



Relação entre Pressão e Volume para Implantação da Técnica in vitro Semi-automática de Produção de Gases na Embrapa Cerrados

Roberto Guimarães Júnior¹

Sérgio Lúcio Salomon Cabral Filho²

Francisco Duarte Fernandes³

Lourival Vilela²

Geraldo Bueno Martha Júnior²

Introdução

Diversos métodos químicos e biológicos foram desenvolvidos para estimar a digestibilidade e a degradabilidade de alimentos, predizendo, assim, o seu valor nutritivo. Os ensaios in vivo envolvendo produção animal e digestibilidade são os métodos mais precisos para determinar o valor nutricional dos alimentos. Entretanto, requerem considerável uso de animais, alimentos, mão-de-obra, tempo e alto custo financeiro. Já os estudos in situ estão sujeitos a superestimar a degradação química e microbiana no rúmen, tendo em vista a perda de partículas pelos poros dos sacos de náilon, utilizados nessa técnica. Dessa forma, metodologias in vitro de avaliação de alimentos têm sido adicionalmente utilizadas para a determinação do valor nutricional de forrageiras, apresentando altas correlações com o consumo e a digestibilidade in vivo (ØRSKOV, 2002). Essas técnicas possuem menor custo, exigindo menor tempo de execução e apresentam melhor controle da condição experimental (FONDEVILLA; BARRIOS, 2001).

A primeira geração de técnicas in vitro para avaliação de alimentos (TILLEY; TERRY, 1963; MENKE et al., 1979; AUFREIRE, 1982) proporcionou a estimativa da digestibilidade potencial dos alimentos, porém com referência mínima à dinâmica de fermentação ruminal. Já a segunda geração desses métodos incorpora as estimativas da cinética de degradação no retículo-rúmen, tanto pela mensuração na degradação ruminal de alimentos em sacos de náilon incubados no rúmen (MEHREZ et al., 1977; ØRSKOV; MCDONALD, 1979; ØRSKOV et al., 1980; SAUVANT et al., 1985; MICHALET-DOREAU et al., 1987), quanto pelas técnicas de produção de gases (BLUMMEL; ØRSKOV, 1993; PELL; SCHOFIELD, 1993; THEODOROU et al., 1994; CONE et al., 1996; SILESHI et al., 1996; MAURÍCIO et al., 1999).

A técnica in vitro semi-automática de produção de gases (MAURÍCIO et al., 1999) é uma metodologia eficiente para estudar o valor nutritivo de alimentos. Essa técnica utiliza um transdutor semi-automático

¹ Médico Veterinário, D.Sc., pesquisador da Embrapa Cerrados, guimaraes@cpac.embrapa.br

² Zootecnista, D.Sc., professor da Universidade de Brasília (UnB), slcabral@unb.br

³ Engenheiro Agrônomo, M.Sc., pesquisador da Embrapa Cerrados, duarte@cpac.embrapa.br

⁴ Engenheiro Agrônomo, M.Sc., pesquisador da Embrapa Cerrados, lvilela@cpac.embrapa.br

⁵ Engenheiro Agrônomo, D.Sc., pesquisador da Embrapa Cerrados, gbmartha@cpac.embrapa.br

acoplado a uma agulha, para mensuração da pressão no interior de frascos de vidro ao longo do processo fermentativo. Os valores de pressão são transformados em volume e, a partir daí, pode-se obter os valores de volume total de gases produzidos, bem como a produção de gases por hora. Essa metodologia se assemelha a outros procedimentos de digestibilidade in vitro que utilizam substrato moído, um meio de cultura anaeróbico e inóculo microbiano proveniente do fluido ruminal. O substrato pré-pesado é suspenso no meio anaeróbico, mantido a 39 °C e o fluido ruminal fresco é adicionado como inóculo. A partir desse momento, a produção de gases da fermentação começa a ser registrada, possibilitando a descrição da cinética de fermentação (WILLIAMS, 2000), uma vez que os gases produzidos durante o processo estão intimamente relacionados ao processo fermentativo dentro do rúmen (QUIN, 1943). Mould et al. (1999), avaliando silagens de milho em diferentes estágios de maturidade, comprovaram, especificamente para a técnica in vitro semi-automática de produção de gases, a relação entre os gases liberados pelo processo fermentativo e a degradabilidade da matéria orgânica. Maurício et al. (2001), ao comparar silagens de sorgo por meio dessa técnica, também observaram correlações elevadas e positivas nos tempos 6, 12, 24, 48 e 96 horas de fermentação para todos os híbridos avaliados (BR700 $r = 0,97$; BR701 $r = 0,99$; BR601 $r = 0,98$; AG2002 $r = 0,99$), evidenciando que o volume de gás produzido refletiu o processo de degradação da matéria seca fermentada. Em estudo semelhante, porém comparando silagens de genótipos de girassol, ensilados em quatro diferentes épocas, Pereira et al. (2001) encontraram correlações 0,99; 0,94; 0,98 e 0,98 para o V2000, Dk 180, M 734 e Rumbosol 91, respectivamente. Sendo assim, a técnica in vitro semi-automática de produção de gases possibilita a avaliação de um grande número de substratos, apresenta alta repetibilidade e oferece a possibilidade de descrição da cinética da fermentação no rúmen, estimando a taxa e a extensão da degradação de diferentes alimentos e dietas.

A utilização da "lei dos gases", de Boyle e Gay-Lussac⁶, para estimação do volume de gases produzidos a partir de valores de pressão não é adequada para a técnica in vitro semi-automática

de produção de gases, pois essa equação não leva em consideração a difusão dos gases na fase líquida (MAURICIO et al., 1999). Portanto, o pré-requisito para o uso da técnica é realizar sua calibração, considerando a relação entre pressão e volume para a condição específica do local em que a metodologia será utilizada.

O objetivo deste trabalho foi determinar a relação entre pressão e volume para implantação da técnica in vitro semi-automática de produção de gases na Embrapa Cerrados.

Aplicações da técnica

A técnica de produção de gases possui várias aplicações. A sua maior utilização é para avaliações de forragens, seja entre espécies, condições de cultivo, entre genótipos, híbridos ou variedades de uma mesma espécie e efeitos de tratamentos físicos ou químicos sobre a fermentabilidade de diferentes substratos (PEREIRA, 2003). Por meio dessa técnica, também se pode avaliar o efeito associativo de alimentos e melhores níveis de inclusão de um determinado alimento na dieta (CAMPOS et al., 2000). Ultimamente, com a crescente preocupação relacionada à emissão de gases de efeito estufa por ruminantes, essa metodologia também tem sido empregada para estimar o potencial de emissão de metano por ruminantes alimentados com diversos tipos de alimentos e dietas.

Uma outra aplicação da técnica de grande interesse para a nutrição animal seria estimar o consumo. Segundo Blummel e Ørskov (1993), cerca de 90 % da variação na ingestão de matéria seca (MS) digestível se explica a partir do modelo exponencial ajustado à produção in vitro de gases. Esses autores observaram valores para os coeficientes de correlação de 0,86 a 0,90 para a ingestão de MS digestível e o volume de gás produzido nos tempos de 8, 12, 24 e 36 horas. Rodrigues et al. (2002) concluíram que as constantes da produção in vitro de gases podem ser usadas para estimar o consumo voluntário de MS e MS digestível. Maurício et al. (2001) observaram correlações significativas entre os dados de produção de gases in vitro e os dados de digestibilidade in vivo. Blummel e Ørskov (1993), além de encontrarem altas correlações ($r = 0,88$) entre os parâmetros de produção de gases e o consumo de MS, observaram também boas correlações desses parâmetros com a ingestão de MS digestível ($r = 0,93$) e taxa de crescimento dos animais ($r = 0,95$).

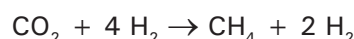
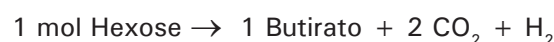
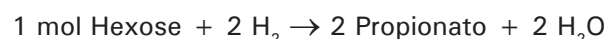
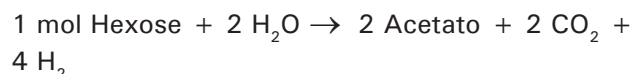
⁶ $PG = V_s / Pa * Pt$, sendo PG = produção de gases (ml); V_s = volume de gases na parte superior do frasco (ml); Pa = pressão atmosférica (psi); e Pt = pressão obtida pelo transdutor (psi).

As técnicas de produção de gases e dos saquinhos de náilon avaliaram de forma semelhante ($P > 0,05$) silagens de milho obtidas em diferentes estádios de maturidade (DIMARCO et al., 2002). Sileshi et al. (1996) e López et al. (1998) também constataram a possibilidade de estimar os dados de degradabilidade in situ por meio da técnica de produção de gases.

Origem dos gases

A produção de gases durante o processo de digestão de ruminantes é basicamente resultante da fermentação dos carboidratos, já que a fermentação da proteína produz baixa quantidade de gases e, na fermentação das gorduras, os gases podem ser desconsiderados (GETACHEW et al., 1998; MENKE et al., 1979). Os gases medidos pela técnica in vitro de produção de gases são gerados de forma direta, na fermentação das pentoses e hexoses, e de forma indireta, na neutralização dos ácidos graxos voláteis pelo tampão bicarbonato presente no líquido ruminal ou na saliva artificial (GETACHEW et al., 1998).

As estequiometria da fermentação das hexoses foram descritas por Hungate (1966) e encontram-se demonstradas abaixo:



A produção de propionato é a única reação que não gera dióxido de carbono. A quantidade de gases diretos produzidos é variável em diferentes proporções molares de AGV (STERN et al., 1997; GETACHEW et al., 1998). Maiores produções são verificadas principalmente quando o substrato é fermentado à acetato e butirato. A fermentação ruminal da proteína produz amônia, que reage com o CO_2 e precipita na forma de carbonato de amônia, diminuindo a quantidade de gases no frasco de fermentação (FONDEVILLA; BARRIOS, 2001). Substratos com elevada quantidade de carboidratos rapidamente degradáveis também tendem a produzir mais propionato e menos gases diretos (SARWAR et al., 1992). Em decorrência disso, Cone e Van Gelder (1999) recomendam a correção na produção

final de gases de acordo com a quantidade de proteína da amostra e Williams (2000) propõe a avaliação da relação acetato:propionato no final da fermentação, quando da comparação de dados de produção de gases entre substratos diferentes.

Fontes de variação da técnica

A preparação das amostras pode ser uma das fontes de variação dessa técnica. Isso porque, normalmente, os ensaios in vitro utilizam materiais moídos muito finos para garantir a homogeneidade em função da pequena quantidade de substrato utilizado. Segundo Mould et al. (2000), a redução do tamanho de partículas com o processo de moagem aumenta a taxa de degradação, pelo aumento da área superficial disponível para a colonização da microflora ruminal. Dessa forma, recomenda-se que os substratos empregados nesses ensaios tenham tamanho de partícula de 1 mm (MENKE et al., 1979; PELL; SCHOFIELD, 1993; THEODOROU et al., 1994; MAURICIO, 1999).

Outra fonte de variação é o fluido ruminal, pois esse pode variar em sua qualidade e homogeneidade de acordo com a espécie animal e suas condições fisiológicas, tipo de dieta fornecida, horário de coleta em relação ao horário de alimentação, entre outros fatores, que, em conjunto, podem afetar os perfis de degradação dos alimentos (SCHOFIELD, 2000). Por isso, é importante que, nos trabalhos que utilizam a técnica de produção de gases, sejam descritas as condições em que o líquido ruminal foi obtido (espécie, raça, dieta, condição fisiológica, sexo e hora de coleta em relação ao horário de alimentação) (PEREIRA, 2003).

Atenção também deve ser dada à manutenção dos valores de pH – entre 6,2 e 6,8 – e à temperatura da reação, que deve ser realizada a 39 °C. Valores de pH inferiores a 6,0 prejudicam a atividade das bactérias celulolíticas (RUSSEL; DOBROWSKI, 1980). Já o controle de temperatura a 39 °C deve ser feito de forma criteriosa, pois a atividade microbiana, o volume de gases produzidos e a pressão são influenciados diretamente pela temperatura (SCHOFIELD, 2000).

Material e Métodos

O experimento foi realizado no mês de novembro de 2007, no Laboratório de Química Analítica da

Embrapa Cerrados, situada a 15°35'30'' latitude Sul, 47°42'30'' longitude Oeste e a uma altitude de 1.007 m.

Foram utilizadas amostras de 1,0 g dos alimentos: capim estrela-roxa (*Cynodon nemfuensis*); fubá de milho; farelo de soja; capim-elefante (*Pennisetum purpureum*); capim-massai (*Panicum híbrido* vr. Massai) e amendoim forrageiro (*Arachis pintoï*), incubados em triplicata em frascos de vidro com volume aferido para 160 mL, previamente lavados e secos em estufa. Além dos frascos contendo amostras, foram utilizados frascos contendo apenas fluido ruminal e solução tampão, com o objetivo de corrigir a pressão produzida por outras fontes que não os alimentos. Em cada frasco foram adicionados manualmente, utilizando uma proveta, 90 mL de meio de cultura, conforme Theodorou et al. (1994) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição do meio de cultura.

Solução/reagente	Quantidade
Tampão	
NH ₄ HCO ₃ (g/L)	4,0
NaHCO ₃ (g/L)	35,0
Água destilada (mL)	1,0
Macromineral	
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (g/L)	9,45
KH ₂ PO ₄ (g/L)	6,20
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,60
Água destilada (mL)	1,0
Micromineral	
CaCl ₂ .2H ₂ O (g/L)	132,0
MnCl ₂ .4H ₂ O (g/L)	100,0
CoCl ₂ .6H ₂ O (g/L)	10,0
FeCl ₃ .6H ₂ O (g/L)	80,0
Solução Rezasurina (g/L)	0,01
Meio B	6,25
Cisteína HCl (g)	950,0
Água destilada (mL)	40,0
1 M NaOH (mL)	6,25
Na ₂ S.9H ₂ O (g)	6,25

Fonte: Theodorou et al. (1994)

Em sequência, os frascos foram vedados com rolhas de borracha (14 mm). Para evitar que qualquer tipo de fermentação ocorresse, os frascos foram mantidos a 4 °C durante a noite. Cinco horas antes

da inoculação, foram removidos da geladeira para estufa a 39 °C até o momento da inoculação. O inóculo utilizado foi proveniente de um bovino adulto mantido em pastagem de *Brachiaria brizantha* (com alta disponibilidade de forragem), sal mineral contendo 9 g/kg de fósforo e água à vontade. O líquido ruminal foi retirado manualmente com auxílio de uma mangueira plástica e armazenado em garrafas térmicas previamente aquecidas. No laboratório, o líquido ruminal foi filtrado através de duas camadas de panos de algodão sob injeção contínua de CO₂ e mantido em banho-maria a 39 °C, sendo, em seguida, adicionados 10 mL do inóculo por frasco de fermentação.

As leituras de pressão foram realizadas por meio de um transdutor de pressão modelo PressData, conectado a uma válvula de três saídas, sendo uma saída ligada ao transdutor; outra, à uma agulha 25 mm x 0,7 mm; e a terceira, à uma seringa graduada. As medições de pressão foram realizadas às 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 19, 24, 30, 36, 48, 72 e 96 horas de fermentação. Imediatamente após cada registro de pressão, o volume correspondente foi medido, por meio de uma seringa graduada, conforme demonstrado pela Fig. 1.

Para determinar a equação de regressão entre os dados de pressão e volume, utilizou-se o procedimento PROC REG (SAS, 2000).

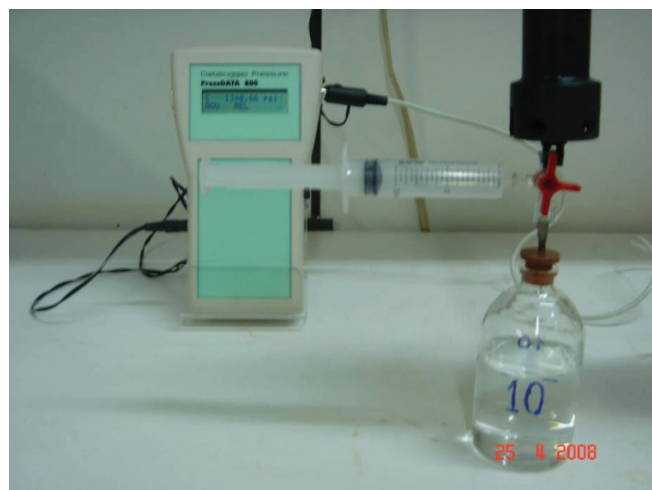


Fig. 1. Sistema de medição de pressão e volume de gases.
Foto: Roberto Guimarães Júnior

Resultados e Discussão

Na Fig. 2, é demonstrada a relação entre pressão e volume a partir de resultados de 860 leituras de

pressão associadas ao volume correspondente. A equação quadrática que descreve essa relação, nas condições da Embrapa Cerrados, foi: volume (mL) = 4,50231 x pressão (psi) + 0,05164 x pressão² (R²=0,996). O alto valor do coeficiente de determinação encontrado para a equação denota sua alta capacidade preditiva.

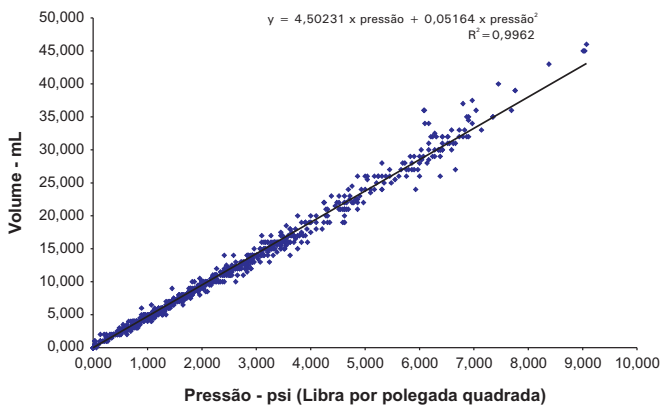


Fig. 2. Relação entre pressão e volume obtida por meio da técnica in vitro de produção de gases durante a fermentação de seis substratos.

A equação encontrada difere das equações obtidas em outras localidades, como no Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Cena [volume (mL) = 0,56 + 3,61 pressão (psi) + 0,18 pressão², (R² = 0,98)]; na universidade de Reading (Inglaterra) [volume (mL) = 0,18 + 3,69 pressão (psi) + 0,08 P², (R² = 0,99)]; e em Medellin [volume (mL) = -0,1375 + 5,1385 pressão (psi) + 0,0777 pressão² (P<0,0001; R² = 0,99)] (MAURÍCIO et al., 2003).

As diferenças encontradas nas equações estão diretamente relacionadas com as diferenças de altitude dos laboratórios. A Lei de Boyle define que o volume ocupado por uma certa quantidade de gás, a uma determinada temperatura, é inversamente proporcional à pressão exercida sobre ele. Uma vez que, em todos os ensaios, as mensurações foram realizadas na temperatura padrão de 39 °C, a altitude foi o único fator que influenciou a pressão.

Ao se comparar os valores correspondentes a 1 psi nos locais onde foram feitas as equações referenciadas e a derivada deste trabalho, fica evidente a influência ocasionada pela altitude na leitura sobre a pressão e, conseqüentemente, sobre o volume de gases correspondente. Em Reading, na Inglaterra, a uma altitude de 66 m,

1 psi = 3,95 mL; no Cena, em Piracicaba, a uma altitude de 780 m, 1 psi = 4,35 mL; em Medellin, que fica a 2.142 m de altitude, 1 psi = 5,07 mL; e, na Embrapa Cerrados, local onde realizou-se o presente trabalho, a uma altitude de 1.007 m, 1 psi = 4,55 mL. Os locais situados em altitudes mais elevadas apresentaram menores pressões atmosféricas, o que implicou maiores valores nas leituras de pressão de gás, em virtude da menor quantidade de gases diluídos na fase líquida. As diferenças entre as equações de regressão ratificam a importância da calibração da metodologia para condições específicas dos laboratórios onde a técnica in vitro semi-automática de produção de gases será utilizada.

Conclusões

A equação para transformação das leituras de pressão em volume de gases produzidos mensurados pela técnica in vitro semi-automática de produção de gases na Embrapa Cerrados é: volume (mL) = 4,50231 x pressão (psi) + 0,05164 x pressão² (R²=0,996).

Referências

- AUFREJRE, J. Utilisation d'enzymes cellulolytiques pour prevoir la digestibilite des fourrages. **Bulletin Technique C.R.Z.V.**, v. 49, p. 23-25, 1982.
- BLUMMEL, M.; ØRSKOV, E. R. Comparison of in vitro gas production and náilon bag degradability of roughages in predicting food intake in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v. 40, p. 109-119, 1993.
- CAMPOS, F. P.; SAMPAIO, A. A. M.; BOSE, M. L. V.; VIEIRA, P. F. Avaliação da digestibilidade in vitro/gás de diversas associações de volumosos - 1 - Produção de gás. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 37, 2000, Viçosa, **Anais...** Viçosa: SBZ, 2000. 1 CD-ROM.
- CONE, J. W.; VaN GELDER, A. H.; VISSCHER, G. J. W.; OUDSHOORN, L. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. **Animal Feed Science and Technology**, v. 61, p. 113-128, 1996.
- DI MARCO, O. N.; AELLO, M. S.; MOMDEDEU, M.; VAN HOUTTE, S. 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.

FONDEVILLA, M.; BARRIOS, A. The gas production and its application to the study of the nutritive value of forages. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 35, n. 3, p. 187-199, 2001.

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

Hungate, R. **The Rumen and Its Microbes**. New York: Academic Press, 1966.

LÓPEZ, S.; CARRO, M. D.; GONZÁLEZ, J. S.; OVEJERO, F. J. Comparison of different in vitro and in situ methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 73, n. 9, p. 99-113, 1998.

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

MAURÍCIO, R. M. M.; PEREIRA, L. G. R.; GONÇALVES, L. C.; RODRIGUES, J. A. S.; BORGES, I.; BORGES, A. L. C. C.; RODRIGUEZ, N. M.; PIRES, D. A. A. Avaliação das silagens de quatro híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) moench) através da técnica "in vitro" semi automática de produção de gás. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBZ, 2001. p. 1346-1348.

MAURÍCIO, R. M. M.; PEREIRA, L. G. R.; GONÇALVES, L. C.; RODRIGUEZ, N.M. Relação entre pressão e volume para implantação da técnica in vitro semi-automática de produção de gases na avaliação de forrageiras tropicais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 2, 2003.

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

MENKE, K. H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; STEINGASS, H.; FRITZ, D.; SCHNEIDER, W. The

estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they incubated with liquor in vitro. **Journal of Agricultural Science**, v. 93, p. 217-222, 1979.

MICHALET-DOREAU, B.; VERITE, R.; CHAPOUTOT, P. Methodologie de mesure de la degradabilite in sacco de l'azote des aliments dans le rumen. **Bulletin Technique C.R.Z.V.**, v. 69, p. 5-7, 1987.

MOULD, F. L.; SMITH, T.; OWEN, E.; PHIPPS, R. H. The relationship between DOMD and gas release estimated in vitro using the reading pressure technique system for four maize silages of different maturity. **Proceedings of the British Society of Animal Science**, p.150, 1999.

MOULD, F. L.; MAURÍCIO, R. M.; OWEN, E. Cumulative and rate of gas release of pure carbohydrates fermented in vitro using Reading Pressure Technique. In: GAS PRDICTON: FERMENTATION KINETICS FOR FEED EVALUATION AND TO ASSESS MICROBIAL ACTIVITY, 2000, Wageningen. **Proceedings ...** Wageningen: EAAP, 2000. p. 27-28.

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

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

ØRSKOV, E. R. **Trails and trails in livestock research**. Abeerden: Garamond, 2002. 204 p.

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

PEREIRA, L. G. R.; MAURÍCIO, R. M. M.; GONÇALVES, L. C.; RODRIGUEZ, N.M.; BORGES, I.; RODRIGUES, J. A. S.; SALIBA, E. O. S.; JAYME, D. G. Avaliação das silagens de quatro híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) moench) através da técnica "in vitro" semi automática de produção de gás. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba, **Anais...** Piracicaba: SBZ, 2001. 1 CD-ROM.

PEREIRA, L. G. R. **Potencial forrageiro da cultura do girassol (*Helianthus annuus* L.) para a produção de silagem.** 2003. 134 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

QUIN, J. I. Studies on the alimentary tract of merino sheep in South Africa 7. Fermentation in the forestomachs of sheep. **Onderspoor Journal of Veterinary Science and Animal Industry**, v. 2, p. 91-117, 1943.

RODRIGUES, M. A. M.; FONSECA, A. J. M.; SEQUEIRA, C. A.; DIAS-DA-SILVA, A. A. Digestion kinetic parameters from an in vitro gas production method as predictors of voluntary intake of forage by mature ewes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 95, p.133-142, 2002.

RUSSELL, J. B., DOMBROWSKI, D. B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, p. 604-610, 1980.

SARWAR, M.; FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M. L. Effects of varying forage and concentrate carbohydrates on nutrient digestibilities and milk production by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1533-1542, 1992.

SAS INSTITUTE. **SAS software: user's guide:** version 8.2. Cary, 2000. 291 p.

SAUVANT, D.; BERTRAND, D.; GIGER, S. Variations and prevision of the in sacco dry matter digestion of concentrates and by-products. **Animal**

Feed Science and Technology, v. 13, p. 7-23, 1985.

SCHOFIELD, P. Gas production methods. **Farm Animal Metabolism and Nutrition**. Wallingford: CAB International, 2000. 450 p.

SILESHI, Z.; OWEN, E.; DHANOA, M. S.; THEODOROU, M. K. Prediction of in situ rumen dry matter disappearance of Ethiopian forages from an in vitro gas production technique using a pressure transducer, chemical analyses or in vitro digestibility. **Animal Feed Science and Technology**, v. 61, p. 73-87, 1996.

STERN, M. D.; BACH, A.; CALSAMIGLIA, S. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2256-2276, 1997.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; McALLAN, A. B.; FRANCE, J. A new gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminal 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 crops. **Journal of British Grassland Society**, v.18, n. 2, p. 104-111, 1963.

WILLIAMS, B. A. Cumulative Gas-production Techniques for Forage Evaluation. In: GIVENS, D. I.; OWEN, E.; AXFORD, R. F. E; OMED, H. M. (Ed.). **Forage Evaluation in Ruminant Nutrition**. Wallingford: CAB International, 2000. 475 p.

**Comunicado
Técnico, 144**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Cerrados

Endereço: BR 020 Km 18 Rod. Brasília/Fortaleza
Caixa postal: 08223 CEP 73310-970

Fone: (61) 3388-9898 **Fax:** (61) 3388-9879
sac@cpac.embrapa.br

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

1ª edição

1ª impressão (2008): 200 exemplares

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**



**Comitê de
publicações**

Presidente: *José de Ribamar N. dos Anjos*
Secretária Executiva: *Maria Edilva Nogueira*

Expediente

Supervisão editorial: *Fernanda Vidigal Cabral de Miranda*
Equipe de revisão: *Fernanda Vidigal Cabral de Miranda*
Francisca Elijani do Nascimento
Jussara Flores de Oliveira Arbués

Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*
Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*
Alexandre Moreira Veloso