPM
	Farelo de Algodão	Milho em grãos moídos	Farelo de Soja	Farelo de Trigo	
A (mL.g ⁻¹ MS)	83,35 ^c	276,33 ^a	134,37 ^{BC}	174,57 ^b	13,911
b (h ⁻¹)	0,078 ^c	0,119 ^b	0,096 ^{BC}	0,163 ^a	0,0100
c (h ^{-1/2})	-0,253 ^a	-0,502 ^{bc}	-0,319 ^{ab}	-0,601 ^c	0,0504
L (h)	3,07 ^a	4,83 ^a	3,43 ^a	3,75 ^a	0,481
tmeio (h)	22,03 ^a	21,52 ^{ab}	19,53 ^{ab}	15,33 ^b	1,603
PG24 (mL.g ⁻¹ MS)	47,18 ^c	157,22 ^a	81,30 ^b	136,08 ^a	6,722
PG48 (mL.g ⁻¹ MS)	72,70 ^d	249,02 ^a	120,68 ^c	171,88 ^b	7,418

A: produção potencial de gases; b e c: constantes do modelo; L: tempo de colonização; (t^{1/2}): tempo no qual a metade de A é atingida; PG24: produção de gases em 24 horas; PG48: produção de gases em 48 horas

^{A, B, C} médias seguidas por sobrescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si (P<0,05)

Não houve diferença entre as gramíneas (brachiaria, buffel, estrela e mombaça) para produção potencial de gases (A), tempo de colonização (L) e tempo para atingir a metade da assíntota (t^{1/2}) (Tabela 5).

A grama estrela apresentou maior (P<0,05) produção de gases às 24 horas (PG24) que o capim buffel e o mombaça. A PG48 foi maior (P<0,05) para a grama estrela e para a brachiaria que para o mombaça. Já a produção de gases as 72 e às 96 horas (PG72 e PG96) foi menor (P<0,05) para o mombaça, (Tabela 5).

Tabela 5 - Parâmetros do modelo de France et al. (1993) e produções relativas de gases das gramíneas (braquiária, buffel, estrela, mombaça), utilizando como fonte de inóculo o conteúdo ruminal e fezes de búfalos

Parâmetros*	Gramíneas				
	Braquiaria	Buffel	Estrela	Mombaça	EPM
A (mL.g ⁻¹ MS)	207,80 ^a	219,07 ^a	187,12 ^a	170,50 ^a	14,006
b (h ⁻¹)	0,039 ^a	0,035 ^a	0,048 ^a	0,032 ^a	0,0050
c (h ^{-1/2})	-0,135 ^a	-0,145 ^a	-0,176 ^a	-0,102 ^a	0,0220
L (h)	3,81 ^a	4,00 ^a	3,80 ^a	3,47 ^a	0,377
tmeio (h)	49,55 ^a	57,53 ^a	32,53 ^a	45,08 ^a	7,091
PG24 (mL.g ⁻¹ MS)	61,87 ^a _b	51,85 ^{bc}	66,87 ^a	47,17 ^c	2,989
PG48 (mL.g ⁻¹ MS)	121,38 ^a _b	112,68 ^{bc}	132,28 ^{ab}	97,68 ^c	4,315
PG72 (mL.g ⁻¹ MS)	152,10 ^a	148,15 ^a	163,35 ^a	127,25 ^b	4,683
PG96 (mL.g ⁻¹ MS)	168,07 ^a	168,73 ^a	176,70 ^a	143,50 ^b	5,274

* A: produção potencial de gases; b e c: constantes do modelo; L: tempo de colonização; (t^{1/2}): tempo no qual a metade de A é atingida; PG24: produção de gases em 24 horas; PG48: produção de gases em 48 horas

^{A, B, C} médias seguidas por sobrescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si (P<0,05)

A produção potencial de gases (A) e o tempo de colonização não diferiram entre as leguminosas (alfafa, estilosantes, leucena e soja perene) avaliadas. O (t^{1/2}) foi maior (P<0,05) para a leucena que para as demais gramíneas avaliadas. A produção de gases às 24, 48 e 72 (PG24, PG48 e PG72) horas foi menor (P<0,05) para leucena que para a alfafa, estilosantes e soja perene. A PG96 foi maior (P<0,05) para soja perene e menor para leucena (Tabela 6).

O uso de leguminosas na dieta visando redução da produção de metano no rúmen tem sido pesquisado com estudos *in vivo* e *in vitro* em ruminantes consumindo baixos ou moderados teores de taninos (Puchala et al. 2005).

A substituição da fonte de inóculo de conteúdo ruminal por fezes não é equivalente, devido aos microrganismos presentes e a ausência de protozoários e também a % da MS das fezes.

Tabela 6 - Parâmetros do modelo de France et al. (1993) e produções relativas de gases das leguminosas (alfafa, estilosantes, leucena e soja perene), utilizando como fonte de inóculo conteúdo ruminal e fezes de búfalos

Parâmetros*	Leguminosas				EPM
	Alfafa	Estilosantes	Leucena	Soja Perene	
A (mL.g ⁻¹ MS)	140,98 ^a	154,98 ^a	166,68 ^a	162,30 ^a	9,809
b (h ⁻¹)	0,036 ^a	0,029 ^{ab}	0,019 ^b	0,035 ^{ab}	0,0040
c (h ^{-1/2})	-0,133 ^a	-0,105 ^a	-0,077 ^a	-0,151 ^a	0,0213
L (h)	4,26 ^a	4,87 ^a	4,595 ^a	5,916 ^a	0,7326
tmeio (h)	41,88 ^b	47,09 ^b	78,45 ^a	49,17 ^b	4,810
PG24 (mL.g ⁻¹ MS)	39,87 ^a	37,97 ^a	22,35 ^b	36,02 ^a	1,854
PG48 (mL.g ⁻¹ MS)	82,88 ^a	81,10 ^a	55,07 ^b	84,45 ^a	2,804
PG72 (mL.g ⁻¹ MS)	108,62 ^a	109,73 ^a	81,38 ^b	115,43 ^a	2,432
PG96 (mL.g ⁻¹ MS)	122,93 ^b	127,42 ^{ab}	101,42 ^c	133,67 ^a	2,206

A: produção potencial de gases; b e c: constantes do modelo; L: tempo de colonização; (t^{1/2}): tempo no qual a metade de A é atingida; PG24: produção de gases em 24 horas; PG48: produção de gases em 48 horas

^{a, b, c} médias seguidas por sobrescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si (P<0,05)

5 CONCLUSÕES

Os inóculos de conteúdo ruminal e de fezes de bubalinos diferem em praticamente todos os parâmetros do modelo de France, demonstrando diferenças entre os microrganismos responsáveis pela fermentação do substrato.

Os concentrados, as gramíneas e as leguminosas avaliados foram diferentes em alguns parâmetros do modelo de France, muito provavelmente pela grande diferença na composição bromatológica dos alimentos usados.

Os inóculos de fezes não são equivalentes aos inóculos de conteúdo ruminal, devido à diferença de população dos microrganismos presentes nestes diferentes tipos de inóculos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCB. **Associação Brasileira de Criadores de Búfalos**. Disponível em: <<http://www.bufalo.com.br/abcb.html>>. Acesso em: 21 dez. 2011.
- ALVES, T. C. **Desenvolvimento ponderal, características da carcaça e eficiência da nutrição energética e protéica no metabolismo ruminal de búfalos e produção de gases in vitro**. 2010. 146 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.
- A. O. A. C. **Official methods of analytical chemistry**, Washington. DC. 1980.
- BLUMMEL, M.; STEINGAB, H.; BECKER, K. The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. **British Journal of Nutrition**, v. 77, p. 911-921, 1997.
- BUENO, I. C. S. et al. **Comparison of inocula from sheep and cattle for the in vitro gas production under tropical conditions**. In: ANNUAL MEETING OF THE BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, Scarbourough, 1999b. **Proceedings**. Penicuik: BSAS, p. 151. 1999a.
- BUENO, I. C. S. et al. **Uso do líquido ruminal e fezes de bovinos e ovinos como fonte de inóculo para a técnica in vitro de produção de gases**. In: REUNIAO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36. Porto Alegre, 1999a. **Anais...** Porto Alegre: SBZ, 1999b.
- BUENO, I. C. S. **Cinética digestiva e síntese microbiana ruminal em ovinos alimentados com fenos de três qualidades distintas**. Piracicaba, 2002. 97p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2002.
- CALABRÒ, S. et al. Comparative analysis of gas production profiles obtained with buffalo and sheep ruminal fluid as the source of inoculum. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123–124, p. 51–65, 2005.
- CAMPOS, F. P. **Digestibilidade de alguns volumosos através do monitoramento computadorizado de produção de gases in vitro**. Jaboticabal, 2000. 111p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”.
- CONE, J.W.; VAN GELDER, A.H.; CHAI, W.Z. Fermentation behaviour of the nylon bag washout and degradable fractions determined with the gas production technique. **Animal Feed Science and Technology**, v.127, p.319-326, 2006.
- DAVIDSON, S. et al. Effects of mounts and degradability of dietary protein on lactation, nitrogen utilization, and excretion in early lactation Holstein cows. **Journal of Dairy Science**. v. 86, p. 1681-1689, 2003.

FRANCE, J.; DHANOA, M.S.; THEODOROU, M.K. A model to interpret gas accumulation profiles with "in vitro" degradation of ruminants feeds. **Journal of Theoretical Biology**, v.163, p.99-111, 1993.

GONÇALVES, L.M.B.O., BORBA, A.E.S. **Study of gas production capacity by three sources of inocula**. J. Agric. Sci. Camb. 127, 511–515.

HARPER, L. A.; DENMEAD, O. T.; FRENEY, J. R.; BYERS, F. M. Direct measurements of methane emissions from grazing and feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.77, p.1392 – 1401, 1999.

HUNGATE, R.E. **The rumen and its microbes**. USA: Academic Press Inc., 533p., 1966.

MARCHESIN, W. A. **Estudo da produção de gases pela digestibilidade *in vitro* do CAPIM–MARANDU [*Braquiaria brizantha* (Hochst ex A. RICH) STAPF], submetido à intensidade de pastejo**, 2010, 57f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

MAURICIO, R. M. et al. Uso de líquido ruminal e fezes como fonte de inóculo para técnica *in vitro* de produção de gases. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35. Botucatu, 1998. **Anais...** Botucatu: SBZ, p. 314 - 316, 1998.

MAURICIO, R. M. et al. Semi automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, p. 321 – 330, 2001.

McDONALD, I. A revised model for estimation of protein degradability in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, v. 96, p. 251 – 252, 1981.

MENKE, K. H. et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy Content of ruminant feedstuff from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. **Journal of agricultural Science**, v. 93, p. 217-222, 1979.

MOSS, A. R. **Methane: Global warning and production by animals**. Chalcombe Publications, Kingston, United Kingdom, 1993. 105p.

NAGADI, S., HERRERO, M., JESSOP, N.S., 2000. The influence of diet of the donor animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and in vitro gas production degradability parameters. **Anim. Feed Sci. Technol.** 87, 231–239.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (NRC) **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington, D. C.: National Academy Press, 242p. 1996.

ORSKOV, E.R.; McDONALD, P. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal Agricultural Science**, v.92, p.499-503, 1979.

ØRSKOV, E.R.; HOVELL, F. D. B.; MOULD, F. The use of the nylon bag technique for evaluation of feedstuffs. *Tropical Animal Production*, v.5, p.195-213, 1980.

PEREZ, J. R. O. Sistema para a estimativa de digestibilidade in vitro. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE DIGESTIBILIDADE EM RUMINANTES, Lavras, 1997. **Anais...** Lavras: FAEPE; UFLAS, p. 55-68, 1997.

PUCHALA, R.; MIN, R.B.; GOETSCH, A.L. et al. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. **Journal of Animal Science**, v.83, p.182-186, 2005.

RYMER, C.; HUNTINGTON, J.A.; WILLIAMS, B.A.; GIVENS, D.I. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v.123–124, p. 9–30, 2005.

SAS, 2000. **SAS system for windows**. Release 8.01, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 2000.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos** (métodos químicos e biológicos). 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 235p. 2002.

THEODOROU, M. K. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentations kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, p. 185-197, 1994.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Cornell University Press, 476 p., 1994.

WILLIAMS, B. A.; BHATIA, S. K.; BOER, H. et al. A preliminary study using the cumulative gas production technique to compare the kinetics of different fermentations by use of standard substrates. **Annales de Zootechnie** 44: 35-46. 1995.