UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS *IN VIVO* E LABORATORIAIS PARA ESTIMAR O VALOR NUTRITIVO DE DIETAS PARA BOVINOS DE CORTE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Magali Floriano da Silveira

Santa Maria, RS, Brasil
2006

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS *IN VIVO* E LABORATORIAIS PARA ESTIMAR O VALOR NUTRITIVO DE DIETAS PARA BOVINOS DE CORTE

por

Magali Floriano da Silveira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia.

Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski

Santa Maria, RS, Brasil

2006

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS *IN VIVO* E LABORATORIAIS PARA ESTIMAR O VALOR NUTRITIVO DE DIETAS PARA BOVINOS DE CORTE

elaborada por
Magali Floriano da Silveira

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

COMISÃO EXAMINADORA:

Gilberto Vilmar Kozloski, Dr.
(Presidente/Orientador/UFSM)

Clóvis Clênio Diesel Senger, Dr. (UFSM)

Jorge Luiz Berto, **Dr.** (UNIJUÍ)

Santa Maria, 27 de novembro de 2006.

“Criança, criança! Basta! Como fustigados por espíritos invisíveis, os cavalos solares do tempo arrebatam consigo o carro leve do nosso destino, e nada mais nos restam senão segurar firme as rédeas, com toda nossa bravura, todo o nosso sangue-frio, e desviar as rodas ora para a direita, ora para a esquerda, aqui de uma pedra, ali de um precipício. Para onde vamos...quem o sabe?Mal nos lembramos de onde viemos.”

Goethe

Agradecimentos

À Deus pela vida, pela oportunidade de crescimento profissional, pela saúde.

Ao meu pai, agradeço pela compreensão, apoio durante esses longos anos. Muito obrigada, por tudo.

À minha querida mãe que está sempre comigo.

Ao Luís pelo amor, apoio, paciência, amizade...obrigada por tudo!

Aos meus irmãos pela amizade e apoio sempre que foi preciso.

Ao Gilberto, pelos conhecimentos repassados, pela valiosa ajuda na condução deste trabalho, pela amizade, e pelos conselhos. Muito obrigada.

Ao professor Brondani, agradeço pela oportunidade de realização desta etapa, pelo apoio, amizade. Ao Miguel, pela amizade, pela troca de conhecimentos.

Aos meus colegas e amigos do setor de Bovinocultura de Corte, obrigada por estarem presente na condução deste trabalho, sem vocês as dificuldades seriam maiores. Obrigada ao Leandro, Glaucia, Luiz Ângelo, Alisson, Milene, Patrícia, Perla, Raul, Sales, Lu e Roberta, é aos demais estagiários, não menos importantes!!

Aos colegas do Tambo, pela ajuda fundamental. Ao Clóvis pelos conhecimentos repassados.

Aos meus amigos de Mestrado, Grasi, Lisi, Dê, Carol, Andréa, Régis, Magnos, pelo companheirismo tanto nas horas boas como as ruins, pela amizade, que espero que perdure por muitos anos.

À Capes pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Curso de Pós–Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS *IN VIVO* E LABORATORIAIS PARA AVALIAR O VALOR NUTRITIVO DE DIETAS PARA BOVINOS DE CORTE
AUTORA: MAGALI FLORIANO DA SILVEIRA
ORIENTADOR: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de novembro de 2006.

O objetivo do experimento foi comparar métodos *in vivo* e laboratoriais para estimar o valor nutritivo de dietas para bovinos de corte. As dietas avaliadas foram isonitrogenadas e constituídas de silagem de planta inteira de milho e 25, 40, 55, 70 % de concentrado. Os valores de digestibilidade das dietas, obtidos em um ensaio de digestibilidade *in vivo*, foram comparados com valores estimados em ensaios *in situ, in vitro, in vitro*/gases e por equações. Para o ensaio de digestiblidade *in vivo* foram utilizados quatro bovinos, em um delineamento Quadrado Latino 4 x 4. Não houve interação significativa entre métodos e dietas. O método *in vitro* prediz com boa acurácia a digestibilidade *in vivo* das dietas experimentais. A equação de Weiss superestimou o valor nutricional destas dietas por superestimar a digestibilidade da fibra e por superestimar a fração endógena fecal. As taxas de degradação estimadas pelos métodos *in situ* e *in vitro*/gases isoladamente não foram úteis para estimar o valor nutricional dos alimentos.

Palavras-chave: digestibilidade, equações, *in situ, in vitro.*

ABSTRACT

Dissertation of Mastership
Post-Garduation in Animal Science Program
Universidade Federal de Santa Maria

Comparison of *in vivo* and laboratorial methods to assess the nutritive value of beef cattle feeds

Author: Magali Floriano da Silveira
Adviser: Gilberto Vilmar Kozloski

Date e Defense's Place: Santa Maria, November, 27 2006.

This experiment was carried out to compare *in vivo* and laboratorial methods to estimate the nutritive value of beef cattle feeds. Diets were isonitrogenous and composed by corn silage as a roughage source and 25, 40, 55 and 70 % of concentrate. Diets digestibility values measured in an *in vivo* digestibility assay were compared to those obtained from *in situ, in vitro, in vitro*/gases assays, as well from values estimated from mathematical equations. The *in vivo* assay was carried out using four cattle in a Latin Square design. There was not significant method by diet interaction. The *in vitro* method had good accuracy to estimate diets digestibility. The Weiss equation overestimated diets nutritional value due both, by overestimate fiber digestibility and by underestimate fecal endogenous excretion. As single indicators, degradation rates calculated from both, *in situ* e *in vitro*/gas assays, were not accurate to estimate the nutritive value of feeds.

Key words: digestibility, equations, *in situ, in vitro*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Digestibilidade média de dietas com diferentes níveis de concentrado obtida por diferentes métodos..... 35
Figura 2 - Digestibilidade média da fibra em detergente neutro (FDN) de dietas com diferentes níveis de concentrado obtida pelo método *in vivo* ou estimada pela equação de Weiss..... 37
Figura 3 - Valor médio de nutrientes digestíveis totais (NDT) de dietas com diferentes níveis de concentrado obtidos por diferentes métodos.....38
Figura 4 - Desvio padrão das médias de digestibilidade de dietas com diferentes níveis de concentrado obtidas por diferentes métodos.....39
Figura 5 - Concentração média de amônia e açúcares (mg/dl) e pH do fluído ruminal de bovinos recebendo dietas com diferentes níveis de concentrado.....40
Figura 6 - Relação entre a digestibilidade verdadeira da matéria orgânica (%) de dietas a base de silagem e concentrado obtida *in vivo* (IVVMO) *ou in vitro* (IVTVMO).....41
Figura 7 - Relação entre o valor de nutrientes digestíveis totais (NDT) de dietas a base de silagem e concentrado obtida *in vivo* (IVNDT) e a digestibilidade verdadeira da matéria orgânica (%) obtida *in vitro* (IVTVMO).....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química dos alimentos 25
Tabela 2 - Composição química das dietas..... 26
Tabela 3 – Diferença dos valores de digestibilidade de dietas a base de silagem e concentrado obtidas por diferentes métodos e comparadas pelo teste ‘t’ para dados pareados 36
Tabela 4 - Coeficientes de correlação entre os valores de digestibilidade de dietas a base de silagem e concentrado obtido por diferentes métodos 41
Tabela 5 - Coeficientes de correlação entre os valores de digestibilidade de dietas a base de silagem e concentrado obtidos *in vivo* com os resultados de volume final de gás e com os parâmetros da cinética de fermentação i*n vitro* e *in situ*.....42

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Valor da digestibilidade das dietas apresentadas pelos métodos 54
Apêndice B - Resumo da análise de variância para digestibilidade obtida por diferentes métodos.....57
Apêndice C - Valor nutricional médio (%), das dietas apresentadas pelos diferentes métodos.....57
Apêndice D - Valores médios da digestibilidade *in vivo* e volume final de gás (ml) (Volfin), taxa de degradação (%/h) *in situ* (Txdegsit), taxa de degradação (%/h) *in vitro*/gases (Txdegvit), lag time (h) *in situ* (lagsitu) e lag time (h) *in vitro*/gases (lagvitro) de dietas com níveis crescentes de concentrado.....58

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Composição da solução tampão (técnica *in vitro*) 59
Anexo B – Composição do meio de cultura (técnica *in vitro*/gases).....60

ÍNDICE

ABSTRACT 7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES 8
LISTA DE TABELAS 9
LISTA DE APÊNDICES 10
LISTA DE ANEXOS 11
ÍNDICE 12
1 – INTRODUÇÃO 13
2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO 15
2.1 *In vivo* 15
2.2 *In situ* 15
2.2.1 Fontes de variação na técnica *in situ* 17
2.2.1.1 Características dos sacos 17
2.2.1.2 Tamanho de partícula 17
2.2.1.3 Peso da amostra em relação à superfície da área do saco 18
2.2.1.4 Efeito da dieta 18
2.2.1.5 Contaminação microbiana 18
2.3 *In vitro* 19
2.3.1 Fontes de variação na técnica *in vitro* 19
2.3.1.1 Preparação da amostra 19
2.3.1.2 Inóculo 20
2.4 Técnica de produção de gás *in vitro* 20
2.4.1 Fontes de variação na técnica de produção de gases *in vitro* 21
2.4.1.1 Efeito do tamanho de amostra 21
2.4.1.2 Efeito do inóculo 21
2.4.1.3 Efeito do meio de incubação 22
2.4.1.4 Uso de frascos em branco 22
2.5 Predição do valor nutritivo com base na composição química 23
2.6 Comparação entre os métodos *in vivo*, *in situ*, *in vitro* e *in vitro*/gases 24
3 MATERIAL E METODOLOGIA 25
3.1 Local e época 25
3.2 Material e delineamento experimental 25
3.3 Ensaio de digestibilidade *in vivo* 26
3.4 Degradabilidade *in situ* 27
3.5 Ensaio de digestibilidade *in vitro* 29
3.6 Técnica da produção de gases *in vitro* 29
3.7 Estimativa do valor nutricional com base na composição química 30
3.8 Métodos analíticos 31
3.9 Análise estatística 33
4 RESULTADOS 35
5 DISCUSSÃO 43
6 CONCLUSÕES 46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 47
8 APÊNDICE 54
9 ANEXO 59

1 – INTRODUÇÃO

A eficiência dos sistemas de produção de bovinos depende, entre outros, da oferta adequada de nutrientes aos animais. A qualidade nutricional de um alimento tem sido definida como o produto do seu consumo voluntário, da sua digestibilidade e da eficiência de utilização dos nutrientes digeridos. A princípio, o parâmetro mais consistente para caracterizar o potencial de um determinado alimento ou dieta em suprir as exigências nutricionais de uma determinada categoria animal, em um sistema específico de manejo, é o desempenho animal obtido com o seu uso. Porém, experimentos deste tipo são relativamente onerosos e demandam tempo para a obtenção de resultados. Em função disso, várias técnicas alternativas de avaliação dos alimentos foram desenvolvidas nas últimas décadas. Associado a elas, foram desenvolvidos também sistemas mecanísticos e mais acurados de avaliação nutricional e de predição da produção animal, que têm por base análises detalhadas do alimento e da fisiologia animal.

Tilley e Terry (1963) desenvolveram uma técnica de digestão *in vitro* que simula os processos de digestão dos animais, a qual tem sido amplamente usada para predizer a digestibilidade *in vivo*. É um método que depende de animais fistulados para coleta de líquido ruminal, mas que permite avaliar vários alimentos ao mesmo tempo. Ao longo de vários anos resultados estimados *in vitro* foram comparados com obtidos *in vivo*, o que permitiu o surgimento de uma série de equações para predizer a digestibilidade da matéria orgânica de diferentes tipos de alimentos com base nesta técnica laboratorial. No entanto, a acurácia destas estimativas é normalmente reduzida por não permitir avaliar efeitos associativos entre componentes das dietas sobre a fermentação ruminal e por não considerar o efeito do nível de consumo e taxa de passagem sobre a digestão.

Outra técnica desenvolvida foi a *in situ* (MEHREZ e ORSKOV, 1977), que avalia a degradação de alimentos incubados em sacos porosos nas condições reais do ambiente ruminal. No entanto, vários fatores, como a freqüência de alimentação do animal fistulado, porosidade e tamanho dos sacos, tamanho da partícula de alimento incubado, entre outros, influenciam nos resultados de degradabilidade. Devido à falta de padronização do método, há grande dificuldade de comparar resultados estimados *in situ* entre laboratórios, ou mesmo com resultados obtidos *in*

vivo em ensaios convencionais de digestibilidade. Recentemente foi desenvolvida a técnica in *vitro*/gases (THEODOROU et al., 1994) que, comparada às demais, permite estimar em laboratório, além da digestibilidade, a taxa de fermentação das diferentes frações dos alimentos e a síntese microbiana ruminal. Esta técnica, por ser a mais recente, tem sido freqüentemente modificada e necessita ainda de adequada validação *in vivo*, principalmente nas condições tropicais de produção de ruminantes.

Na prática, o método mais comumente utilizado para estimar o valor nutricional é o uso de equações matemáticas baseadas na composição química dos alimentos (MCDOWELL et al., 1974; WEISS et al., 1992). A acurácia destas equações, no entanto, geralmente está restrita a alimentos que foram utilizados para derivá-las.

O presente estudo foi conduzido para comparar diferentes métodos para estimar o valor nutricional de dietas para ruminantes.

2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

2.1 In vivo

O método padrão para medir a digestibilidade envolve um ensaio com animais recebendo a dieta a ser avaliada por um determinado tempo, período no qual é medido o consumo de alimento e a produção fecal (KITESSA et al., 1999). Nesta técnica não há exigência de animais fistulados no rúmen e o resultado é a expressão mais real dos processos digestivos dos animais. No entanto, a acurácia dos resultados é restrito ao nível de consumo, tipo de animal e do alimento utilizado no ensaio. Por exemplo, o aumento do nível de consumo pelos animais provocaria aumento na taxa de passagem do alimento pelo trato digestivo, com isso, o tempo que o alimento estaria sujeito à degradação diminuiria, afetando a digestibilidade.

O tipo de animal é outro fator que pode afetar a digestibilidade de alimentos *in vivo.* Kitessa et al. (1999) cita em sua revisão que ovinos digerem mais eficientemente os grãos de cereais do que bovinos e estes por sua vez, digerem melhor volumosos de baixa qualidade comparados aos ovinos. Além disso, a digestibilidade medida *in vivo* requer um tempo relativamente grande para se obter resultados, tem custos relativamente alto com animais, alimentação, estrutura física, análises laboratoriais e permite avaliar somente um número limitado de alimentos em cada ensaio.

2.2 In situ

Atualmente os modelos de avaliação de dietas para ruminantes têm incorporado relações dinâmicas presentes no processo digestivo e requerem conhecimento das taxas de degradação ruminal dos alimentos para predizer consumo e desempenho animal (NRC, 1996; AFRC, 1992).

A técnica *in situ* foi inicialmente proposta por Mehrez e Orskov (1977) para estimar a taxa de degradação da proteína de concentrados protéicos. Esta técnica

tem sido amplamente utilizada, especialmente por possibilitar a comparação de características de degradação entre alimentos e também por melhorar o conhecimento da digestão ruminal (VANZANT et al., 1998).

Considerando que a digestão ruminal de alimentos é influenciada pelo tempo de permanência desse no rúmen, Orskov & McDonald (1979) introduziram o efeito da taxa de passagem, para estimar a degradabilidade efetiva. McDonald (1981) e Dhanoa (1988) modificaram o modelo incluindo o tempo de colonização dos microorganismos no alimento e, com isso, melhorar a acurácia da estimativa da taxa de degradação.

O modelo amplamente utilizado para estimar a cinética de degradação dos alimentos é o descrito por Orskov e McDonald (1979) expresso pela seguinte equação não - linear:

$$P= a + b * (1-exp^{c*t})$$

Onde: P = degradabilidade potencial do alimento;

t = tempo de incubação

a = representa o substrato solúvel e rapidamente degradável;

b = representa o substrato insolúvel, mas potencialmente degradável;

c = taxa constante da função b.

Adicionalmente, na equação acima foi incluída a taxa de passagem do alimento para estimar a degradabilidade efetiva.

$$\text{Degradabilidade efetiva} = a+ ((b * c) / (c + k))$$

Onde: k = taxa de passagem das partículas pequenas do rúmen

A técnica *in situ* envolve a suspensão de amostras de alimento no interior do rúmen acondicionadas em sacos porosos, permitindo o contato direto do alimento a ser testado com o meio ambiente ruminal. Porém, a amostra não fica sujeita aos eventos digestivos como a mastigação, ruminação e passagem. Além disso, diversos fatores afetam a degradação do alimento *in situ*, o que determina a necessidade de padronização da técnica para que estes fatores sejam controlados. Dentre estes fatores podemos citar a porosidade do saco, tamanho da amostra,

tamanho da partícula da amostra, relação peso de amostra/superfície do saco, dieta do animal e freqüência de alimentação (NOCEK, 1988; HUNTINGTON e GIVENS, 1995).

2.2.1 Fontes de variação na técnica *in situ*

2.2.1.1 Características dos sacos

O tipo de material utilizado na fabricação dos sacos é geralmente o nylon, poliéster ou dracon (KITESSA et al., 1999). O nylon é o tipo de material usado pela maioria dos pesquisadores (HUNTINGTON e GIVENS, 1995), porém o AAC- SCA (1990) recomenda o uso de poliéster para a padronização da técnica. A porosidade do saco é outra importante característica, dela depende a troca de material entre o meio ambiente ruminal e o meio interno do saco, permitindo que populações microbianas degradem o alimento e ao mesmo tempo limitem a saída de material não degradado (NOCEK, 1988). Huntington & Givens (1995) sugerem em sua revisão, que o tamanho do poro deve ser aquele que permite o fluxo microbiano sem excessiva perda de partícula, variando entre 30 a 50 μm.

2.2.1.2 Tamanho de partícula

Na incubação *in situ,* o alimento incubado não sofre os efeitos da mastigação e ruminação, portanto, é necessário que este tenha um tamanho de partícula que permita a acessibilidade dos microorganismos a uma grande área do alimento. A moagem do alimento reduz o tamanho de partícula e aumenta a superfície de área para a degradação microbiana. No entanto, a moagem excessiva pode resultar na saída de pequenas partículas pelos poros do saco, tendo como resultado uma superestimação das taxas de digestão (NOCEK, 1988). Weakely et al. (1977) verificaram que a degradação *in situ* do farelo de soja foi menor quando moído em partícula 2000 μm do que com tamanho de partícula mais fina (520 μm). Vanzant et al. (1998) recomendam moer os alimentos com peneira com crivos de 2 mm para todos os tipos de alimentos.

2.2.1.3 Peso da amostra em relação à superfície da área do saco

O tamanho ótimo de amostra é aquele que provém suficiente resíduo de alimento após o tempo de incubação no rúmen para as análises químicas (NOCEK, 1988). Na literatura diversas relações têm sido indicadas (MEHREZ e ORSKOV,, 1977; LINDBERG, 1981; NOCEK, 1988), porém, a relação peso da amostra:superfície do saco de 16 mg/cm^2, para amostras secas, parece ser a mais apropriada e a mais utilizada entre pesquisadores (HUNTINGTON & GIVENS, 1995).

2.2.1.4 Efeito da dieta

A dieta pode ter um efeito definitivo na taxa de degradação do material que é incubado (VILLALOBOS et al., 2000), pois determina a quantidade e o tipo de microorganismos que vão degradar o alimento. Em animais recebendo dieta a base de concentrado, a atividade de bactérias celulolíticas é reduzida, uma vez que a degradação de carboidratos solúveis causa uma redução no pH ruminal, favorecendo a população amilolítica em detrimento das populações celulolíticas (NOCEK, 1988). Em sua revisão, Vanzant et al. (1998) sugerem o uso de 60 a 70% de volumoso na dieta basal, favorecendo a diversidade microbiana.

2.2.1.5 Contaminação microbiana

Por causa do contato direto do alimento com microorganismos ruminais, as avaliações *in situ* apresentam uma grande dificuldade de estimar a degradabilidade verdadeira do alimento, devido à contaminação microbiana (NOCEK, 1988; VANZANT et al., 1998). A contaminação microbiana é mais alta em resíduos de forragem, e sua proporção aumenta com o aumento do tempo de incubação dos alimentos (NOCEK, 1988). Diversos marcadores têm sido usados para quantificar a

contribuição microbiana, como as purinas e N^{15}, mas esses métodos são complexos para o uso na rotina (KENNEDY et al., 1984).

2.3 In vitro

A técnica de digestão *in vitro* foi desenvolvida pela primeira vez por Tilley e Terry (1963) e tem sido comumente usada para predizer a digestibilidade *in vivo*. O método envolve dois estágios, sendo que o primeiro compreende 48 horas de fermentação anaeróbia em uma solução tampão, contendo fluído ruminal, seguida por 48 horas de digestão ácida com pepsina. Posteriormente, Goering & Van Soest (1970) modificaram o método em que o resíduo de 48 h de fermentação foi tratado com solução detergente neutro para estimar a digestibilidade verdadeira da matéria seca e, Komarek (1993), substituiu a incubação individual em tubos de vidro por incubação das amostras em saquinhos de poliéster. Embora o método de Tilley e Terry (1963) tem sido extensivamente validado com estudos *in vivo* (KITESSA et al., 1999) a acurácia destas estimativas é normalmente reduzida por não permitir avaliar efeitos associativos entre componentes das dietas sobre a fermentação ruminal e por não considerar o efeito do nível de consumo e taxa de passagem sobre a digestão. Além de fornecer apenas resultados pontuais (SENGER, 2005), também não apresenta informação da cinética de digestão do alimento.

2.3.1 Fontes de variação na técnica *in vitro*

2.3.1.1 Preparação da amostra

Para uma alta precisão da digestibilidade *in vitro* é necessário que as amostras de alimento sejam moídas com peneira com crivos de 1 mm. Cone et al., (1996) relataram aumento nas taxas de desaparecimento quando o tamanho de partícula diminui de 1 mm para 0.1 mm.

2.3.1.2 Inóculo

O fluído ruminal incluído no meio de incubação deve ter alta atividade microbiana, o qual depende da dieta do animal doador e do horário de coleta.

A acurácia do método *in vitro* parece diminuir quando a dieta do animal doador possui menos de 100g/kg de proteína bruta (WEISS, 1994) ou quando o fluído ruminal é coletado 16 a 18 horas após a alimentação. Weiss (1994) sugere coletar o fluído ruminal de 8 a 12 h após a alimentação, devido à máxima atividade da maioria das enzimas fribolíticas neste período. Alguns estudos, no entanto, não têm verificado efeito da dieta do animal doador sobre a digestibilidade *in vitro* (JUNG e VAREL, 1988).

2.4 Técnica de produção de gás *in vitro*

Usando os mesmos princípios metodológicos da técnica *in vitro*, Mencke et al. (1979), propuseram um método par estimar o valor nutricional dos alimentos que, em vez de medir o desaparecimento da amostra, envolve a medida da produção de gases durante a fermentação (CO_2 e CH_4).

A produção de gases pode ser medida diretamente, com o uso de seringa de vidro graduada (MENCKE et al., 1979; KHAZAAL e OSRKOV, 1993) onde o aumento da pressão do gás faz com que o êmbolo da seringa se desloque. Este sistema apresenta baixa sensibilidade e não permite detectar diferenças pequenas de produção de gás. A vantagem neste método é a simplicidade, uma vez que envolve o mínimo de equipamentos.

Um novo método foi descrito por Theodorou et al. (1994) onde o volume de gás é estimado com base na medida da pressão interna das garrafas. Este sistema apresenta maior precisão e praticidade que o método da seringa. Posteriormente, Cone et al., (1996) aperfeiçoaram a técnica tornando-a totalmente automatizada.

Assim como as demais técnicas de digestibilidade, a produção de gás está sujeita a fatores que determinam variações nos resultados. Dentre estes fatores, a anaerobiose, a temperatura, o pH e um adequado tampão são de suma importância,

já que todos eles podem contribuir para a diminuição da população microbiana, e assim influenciar a produção de gás *in vitro.*

2.4.1 Fontes de variação na técnica de produção de gases *in vitro*

2.4.1.1 Efeito do tamanho de amostra

Alimentos finamente moídos apresentam maior área superficial para a aderência dos microorganismos, favorecendo a fermentação inicial do substrato e contribuindo para a produção de gás, o que poderia alterar a relação das taxas de produção de gases das frações de rápida e lenta degradação.

O tamanho da amostra pode alterar a produção de gás. Amostras maiores podem apresentar reduzida produção de gás devido ao esgotamento do tampão e também por uma baixa proporção de microorganismos por substrato (GETACHEW et al., 1998). Diversos autores recomendam o uso de 1 g de amostra por garrafa para não exceder a capacidade do tampão do meio (MAURICIO et al., 1999; PELL e SCHOFIELD, 1993). Cone et al., (1996) observaram saturação do tampão resultando na diminuição do pH a valores abaixo de 6,5 quando mais de 0.5 g da mistura de grão de milho e sabugo foram incubados.

2.4.1.2 Efeito do inóculo

Aumentando a proporção de fluído ruminal na incubação com o meio eleva, o volume de gás produzido e a taxa de produção de gás e reduz o *lag time* (PELL e SCHOFIELD, 1993). Esses mesmos autores sugerem que 20 ml de inóculo/100 ml de meio, seja suficiente para assegurar a taxa máxima de digestão da fibra. Para verificar se a atividade microbiana não foi limitada, recomenda-se o emprego de brancos nas corridas da técnica de produção de gás. Menke & Steingass (1988), indicaram como mínimo necessário 7 ml/24h de gás produzido no branco quando o volume da incubação for 30 ml.

A atividade microbiana do inóculo está atrelada à condição do animal doador. Cone et al. (1996) observaram maior taxa de fermentação quando o inóculo foi

coletado após a alimentação da manhã e Menke e Steingass (1988), utilizando inóculo coletado antes da alimentação, observaram redução nas variações da composição e da atividade do inóculo. Rymer et al. (2005) recomendam em sua revisão que o inóculo deve ser coletado de mais de um animal doador, sendo posteriormente misturado, para reduzir a variação, devido à variabilidade animal.

2.4.1.3 Efeito do meio de incubação

A função dos tampões utilizados na técnica *in vitro* é manter as condições do meio ambiente dos tubos para que ocorram os processos de fermentação. Isto só é permitido por que os nutrientes necessários para a manutenção do ambiente e do pH ruminal são suplementados na composição do meio empregado.

Os tampões comumente utilizados são compostos por fosfato, bicarbonato, adicionalmente hidróxido de cisteína e sulfito de sódio são incluídos para diminuir o potencial redox juntamente com a adição de nitrogênio (N) e micro minerais para assegurar a suplementação de nutrientes e não afetar a atividade microbiana. É fundamental a utilização de CO_2 e agentes redutores para promover uma rápida e progressiva fermentação (GRANT e MERTENS, 1992).

2.4.1.4 Uso de frascos em branco

As garrafas em branco são caracterizadas por apresentarem somente inóculo ruminal e tampão e são utilizados durante os ensaios de digestibilidade *in vitro*. Os brancos podem ser utilizados para ajustar as diferenças na pressão atmosférica e também corrigir para o resíduo da matéria orgânica fermentável que é incluída com o inóculo (RYMER et al., 2005). Porém, os brancos não produzem gás na mesma taxa que as amostras, isto se deve ao fato de que nos brancos ocorre mais cedo o crescimento microbiano (CONE et al., 1998). Assim, Rymer et al. (2005) sugerem ser incorreto diminuir o valor do branco nas amostras incubadas em cada intervalo de tempo.

2.5 Predição do valor nutritivo com base na composição química

Todas as metodologias de avaliação nutricional dos alimentos citadas, direta ou indiretamente, necessitam de animais experimentais ou doadores de inóculo ruminal e envolvem manipulação e procedimentos experimentais relativamente complexos. Em função disso, se pode optar pela estimativa do valor energético do alimento com base na composição química, utilizando-se equações de predição.

Em princípio, o uso da composição química para predizer a digestibilidade dos alimentos depende da associação entre a fração química do alimento e a digestibilidade *in vivo,* a qual pode ser uma simples correlação ou uma relação de causa e efeito (WEISS, 1993).

O sistema de análise proximal (método de Weende) tem sido usado por aproximadamente um século para predizer a disponibilidade de proteína e energia do alimento (McDOWELL et al., 1974). Porém, estas equações são de natureza empírica.

Estas equações são populações dependentes e não tem uma relação causal, ou seja, foram desenvolvidas com base em uma relação estatística entre uma população específica de animais, alimentos, técnicas de produção e processamento (KITESSA et al., 1999). Weiss (1993) observou, por exemplo, que equações que foram formuladas com base em uma população de plantas leguminosas foram pouco precisas para estimar o valor nutricional de gramíneas. Por serem empíricos, a acurácia destes modelos fica limitada às condições em que foram desenvolvidas. Recentemente, graças aos avanços do conhecimento na área de nutrição animal, Weiss et al. (1992) desenvolveram equações mais mecanicistas, que incluem alguns aspectos dos processos digestivos para estimar a digestibilidade de diferentes frações do alimento.

As metodologias utilizadas nos diferentes laboratórios, para avaliar a composição química dos alimentos, são as principais fontes de variação na acurácia de predição do valor nutritivo com base nas equações. Por exemplo, a lignina pode ser determinada utilizando permanganato (GOERING e VAN SOEST, 1970) ou ácido sulfúrico (VAN SOEST, 1963), contribuindo para variações nas estimativas da digestibilidade. Com a padronização dos métodos de análises químicas estas variações poderiam ser minimizadas.

2.6 Comparação entre os métodos *in vivo, in situ, in vitro e in vitro*gases

Di Marco et al. (2002) avaliando silagem de milho confeccionada com diferentes estágios de maturidade do grão, observaram digestibilidade da matéria seca obtida pelo método *in vivo* mais baixa (0,53) do que a obtida pelo método *in vitro* e *in situ* (0,61 e 0,60), respectivamente. No entanto, diversos trabalhos encontraram correlação significativa entre os métodos *in vivo, in situ, in vitro* e *in vitro*/gases (GARCEL e POPPE 1989; JUDKINS et al. 1990; KHAZAAL et al. 1993; KHAZAAL et al. 1995), quando forragens frescas ou conservadas foram avaliadas. De outra forma, estas metodologias não apresentaram boa acurácia para predizer o valor nutricional de dietas de alto valor nutricional (ADESOGAN et al., 1998).

3 MATERIAL E METODOLOGIA

3.1 Local e época

Os experimentos *in vivo* e *in situ* foram conduzidos no Laboratório de Bovinocultura de Corte e os ensaios *in vitro* e as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal, ambos pertencentes ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria. Os experimentos foram realizados durante o ano de 2005.

3.2 Material e delineamento experimental

As dietas avaliadas foram isonitrogenadas e constituídas de silagem de planta inteira de milho misturada a 25, 40, 55, 70 % de concentrado. O concentrado foi composto de milho, farelo de trigo, farelo de soja, calcário calcítico e sal. A composição química da silagem e dos concentrados é apresentada na Tabela 1.

Os valores de digestibilidade das dietas, obtidos em um ensaio de digestibilidade *in vivo*, foram comparados com valores estimados em ensaios *in situ, in vitro, in vitro*/gases e por equações.

Tabela 1 **- Composição química[1] dos alimentos**

Componente	Silagem de milho	Concentrado (%)			
		25	40	55	70
MS (%)	30	87	88	86	86
Composição (% na MS):					
MO	90	91	92	94	94
FDN	63	17	23	20	21
FDA	34	8	9	7	7
LDA	5,28	1,40	1,98	1,87	1,57
EE	2,78	2,44	2,43	2,43	2,44
FB	28,3	5,08	5,61	4,28	4,76
ENN	22,0	44,1	53,6	57,4	59,1
N total	1,11	4,22	2,94	2,54	2,19
Composição (% do N total):					
NIDA	7,21	1,42	1,36	1,57	1,37
NIDN	21,4	4,28	7,91	9,17	11,17

[1] MS= Matéria Seca; MO= Matéria Orgânica; FDN= Fibra em Detergente Neutro; FDA= Fibra Detergente Ácido; LDA= Lignina; EE= Extrato Etéreo; FB= Fibra Bruta; ENN= Extrativo Não Nitrogenado; N total= Nitrogênio Total; NIDA= Nitrogênio Insolúvel em Detergente Ácido; NIDN= Nitrogênio Insolúvel em Detergente Neutro.

Na Tabela 2 é apresentada a composição química das dietas.

Tabela 2 **- Composição química[1] das dietas**

Componente	Níveis de Concentrado (%)			
	25	40	55	70
MS (%)	44,2	53,2	60,8	69,2
Composição (% na MS):				
MO	90,2	90,8	92,2	92,8
FDN	51,5	47,0	39,3	33,6
FDA	27,5	24,0	19,1	15,1
LDA	4,3	3,9	3,4	2,7
EE	2,7	2,6	2,6	2,5
FB	22,5	19,2	15,1	11,8
ENN	27,5	34,6	41,5	48,0
N total	1,9	1,8	1,9	1,9
Composição (% do N total):				
NIDA	5,7	4,8	4,1	3,2
NIDN	17,1	15,9	14,7	14,4

[1] MS= Matéria Seca; MO= Matéria Orgânica; FDN= Fibra em Detergente Neutro; FDA= Fibra Detergente Ácido; LDA= Lignina; EE= Extrato Etéreo; FB= Fibra Bruta; ENN= Extrativo Não Nitrogenado; N total= Nitrogênio Total; NIDA= Nitrogênio Insolúvel em Detergente Ácido; NIDN= Nitrogênio Insolúvel em Detergente Neutro.

3.3 Ensaio de digestibilidade *in vivo*

O ensaio de digestibilidade *in vivo* foi conduzido com quatro bovinos fistulados no rúmen, recebendo as dietas experimentais, em um delineamento Quadrado Latino 4 $\times$ 4. Após um período pré-experimental de aproximadamente três semanas, com a finalidade de adaptar os animais ao manejo e às instalações, o experimento foi conduzido, em quatro períodos de 15 dias, sendo os primeiros 10 dias destinados à adaptação dos animais às dietas e os cinco últimos dias à coleta de dados e amostras. Os animais foram pesados no início e no final de cada período experimental, após jejum absoluto de aproximadamente 14 horas. Durante o período

pré-experimental os animais foram alimentados *ad libitum* duas vezes ao dia, em torno das 08:00h e 17:00h, de forma a ter sobras em torno de 10% do oferecido. Durante o período experimental, os animais receberam alimentação restrita a 90% do consumo voluntário, calculado com base no peso vivo dos animais, e relativo à dieta com menor consumo durante o período pré-experimental. A digestibilidade aparente de cada componente das dietas foi medida através da coleta total das fezes dos animais (com uso de sacola presa no animal) nos últimos cinco dias de cada período sendo retirada uma amostra (aproximadamente 10% do total) diariamente. As amostras foram secas em estufa a 55ºC durante pelo ao menos 72 horas, moídas em peneira com porosidade de 1 mm e armazenadas para posterior análise.

No último dia de cada período foram coletadas amostras de líquido ruminal nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 6, 9 h após a alimentação. Imediatamente após a coleta as amostras foram filtradas e determinadas o pH. A seguir, foi retirada uma alíquota de 18 mL, sendo acidificada com 2 mL de H_2SO_4, centrifugada durante 20 minutos a 500 $\times$ g, e o sobrenadante congelado para posterior análise laboratorial.

3.4 Degradabilidade *in situ*

O ensaio de degradabilidade *in situ* foi conduzido com quatro bovinos fistulados no rúmen, recebendo uma dieta à vontade constituída por 70% de volumoso na forma de silagem de milho e 30% de concentrado na forma de farelo de trigo, conforme a recomendação de Huntington e Givens (1995). O alimento era fornecido duas vezes ao dia por volta de 8:00 e 16:00 h. Adicionalmente os animais eram suplementados com sal mineral à vontade.

Para a incubação, as amostras das dietas experimentais foram secas em estufa (55° C) com ar forçado por 72 horas e, após, foram moídas em moinho tipo Willey com peneira com poros de 1 mm. Cinco gramas de amostra foram pesadas em sacos de poliéster (10 x 16 cm e porosidade de 50μm), proporcionando uma relação de 15 mg de amostra/cm^2 de saco, os quais foram selados e incubados no rúmen em duplicatas por horário e dieta.

As amostras foram incubadas seqüencialmente durante 3, 6, 9, 12, 24, 36, 72, 96 h, com retirada conjunta de todas as amostras ao final das 96 h de incubação. Deste modo, em cada animal foram incubados 72 saquinhos (4 dietas x 9 tempos x 2 duplicatas).

Para a incubação, os saquinhos foram colocados dentro de sacos maiores de tecido sintético com grande porosidade, sendo este preso a uma peça de metal, que tinha a função de manter os sacos na parte ventral do rúmen, e fixado externamente com uma corda de náilon.

Após o período de incubação, os sacos foram lavados extensivamente até a água fluir límpida. Adicionalmente sacos não incubados de cada dieta também foram lavados para estimar a fração solúvel (tempo 0 h). Posteriormente, todos os sacos foram mantidos submersos por 24 h em uma solução de dissociação das bactérias (Whitehouse et al., 1994), eliminando a contaminação microbiana, lavados, colocados em estufa com ar forçado à 55º C por 72 h, e pesados. Os valores médios do desaparecimento da matéria seca da amostra de cada dieta nos respectivos tempos de incubação foram ajustados ao modelo descrito por Orskov & McDonald (1979) expresso pela seguinte equação:

$$P= a + b * (1-exp^{c*t})$$

Onde: P = degradabilidade potencial do alimento;

t = tempo de incubação

a = representa o substrato solúvel e completamente degradável que é rapidamente lavado para fora do saco;

b = representa o substrato insolúvel, mas potencialmente degradável;

c = taxa constante da função b.

Adicionalmente, na equação acima foi incluída a taxa de passagem do alimento para estimar a degradabilidade efetiva (DE).

$$\text{Degradabilidade efetiva} = a+ ((b * c) / (c + k))$$

Onde: k = taxa de passagem das partículas pequenas do rúmen

3.5 Ensaio de digestibilidade *in vitro*

Aproximadamente 300 mg das amostras secas e moídas foram pesadas em sacos de poliéster (3 × 4 cm, porosidade de 50μm), os quais foram selados e incubados *in vitro,* conforme modificação de Komarek (1993). O inóculo ruminal foi obtido de dois bovinos fistulados no rúmen, mantidos em pastagem de campo natural, durante o período de outono-inverno.

Os saquinhos foram colocados em duplicata em frascos de vidro com capacidade máxima de dois litros, vedados com tampa dotada de uma válvula de Bünsen contendo solução tampão/ mineral (TILLEY E TERRY 1969), modificado pela Ankom (ANKOM TECNOLOGY CORPORATION, NEW YORK, USA) (Anexo A), e inóculo ruminal, e incubados a 39ºC em banho-maria durante 48h, com agitação lenta. Após 48 h de incubação, os saquinhos foram tratados com solução detergente neutro (GOERING e VAN SOEST, 1970), em autoclave a 120°C durante 60 minutos (DESCHAMPS, 1999) A seguir, estes foram lavados em água corrente, água destilada e acetona e secados em estufa a 105°C durante pelo menos oito horas, e queimados em mufla a 550ºC durante 2 h. A matéria orgânica (MO) que desapareceu durante a incubação foi considerada a digestibilidade verdadeira da amostra (DVMO). O ensaio foi conduzido em quatro frascos, cada um representando uma repetição.

3.6 Técnica da produção de gases *in vitro*

O líquido ruminal foi obtido de dois bovinos fistulados no rúmen, mantidos em pastagem de campo natural durante o período de outono-inverno. Após a coleta, o líquido foi filtrado através de duas camadas de gaze sob injeção contínua de CO_2 e mantido em banho-maria à 39° C. Foram conduzidos quatro ensaios com três repetições por dieta em cada ensaio. Aproximadamente 1 g de amostra parcialmente seca foi pesada e colocada em frascos de 160 ml, contendo 80 ml de meio de cultura (Anexo B) conforme Theodorou et al., (1994), e 20 ml de inóculo ruminal, previamente injetados com CO_2.

Frascos contendo apenas líquido ruminal e meio de cultura foram usados como 'brancos'. Os frascos foram então vedados e incubados a 39ºC em estufa de ar forçado. A pressão originada na parte superior dos frascos foi medida utilizando-se um transdutor de pressão conectado a uma válvula de três saídas. A primeira saída foi conectada a uma agulha (0,6 mm), a qual era inserida na tampa de borracha, a segunda ao transdutor de pressão e a terceira permanecia livre e era utilizada para retirada da pressão a cada leitura. As leituras de pressão foram feitas nos tempos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72 e 96 horas após a incubação.

A produção de gases em cada tempo foi corrigida para a produção de gás média obtida de frascos contendo o meio de incubação sem amostra. A conversão da pressão em volume de gás foi feita utilizando-se uma equação previamente obtida por Senger (2005).

Os volumes médios de produção de gás para cada dieta nos respectivos tempos de incubação foram ajustados ao modelo logístico unicompartimental descrito por Shofield et al. (1994) apresentado abaixo:

$$Vt = Vf * (1 + \exp(2 - 4*S*(t - L)))^{-1}$$

Onde:

Vf = volume final de gás (ml) no tempo t;

S = taxa de degração (h^{-1});

L = tempo de colonização (h).

3.7 Estimativa do valor nutricional com base na composição química

O teor de NDT (nutrientes digestíveis totais) das dietas foi estimado com base na composição química utilizando-se dois modelos matemáticos diferentes:

a) McDowell et al. (1974)

$$\text{NDT (volumoso)} = -72.943 + 4.675\,(FB) - 1.280\,(EE) + 1.611\,(ENN) + 0.497(PB) - 0.044\,(FB)^2 - 0.760\,(EE)^2 - 0.039\,(FB)\,(ENN) + 0.087\,(EE)\,(ENN) - 0.152\,(EE)\,(PB) + 0.074\,(EE)^2\,(PB)$$

$$NDT\ (concentrado) = -202.686 - 1.357\ (FB) + 2.638\ (EE) + 3.003\ (ENN) + 2.347(PB) + 0.046\ (FB)^2 + 0.647\ (EE)^2 + 0.041\ (FB)\ (ENN) - 0.081\ (EE)\ (ENN) + 0.553\ (EE)\ (PB) - 0.046\ (EE)^2\ (PB)$$

Onde:

FB = fibra bruta, (%);

EE = extrato etéreo, (%);

PB = proteína bruta, (%);

ENN = extrativos não nitrogenados, (%).

A utilização de uma ou outra destas equações levou em consideração o teor de fibra bruta (FB) de cada uma das dietas. Nas dietas com teor de FB acima de 18% utilizou-se a equação para volumosos e naquelas com menos de 18% de FB utilizou-se a equação para concentrado.

b) Weiss et al. (1992)

$$NDT = CNFdig + PB\ dig + EE\ dig + FDN\ dig - 7$$

Onde:

$CNFdig = 0,98*(100-(FDN_c + PB + EE + Cinzas))$;

PB dig forragem = PB* Exp (-1,2* (Nida/PB));

PB dig do concentrado = (1- (0,4* (Nida/PB)))*PB;

EE dig = (EE-1);

$FDN\ dig = 0,75*\ (FDN_c - LDA)*(1-(LDA/FDN_C)^{*0,667}$

CNFdig = carboidratos não fibrosos digestíveis; PBdig forragem = proteína bruta digestível da forragem; PBdig concentrado = proteína bruta digestível do concentrado ; EEdig = extrato etéreo digestível; FDNdig = fibra em detergente neutro digestível; LDA = lignina; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido; FDN_c = fibra em detergente neutro livre de cinzas.

3.8 Métodos Analíticos

Nas amostras de alimento oferecido foi determinado o teor de matéria seca (MS), por secagem em estufa a 105ºC durante pelo menos oito horas e, cinzas

(MM), por calcinagem em mufla a 550ºC durante duas horas. O teor de nitrogênio total (N) foi determinado pelo método de Kjeldahl (método 984.13, AOAC, 1995), modificado conforme descrito por Kozloski et al. (2003). Os teores de extrato etéreo (EE) foram obtidos por extração com éter etílico, a 180ºC, por duas horas em aparelho extrator tipo Soxtherm. O calor de combustão (EB) foi medido usando uma bomba calorimétrica adiabática tipo Parr. Os teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina em detergente ácido (LDA) foram determinados de acordo com Robertson e Van Soest (1981). Contudo, a determinação de FDN e FDA foi feita com uso de sacos de poliéster, conforme modificação de Komarek (1993). Os teores de fibra bruta foram determinados submetendo as amostras às digestões ácida e básica, durante 30 minutos cada. Os teores de nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) foram analisados de acordo com Licitra et al. (1996). Extrativo não nitrogenado (ENN) foi calculado como: 100 – (PB + FB + EE + MM + MS). Nas fezes foram determinados, utilizando os métodos acima citados, os teores de MS, MO, N, NIDN, NIDA, FDN, FDA, EB, EE.

A digestibilidade verdadeira da matéria orgânica foi calculada como:

$$DVMO = ((CMO – FDN_{fezes})/CMO * 100);$$

Onde:

CMO = matéria orgânica consumida (g/kg);

FDN_{fezes} = excreção fecal de FDN (g/kg).

O teor de NDT das dietas foi calculado como:

$$NDT = (CCHO – CHO_{fezes}) + ((CN*6,25) – (N_{fezes}*6,25)) + ((CEE – EE_{fezes}) * 2,25)$$

Onde:

CCHO = consumo de carboidratos (g/kg);

CHO_{fezes} = excreção fecal de CHO (g/kg);;

CN = consumo de nitrogênio (g/kg);

N_{fezes} = excreção fecal de N (g/kg);;

CEE = consumo de extrato etéreo (g/kg);;

EE_{fezes} = excreção fecal de EE (g/kg);.

Nas amostras de fluido ruminal foi determinada à concentração de amônia (WEATHERBURN, 1967), e de açúcares (DUBOIS et al., 1956).

3.9 Análise estatística

Os dados de digestibilidade *in vivo, in situ* e *in vitro* foram analisados com base no seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_i + \bar{\alpha}_j + \beta\alpha_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Onde:

Y_{ijk} = variáveis dependentes;

μ = média geral das observações;

β_i = efeito do i – ésimo método;

$\bar{\alpha}_j$ = efeito do j – ésima dieta;

$\beta\alpha_{ij}$ = interação entre método de índice i e dieta de índice j.;

ε_{ijk} = erro residual

As médias de digestibilidade ou degradabilidade efetiva obtidas pelos métodos *in vivo*, *in situ*, *in vitro* foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade do erro Tipo 1. Adicionalmente foram realizadas análises de correlação de Pearson entre os parâmetros da cinética de fermentação (degradação) ruminal obtidas *in situ e in vitro/*gases, assim como entre as médias de digestibilidade, degradabilidade efetiva ou do teor de NDT obtidos pelos diferentes métodos. As médias de digestibilidade, de degradabilidade efetiva ou do teor de NDT obtidos pelos diferentes métodos foram também comparados pelo teste t para dados pareados.

Análise de regressão foi utilizada para avaliar o efeito dos níveis de concentrado sobre as variáveis dos parâmetros ruminais aonde foram incluídos no modelo os efeitos de animal, período, tratamento, tempo e a interação tempo x tratamento, conforme o modelo:

$$Yijklm = \mu + \beta_i + \bar{\alpha}_j + \acute{\Omega}_K + \Delta_L + (\Delta\acute{\Omega}_{kL}) + \varepsilon ijklm$$

Onde, β_i corresponde ao efeito do animal, α^-_j corresponde ao período, Ω_K corresponde ao tratamento, Δ_L corresponde ao tempo e $\Delta\Omega_{kL}$ ao efeito da interação tempo x tratamento.

Todas as análises foram feitas utilizando-se o programa estatístico SAS (1997).

4 RESULTADOS

As digestibilidades das dietas obtidas pelos diferentes métodos são apresentadas na Figura 1 e, os resultados da comparação entre métodos pelo teste t para dados pareados, são apresentados na Tabela 3. Não houve interação significativa entre dietas e métodos (P>0,05). Em todos os métodos a digestibilidade da MS ou da MO aumentaram linearmente com o aumento do nível de concentrado (P<0,05). No entanto, pelo método *in vivo*, quando o nível de concentrado aumentou de 40 para 55% ambos, a DapMO e a DVMO, tenderam à estabilidade, aumentando com o incremento do nível de concentrado para 70%.

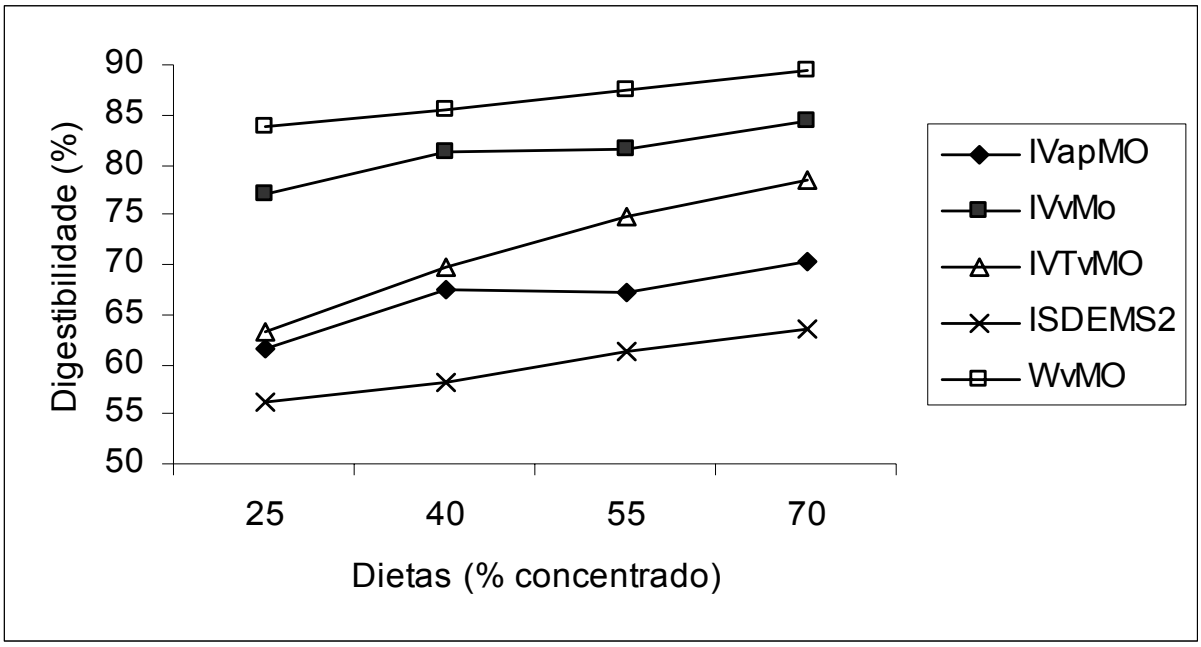

Figura 1 – **Digestibilidade média de dietas com diferentes níveis de concentrado obtida por diferentes métodos**. IVapMO= digestibilidade aparente da matéria orgânica (MO) obtida pelo método *in vivo*; IVvMO= digestibilidade verdadeira da MO obtida pelo método *in vivo*; IVTvMO= digestibilidade verdadeira da MO obtida pelo método *in vitro*; ISDEMS= degradabilidade efetiva da matéria seca (MS) obtida pelo método *in situ* com taxa de passagem de 2%/h; WvMO= digestibilidade verdadeira da MO obtida pela equação de Weiss et al., (1992).

Tabela 3 – **Diferença dos valores de digestibilidade de dietas a base de silagem e concentrado obtidas por diferentes métodos e comparadas pelo teste 't' para dados pareados***

Diferença	Médias	Média	EP	t	P>t
IVapMO – ISDEMS2	66,6 – 59,8	6,8	1,17	12,7	0,0010
IVvMO – IVTvMO	81,1 – 71,6	9,5	1,93	4,91	0,0161
IVapMO – IVTvMO	66,6 – 71,6	-5,0	1,70	-2,9	0,0608
IVapMO – WapMO	66,6 – 79,5	- 12,9	0,92	-13,9	0,0008
IVvMO – WvMO	81,1 – 86,5	- 5,4	0,57	-9,5	0,0025
IVNDT – WNDT	64,0 – 74,4	-10,4	0,85	-12,2	0,0012
IVNDT – WEENDT	64,0 – 62,2	1,82	3,7	0,49	0,6553
WNDT – WEENDT	74,4 – 62,2	12,2	3,7	3,3	0,0452
FDNIV - FNDW	57,2 – 73,8	-16,7	1,9	-8,9	0,0030

*IVapMS=digestibilidade aparente da matéria seca (MS) obtida pelo método *in vivo;* ISDEMS2=degradabilidade efetiva da MS estimada pelo método *in situ* com taxa de passagem de 2%/h; IVapMO=digestibilidade aparente da matéria orgânica (MO obtida pelo método *in vivo;* WapMO=digestibilidade aparente da MO estimada pela equação de Weiss et al. (1992); IVvMO=digestibilidade verdadeira da MO obtida pelo método *in vivo*; IVTvMO=digestibilidade verdadeira da MO estimada pelo método *in vitro*; WvMO=digestibilidade verdadeira da MO estimada pela equação de Weiss et al. (1992); IVNDT= NDT, nutrientes digestíveis totais (%) obtido pelo método *in vivo*; WNDT= NDT, nutrientes digestíveis totais (%) estimado pela equação de Weiss et al. (1992); WEENDT= NDT, nutrientes digestíveis totais (%) estimado pela equação de McDowell et al. (1974); FDNIV= digestibilidade da em fibra detergente neutro obtida pelo método *in vivo*; FDNW= digestibilidade da fibra em detergente neutro estimada pela equação de Weiss (1992).

O valor da DE obtida pelo método *in situ* (ISDEMS2) subestimou o valor nutricional das dietas quando comparada a DapMO obtida pelo método *in vivo*. Da mesma forma, o valor médio de DVMO obtido pelo método *in vitro* foi inferior (P<0,05) à DVMO média obtida *in vivo*. A DapMO obtida pelo método *in vivo* foi similar (P>0,05) à DVMO obtida pelo método *in vitro*. Por sua vez, a DVMO média das dietas foi mais alta (P<0,05) pela equação de Weiss et al. (1992) comparado aos demais métodos. A equação de Weiss, da mesma forma, superestimou a digestibilidade da FDN quando comparada ao método *in vivo* (Figura 2), assim como o valor de nutrientes digestíveis totais (NDT) (Figura 3) em comparação aos demais métodos.

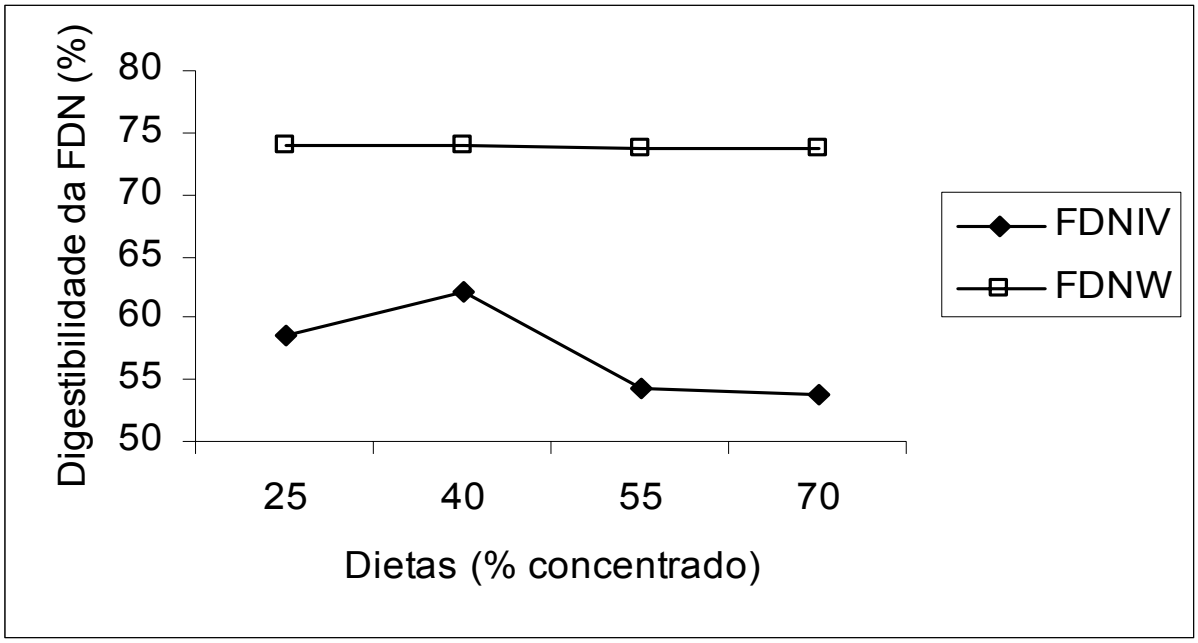

Figura 2 – **Digestibilidade média da fibra em detergente neutro (FDN) de dietas com diferentes níveis de concentrado obtida pelo método *in vivo* ou estimada pela equação de Weiss.** FDNIV= digestibilidade da FDN obtida pelo método *in vivo*; FDNW= digestibilidade da FDN estimada pela equação de Weiss et al., (1992)

Como média de todas as dietas, o teor de nutrientes digestíveis totais (NDT) estimado pela equação de McDowell foi similar (P>0,05) ao obtido *in vivo*. No entanto, esta equação tendeu a superestimar o teor de NDT das dietas com 25 e 40% de concentrado, e subestimar nas dietas com 55 e 70% de concentrado.

Os valores de NDT obtidos pelo método *in vivo* e estimados pela equação de McDowell et al. (1974) não foram diferentes entre si. Da mesma forma, a DVMO estimada pelo método *in vitro* foi similar (P>0,05) ao valor da DapMO obtido pelo método *in vivo .* O NDT obtido pela equação de McDowell foi similar ao NDT obtido *in vivo*, e menor (P<0,05) que o calculado pela equação de Weiss et al., (1992).

A equação de Weiss et al. (1992) superestimou (P<0,05) o valor nutricional das dietas quando comparada aos demais métodos, além disso, superestimou também a digestibilidade da FDN (FDNW) quando comparada com o método *in vivo* (FDNIV).

O desvio padrão das médias de digestibilidade das dietas foi mais alto quando o método *in vivo* foi utilizado (Figura 4). Os menores desvios padrões, por outro lado, foram verificados no método *in vitro.*

Não houve interação significativa entre tempo e dieta na análise das variáveis ruminais. O teor médio de amônia no fluido ruminal foi semelhante em todas as dietas, mas o pH diminuiu linearmente (P<0,05) e o teor de açúcares aumentou curvilinearmente (P<0,05) com o aumento da proporção de concentrado nas dietas (Figura 5).

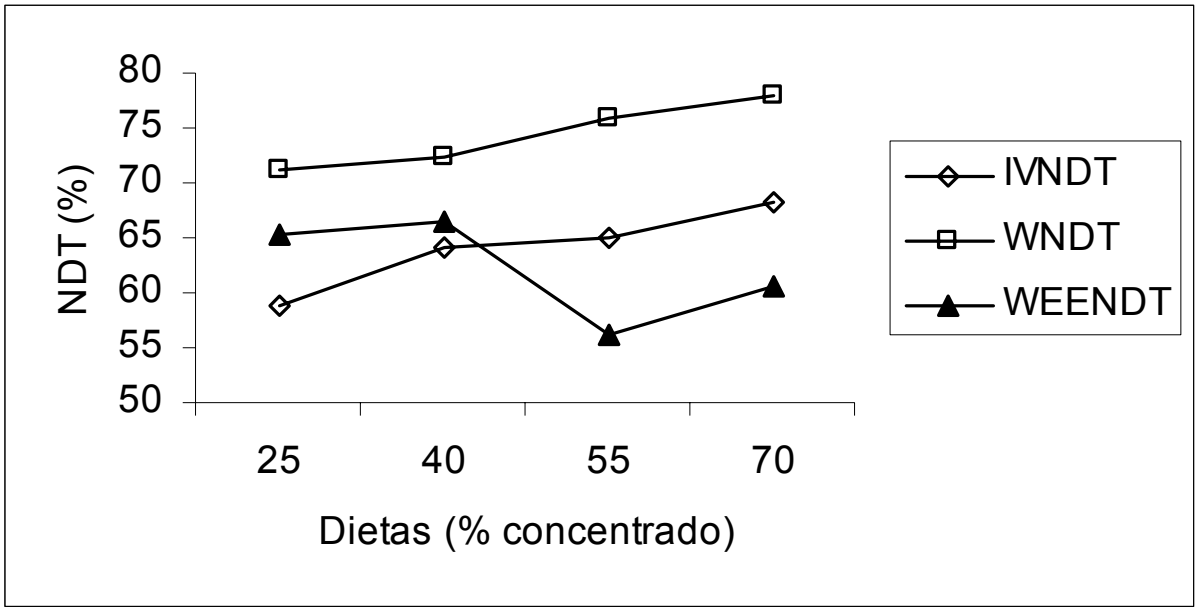

Figura 3 – **Valor médio de nutrientes digestíveis totais (NDT) de dietas com diferentes níveis de concentrado obtidos por diferentes métodos.** IVNDT= NDT obtido pelo método *in vivo*; WNDT= NDT obtido pela equação de Weiss et al. (1992); WEENDT= NDT obtido pela equação de McDowell et al. (1974).

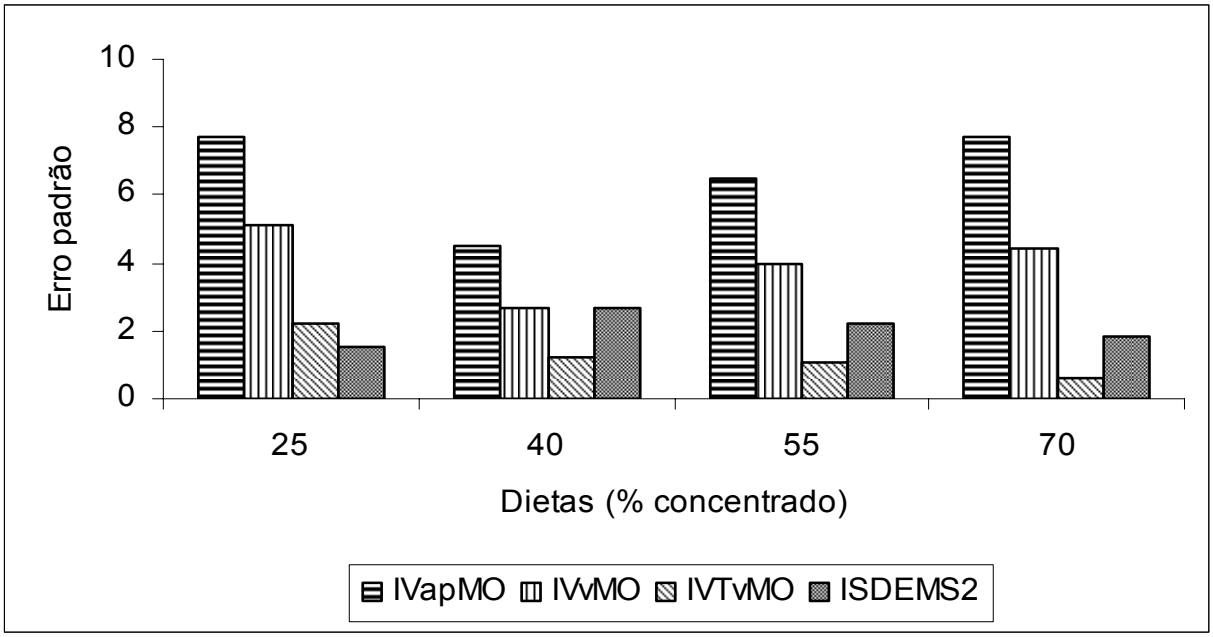

Figura 4 – **Desvio padrão das médias de digestibilidade de dietas com diferentes níveis de concentrado obtidas por diferentes métodos.** IVapMO= digestibilidade aparente da matéria orgânica (MO) obtida pelo método *in vivo*; IVvMO= digestibilidade verdadeira da MO obtida pelo método *in vivo*; IVTvMO= digestibilidade verdadeira da MO obtida pelo método *in vitro*; ISDEMS= degradabilidade efetiva da matéria seca (MS) obtida pelo método *in situ* com taxa de passagem de 2%/h;

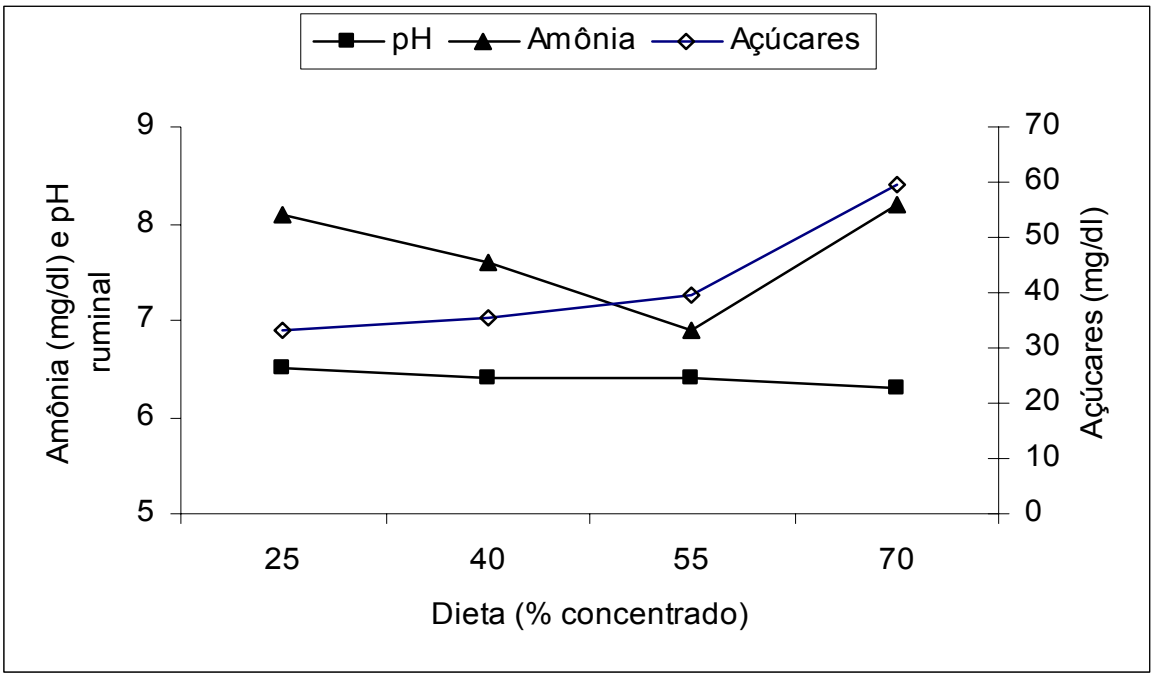

Figura 5 – **Concentração média de amônia e açúcares (mg/dl) e pH do fluído ruminal de bovinos recebendo dietas com diferentes níveis de concentrado**

A DVMO obtida pelo método *in vitro* correlacionou-se positiva e significativamente (P<0,05) com a DVMO e com o NDT obtidos pelo método *in vivo* (Tabela 4). Os demais métodos não apresentaram correlação significativa (P>0,05) com o método *in vivo*. Observa-se nas Figuras 6 e 7, respectivamente, a relação entre a DVMO (r^2=0,91) e o valor de NDT obtido *in vivo* (r^2=0,94) com a DVMO obtida pelo método *in vitro*. Os parâmetros de degradação *in situ* e as taxas de fermentação estimada pela técnica *in vitro*/gases não apresentaram correlação significativa (P>0,05) entre si e com o método *in vivo* (Tabela 5).

Tabela 4 – Coeficientes de correlação entre os valores de digestibilidade de dietas a base de silagem e concentrado obtido por diferentes métodos*[*]

Métodos	IVTvMO	ISDEMS2	WvMO	WapMO	WNDT	WEENDT
IVapMS	0,9023	0,8363	0,8499	0,8499	0,7879	- 0,3219
IVapMO	0,9395	0,8845	0,8945	0,8945	0,8427	-0,4035
IVvMO	0,9567[*]	0,9152	0,9279	0,9279	0,8791	-0,4257
IVNDT	0,9718[*]	0,9333	0,9414	0,9414	0,9003	-0,4814

[*]P < 0,05. [**]IVapMS=digestibilidade aparente da MS obtida pelo método *in vivo;* IVapMO=digestibilidade aparente da MO obtida pelo método *in vivo;* IVvMO=digestibilidade verdadeira da MO obtida pelo método *in vivo;* IVNDT= NDT, nutrientes digestíveis totais (%) obtido pelo método *in vivo*; IVTvMO=digestibilidade verdadeira da MO estimada pelo método *in vitro;* ISDEMS5=degradabilidade efetiva da MS estimada pelo método *in situ* com taxa de passagem de 5%/h; ISDEMS3=degradabilidade efetiva da MS estimada pelo método *in situ* com taxa de passagem de 3%/h; WvMO=digestibilidade verdadeira da MO estimada pela equação de Weiss et al. (1992); WapMO=digestibilidade aparente da MO estimada pela equação de Weiss et al. (1992); WNDT= NDT, nutrientes digestíveis totais (%) estimado pela equação de Weiss et al. (1992); WEENDT= NDT, nutrientes digestíveis totais (%) estimado pela equação de McDowell et al. (1974);

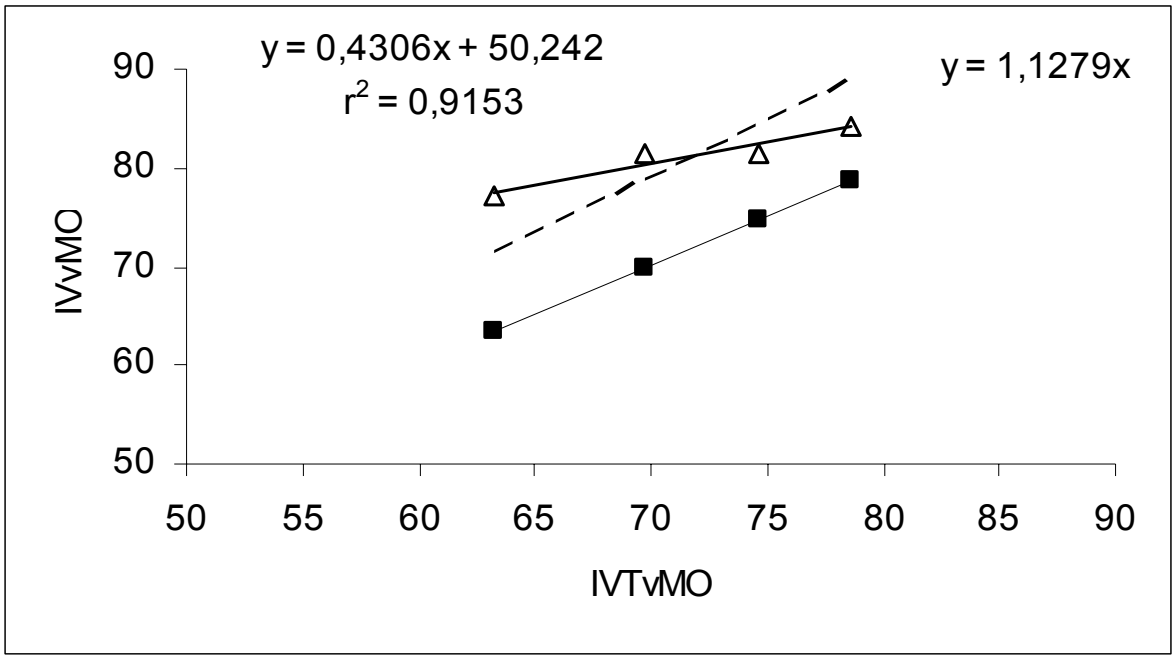

Figura 6 - **Relação entre a digestibilidade verdadeira da matéria orgânica (%) de dietas a base de silagem e concentrado obtida *in vivo* (IVVMO) *ou in vitro* (IVTVMO)**. ∆= Relação entre a DVMO obtida pelos métodos *in vivo* e in *vitro*; ■ = reta onde Y=X; ---- = reta do ponto de origem

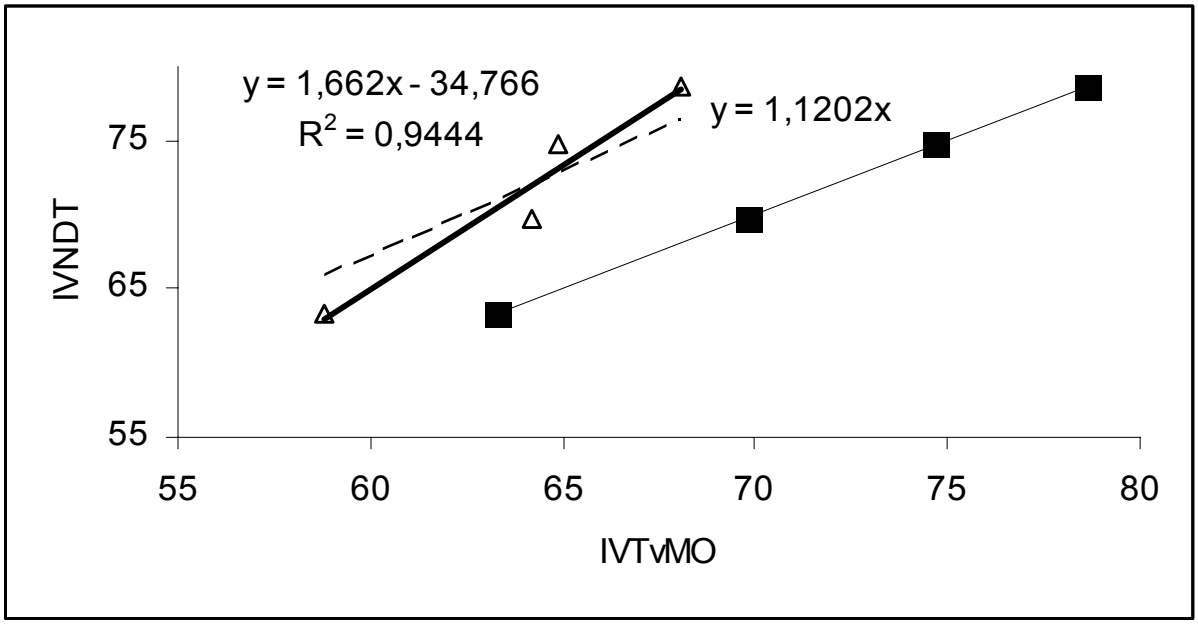

Figura 7 - **Relação entre o valor de nutrientes digestíveis totais (NDT) de dietas a base de silagem e concentrado obtida *in vivo* (IVNDT) e a digestibilidade verdadeira da matéria orgânica (%) obtida *in vitro* (IVTVMO).** ∆= Relação entre o NDT e a DVMO obtida pelos métodos *in vivo* e in *vitro*; ■ = reta onde Y=X; ---- = reta do ponto de origem

Tabela 5 – **Coeficientes de correlação entre os valores de digestibilidade de dietas a base de silagem e concentrado obtidos *in vivo* com os resultados de volume final de gás e com os parâmetros da cinética de fermentação *in vitro* e *in situ*[*]**

Itens[**]	VolFinal	Txdegsit	Txdegvitr	Lgsitu	Lgvitro
IVapMO	-0,1162	-0,1830	0,1484	-0,3104	0,1250
IVVMO	-0,0098	-0,1597	0,2223	-0,2996	0,1266

[*]P<0,05. [**]IVapMO=digestibilidade aparente da MO obtida pelo método *in vivo;* IVvMO=digestibilidade verdadeira da MO obtida pelo método *in vivo*; VolFinal=volume final de gases (mL) estimado pela técnica de produção de gás; Txdegsit=taxa fracional de degradação estimada pelo método *in situ*; Txdegvitr=taxa fracional de degradação estimada pela produção de gases *in vitro*; Lgsitu=tempo de colonização (h) estimado pelo método *in situ;* Lgvitro=tempo de colonização (h) estimado pela técnica de produção de gases *in vitro*.

5 DISCUSSÃO

Vários métodos alternativos ao ensaio de digestibilidade *in vivo* têm sido desenvolvidos e avaliados para estimar o valor nutricional de dietas para ruminantes. No entanto, os resultados encontrados nos diversos estudos que avaliaram estes métodos apresentam discrepâncias. Em alguns estudos foram observadas altas correlações entre os métodos *in vivo, in situ e in vitro* (GARCEL e POPPE, 1989; JUDKINS et al., 1990; KHAZAAL et al., 1993; KHAZAAL et al., 1995), mas em outros não (ADESOGAN et al.,1998; NSAHLAI e UMUNNA, 1996; GIVENS et al.,1995).

A digestibilidade obtida pelo método *in vivo* não foi a esperada, uma vez que os valores foram similares entre os níveis de 40 e 55% de concentrado. Isto ocorreu devido à significativa redução da digestibilidade da FDN na dieta com 55% de concentrado. O efeito depressivo da adição de suplementos energéticos sobre o consumo e a digestibilidade de volumosos está amplamente documentada na literatura (DELCURTO et al.,1990; PORDOMINGO et al., 1991; NETTO, 2006). A presença de carboidratos solúveis no rúmen normalmente resulta em queda do pH e, estudos *in situ* (MOULD e ORSKOV, 1983) e *in vitro* (GRANT e MERTENS, 1992) demonstraram que a digestibilidade da fibra é limitada a pH abaixo de 6,0. No entanto, ela pode ser também afetada negativamente pela presença de carboidratos solúveis *per se*, especialmente por exercerem um efeito adverso sobre a taxa da degradação da fibra (ARROUQY et al., 2005). No presente estudo, o pH provavelmente não foi o principal responsável por esta redução da digestibilidade da fibra, uma vez que, mesmo no nível de 70% de concentrado, o valor médio de pH foi acima de 6,0 (média de 6,3). É provável que o efeito inibitório *per se* do amido e/ou açúcares sobre a digestibilidade da FDN tenha sido mais significante no presente estudo. Os mecanismos desta inibição, contudo, não são conhecidos.

A DVMO obtida *in vivo* foi sempre mais alta que a *in vitro*, mas esta diferença tendeu a diminuir com o aumento do nível de concentrado na dieta. Isto possivelmente ocorreu porque, quanto menos concentrado maior o teor de fibra da dieta e, neste caso, quantidades significativas de hemicelulose podem ter escapado da digestão ruminal, passado pela acidez do abomaso e sendo fermentadas por bactérias no intestino grosso dos animais (FAHEY e BERGER, 1993). Outro fator importante pode ter sido o tempo de incubação utilizado no método *in vitro* (48 horas), o qual pode não ter sido suficiente para degradar todo o material

potencialmente degradável das dietas, e tenha sido menor que o ocorrido no rúmen dos animais (JUDKINS et al., 1990). Apesar disso, no entanto, os métodos *in vitro e in vivo* apresentaram alta correlação.

A técnica *in situ*, por sua vez, além de subestimar a digestibilidade dos alimentos, não se correlacionou com a *in vivo*. Os parâmetros resultantes do modelo matemático utilizado no presente estudo podem não terem estimado adequadamente o processo de digestão ruminal real. Além disso, valores mais altos para *in vivo* podem ser atribuídos a uma participação significativa do intestino delgado na digestão de frações do amido que escapam da digestão ruminal (VAN SOEST, 1994), uma vez que a técnica *in situ* mede o desaparecimento de material digestível apenas no rúmen.

Os resultados de volume de gás obtidos *in vitro* não apresentaram correlação com a digestibilidade *in vivo*. A técnica *in vitro*/gases estima o valor nutricional dos alimentos, pela medida de produção de gases (CO_2 e CH_4) produzidos a partir da fermentação de carboidratos (THEODOROU et al.,1994). No entanto, não inclui amônia e, deste modo, não considera adequadamente a degradação das proteínas. Diversos autores observaram alta correlação entre digestibilidade *in vivo* e produção de gases *in vitro* (KHAZAAL et al., 1993; BLÜMELL e ORSKOV, 1993; KHAZAAL et al.,1995). Contudo, estes autores avaliaram forrageiras com teores de proteína menores (9,5% PB) do que o teor presente nas dietas experimentais (12% PB) do presente trabalho. Além disso, o volume total de gás produzido foi resultado da incubação das amostras durante 96 horas, em um meio de incubação estático. No animal, de outra forma, a digestibilidade dos alimentos é conseqüência tanto da taxa de degradação, mas também é inversamente relacionada à taxa de passagem pelo trato digestivo (VAN SOEST, 1994).

As taxas de degradação e/ou fermentação obtidas pelos métodos *in situ* e *in vitro*/gases não tiveram correlação com a digestibilidade *in vivo.* De fato, isto indica que elas são válidas somente quando incluídas em modelos mecanísticos que incluem também, além das taxas de degradação, as taxas de passagem dos componentes da dieta (FOX et al., 2004) para estimar a digestão de ruminantes.

Na rotina dos laboratórios, o método mais comumente utilizado para estimar o valor nutricional dos alimentos é o uso de equações matemáticas baseadas na composição química dos alimentos (McDOWELL et al., 1974; WEISS et al., 1992). No presente estudo, a equação de McDowell et al., (1974), apesar de ter resultado

em um valor médio do NDT das dietas similar ao obtido *in vivo*, apresentou baixa correlação com este método. Por sua vez, a equação de Weiss et al., (1992) superestimou o valor nutricional das dietas, principalmente por superestimar a digestibilidade da FDN, mas foi bem melhor correlacionado com o método *in vivo* do que a equação de McDowell et al., (1974). Pela equação de Weiss, a digestibilidade da FDN é inversamente relacionada ao teor de lignina. No entanto, ela não considera o efeito associativo entre alimentos, ou seja, o efeito negativo do amido sobre a digestibilidade da fibra no rúmen (DELCURTO et al., 1990; MOURIÑO et al., 2001). Além disso, a equação de Weiss assume que a fração endógena representa 7% da matéria orgânica fecal, enquanto no presente estudo esta fração foi de 14,4%. Senger (2005), da mesma forma, também verificou que a equação de Weiss superestimou a digestibilidade de silagens de milho quando comparada com a digestibilidade verdadeira da matéria orgânica obtida *in vitro*.

6 CONCLUSÕES

A digestibilidade *in vivo* de dietas a base de silagem e concentrado pode ser estimada precisamente pelo método *in vitro.*

A equação de Weiss superestimou o valor nutricional destas dietas por superestimar a digestibilidade da fibra e por subestimar a fração endógena fecal. No entanto, quando comparada com a equação baseada na análise proximal dos alimentos, estimou com mais precisão o valor energético das dietas.

As taxas de degradação estimadas pelos métodos *in situ* e *in vitro*/gases isoladamente não foram úteis para estimar o valor nutricional dos alimentos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAC-SCA. Australian Agricultural Council – Standing Committee on Agriculture: Ruminant Subcommittee. **Feeding standards for Australian livestock: Ruminants.** (CSIRO Publications: East Melbourne), 1990.

ADESOGAN, A.T.; OWEN, E.; GIVENS, D.I. Prediction of the in vivo digestibility of whole crop wheat from in vitro digestibility, chemical composition, in situ rumen degrability, in vitro gas production and near infrared reflectance spectroscopy. **Animal Feed Science and Technology**, v.74, p.259-272, 1998.

AFRC. Agricultural Food Research Council. Technical Committee on Response to Nutrients. Report No.9. **Nutrient Requirements of Ruminant Animals: Protein.** *Nutrition Abstracts and Reviews* 62B, p.787-835, 1992.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12 ed. Washington, D.C., 1995.

ANKOM TECNOLOGY CORPORATION, Macedon,New York, USA.www.ankom.br.

ARROQUY, J.I.; COCHRAN, R.C.; NAGARAJA, T.G., et al. Effect of types of non-fibre carbohydrate on in vitro forage fibre digestion of low-quality grass hay. **Animal Feed Science and Technology**. 120, 93–106, 2005.

BLÜMMEL, M.; ORSKOV, E.R. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. **Animal Feed Science and Technology,** v.40, p.109-119, 1993.

CONE, J.W.; VAN GELDER, A.H.; VALK, H. Prediction of nylon bag degradation characteristics of grass samples with the gas production technique. **Journal Science Feed Agricultural**, v. 77, p. 421– 426, 1998.

CONE, J.W.; VAN GELDER, A.H.; VISSCHER, G.W.A. et al. Use of a new automated time related gas production apparatus to study the influence of substrate concentration and source of rumen fluid on fermentation kinetics. **Animal Feed Science and Technology,** v.61, p.113-128, 1996.

DELCURTO, T.; COCHRAN R.C.; HARMON, D.L. et al. Supplementation of dormant tallgrass-prairie forage: Influence of varying supplemental protein and (or) energy

levels on forage utilization characteristics of beef steers in confinement. **Journal of Animal Science**, v.68, n.2, p.515-531, 1990.

DESCHAMPS, F.C. Implicações do período de crescimento na composição química e digestão dos tecidos de cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, p.1358-1369, 1999.

DHANOA, M.S. On the analysis of dracon bag data for low degradability feeds. **Grass and Forage Science**, v.43, p.441-444, 1988.

Di MARCO, O.N.; AELLO, M.S.; NOMDEDEU, M. et al. Effect of maize crop maturity on silage chemical composition and digestibility (in vivo, in situ and in vitro). **Animal Feed Science and Technology,** v.99, p.37-43, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K. et al Colorimetric method for determination of sugars and related substances**. Analytical Chemistry**, v. 28, p.350-356, 1956**.**

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F.F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem**. 28, 350–356; 1956.

FAHEY, Jr.,G.C.; BERGER, L.L. Los carbohidratos el la nutricion de los ruminantes. In: Church, D.C. **El ruminante: fisiologia digestiva y nutricion**. Zaragoza: Acribia, 641p, 1993.

FOX, D.G.; TEDESCHI, L.O.; TYLUTKI, T.P. et al The Cornell Net Carbohydrate and Protein System Model for evaluation herd nutrition and nutrient excretion**. Animal Feed Science and Technology**, v.112, p.29-78, 2004.

GARCELL, A.; POPPE, S. Studies on the feed value of Bermuda grass cross nº1 (*Cynodon dactylon*) in Cuba. **Archivos Animal Nutrition,** v.39, p.203-209, 1989.

GETACHEW, M.G.; BLÜMMEL, H.P.S.; MAKKAR, K.B. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology,** v.72, p.261-281, 1998.

GIVENS, D.I.; COTTYN, B.G.; DEWEY, P.J.S. et al. A comparison of the neutral detergent-cellulase method with other laboratory methods for predicting in vivo of

maize silages from three European countries. **Animal Feed Science and Technology**, v.54, p.55-64, 1995.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Forage fiber analysis: apparatus reagents, procedures and some applications. **Agricultural Hantbook**, 379. Washington, D.C. 1970.

GRANT, R.J.; MERTENS, D.R. Development of buffer system for pH control and evaluation of pH effects on fiber digestion *in vitro*. **Journal of Dairy Science,** v. 75, p.1581, 1992.

HUNTINGTON, J.A.; GIVENS, D.I. The in situ technique for studying the rumen degradation of feeds: A review of the procedure. **Nutrition Abstracts and Reviews** (Series B), v.65, n.2, p.63-93, 1995.

JUDKINS, M.B.; KRYSL, L.J.; BARTON, R.K. Estimating diet digestibility: a comparison of 11 techniques across six different diets fed to rams. **Journal of Animal Science,** v.68, p.1405-1415, 1990.

JUNG, H.G.; VAREL, V.H. Influence of forage type on ruminal bacterial population s and subsequent *in vitro* fibre digestion. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.1523-35, 1988.

KENNEDY, P.M.; HAZLEWOOD, G.P.; MILLIGAN, L.P. A comparison of methods for the estimation of the proportion of microbial nitrogen in duodenal digesta, and of correction for microbial contamination in nylon bags incubated in the rumen of sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 52, p.403, 1984.

KHAZAAL, K.; ORSKOV, E.R. The in vitro gas production technique: an investigation on its potential use with insoluble polyvinylpyrrolidone for the assessment of phenolics-related antinutritive factors in browse species. **Animal Feed Science and Technology,** v.47, p.305-320, 1993.

KHAZAAL, K.; DENTINHO, M.T.; RIBEIRO, J.M. et al. Prediction of apparent digestibility and voluntary intake of hays fed to sheep: comparison between using fibre components, *in vitro* digestibility or characteristics of gas production or nylon bag degradation. **Animal Science,** v.62, p.527-538, 1995.

KHAZAAL, K.; DENTINHO, M.T.; RIBEIRO, J.M. et al. A comparison of gas production during incubation with rúmen contents *in vitro* and nylon bag degradability

as predictors of the apparent digestibility *in vivo* and the voluntary intake of hays. **Animal production,** v.57, p.105-112, 1993.

KITESSA, S.; FLINN, P.C.; IRISH, G.G. Comparison of methods used to predict the *in vivo* digestibility of feeds in ruminants. **Australia Journal Agricultural Research** , v. 50, p.825-841, 1999.

KOMAREK, A. R. A fiber bag procedure for improved efficiency of fiber analyses. **Journal of Dairy Science**, v.76, supl.(1), p.250, 1993.

KOZLOSKI, G.V.; PEROTTONI, J.; ROCHA, J.B.T. et al. Potencial nutricional assessment of dwarf elefhant grass (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Mott) by chemical composition, digestion and net portal flux of oxygen in cattle. **Animal Feed Science Technology,** v.104, p.29-40 2003.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science Technology**, v.57, p. 347-358, 1996.

LINDBERG, J.E. The effect of basal diet on the ruminal degradation of dry matter, nitrogen and cell walls in nylon bags. **Journal Agricultural Research,** v.11, p.159-169, 1981.

MAURÍCIO, R.M., MOULD, F.L., DHANOA, M.S. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, p.321-330, 1999.

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

McDOWELL, L. R., et al. Tabelas de composicão de alimentos da America Latina. **Universidade da Florida**, Gainesville, p.47, 1974.

MEHREZ, A.Z.; ORSKOV, E.R. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feed in the rumen. **Journal of Agricultural Science,** v.88, p.645-650, 1977.

MENKE, K.H.; STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. **Anim. Res. Dev**., v.28, p.07-55, 1988.

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

MOURIÑO, F.; AKKARAWONGSA, R.; WEIMER, P.J. Initial pH as a determinant of cellulose igeston rate by mixed ruminal microorganisms *in vitro.* **Journal of Dairy Science,** v.84, n.4, p.848-859, 2001.

MOULD, F.L., ØRSKOV, E.R.. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. **Animal Feed Science and Technology**. V.10, p.1-14, 1983.

NETTO, D. P. **Digestão do feno de Tifton 85 (*Cynodon ssp*) sob níveis de suplementação energética e suplementação nitrogenada**. 2006. 70p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

NSAHLAI, I.V.; UMUNNA, N.N. Comparison between reconstituted sheep faeces and rumen fluid inocula and between *in vitro* and *in sacco* degradability methods as predictors of intake an *in vivo* digestibility. **Journal of Agricultural Science,** v.26, p.235-248, 1996.

NOCEK, J.E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 8, p. 2051-2069, 1988.

NRC. 1996. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. (7th Ed.) National Academy Press, Washington, DC., USA

ORSKOV, E.R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal Agricultural Science**, v. 92, n. 1, p. 499-503, 1979.

PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.4, p.1063-1073, 1993.

PORDOMINGO, A.J.; WALACCE J.D.; FREEMAN, A.S. et al. Supplemental corn grain for steers grazing native rangeland during summer. **Journal Animal Science**, v.69, p.1678-1687, 1991.

ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P.J. The detergent system of analysis. In: JAMES, W.P.T.; THEANDER, O.(Eds.), **The analysis of Dietary Fibre in Food**. New York: Marcel Dekker, p.123-158, Chapter 9, 1981.

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

SAS, INSTITUTE INC. SAS'S User's Guide. SAS for Windows: **SAS Institute** inc. 1997, 46 p.

SENGER, C.C.D. **Comparação de técnicas na avaliação da qualidade de silagens de milho**. 2005. 126f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gás production. **Journal of Animal Science,** v.72, n.11, p.2980-2991, 1994.

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

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crop. **Journal British Grassland Society,** v.18, n.2, p.104-111, 1963.

VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v.46, p.829-835, 1963.

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

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

VILLALOBOS, G.C.; GONZÁLEZ, V.E.; ORTEGA, S.J.A. Técnicas para estimar la degradación de proteína y materia orgánica en el rumen y su importancia en rumiantes en pastoreo. **Técnica Pecuária do México**, Cidade do México, v.38,n.2, p.119-134, 2000.

WEAKLEY, D.C.; OWENS, F.N.; HEATH, D.G., et al. Particle size and soya bean meal value for ruminants. **Journal of Animal Science**, v.45 (supplement 1), p.268, 1977.

WEATHERBURN, M.W. Phenol-hypoclorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry,** v.39, p.971-974, 1967.

WEISS, W.P.; CONRAD, H.R.; ST. PIERRE, N.R. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, v.39, p.95-110, 1992.

WEISS, W.P. Predicting energy value of feeds. **Journal of Dairy Science**, v.76, p. 1802-1811, 1993.

WEISS, W.P. Estimation of the digestibility of forages by laboratory methods. **In: Forage Quality, Evaluation and Utilisation**. (Ed. G. C. Fahey Jr.). American Society of Agronomy, Crop Science Society of América, and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA, p. 644-81, 1994.

WHITEHOUSE, N.L.; OlSON,V.M.; SCHWAB,C.G. et al .Improved techniques for dissociating perticle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.1335-1343, 1994.

8 APÊNDICE

Apêndice A – Valor da digestibilidade (%) das dietas apresentadas pelos métodos[1]

Dieta	Repetição	Método	Digestibilidade
25	1	1	50,4
25	1	2	51,1
25	1	3	70,4
25	1	4	63,5
25	1	5	57,2
25	2	1	62,2
25	2	2	62,6
25	2	3	77,4
25	2	4	65,6
25	2	5	54,1
25	3	1	61,6
25	3	2	62,8
25	3	3	77,9
25	3	4	63,8
25	3	5	57,5
25	4	1	69,2
25	4	2	69,6
25	4	3	82,7
25	4	4	60,3
25	4	5	56,6
40	1	1	67,6
40	1	2	68,0
40	1	3	82,8
40	1	4	71,3
40	1	5	60,6
40	2	1	66,8
40	2	2	66,7
40	2	3	81,1
40	2	4	68,3

Apêndice A – (Continuação...) Valor da digestibilidade (%) das dietas apresentadas pelos métodos[1]

Dieta	Repetição	Método	Digestibilidade
40	2	5	55,8
40	3	1	62,1
40	3	2	62,3
40	3	3	77,8
40	3	4	70,1
40	3	5	56,3
40	4	1	72,4
40	4	2	73,2
40	4	3	83,9
40	4	4	69,4
40	4	5	60,7
55	1	1	68,4
55	1	2	69,1
55	1	3	82,4
55	1	4	75,9
55	1	5	64,4
55	2	1	72,1
55	2	2	72,7
55	2	3	84,8
55	2	4	74,3
55	2	5	61,2
55	3	1	56,3
55	3	2	57,9
55	3	3	75,7
55	3	4	-
55	3	5	59,7
55	4	1	67,9
55	4	2	69,4
55	4	3	83,1
55	4	4	73,9

Apêndice A – (Continuação...) Valor da digestibilidade (%) das dietas apresentadas pelos métodos[1]

Dieta	Repetição	Método	Digestibilidade
55	4	5	59,8
70	1	1	75,5
70	1	2	76,0
70	1	3	87,1
70	1	4	78,7
70	1	5	65,4
70	2	1	58,7
70	2	2	60,2
70	2	3	78,6
70	2	4	77,9
70	2	5	63,2
70	3	1	75,3
70	3	2	76,6
70	3	3	88,4
70	3	4	79,2
70	3	5	61,0
70	4	1	67,6
70	4	2	68,4
70	4	3	83,0
70	4	4	78,3
70	4	5	64,1

1; 2; 3= digestibilidade aparente da MS, MO, verdadeira da MO obtidas *in vivo*, respectivamente*;* 4= digestibilidade verdadeira da MO estimada *in situ*; 5= degradabilidade da MS estimada pela técnica *in situ* com taxa de passagem de 2%/h.

Apêndice B – Resumo da análise de variância para digestibilidade obtida por diferentes métodos

Causas de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	Valor do F	Probabilidade
Modelo	5	9239,3	1847,9	65,31	0,0001
Erro	89	2518,2	28,3		
Total	94	11757,5			

r^2=0,78; CV=8,15; Média=65,3

Apêndice C - Valor nutricional médio (%) das dietas apresentadas pelos diferentes métodos

Dieta	IVapMS	IVapMO	IVvMO	IVNDT	IVTvMO	ISDMS5	ISDMS3	WDvMO
25	60,8	61,5	77,1	58,8	63,3	48,9	52,9	83,8
40	67,2	67,5	81,4	64,2	69,8	49,6	54,4	85,4
55	66,2	67,3	81,5	64,9	74,7	51,0	57,2	87,4
70	69,3	70,3	84,3	68,1	78,6	54,4	59,5	89,5

Apêndice C – (Continuação...) Valor nutricional médio das dietas apresentadas pelos diferentes métodos

Dieta	WapMO	WNDT	WEENDT	FDNIV	FDNW
25	76,8	71,1	65,2	58,5	74,0
40	78,4	72,5	66,6	62,0	73,9
55	80,4	76,0	56,2	54,2	73,8
70	82,5	78,0	60,7	53,9	73,7

Apêndice D – Valores médios da digestibilidade *in vivo* e volume final de gás (ml) (Volfin), taxa de degradação (%/h) *in situ* (Txdegsit), taxa de degradação (%/h) *in vitro*/gases (Txdegvit), lag time (h) *in situ* (lagsitu) e lag time (h) *in vitro*/gases (lagvitro)

Dieta	Rep.	DapMS	DapMO	DVVMO	Volfin	Txdegsit	Txdegvit	Lagsitu	Lagvitro
25	1	50,38	51,08	70,36	181,0	0,026	0,0411	1,0	6,56
25	2	62,18	62,56	77,39	167,5	0,062	0,0287	0,9	4,04
25	3	61,55	62,75	77,91	183,5	0,028	0,021	0,0	2,54
25	4	69,24	69,63	82,67	136,9	0,006	0,024	0,0	6,68
40	1	67,56	67,98	82,80	188,0	0,034	0,0416	0,0	6,25
40	2	66,76	66,72	81,11	191,0	0,024	0,0326	0,0	3,84
40	3	62,13	62,29	77,80	195,4	0,021	0,0219	0,0	1,43
40	4	72,37	73,19	83,9	151,5	0,025	0,0246	0,4	3,34
55	1	68,4	69,10	82,38	190,1	0,024	0,0438	0,9	6,07
55	2	72,14	72,68	84,78	165,2	0,036	0,046	2,3	3,63
55	3	56,25	57,87	75,66	197,0	0,057	0,0243	8,6	0,863
55	4	67,92	69,37	83,12	170,9	0,014	0,0384	0,0	6,48
70	1	75,46	76,02	87,08	208,5	0,047	0,0456	0,7	6,00
70	2	58,73	60,18	78,56	211,0	0,041	0,0433	0,0	3,44
70	3	75,26	76,55	88,41	207,2	0,031	0,029	0,0	1,87
70	4	67,57	68,39	83,0	183,3	0,034	0,0453	0,9	6,36

9 ANEXO

Anexo A – Composição da solução tampão[1]

Composição da solução tampão		
Ingredientes:		Mililitro/Litro
Solução A		665
Solução B		135
Fluído ruminal		200
Total		1000
	Solução A	
Reagentes		Gramas/Litro
KH_2PO_4		10
$MgSO_4.7H_2O$		0,5
NaCl		0,5
$CaCl_2.2H_2O$		0,1
Uréia (grau reagente)		0,5
	Solução B	
Reagentes		Grama/Litro
Na_2CO_3		15
$Na_2S.9H_2O$		1

[1] Ankon

ANEXO B – Composição do meio de cultura[1]

Composição do meio de cultura		
Ingredientes:		Mililitro/Litro
Água destilada		520,30
Solução B		208,10
Solução C		208,10
Solução A		0,11
Solução Rezasurina		1,00
Solução Redutora		62,40
Total		1000,01
	Solução B	
Reagentes		Gramas/Litro
NH_4HCO_3		4,00
$NaHCO_3$		35,00
	Solução C	
Reagentes		Gramas/Litro
Na_2HPO_4		9,45
KH_2PO_4		3,32
$MgSO_4.7H_2O$		0,60
	Solução A	
Reagentes		Gramas/Litro
$CaCL_2.2H_2O$		132,00
$MnCl_2.4H_2O$		100,00
$CoCl_2.6H_2O$		10,00
$FeCL_3.6H_2O$		80,00
	Solução Redutora	
Reagentes		Quantidade/1000ml
Cysteine HCl (gramas)		6,25
Água destilada (ml)		950
NaOH 1M (ml)		40
Na_2S (gramas)		6,25
	Solução de Rezasurina	
Reagente		g/l
Rezasurina		1,0

[1] Adaptado de Menke et al. (1979).