

JUAN RAMÓN OLALQUIAGA

**ADAPTAÇÃO DE UM MÉTODO PARA ESTIMAR DIGESTIBILIDADE  
"IN VITRO"**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como um dos requisitos para obtenção do grau de "MESTRE EM ZOOTECNIA"-Área de Nutrição de Ruminantes.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS  
LAVRAS -:- MINAS GERAIS





JUAN RAMÓN OLALQUIAGA

**ADAPTAÇÃO DE UM MÉTODO PARA ESTIMAR DIGESTIBILIDADE  
"IN VITRO"**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como um dos requisitos para obtenção do grau de "MESTRE EM ZOOTECNIA" - Área de Nutrição de Ruminantes.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS  
LAVRAS - MINAS GERAIS



JUAN RAMÓN OLAVEAGA

RELATÓRIO DE UM MÉTODO PARA ESTIMAR DIGESTIBILIDADE  
"IN VITRO"

Este trabalho é dedicado à memória do Sr. Dr. João de Deus de Aguiar, que faleceu em 1940, e a quem se deve a iniciativa de se estudar a digestibilidade dos alimentos para o gado em condições "in vitro".

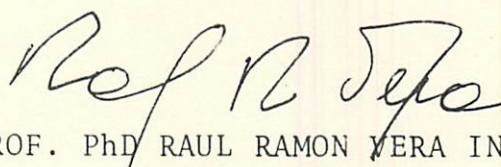


ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS  
LAVRAS - MINAS GERAIS

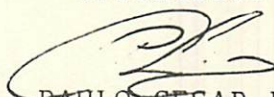
111



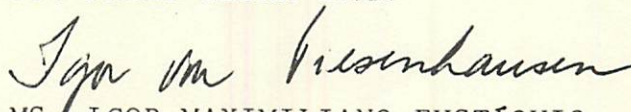
APROVADA : 14/11/79



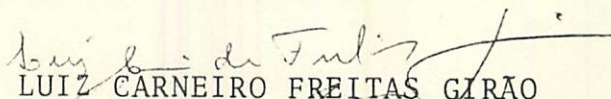
PROF. PhD RAUL RAMON VERA INFANSON  
Orientador



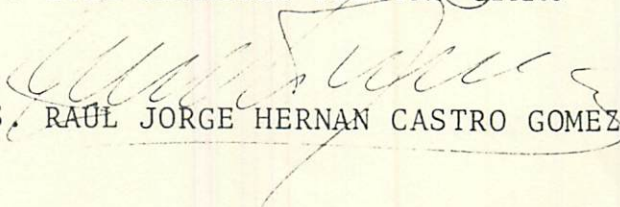
PROF. Dr. PAULO CESAR LIMA



PROF. MS IGOR MAXIMILIANO EUSTÁQUIO  
VIVACQUA VON TIESENHAUSEN



PROF. MS. LUIZ CARNEIRO FREITAS GIRÃO



PROF. MS. RAUL JORGE HERNAN CASTRO GOMEZ

À

Meus pais, Vasco e Marica

Irmãos, Marinês, Juanita, Felipe

Helena

DEDICO



## AGRADECIMENTOS

A Escola Superior de Agricultura de Lavras.

Ao professor Kenneth Maxwell Autrey pela dedicada orientação durante o curso, na idealização e condução inicial deste trabalho.

Ao professor Raul Ramón Vera pela eficiente e desinteressada orientação durante o curso e na fase final do trabalho.

Aos professores do curso de Pós-graduação, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas pela sua consideração.

Ao Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura de Lavras na pessoa dos professores Weber Almeida, Márcio de Castro Soares e Rogério Santoro Neiva pela valiosa colaboração durante o curso.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) na pessoa do Dr. Esteban Alberto Pizarro.

À Universidade Federal de Viçosa, na pessoa do Professor Roberto Maciel Cardoso, pelo fornecimento de parte das amostras uti-

lizadas no presente trabalho.

A todos que de alguma forma colaboraram para a condução deste trabalho.



## BIOGRAFIA DO AUTOR

JUAN RAMÓN OLALQUIAGA, filho de Maria I. Pérez e Felipe Ramón Olalquiaga, nasceu na cidade de Florida (Uruguay), aos 12 dias do mês de outubro de 1948.

Iniciou o curso de Engenharia Agronômica, na Faculdade de Agronomia de Montevideo (Uruguay) em 1971, tendo concluído o mesmo em fevereiro de 1976 na Escola Superior de Agricultura de Lavras.

Em março do mesmo ano começou o Curso de Pós-Graduação, beneficiado por uma bolsa do PRODECA.

Foi contratado pela ESAL, Departamento de Zootecnia a partir de fevereiro de 1978, onde desempenha suas funções até o presente.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO .....	1.
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4.
2.1. Preparo do substrato .....	6.
2.2. Algumas fontes de variação relacionadas com o inócu lo.....	8.
2.2.1. Alimentação do animal doador do inóculo .....	8.
2.3. Meio incubador .....	11.
2.4. Tempo de incubação .....	14.
2.5. Filtragem .....	16.
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	17.
3.1. Ensaio de digestibilidade "in vivo" .....	18.
3.2. Ensaio de digestibilidade "in vitro" .....	19.
3.3. Análise estatística .....	21.
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23.
4.1. Composição bromatológica dos alimentos .....	23.



4.2. Ensaio de digestibilidade "in vivo" .....	25.
4.3. Ensaio de digestibilidade "in vitro" .....	28.
4.4. Valores do pH após fermentação .....	34.
4.5. Correlação entre digestibilidade "in vivo" e "in vitro" .....	36.
5. CONCLUSÕES .....	39.
6. RESUMO .....	40.
7. SUMMARY .....	42.
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44.
9. APÊNDICE .....	52.

## LISTA DE QUADROS E FIGURAS

QUADRO		Página
1	Correlações e equações de regressão entre os valores "in vivo" e "in vitro" da digestibilidade da matéria seca determinados por vários autores.....	5.
2	Temperatura média mensal mínima e máxima correspondente aos períodos dos ensaios .....	17.
3	Causa de variação e esperanças matemáticas dos quadros médios para o modelo proposto por BARNES (5).	22.
4	Composição bromatológica média das matérias secas dos fenos de capim 'Napier' e capim-gordura I e das amostras de feno de capim-gordura II e soja obtidas em outros laboratórios .....	24.
5	Consumo diário médio de matéria seca por animal expresso como gramas de matéria seca por unidade de tamanho metabólico por dia (g/UTM.d), médias, erro padrão da média e coeficiente de variação para os fenos de 'Napier' e Capim-gordura.....	27.



QUADRO	Página
6 Coeficientes de digestibilidade "in vivo" da matéria seca (DMS,%) por animal, média, erro padrão da média e coeficientes de variação para os fenos de 'Napier' e capim-gordura.....	29.
7 Quadrados médios correspondentes as fontes de variação analisadas, teste de F e E (QM).....	31.
8 Coeficientes médios de digestibilidade da matéria seca, média e obtidos no ensaio "in vitro" para os quatro fenos e por rodada.....	33.
9 Valores de pH após 48 horas de fermentação, média, e coeficientes de variação por forragem e rodada, pH de inóculo por rodada.....	35.
FIGURA	
1 Correlação entre a digestibilidade "in vivo" (DMS) e "in vitro" (DIVMS) da matéria seca.....	38.

## 1. INTRODUÇÃO

Tem se indicado que um dos três parâmetros básicos dos estudos acerca da dieta dos ruminantes, é o conhecimento da digestibilidade da mesma. Para tal dispõe-se de diversos métodos que são classificados como diretos e indiretos. Estes últimos, têm recebido grande atenção dos pesquisadores, principalmente em função dos problemas e desvantagens inerentes aos métodos convencionais, ISHIZAKI et alii (22), assim como dos resultados satisfatórios obtidos com o uso dos métodos indiretos.

Fundamental destaque tem sido dado aos métodos de digestibilidade "in vitro", BARNES (2). Sua importância é salientada por JOHNSON (25), quando afirma que no desenvolvimento e seleção de um desses métodos, o pesquisador pode inicialmente decidir se seus objetivos são reproduzir o mais apuradamente quanto possível, os processos que ocorrem no rumen, ou apenas qualitativa e quantitativamente, parte deles. Isto abre grandes possibilidades de estudos, como:

1. Digestão dos carboidratos estruturais e fatores que afetam esse processo.



2. Utilização de nitrogênio protéico e não protéico pelos microorganismos do rúmen.
3. Estudo do metabolismo em culturas mistas e puras de microorganismos ruminais.
4. Estudo dos fenômenos da velocidade de reação, definindo-se o tempo que exige um sistema não estático.
5. Estudo da simbiose .
6. Estudo da avaliação de forragens.
7. Estudo da bioenergética da fermentação ruminal.

GOMIDE (19) dá ênfase à importância da técnica da fermentação "in vitro" como forma de estimar a digestibilidade das forragens, fundamentando-se no interesse existente nos valores relativos ou absolutos. No primeiro caso, os valores obtidos constituem informações valiosas em estudos de introdução, seleção e melhoramento de forrageiras. Especialmente, dado à sua facilidade de execução, tempo, quantidade de forragem requerida e baixo custo. No segundo, há interesse em predizer o valor da digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, proteína ou energia a ser observado "in vitro", auxiliando o nutricionista, tanto na avaliação de alimentos como em programas nutricionais.

O objetivo desse trabalho foi a adaptação de um método de digestibilidade "in vitro" para o Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura de Lavras que atenda às exigências de pesquisas nas áreas de Forragicultura e Nutrição de Ruminantes.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Vários métodos de fermentação "in vitro" têm sido descritos, alguns mais simples, outros mais complexos, embora todos apresentem como objetivo comum o propósito de reproduzir as condições próprias do rúmen-retículo. As principais diferenças encontradas são (JOHNSON, 24):

- tipos de recipientes usados no processo de fermentação;
- quantidades de substrato a fermentar;
- volume de inóculo, solução tampão e suas relações com a quantidade de substrato;
- obtenção e preparo do inóculo;
- tempo de fermentação;
- gaseificação contínua ou não com  $CO_2$ ;
- incubação em estufa ou banho-maria, com ou sem agitação contínua.

GOMIDE (19) observa que os métodos variam também, com relação ao critério de avaliação ou parâmetros a serem medidos:

- digestibilidade "in vitro" dos carboidratos estruturais;



- desaparecimento "in vitro" da matéria seca ou orgânica ou da energia;
- produção total de gases ou ácidos graxos voláteis, etc.

WARNER, citado por JOHNSON (24) estabelece os seguintes critérios, para testar a validade de um sistema "in vitro" verdadeira - mente representativo das condições "in vivo".

1. Manutenção do número normal, reprodução e proporção de microorganismos.
2. Manutenção das taxas normais de digestão da celulose, amido e proteína, e normal interação entre eles.
3. Habilidade para predizer resultados quantitativos "in vivo".

Com base nos critérios expostos, diversos trabalhos têm demonstrado ser possível o uso da técnica do rúmen artificial para estimar a digestibilidade "in vivo". Especificamente, o método descrito por Tilley e Terry (45) como atestam os altos coeficientes de correlação ( $r$ ) e baixos erros padrões das estimativas ( $s_y/x$ ), encontrados para diversas forragens em diferentes condições, Quadro 1.

Devido à complexidade do sistema envolvido nos métodos "in vitro", são muitas as fontes de variação a que estão sujeitos os resultados obtidos por este tipo de método, COWLISHAW (11), BARNES (2), GOMIDE (19), BARNES (4).

BARNES (2) classificou os erros a que estão sujeitos os resultados dos métodos "in vitro" em duas categorias. Aqueles que contribuem para a imprecisão dos resultados ou erros aleatórios e "Bias", que se referem à ineficiência dos resultados "in vitro" em estimar



QUADRO 1 - Correlações e equações de regressão entre os valores "in vivo" e "in vitro" da digestibilidade da matéria seca determinados por vários autores.

Referência	Substrato	r	Equação de regressão	s y/x
TILLEY & TERRY (45) <sup>+</sup>	Fenos de gramíneas	-	$\hat{Y} = 1,01 + 0,99X$	$\pm 2,31$
OH et alii (35) <sup>+</sup>	Fenos de gramíneas e de leguminosas	0,88	$\hat{Y} = 16,70 + 0,74X$	$\pm 2,96$
JOHNSON & DEHORITY (23) <sup>+</sup>	Fenos de gramíneas e de leguminosas	0,90	$\hat{Y} = 7,10 + 0,83X$	$\pm 2,10$
SCALES et alii (40) <sup>*</sup>	Gramíneas frescas	0,92	$\hat{Y} = 10,2 + 0,79X$	$\pm 2,40$
SCHIMID et alii (43) <sup>+</sup>	Silagem de milho	0,83	$\hat{Y} = 2,59 + 0,92X$	$\pm 1,78$
SCHIMID et alii (22) <sup>+</sup>	Silagem de sorgo	0,91	$\hat{Y} = 17,69 + 0,26X$	$\pm 1,90$
ISHIZAKI et alii (22) <sup>+</sup>	Fenos de gramíneas	0,83	$\hat{Y} = -4,36 + 0,99X$	-
VIEIRA & GOMIDE (48) <sup>+</sup>	Fenos de gramíneas	0,91	$\hat{Y} = -7,91 + 1,30X$	$\pm 4,35$
FARIAS et alii (16) <sup>*</sup>	Silagem de capim-elefante	0,97	$\hat{Y} = 14,83 + 0,86X$	$\pm 2,1$
KUMERO & DEHORITY (28) <sup>*</sup>	Rações com alta energia	0,85	$\hat{Y} = 26,40 + 0,60X$	-
VIEIRA & GOMIDE (48) <sup>*</sup>	Fenos de gramíneas	0,93	$\hat{Y} = 9,33 + 1,285X$	$\pm 3,92$

+ - 24 horas de fermentação.

\* - 48 horas de fermentação.



a digestibilidade aparente. No primeiro caso encontram-se os erros decorrentes do manuseio não exatamente igual das amostras, o que contribui ao aumento da variância na análise, tanto entre, como dentro de rodadas. No segundo caso, pode-se ter altos coeficientes de correlação, mas as equações de regressão deduzidas, podem ter um valor limitado de predição, quando o erro da equação é muito amplo. Pelos erros de vício são responsáveis os erros aleatórios, assim como a variação nas determinações "in vivo" já que os resultados "in vitro" não podem ser melhores que os resultados "in vivo" nos quais são baseados.

Os erros genericamente denominados "aleatórios" podem estar relacionados com o preparo do substrato, inóculo, meio incubatório, tempo de incubação e recuperação de substrato não digerido, GOMIDE (19), BARNES (2).

### 2.1. Preparo do Substrato

Em relação à temperatura de secagem, TILLEY & TERRY (45), não encontraram diferenças significativas nos resultados de digestibilidade "in vitro" em amostras secas a 40 e 100 °C. Temperaturas de secagem elevadas, 100 °C ou mais, seriam prejudiciais se o processo se prolongasse por mais de quatro dias.

COWLISHAQ & UNSWORTH (11), também não encontraram diferenças significativas nos coeficientes de digestibilidade "in vitro" quando secaram amostras de forragem de baixa qualidade, 1,5% de proteína bruta (PB), 39,8% de fibra bruta (FB), 4,5% de cinzas (C), a 65 e



105 °C. A resultados concordantes com os anteriores, tinham chegado SCHMID et alii (42) quando compararam secagem em estufa por 16 horas a 50, 65, 80 e 100 °C em três variedades de sorgo e três de milho, utilizadas na forma de silagem. Quando compararam secagem por liofilização por 24 horas com os quatro métodos em estufa, a liofilização possibilitou valores mais altos de digestibilidade "in vitro" da matéria seca. Nesses alimentos, na sua forma natural, o processo de liofilização foi superior aos métodos de secagem em estufa, exceto a 100 °C que por sua vez não foi diferente da secagem a 80 e 50 °C, sendo que o material seco a 65 °C forneceu os valores mais baixos de digestibilidade "in vitro" da matéria seca.

VAN SOEST (46), informa que a temperatura de secagem afeta as determinações de lignina. Em alguns casos, quando a lignina é usada como indicador da digestibilidade, esta pode ser uma fonte de variação. Em outro trabalho, o mesmo autor indica que temperaturas de 50 °C produzem modificações insignificantes, sendo esta conseqüentemente a temperatura de secagem máxima recomendável para análise de lignina, VAN SOEST (47).

Em relação ao tamanho das partículas, DEHORITY et alii (12) trabalhando com fenos de gramíneas de leguminosas, em diferentes estágios vegetativos, concluíram que a redução no tamanho das partículas da forragem, devido à moagem por esmagamento, determinou maiores coeficientes de digestibilidade "in vitro" da celulose, quando comparados com amostras moídas em peneiras de 40 malhas/cm<sup>2</sup> (40 mesh). Observaram ainda, uma relação direta com o tempo de moagem e o coeficiente de digestibilidade até um período máximo de 72 horas, após o qual



não foram encontradas diferenças significativas. TILLEY & TERRY (45) determinaram que a influência do tamanho das partículas nos resultados "in vitro" era maior nas forragens de baixa digestibilidade. Para eles, este efeito deve-se ao rompimento, em maior intensidade, das paredes celulares permitindo a penetração de enzimas em regiões onde normalmente são excluídas. Ainda em relação ao tamanho das partículas, BAUMGARDT & OH (7), trabalhando com dois fenos de alfafa e dois fenos de gramíneas, moídos em peneiras de 40 e 60 "mesh", determinaram que o menor tamanho aumentou a digestibilidade "in vitro" da celulose. Isto foi verdadeiro para os dois grupos, embora a digestibilidade da celulose nas gramíneas tenha sido afetada mais intensamente. Este fato não provocou diferenças significativas nas correlações "in vitro" e "in vivo", levando os autores a sugerir que o tamanho das partículas deve ser padronizado em cada laboratório.

## 2.2. Algumas fontes de variação relacionadas com o inóculo

Sabe-se que modificações na dieta de um ruminante traz como consequência modificações na população de microorganismos do rúmen, HUNGATE (21) e EADIE (14), sendo que isto pode refletir-se na atividade do inóculo.

### 2.2.1. Alimentação do animal doador do inóculo

HOPSON et alii (20) trabalhando com a técnica de saquinhos de nylon, encontraram que a alfafa quando ministrada como alimento, aumenta significativamente a digestibilidade da celulose em três



gramíneas que foram utilizadas no experimento. Por outro lado, as gramíneas não melhoraram a digestibilidade quando serviram como alimento e substrato. Em concordância, BEZEAU (8) determinou diferenças significativas na atividade do inóculo proveniente de animais alimentados com alfafa e fenos de gramíneas respectivamente, na habilidade para digerir celulose. A variação foi menor com inóculo proveniente de animais alimentados com alfafa. Ainda, NELSON et alii (34) em estudo que incluiu alfafa, gramíneas e silagem de milho como dietas e substratos, detectou diferenças significativas na digestibilidade da matéria seca, devido à dieta do animal doador. A silagem de milho foi a dieta que possibilitou a maior variação, enquanto que Azevem (*Lolium perenne*, L.), a menor.

( ROBERTSON & VAN SOEST (38) trabalhando com dois tipos de dieta, feno de gramíneas e concentrado nas dietas dos animais doadores, encontraram diferenças significativas entre os valores obtidos de digestibilidade dos constituintes da parede celular. Indica o autor, que o inóculo proveniente de animais alimentados com feno utilizaram melhor os constituintes da parede celular do concentrado que aqueles provenientes de animais alimentados somente com concentrado.) Enquanto isto, MONSON & UTLEY (31), trabalhando com dietas constituídas de feno de gramíneas e dietas concentradas em substratos de feno de gramíneas, milho grão e misturas de ambos em proporções variáveis, não encontraram diferenças significativas atribuíveis à dieta. Embora pequenas, as diferenças foram consistentes e contraditórias ao determinado por ROBERTSON & VAN SOEST (38), no sentido de que as dietas na base de forragens estimulariam a digestibilidade do concentrado, no caso, grão de milho. /



Enquanto isso, BATISTA (5) em recente trabalho que incluiu duas raças bovinas (Holandês e Gir), uma bubalina (Jaffarabadi) e dois tipos de alimento, (silagem de 'Napier' com 10% de fubã de milho e feno de capim gordura), que também serviram como substrato. Encontrou que a silagem como alimento do animal doador propiciou coeficientes de digestibilidade "in vitro" da matéria seca, significativamente, mais altos ( $P < 0,01$ ) que o alimento feno de capim gordura, para as três raças e ambos substratos.

Os trabalhos acima sugerem que esta é uma importante fonte de variação, que deve ser levada em consideração na interpretação dos dados. Sendo importante uma padronização em termos de cada laboratório de acordo com a disponibilidade de alimentos.

A influência do estado nutricional do animal no momento da coleta do fluido ruminal, sobre os resultados "in vitro" não é muito claro, devido aos poucos trabalhos conduzidos neste sentido, embora a maioria dos pesquisadores tenham opiniões formadas a este respeito, JOHNSON (27). Alguns laboratórios têm usado períodos de jejum prolongados, 16 a 18 horas, COWLISHAW & UNSWORTH (11). Nestas condições o inóculo não teria as concentrações máximas de microorganismos, os quais estão presentes 1 a 6 horas após a alimentação do animal, JOHNSON (27). Inóculos coletados nestas condições, assim como volumes reduzidos do mesmo (1 ml) e suspensões de lavado de células, fornecem valores reduzidos na digestibilidade da fibra e a variação entre amostras é aumentada, TILLEY & TERRY (45). Outros laboratórios têm utilizado coleta com jejum prévio menos prolongado, 2 a 5 horas, BAUMGARDT (6), MOORE & DUHAM (32), BARNES (4), bem como coleta sem jejum prévio, NELSON (34).



Neste sentido, é imprescindível uma padronização deste passo para reduzir as variações, assim como parece aconselhável usar volumes maiores de inóculo, coletado de animais com processos digestivos ativos e aceitar os erros que isto poderia introduzir, TILLEY & TERRY (45).

Na obtenção e preparo do inóculo tem sido introduzidas algumas modificações principalmente em função do estudo proposto. DEHORITY (13) estudando a digestibilidade da celulose utilizou um lavado de células com tampão-fosfato e centrifugação diferencial procurando um inóculo constituído principalmente de bactérias celulolíticas. JOHNSON (27) assinala que o lavado de células diminui a variação devida a dias diferentes de extração, mas isto não é, necessariamente, vantajoso em estudos com o método em dois estágios.

Em outros casos e principalmente quando se estuda a digestibilidade das matérias seca e orgânica, o líquido é extraído através de fístula, seguidamente filtrado através de número variável de camadas de tecido poroso e o filtrado resultante é usado como inóculo, BARNES (4), MOORE e DUNHAM (32).

### 2.3. Meio incubador

Em relação ao meio incubador a maioria dos pesquisadores concordam que a saliva artificial de McDougall satisfaz as exigências básicas do sistema, TILLEY & TERRY (45), BAUMGARDT (6), DEHORITY (13), SCHMID (43), NELSON (34). No entanto outros trabalhos têm sido conduzidos em meios que diferem do anterior na concentrações dos solutos,



ou na composição da solução tampão baseada em um tampão fosfato, assim como no enriquecimento com ureia, biotina e ácido valérico. Este enriquecimento é um intento de suprir necessidades dos microorganismos celulolíticos, principalmente quando se trabalha com suspensões de lavados de células, DEHORITY (12) JOHNSON & DEHORITY (26).

SCHMID et alii (41) determinaram que a adição de ureia ao meio incubador, melhorou a digestibilidade do substrato, principalmente quando este possuía altos níveis de carboidratos solúveis (grão de milho); não tendo acontecido o mesmo quando o substrato foi alfafa. O melhor nível por eles determinado para uma aproximação da máxima digestão para o grão de milho, planta de milho e planta de sorgo, foi 10 mg de ureia por 0,25g de matéria seca de substrato. A adição de ureia não melhorou a precisão das determinações.

COWLISHAW & UNSWORTH (11) encontraram que a adição de 6 mg de ureia ao meio, aumentou a digestibilidade da matéria orgânica, quando o segundo estágio (digestão com pepsina ácida) foi suprimido. O período do primeiro estágio foi de 48 horas, sendo o substrato uma mistura de forragens com 11,1% de P.B. Em outro experimento, a adição de ureia aumentou a digestibilidade da matéria orgânica (MO), mas quando a primeira fase do método foi de 48 horas os efeitos não foram significativos. O estudo envolveu uma forragem de baixa qualidade (1,5% P.B.).

EL-SHAZLY et alii (15), encontraram que a adição de amido diminui a digestão da celulose "in vivo" (técnica de saquinhos de nylon) e "in vitro". Este efeito foi diminuído quando o meio foi enriquecido com uréia.



A adição de carboidratos não parece aconselhável quando se pretende estudar a digestão da matéria seca, matéria orgânica e de carboidratos, JOHNSON (27).

Devido as limitadas variações de temperatura existentes no rúmen, grande atenção deve ser dispensada durante a manipulação do inóculo até sua distribuição nos recipientes incubadores, os quais já devem encontrar-se à temperatura de incubação neste momento. Uma vez nos recipientes tanto a incubação em banho-maria como em estufa incubadora satisfazem as necessidades de temperatura, desde que as flutuações não sejam muito largas ( $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ). Deve se prestar atenção à elevação da temperatura, já que as bactérias do rúmen parecem ser especialmente sensíveis a temperaturas superiores a  $40^{\circ}\text{C}$  e se expostas por períodos de tempo maiores, perdas acentuadas na atividade podem vir a ocorrer, JOHNSON (24). A temperatura escolhida para fermentação "in vitro" geralmente tem sido  $39^{\circ}\text{C}$ , DEHORITY (13), BAUMGARDT (6), embora temperaturas de  $28-39^{\circ}\text{C}$ , também tenham sido usadas, TILLEY & TERRY (45), COWLISHAW & UNSWORTH (11).

Na manutenção das condições de anaerobiose, duas técnicas têm sido utilizadas com maior frequência. Uma delas consiste em saturar o meio de cultivo inoculado com  $\text{CO}_2$  seguida de imediata vedação do recipiente incubatório, com rolha provida com válvula de Bunsen; neste caso admite-se que os próprios gases de fermentação mantêm as condições de anaerobiose, TILLEY & TERRY (45). A outra que se baseia numa corrente contínua de  $\text{CO}_2$  através do recipiente incubatório para manter essas condições, apresenta como desvantagem uma maior complexidade, GOMIDE (19), entretanto pode ser aconselhável seu uso, no caso de pretender-se tomar amostras do meio a diferentes intervalos



de tempo, JOHNSON (25).

Desde que o poder tampão do meio incubador é a única forma de controlar internamente o pH dos processos fermentativos "in vitro", pode ser necessário o ajustamento do mesmo, dependendo de fatores como, proporção de solução tampão para quantidade de inóculo, quantidade de substrato e natureza do material que está sendo fermentado. Esse pH deve ser mantido dentro dos limites de 6,7 a 7,0 durante toda a primeira fase do método, já que é dentro desta faixa que se dá a maior atividade microbiana no rúmen. Este ajustamento pode ser feito com carbonato de sódio e ácido fosfórico dependendo da situação. O uso de proporções maiores de solução tampão em relação ao volume de inóculo e quantidade de substrato diminuem as variações internas de pH, TILLEY & TERRY (45), JOHNSON (23).

#### 2.4. Tempo de incubação

BAUMGARDT et alii (6), em pesquisa "in vitro" que incluiu 31 forragens (fenos de gramíneas e de leguminosas), verificaram coeficientes médios de digestibilidade da celulose de 47,6 e 60,0% para períodos de incubação de 24 e 48 horas, respectivamente. Os coeficientes de correlação entre digestibilidade "in vitro" da celulose e a energia digestível (0,85 e 0,78 para os períodos de 24 e 48 horas) foram altamente significativos.

BAUMGARDT e OH (7), trabalhando com forragens com digestibilidade "in vivo" conhecida e quatro períodos de fermentação (18, 24, 30 e 48 horas) verificaram que os coeficientes de correlação para



digestibilidade "in vitro" e "in vivo" da celulose foram altamente significativos para os quatro períodos. A variação entre rodadas foi significativamente menor para o período de 48 horas de fermentação.

CARVALHO (10) estudando três períodos de fermentação (24, 36 e 48 horas) em uma gramínea tropical (*Tripsacum fasciculatum* Trin), verificou um acréscimo linear na digestibilidade "in vitro" da matéria seca e da celulose, apresentando o período de 48 horas o mais alto grau de digestão. O período de 24 horas de fermentação apresentou maior variação entre os coeficientes de digestibilidade da matéria seca e da celulose que os períodos de 36 e 48 horas. Neste trabalho não foram fornecidos dados acerca da correlação entre a digestibilidade "in vitro" determinada nos diferentes períodos de fermentação e "in vivo".

( O período de tempo requerido para uma máxima digestão pelos microorganismos do rúmen é dependente de fatores relacionados com o substrato, percentagem de fibra bruta, grau de lignificação, tamanho de partículas, suprimento de nutrientes necessários para uma máxima atividade dos mesmos, COWLISHAW & UNSWORTH (11), assim como do inóculo, fonte e atividade do mesmo. Assim sendo, o melhor período de fermentação seria aquele que maximizasse a correlação "in vivo" e "in vitro" e minimizasse as variações entre e dentro das rodadas, condições estas que devem ser estabelecidas para cada laboratório, BAUMGARDT & OH (7).



## 2.5. Filtragem

O método de recuperação do resíduo não digerido em ensaios "in vitro" pode ser uma fonte de variação. Neste sentido, a recuperação em papel de filtro pode resultar em valores menores da digestibilidade "in vitro" em relação a outros materiais mais porosos, devido a uma possível retenção de material celular sintetizado durante a fermentação, MOORE e MOTT (33). Desta forma ROBERTSON et alii (41) trabalhando com dois métodos de filtragem, em papel de filtro e cadinhos de vidro poroso, verificaram diferenças dignificativas entre os dois métodos. Entretanto essas diferenças deixaram de ser significativas, quando as estimativas, com papel de filtro foram corrigidas em relação às determinações em branco. Os autores concluíram que o papel de filtro pode substituir o cadinho desde que tais determinações sejam conduzidas simultaneamente para servirem como correção.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nas instalações do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Minas Gerais. A ESAL tem como coordenadas geográficas  $21^{\circ}14'30''$  de latitude Sul e  $45^{\circ}00'10''$  de Longitude Oeste, apresentando a região, um clima do tipo CWA, BRASIL (9).

As temperaturas mínimas e máximas médias correspondentes ao período experimental estão relacionadas no Quadro 2.

QUADRO 2 - Temperatura média mensal mínima e máxima correspondente aos períodos dos ensaios.

Mês	Ano	Mínima °C	Máxima °C
Outubro	1977	15,9	28,0
Novembro	1977	17,4	26,0
Fevereiro	1978	17,6	30,6
Março	1978	17,4	30,9

FONTE : Ministério da Agricultura - Instituto Nacional de Meteorologia - 5º Distrito de Meteorologia - Estação Climatológica Principal de Lavras.



### 3.1. Ensaio "in vivo"

O ensaio "in vivo" foi realizado com duas forragens, feno de capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv), denominado Gordura I preparado após floração e feno de capim Elefante, (*Pennisetum purpureum*, Schum), variedade 'Napier', com aproximadamente 40 dias de idade. Foram utilizados oito carneiros sem raça definida, com idade variando entre 3,5 a 4,5 anos, com peso médio de 54,3 kg, alojados nas gaiolas metabólicas um mês após a tosquia.

A técnica utilizada foi a coleta total de fezes por meio de bolsas coletoras com as quais os animais foram equipados durante o tempo em que durou o ensaio. A digestibilidade aparente determinada pela diferença entre matéria seca consumida e a presente nas fezes durante um período experimental de nove dias, para cada uma das forrageiras. Para isto pesava-se o alimento fornecido duas vezes ao dia, fazendo-se uma amostragem simultânea para posteriores análises no laboratório. Os animais eram alimentados duas vezes, diariamente, às 7:00 e 16:30 horas e minutos antes procedia-se à retirada das fezes. As sobras de alimentos do dia anterior eram retiradas apenas no horário da manhã.

As fezes da manhã eram levadas ao laboratório após a coleta da manhã onde eram pesadas e determinada a matéria seca, juntamente com as da tarde do dia anterior. As sobras, eram levadas ao laboratório nos mesmos horários que as fezes, quando era determinada a matéria seca e guardadas.

O período pré-experimental foi de vinte dias, tempo necessá-



rio aos animais adaptarem-se às gaiolas, assim como, às bolsas coletoras e estabilizarem o consumo. Os mesmos foram vermifugados no momento de serem confinados e tiveram sempre à disposição água e mistura mineral.

### 3.2. Ensaio "in vitro"

O objetivo do ensaio de digestibilidade "in vitro" foi a adaptação do método descrito por TILLEY & TERRY (45) e modificado por MOORE e DUNHAM (32).

Neste ensaio utilizaram-se quatro fenos. Além dos fenos de gordura e Napier utilizados no ensaio "in vivo", com os quais preparou-se uma amostra composta para cada um deles, proporcional ao consumo diário, foram utilizados feno de capim gordura (*Melinis minutiflora*, Beauv) denominado Gordura II e de Soja (*Glycine javanica*, Lin) com digestibilidade "in vivo" da matéria seca (DMS) de 60,0 e 60,7% determinadas em outros laboratórios, (Universidade Federal de Viçosa e Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Sete Lagoas, respectivamente). Enquanto que as análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da ESAL.

O líquido ruminal foi obtido através de fístula de rúmen, em dois bovinos de raça Holandesa de 480 e 450 kg de peso vivo. Os mesmos recebiam uma dieta composta de silagem de milho consumida a vontade e um suplemento de 1,0 kg/dia de farelo de soja e suplemento mineral, oferecido em duas refeições diárias. A extração era feita dentro das duas primeiras horas após os animais terem recebido o su-



plemento protéico da manhã.

A solução tampão fora preparada no dia anterior ao início de cada incubação e de acordo com a fórmula de McDOUGALL (29). O  $\text{CaCl}_2$  era adicionado após a solução ser gaseificada com  $\text{CO}_2$  até um pH entre 6,9 a 7,0 e ter sua temperatura elevada a  $39^\circ\text{C}$ , em banho-maria.

O líquido do rúmen era filtrado através de duas camadas de um tecido de porosidade apropriada (cheese-cloth) no momento da extração. Imediatamente transportado ao laboratório em banho-maria ( $39-40^\circ\text{C}$ ) onde era filtrado novamente através de quatro camadas de tecido e uma lâ de vidro, sob atmosfera de  $\text{CO}_2$ . Continuando em atmosfera de  $\text{CO}_2$ , era dosado e adicionado à solução tampão na proporção de 1:4, sendo gaseificado com  $\text{CO}_2$  por mais 8 a 10 minutos. Depois, era distribuído em vidros de aproximadamente 100 ml, onde estava uma amostra de aproximadamente 0,5 grama de feno moído, em peneira de 1mm. Os vidros eram tampados com rolhas providas de válvulas de Bunsen e incubados em banho-maria a  $39^\circ\text{C}$ .

Após 48 horas de incubação, o meio era acidificado com 6 ml de HCl a 20% a fim de deter-se a fermentação. Logo após, era inoculado com uma solução de pepsina (1:1000 U1) a 10% (p/v) iniciando-se, assim, o segundo estágio do método. Os vidros permaneciam por mais 48 horas nas mesmas condições após o que procedi-se à filtração de seu conteúdo em papel de filtro qualitativo, de 12 cm de diâmetro, da marca KLABIN, previamente secos e tarados, TILLEY e TERRY (47).

A rodada compreende todos os processos desde a preparação da saliva artificial, até a determinação da matéria seca residual, após a fermentação com pepsina. Isto repetia-se semanalmente, de tal for

ma que cada rodada representa uma repetição no tempo.

### 3.3. Análise Estatística

A análise de variância dos resultados da digestibilidade "in vitro" da matéria seca (DIVMS) de 5 rodadas foi realizada segundo o modelo matemático, BARNES (5):

$$Y_{ijk} = u + R_i + F_j + (FR)_{ij} + e_{kij}$$

onde :

$Y_{ijk}$  = valor observado

$u$  = média geral

$R_i$  = efeito da rodada  $i$

$F_j$  = efeito da forragem  $j$

$(FR)_{ij}$  = efeito da interação entre  $F$  e  $R$

$e_{kij}$  = erro experimental dentro de rodadas

O modelo foi admitido como misto, sendo o efeito da média geral e o efeito da forragem, considerados fixos e o efeito das rodadas admitidos aleatório.

A estimativa dos componentes da variância para cada uma das fontes de variação foram determinadas como segue :



QUADRO 3 - Causa de variação e esperanças matemáticas dos quadrados médios para o modelo proposto por BARNES (5).

C.V.	G.L.	E (Q.M.)
Rodadas, $R_i$	4	$\sigma^2 + 12 \sigma^2_R$
Forragem, $F_j$	3	$\sigma^2 + 4\sigma^2_{RF} + 5\sum_j F_j^2$
Rodadas x Forragens (FR) $_{ij}$	12	$\sigma^2 + 15/4 \sigma^2_{RF}$
Determinações dentro de rodadas $e_{k(ij)}$	40	$\sigma^2$
TOTAL	59	





#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1. Composição bromatológica dos alimentos

A composição bromatológica média das forragens utilizadas nos ensaios "in vivo" e "in vitro", estão no Quadro 4.

Neste Quadro ainda pode-se observar as diferenças existentes na composição bromatológica das forragens utilizadas revelando a baixa qualidade do feno de capim-gordura I, com níveis protéicos da ordem de 3,89% na matéria seca e valores relativamente altos de fibra bruta, 35,78%. Esta baixa qualidade foi determinada possivelmente pelo avançado estágio de maturação em que foi fenado este capim. O feno de 'Napier' foi elaborado quando as plantas estavam, aproximadamente com 40 dias de idade, estas plantas cresceram em solo rico em matéria orgânica e revelaram um teor protéico mais elevado, 15,64% e mais baixo em fibra bruta 27.18% que o capim-gordura I. Esses dois fenos foram escolhidos propositadamente, procurando-se obter forragens de alta e baixa digestibilidade aparente da matéria orgânica.

O feno da soja apresenta percentagem semelhante de proteína

QUADRO 4 - Composição bromatológica média das matérias secas dos fenos de capim 'Napier' e capim-gordura I e das amostras de feno de capim-gordura II e soja obtidas em outros laboratórios.

Feno	% MS	Composição				
		PB	FB	EE	ENN	CINZA
'Napier'	86,90	15,64	27,18	2,11	41,09	13,97
Capim gordura I	91,05	3,89	35,78	1,81	53,63	4,86
Soja perene	90,91	15,66	29,56	1,90	43,80	9,08
Capim gordura II	91,74	9,65	23,13	1,14	51,67	14,11



QUADRO 4 - Composição bromatológica média das matérias secas dos fenos de capim 'Napier' e capim-gordura I e das amostras de feno de capim-gordura II e soja obtidas em outros laboratórios.

Feno	% MS	Composição				
		PB	FB	EE	ENN	CINZA
'Napier'	86,90	15,64	27,18	2,11	41,09	13,97
Capim gordura I	91,05	3,89	35,78	1,81	53,63	4,86
Soja perene	90,91	15,66	29,56	1,90	43,80	9,08
Capim gordura II	91,74	9,65	23,13	1,14	51,67	14,11

e fibra bruta ao feno de 'Napier' sendo que o feno denominado Gordura II, mostrou teores mais baixos de proteína (9,65%) e fibra bruta (23,13%).

#### 4.2. Ensaio de Digestibilidade "in vivo"

Na determinação da digestibilidade aparente da matéria seca foram utilizados quatro carneiros por cada uma das forragens. No Quadro 4, são mostrados os dados de consumo expressos em gramas de matéria seca por unidade de tamanho metabólico (PV 0,75) por dia, (g/UTM.d).

Observa-se no Quadro 4 que o consumo de matéria seca por animal foi baixo para ambos os fenos, quando comparado com dados encontrados mais comumente na literatura, MILFORD & MINSON (30), VILLOBOLOS (49), FERREIRA (17). Entretanto, MILFORD & MINSON (30) fazem estimativas da ordem de 36,8, 37,7 e 39,7 g/kg PV<sup>0,73</sup> para forragens tropicais (*Setaria sphacelata*, *Digitaria decumbens*, *Chloris gayana*) respectivamente que apresentam uma digestibilidade aparente da ordem de 55%. No caso do capim-gordura I, alguns fatores tais como baixo conteúdo de proteína e idade da planta, podem explicar o baixo consumo observado concordando com MILFORD & MINSON (30), REID & JUNG (37). O baixo consumo de feno de 'Napier' observado pode estar relacionado de alguma forma, com o solo em que desenvolveu-se a forragem um antigo confinamento e não escapa a possibilidade da existência de algum fator que diminuiu-se sua aceitabilidade.

O fato do feno de capim-gordura I apresentar uma maior varia



bilidade que o 'Napier' explica-se pela sua pior qualidade, já que o consumo está relacionado com o conteúdo de proteína da forragem e em alguns casos com a idade da planta e sua digestibilidade, MILFORD & MINSON (30).

Os valores mais baixos da digestibilidade aparente da matéria seca (Quadro 5), observados no feno de capim-gordura I, explicam-se pela menor qualidade do mesmo, determinado por um baixo teor de proteína e alto de fibra, o que possivelmente limitaria sua digestibilidade em relação ao feno de 'Napier'.

SILVA & GOMIDE (44) ao estudarem o consumo e digestibilidade de três gramíneas tropicais em bovinos, observaram que o capim-gordura mostrou o maior decréscimo no consumo, apresentando ainda um decréscimo na digestibilidade aparente da matéria seca quando aumentou o estágio de maturação de 2 para 8 meses de idade. Nesse trabalho foi observado um coeficiente de digestibilidade de 40,2% aos 8 meses de idade, algo mais alto ao observado na pesquisa. O feno de 'Napier' apresentou valores de digestibilidade aparente da matéria seca mais baixos que os encontrados por OLUBAJO et alii (35), ao trabalharem com esta gramínea com 6 semanas de idade. FERREIRA (17), trabalhando com silagem deste capim, com 15,7% de matéria seca no material fresco, determinou valores de 57,01 e 52,11 de digestibilidade da matéria seca, com e sem adição de raspa de mandioca, respectivamente, no momento da ensilagem. FONSECA (18) estudando a digestibilidade aparente da matéria seca do capim 'Napier' em bovinos, cortado aos 3 meses de idade determinou valores médios de 68,48%, bastante mais altos aos encontrados neste trabalho.



QUADRO 5 - Consumo diário médio de matéria seca por animal expresso como gramas de matéria seca por unidade de tamanho metabólico por dia (g/UTM.d), médias, erro padrão da média e coeficiente de variação para os fenos de 'Napier' e Capim-gordura.

Feno	Animais				$\bar{X}$	s ( $\hat{m}$ )	C.V. (%)
	1	2	3	4			
'Napier'	41,04	38,81	38,20	36,67	38,68	0,90	4,68
Capim gordura I	14,57	19,19	17,52	17,72	17,25	0,97	11,25



Observando-se os consumos médios, relativamente baixos, para ambas as forragens e de acordo com BALCH & CAMPLING (1), o nível de consumo de matéria seca apresenta uma relação inversa com o tempo de retenção do alimento no trato digestivo, era de se esperar coeficiente de digestibilidade mais elevados aos observado, desde que o tempo de permanência do alimento no retículo rúmen está associado positivamente, com a digestibilidade do mesmo, HUNGATE (21).

#### 4.3. Ensaio de Digestibilidade "in vitro".

Neste ensaio foram utilizadas as quatro forragens ou seja , os fenos de 'Napier' e capim gordura I, com coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca determinados, como já foi descrito neste trabalho e os fenos de soja e capim-gordura II com coeficientes de digestibilidade determinados em outros laboratórios.

A análise de variância através de modelo empregado revelou diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) entre rodadas, forragens ( $P < 0,01$ ) e para a interação rodadas x forragens ( $P < 0,05$ ).

Quando se realizou o desdobramento da interação observou-se que o feno de capim-gordura II foi o responsável pela interação rodadas x forragens (R x F), com um valor de F significativo ao nível de 1%, sendo que as outras forragens apresentaram valores não significativos.

No Quadro 6 são mostradas as médias de digestibilidade "in vitro" da matéria seca para as quatro forragens. O feno de capim 'Napier' apresenta os valores mais altos, 75,07% e o capim-gordura I

QUADRO 6 - Coeficientes de digestibilidade "in vivo" da matéria seca (DMS, %) por animal, média, erro padrão da média e coeficientes de variação para os fenos de 'Napier' e capim-gordura.

Feno	Animais				$\bar{X}$	s ( $\hat{m}$ )	C.V. (%)
	1	2	3	4			
'Napier'	58,58	60,46	56,67	57,54	58,31	0,82	2,80
Capim gordura I	31,50	35,00	31,48	40,00	34,49	2,01	11,68



as mais baixas, 41,36%. Também, como era de se esperar, as médias foram estatisticamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. A variação para cada um dos fenos, representada pelo coeficiente de variação, mostrou valores desde 1,38% ( $s=1,04$ ) para o feno de 'Napier' até 3,90 ( $s=2,62$ ) para o capim gordura II. Concomitantemente este feno apresentou o maior valor para o erro padrão da média  $\pm 1,17$ .

Os valores dos componentes da variância que aparecem no Quadro 7, mostram uma estimativa de 2,40 para a variância ( $s^2$ ), associada com as determinações dentro da rodada. Esse valor parece um pouco menor que aqueles encontrados por BARNES (3) e (4), que foram de 2,8 e 2,6, respectivamente, sendo que esse autor trabalhou com um número maior de dados. No primeiro trabalho que inclui dados de cinco laboratórios, as estimativas para esse parâmetro variaram de 0,22 até 10,62. No segundo, com dados de quatorze laboratórios, a variação foi de 0,5 a 7,3.

O componente de variância estimado para a interação,  $s^2(RF)$ , apresenta um valor de 0,82, inferior aos encontros por BARNES (3) e (4), que foram de 2,35 e 3,90 e que variaram de menos de 1,0 a 16,3, no primeiro trabalho e de 0,27 a 6,74, no segundo.

Os parâmetros analisados anteriormente parecem ser de importância relativamente maior, para mostrar o aperfeiçoamento do método, já que o primeiro representa a variação média entre as repetições dentro de cada rodada, sendo aqui onde residem as causas dos "erros aleatórios", BARNES (2). Uma interação significativa mostra que a magnitude da variação na digestibilidade da matéria seca para as forra -

QUADRO 7 - Quadrados médios correspondentes as fontes de variação analisadas, teste de F e

E (QM).

CV	GL	QM	F	E (QM)
Rodados (R)	4	19,5555	8,15 <sup>**</sup>	1,43
Forragens (F)	3	3074,5711	631,11 <sup>**</sup>	Efeito fixo
R x F	12	4,8717	2,03 <sup>*</sup>	0,66
Resíduo 40	40	2,3998		2,40

\*\* P < 0,01

\* P < 0,05

CV 1,54%



gens não foi a mesma de rodada para rodada. No presente trabalho a interação foi significativa, todavia o componente da variância estimado foi muito baixo,  $s^2$  (RF) = 0,82, sendo que o desdobramento mostrou que uma variação estatisticamente maior, ocorreu apenas entre as rodadas para o feno de capim gordura II, o que indica ter sido um problema relacionado com essa amostra em particular.

O método de digestibilidade "in vitro", envolve um sistema biológico complexo e como tal estará sujeito a muitas variações inerentes ao próprio sistema que podem vir a aumentar a variação dentro e entre rodadas. Há outros fatores, ainda, que podem contribuir a aumentar essa variação, como manuseio não exatamente igual das amostras, variações na eficiência do inóculo em diferentes dias de coleta, lugar exato da retirada dentro do rúmen, tempo de realização das fases críticas.

O alto valor observado do F ( $P < 0,01$ ) para forragens, está dentro do esperado e explica-se pelas diferenças inerentes a cada uma das forragens que determinam coeficientes de digestibilidade da matéria seca "in vitro" muito diferentes, como pode ser observado no Quadro 8.

QUADRO 8 - Coeficientes médios de digestibilidade da matéria seca, média e obtidos no ensaio "in vitro" para os quatro fenos e por rodada.

Feno	Rodada n <sup>o</sup>					$\bar{X}$	s	s ( $\hat{m}$ )	C.V. (%)
	1	2	3	4	5				
	DIVMS %								
'Napier'	73,79	76,09	74,11	75,55	75,80	75,07a	1,04	0,46	1,38
Capim gordura I	41,41	40,51	40,22	43,47	41,21	41,36d	1,27	0,57	3,07
Soja	62,49	61,09	60,65	63,14	63,49	62,17c	1,25	0,56	2,01
Capim gordura II	66,17a	64,56b	65,40b	69,57a	70,46a	67,23b	2,62	1,17	3,90

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P < 0,05)



#### 4.4. Valores de pH após a fermentação

Os valores de pH após 48 horas de fermentação foram computados para quatro das cinco rodadas, analisadas em relação a digestibilidade da matéria seca. Esses valores assim como os valores de pH do inóculo para cada uma das rodadas aparecem no Quadro 9.

Embora as variações entre e dentro das rodadas fossem relativamente baixas e os valores encontrados possam ser considerados normais, já que todas estão próximas de neutralidade, a análise de variância mostrou diferenças significativas para rodadas ( $P < 0,01$ ), forragens ( $P < 0,01$ ) e para a interação rodadas x forragens ( $P < 0,01$ ). Realizado o desdobramento da interação, o feno de soja foi o que apresentou diferença significativa ( $P < 0,01$ ) entre rodadas, sendo também este feno o que apresentou as maiores médias de variação dentro das rodadas.

As médias das quatro rodadas para os valores de pH das forragens variaram desde 6,89 para o feno de capim-gordura II com um coeficiente de variação de 0,75% até 7,04% para o feno de soja que apresentou o coeficiente de variação mais elevado,  $CV = 0,65\%$ . A média geral para os valores de pH das quatro forragens e de quatro rodadas foi de 6,95 unidades de pH, com um coeficiente de variação de 1,01%.

Os valores de pH para o inóculo variaram de 6,25, na primeira rodada computada, até 6,65 na segunda com uma média de 6,44 unidades, apresentando um coeficiente de variação de 2,72%.



QUADRO 9 - Valores de pH após 48 horas de fermentação, média, e coeficientes de variação por forragem e rodada, pH de inóculo por rodada.

Feno	Rodada nº				$\bar{X}$	s ( $\hat{m}$ )	C.V. (%)
	1	2	3	4			
'Napier'	6,96	6,88	7,03	7,02	6,97	0,04	1,04
Capim gordura I	6,92	6,82	6,92	7,01	6,92	0,04	1,12
Soja	6,93	6,95	7,13	7,15	7,04	0,06	1,65
Capim gordura II	6,93	6,82	6,90	6,93	6,89	0,03	0,75
$\bar{X}$	6,93	6,87	6,99	7,03	6,95	0,03	1,01
pH inóculo	6,25	6,65	6,35	6,50	6,44	0,09	2,72



#### 4.5. Correlação entre digestibilidade "in vivo" e "in vitro".

A correlação e equação de regressão entre os coeficientes de digestibilidade "in vivo" e digestibilidade "in vitro", da matéria seca são apresentadas na Figura 1.

O coeficiente de correlação encontrado nesta pesquisa (0,90) é semelhante aos encontrados por VIEIRA & GOMIDE (48) ao trabalharem com três gramíneas tropicais em quatro épocas de corte com um coeficiente de correlação, entre digestibilidade "in vivo" e "in vitro" da matéria seca com 48 horas de fermentação, igual a 0,91, com um coeficiente de determinação de 82%. SCHMID et alii (43) trabalhando com 25 silagens de milho e 26 de sorgo encontraram coeficientes de correlação de 0,83 e 0,91 para as silagens de milho e sorgo, respectivamente. OH et alii (36) trabalhando com 32 amostras de gramíneas e 24 de leguminosas temperadas, determinaram coeficientes de correlação para a digestibilidade "in vivo" e "in vitro" da matéria seca de 0,88 para todas as forragens e de 0,83 e 0,97 para gramíneas e leguminosas respectivamente. Desta forma o coeficiente determinado parece situar-se na média dos valores encontrados na literatura. Entretanto o baixo nível de significância ( $P < 0,05$ ) encontrado para este parâmetro pode explicar-se em parte pelo baixo número de observações disponíveis, apenas 4 para a análise, determinando um baixo número de graus de liberdade para o mesmo. O valor de  $t$  calculado foi de 2,86 que está bastante próximo do valor de  $t$  tabelado  $P < 0,01$  que é igual a 2,93 para dois graus de liberdade.



A equação de regressão obtida  $\hat{y} = 4,72 + 0,79 X$  com um erro padrão da estimativa,  $s_{y/x}$ , de 6,85. Este erro padrão parece bastante maior que aqueles encontrados na literatura, VIEIRA & GOMIDE (48), TILLEY e TERRY (45), OH et alii (36), JOHNSON e DEHOR ITY (25). Em parte este alto valor pode ser devido ao baixo número de graus de liberdade com que foi estimado apenas 2, todavia o coeficiente de determinação relativamente alto, significa que 81% da variação total é explicada pela associação entre as variáveis.



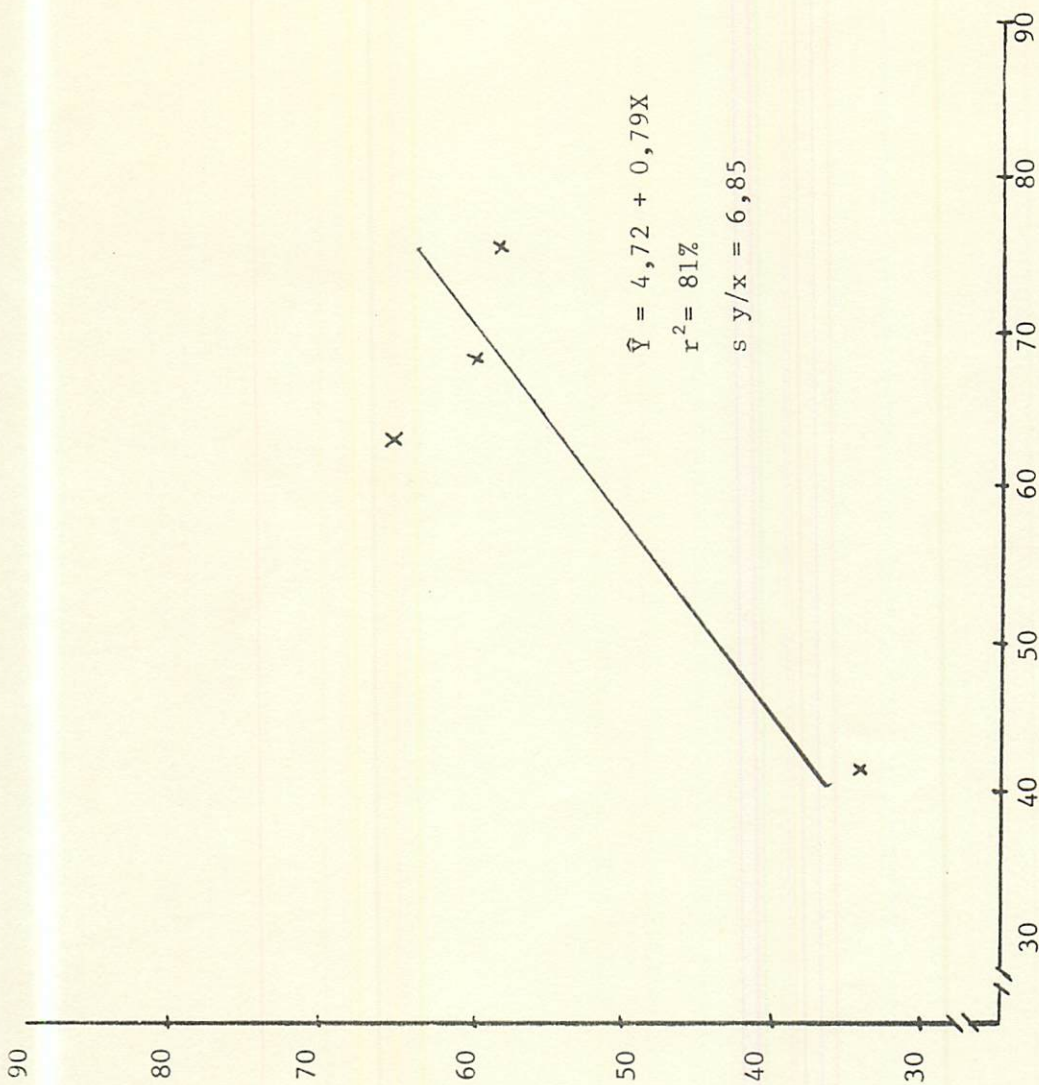


FIGURA 1 - Correlação entre a digestibilidade "in vivo" (DMS) e "in vitro" (DIVMS) da matéria seca.

## 5. CONCLUSÕES

Nas condições do presente trabalho pode concluir-se:

1. Tanto o feno de capim 'Napier' como o de capim-gordura I apresentaram consumos baixos, 38,68 g/UTM.d e 17,25 g/UTM.d respectivamente.

2. A variabilidade no consumo e digestibilidade foi maior para o feno de capim gordura I do que para o feno de capim 'Napier'.

3. O feno de 'Napier' apresentou uma digestibilidade "in vivo" da matéria seca superior ao feno de capim gordura I.

4. No ensaio de digestibilidade "in vitro" o feno de capim 'Napier' apresentou o coeficiente mais elevado (75,07%) e o feno de capim gordura I o mais baixo (41,35%) sendo que a maior variação foi verificada no feno de capim-gordura II.

5. A relação entre a digestibilidade "in vivo" e "in vitro" é representada por  $\hat{Y} = 4,72 + 0,79X$ , com um coeficiente de determinação de 81%.



## 6. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a adaptação de um método de digestibilidade "in vitro" para implantação no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura de Lavras. Para isto foram realizados dois ensaios, um "in vivo" e outro "in vitro".

No primeiro ensaio foram utilizados fenos de capim-elefante, variedade 'Napier' (*Pennisetum purpureum* Schum), elaborado quando as plantas apresentaram aproximadamente 40 dias de idade e de capim gordura (*Melinis minutiflora* Beauv) denominado capim gordura I, preparado com o capim após floração. O ensaio foi realizado com quatro carneiros por forragem, sendo que o método utilizado na determinação da digestibilidade aparente da matéria seca foi a coleta total de fezes. Os consumos observados foram de 38,68 e 17,25 g/UTM.d, para os fenos de 'Napier' e capim gordura I, sendo que os respectivos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca foram 58,3% e 34,49%, com coeficientes de variação de 2,80% e 11,68%.

O ensaio "in vitro" foi conduzido com os fenos já descritos, os de soja (*Glycine javanica*, Lin) e capim gordura, denominado capim gordura II, com coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca de 60,70% e 60,00%, determinadas em outros laboratórios. Foi utilizado o método de TILLEY e TERRY (47), sendo computados cinco rodadas para a análise estatística. Os coeficientes de digestibilidade "in vitro" da matéria seca variaram desde 75,07% para o feno de 'Napier' e 41,36% para o feno denominado capim gordura II. Foram observados ainda, diferenças significativas para as forragens ( $P < 0,05$ ), para rodadas ( $P < 0,05$ ) e para a interação rodadas x forragens ( $P < 0,05$ ).

A equação de regressão que melhor representou os dados "in vivo" e "in vitro" foi  $\hat{Y} = 4,72 + 0,79X$ , com um erro padrão da estimativa de 6,85 e um coeficiente de correlação de 0,90.



## 7. SUMMARY

The aim of this study was to adapt an "in vitro" digestibility method to be used at the Animal Nutrition Laboratory of the Escola Superior de Agricultura de Lavras. For this, two tests were carried out, one "in vivo" and the other "in vitro".

Hays of elephant grass variety 'Napier' (*Pennisetum purpureum*, Schum), with 40 days of growth and molasse-grass hay (*Melinis minutiflora*, Beauv) named molasse-grass hay 'I', prepared with grass after bloom, were used for the first test. The tests were performed with four mature wethers for each hay, and the method used for the determination, of the apparent digestibility of the dry matter was based on total faecal. The values observed for intake were 38.68 and 17.85 g/W<sup>0,75</sup> collection.day for the 'Napier' hay and molasse grass I respectively and the apparent digestibility coefficient of the dry matter were 58.3% and 34.49% respectively with a coefficient of variation of 2.8% and 11.68%.

The "in vitro" tests were carried out with the above mentioned

ed hays, soybean hays (*Glycine javanica*, Lin) and molasses grass , named molasse grass II, with coefficients of apparent digestibility of the dry matter of 60.70% and 60.00% determined in other laboratories. The Tilley and Terry method (47) was used, taking into account five runs for the statistical analysis. The coefficient of digestibility of the dry matter "in vitro" ranged from 41.36% for the molasse grass II to 75.07% for the 'Napier' hay. Significant differences were observed for the hays ( $P < 0,05$ ) and for the interaction between runs and hays ( $P < 0,05$ ).

The regression equation that best represented the data " in vivo" and "in vitro" was :  $\hat{Y} = 4.72 + 0.79X$ , with a standard error of the estimate of 6.85 and a correlation coefficient of 0.90.





## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. BALCH, C.C. & CAMPLING, R.C. Rate of passage of digesta through the ruminant digestive tract. In: DOUGHERTY, R.W. Physiology of digestion in the ruminant, Washington, Buterwoth , p.108-123. 1965.
02. BARNES, R.F. Use of "in vitro" rumen fermentation techniques for estimating forage digestibility and intake . Agronomy Journal, Madison, 57(2):213-16. 1965.
03. \_\_\_\_\_ Collaborative "in vitro" rumen fermentation studies of forage substrates. Journal of Animal Science, Champaing, 26(5):1120-30, Sept. 1967.
04. \_\_\_\_\_ Collaborative research with the two-stage "in vitro" rumen fermentation technique. In: Proceedings of the National Conference of Forage Quality Evaluation and Utilization, Nebraska, 1970. pNI-N20.
05. BATISTA, Heriberto Antônio Marques. Digestibilidade comparativa entre búfalo Jaffarabadi e bovinos Gir e Holandês. Lavras, ESAL, 1979. 66p. (Tese de MS).





06. BAUMGARDT, B.R., TAYLOR, M.W. & CASON, J.L. Evaluation of forages in the laboratory II. Simplified artificial rumen procedure for obtaining repeatable estimates of forage nutritive value. Journal of Dairy Science, Champaign, 45(1):62-68, Jan. 1962.
07. \_\_\_\_\_ & OH, H.K. Evaluation of forages in the laboratory IV. Within and among trial variability of the Wisconsin artificial rumen procedure. Journal of Dairy Science, Champaign, 47(1):263-66, Jan. 1964.
08. BEZEAU, L.M. Effect of substrate "in vitro" digestion trials. Journal of Animal Science, Champaign, 24(3):823-25, Aug. 1965.
09. BRASIL, Ministério da Agricultura. Serviço de meteorologia. Rio de Janeiro, 1964. 217p.
10. CARVALHO, Margarida Mesquita. A técnica do rúmen artificial na estimativa da digestibilidade aparente de forrageiras tropicais. Viçosa, UFV 1967. 52p. (Tese de MS).
11. COWLISHAW, S.J. & UNSWORTH, E.F. Factors affecting the "in vitro" digestibility of tropical grasses. Turrialba, Costa Rica, 26(11):44-53, Enero 1976.
12. DEHORITY, B.A. & JOHNSON, R.R. Effect of particle size upon the "in vitro" cellulose digestibility of forages by rumen bacteria. Journal of Dairy Science, Champaign, 44(12):2242-49, Dec. 1961.



13. DEHORITY, B.A. & JOHNSON, R.R. Effect of particle size on the digestion rate of purified cellulose by rumen cellulolytic bacteria "in vitro". Journal of Dairy Science, Champaign, 44(4): 687-92, Apr. 1961.
14. EADIE, J.M. & MANN, S.O. Development of the rumen microbial population: high starch diets and instability. In: Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. A.T. Phillipson Oriel Press, Newcastle. 1970. 335-47.
15. EL-SHAZILY, K.; DEHORITY, B.A. & JOHNSON, R.R. Effect of starch on the digestion of cellulose "in vitro" and "in vivo" by rumen microorganisms. Journal of Animal Science, Champaign, 20(2):268-73, May. 1961.
16. FARIAS, I.; FERREIRA, J.J. & GOMIDE, J.A. Digestibilidade do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) correlação "in vitro" x "in vivo". Revista Ceres, Viçosa 19(106):410-15, Nov. 1972.
17. FERREIRA, J.J. Efeito do estágio de desenvolvimento do pré-murchamento e da adição da raspa de mandioca sobre o valor nutritivo da silagem do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum). Viçosa, UFV 1973. 42p. (Tese MS).
18. FONSECA, José Brandão. Estudos de digestibilidade de forrageiras tropicais pelo processo convencional. Viçosa UFV 1964. 77p. (Tese MS).
19. GOMIDE, José Alberto. A técnica da fermentação ruminal "in vitro" na avaliação das forragens. Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Viçosa, 3(2):210-24, junho 1974.



27. JOHNSON, R.R. The development and application of "in vitro" rumen fermentation methods for forage evaluation. In: Proceedings of the National Conference of Forage Quality Evaluation and Utilization. Nebraska, 1970. p.MI-MI6.
28. KUMERO, F.; DEHORITY, B.A. & JOHNSON, R.R. Development of and "in vitro" fermentation technique for estimativa the nutritive value of high energy mixed rations for ruminantes. Journal of Animal Science, New York, 26 (4):867-71, July 1967.
29. McDOUGALL, E.I. Studies ou ruminant saliva. The composition and output of sheeps saliva. The Biochemical Journal, London , 43(1):199-209, 1948.
30. MILFORD, R. & MINSON, D.J. Intake of tropical pasture species . In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE PASTAGENS, 9º Anais... São Paulo, 1965. v.1. 815-22p.
31. MONSON, W.G. & UTLEY, P.R. Effects of diet of fistulated steer on "in vitro", and "in vivo" nylon bag digestibility of forage-corn mixtures. Agronomy Journal, Madison 66(3):358-60 , May-June 1924.
32. MOORE, J.E. & DINHAM, D.G. Proceedure for the two-stage " in vitro" organic matter digestion of forage. Departament of Animal Science, Nutrition Laboratory, Gainesville University of Florida, 1971. 8p. (Mimeografado).
33. \_\_\_\_\_. MOOTT, G.O. Recovery of residual organic matter from "in vitro" digestion of forages. Journal of Dairy Science , Champaing, 57(10):1258-59, Oct. 1974.



34. NELSON, B.D.; ELIZEY, H.D.; MONTGOMERY, C. & MORGAN, E.G. Factors affecting the variability of and "in vitro" rumen fermentation technique for estimating forage quality Journal of Dairy Science, Champaign, 55(3):358-66, Mar. 1972.
35. OLUBAJO, F.O.; VAN SOEST, P.J. & OYENUGA, Y.A. Comparison and digestibility of four tropical grasses grown in Nigéria. Journal of Animal Science, Champaign, 38(1):149-53, Jan. 1974.
36. OH, H.K.; BAUMGEARDT, B.R. & SCHOOL, J.M. Evaluation of forages in the laboratory, V. Comparison of chemical analyses, solubility tests and "in vitro" fermentations. Journal of Dairy Science, Illinois, 49(7):850-55, July 1966.
37. REID, R.L. & JUNG, G.A. Factors affecting the intake and palatability of forages for sheeps. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE PASTAGENS, 9ª Anais... São Paulo, 1969 v.I. 863-69p. 1965.
38. ROBERTSON, J.B. & VAN SOEST, P.J. Inocula and the "in vitro" digestibility of feeds. Journal of Animal Science, Champaign, 35(I):286, Abst. 16, Jan. 1972.
39. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & TORRES, Filemon. Substitution of filter paper for crucibles in the "in vitro" rumen true digestibility determination. Journal of Dairy Science, Champaigns, 55(9) : 1305-07, Sept. 1972.
40. SCALES, G.H.; STREETER, C.L.; DENHAM, A.H. & WARD, G.M. A comparison of indirect methods of predicting "in vitro" digestibility of grazed forage. Journal of Animal Science, Champaign, 38(1):192-99, Jan. 1974.



41. SCHMID, A.R., MARTEN, G.C. & ROTH, L.S. Effect of N supplementation on "in vitro" digestibility of corn, sorghum, and alfalfa. Agronomy Journal, Madison 61(1):20-21, Jan. 1969.
42. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ & GOODRICH, R.D. Influence of drying methods and temperatures on "in vitro" dry matter digestibility of corn and sorghum fodder and silage. Agronomy Journal, Madison, 62(4):543-46, July-Aug. 1970.
43. \_\_\_\_\_., GOODRICH, R.O.; MARTEN, G.C.; MEISKE, J.C., JORDAN R. M. & HALGERSON, J.L. Evaluation of laboratory methods for determining, quality of corn and sorghum silages. In: Biological methods for predicting "in vivo" digestibility. Agronomy Journal, Madison, 67(2):243-46, Mar.Apr. 1975.
44. SILVA, J.F.C. & GOMIDE, J.A. Efeito do estágio de maturação sobre o consumo e digestibilidade aparente da matéria seca de três gramíneas tropicais. Revista Ceres, Viçosa, 13(76):255-75, Mar. 1967.
45. TILLEY, J.M.A. & TERRY, R.A. A two-stage technique for the "in vitro" digestion of forage crops. Journal British Grassland Society, London, 18:104-11, 1963.
46. VAN SOEST, P. J. Estimation of forage protein digestibility and determination of the effects of heat-drying upon forages by means of the nitrogen content of acid-detergent fiber. Journal of Dairy Science, Champaign, 45(5):664, Abst. P3 May 1962.
47. \_\_\_\_\_. Symposium on nutrition and forage and pastures: new chemical procedures for evaluating forages. Journal of Animal



Science, Champaign, 23(3):838-45, Aug. 1964.

48. VIEIRA, L.M., GOMIDE, J.A. Estimativa de digestibilidade e do consumo de matéria seca de gramíneas forrageiras tropicais pela técnica do rúmen artificial. Experientiae, Viçosa, 10(4):71-91, Abril 1970.
49. VILLALOBOS, C.C. Métodos para estimativa do consumo de duas gramíneas tropicais. Viçosa UFV, 1972. 40p. (Tese MS).



APÊNDICE

## APÊNDICE

A metodologia seguida no ensaio "in vitro" foi a seguinte:

## 1. Materiais

- 1.1. Vidros com capacidade de 100 ml de cor âmbar.
- 1.2. Tampas de borrachas para os vidros, providas com válvulas de Bunsen.
- 1.3. Papel de filtro quantitativo.
- 1.4. Funil de porcelana próprio para filtrar com papel de filtro.
- 1.5. Kitasato de 2000 ml.
- 1.6. Erlenmeyer de 250 ml com tampa para transportar inóculo.
- 1.7. Caixa de isopor.
- 1.8. Pipetas graduadas de 1 a 10 ml.
- 1.9. Pipeta volumétrica de 50 ml.
- 1.10 Lã de vidro.
- 1.11 Balão de CO<sub>2</sub> com válvula de redução e tubos próprios para distribuição do gás.



## 2. Reagentes

## 2.1. Solução tampão (saliva artificial de McDougall):

São requeridos 40 ml por amostra :

$\text{NaHCO}_3$	9,80 g/l
$\text{N}_3_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,00 g/l
KCl	0,51 g/l
NaCl	0,47 g/l
$\text{MgSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$	0,12 g/l

2.2. Solução de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  a 4% (p/v)

São requeridos 1,0 ml por litro de saliva.

Dissolver 4 g de  $\text{Cl}_2$  em 100 ml de água destilada.

A solução de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  deve ser adicionada aos demais componentes da saliva, pouco antes de ser usada para evitar a precipitação de fosfato de cálcio, que é incolúvel, nestas condições.

## 2.3. HCl a 20% (v/v)

São requeridos 6 ml por amostra.

Dilui 200 ml de HCl concentrado para um litro.

## 2.4. Pepsina a 10% (p/v)

São requeridos 10 ml por amostra.

Adicionar 100 g de pepsina 1:1000 U1 a um litro de água destilada.

### 3. Preparo do substrato

As forragens a serem digeridas devem ser secas ao ar e moídas em peneira de 1 mm. Amostras representativas são guardadas em vidros hermeticamente fechados, que permitam uma fácil remoção das alíquotas, no momento desejado.

### 4. Inóculo

#### 4.1. Dieta dos animais doadores

A fim de diminuir possíveis diferentes devidos a variações individuais dos animais entre rodadas, usou-se dois animais equipados com fístula de rúmen. Os mesmos foram alimentados com silagem de milho à vontade, suplementados com 1,0 kg de farelo de soja para cada 500 kg de pv, e 50 g de sal mineralizado fornecido duas vezes ao dia, 7:00 e 16:30 horas.

#### 4.2. Preparo do inóculo

São requeridos 10 ml por amostra.

O fluído foi coletado duas horas após os animais terem recebido o suplemento protéico e mineral da manhã.

Removia-se o conteúdo da parte central do rúmen e exprimi-se através de duas camadas de tecido poroso, coletando o fluído em Erlemmeyer, previamente aquecido a 39 °C, e gaseificado com CO<sub>2</sub>, imediatamente transportado ao laboratório em banho-maria a 39-40 °C onde foi gaseificado, por borbulhamento, com CO<sub>2</sub> por mais ou menos cinco minutos.



Sempre sob atmosfera de  $\text{CO}_2$ , foi novamente filtrado por quatro camadas de tecido poroso e uma camada de lã de vidro, dosado em bureta e transferido para o recipiente que continha a saliva artificial saturada com  $\text{CO}_2$ , já em banho-maria a  $39^\circ\text{C}$ .

## 5. Procedimento

### 5.1. Pesagem das amostras

No dia anterior ao início da incubação foram pesadas amostras de aproximadamente 0,5 gramas das forragens, em vidros de 100ml. Preparava-se uma quantidade suficiente de saliva artificial, que era guardada até o dia seguinte à temperatura ambiente.

Duas horas antes do início da incubação adicionava-se 2ml de água destilada a cada um dos vidros, inclusive aos brancos (um para cada cinco amostras). Levava-se a saliva artificial ao banho-maria a  $39^\circ\text{C}$ , borbulhava-se com  $\text{CO}_2$  até um pH de 6,9-7,0, após o que, adicionava-se  $\text{CaCl}_2$  a 4%, 1 ml por litro.

Uma vez preparado o inóculo como foi descrito, este foi adicionado a saliva artificial acrescida do  $\text{CaCl}_2$  e já saturada com  $\text{CO}_2$  na proporção de 1:4 (v/v). Com o intuito de eliminar o ar tanto quanto possível, o mesmo era borbulhado com  $\text{CO}_2$  por mais 8-10 minutos.

Distribui-se o meio (50 ml por amostra) nos vidros contendo as forragens e nos brancos, ao acaso, utilizando-se pipeta de 50 ml. Os vidros foram previamente aquecidos à temperatura de  $39^\circ\text{C}$  e retirado o ar com corrente de  $\text{CO}_2$  durante 15 segundos. Durante toda a operação era mantida uma atmosfera de  $\text{CO}_2$ , tomando-se o cuidado de não permitir o borbulhamento do  $\text{CO}_2$  no meio.



Imediatamente à distribuição, os vidros eram fechados com tampão de borracha provido de válvulas de Bunsen e transferidos ao banho-maria, 39°C, inclusive os brancos.

Duas ou três vezes por dia, os vidros eram agitados com movimentos circulares e suaves, a fim de que todas as partículas da amostra entrassem em contato com o meio.

Após 48 horas de incubação, removiam-se as tampas levando-as para remover as partículas por ventura aderidas, usando-se um mínimo de água destilada e determinava-se o pH.

Acidificava-se o meio com 6 ml de HCl a 20% parceladamente para evitar-se a formação de espuma em excesso, que pode levar a perda de amostra. O pH do meio deve ficar em torno de 1-2 unidades de pH.

Adicionava-se 10 ml de pepsina (1:1000) a 10%, tampava-se novamente os vidros e retornavam ao banho-maria a 39°C. Agitavam-se os vidros duas ou três vezes por dia, com movimentos circulares e suaves.

Após 48 horas de incubação, o conteúdo dos vidros foi filtrado com papel de filtro quantitativo, previamente secos e pesados, eram dobrados de forma a não perder-se amostra e secos em estufa, 105°C, até peso constante. Quando eram levados à temperatura ambiente em dessecador e novamente pesados.

## 5.2. Cálculos

### 5.2.1. Pesos que devem ser registrados

#### a. Peso da amostra



- b. Matéria seca da amostra (%)
- c. Peso do papel de filtro seco
- d. Peso de papel de filtro + resíduo seco (inclusive branco)

5.2.2. Matéria seca inicial

$$\text{MS inicial} = \frac{a \times b}{100}$$

5.2.3. Matéria seca do branco

$$\text{MS branco} = d - c$$

5.2.4. Matéria seca residual

$$\text{MS residual} = d - c$$

5.2.5. Digestibilidade de matéria seca

$$\text{DIVMS}(\%) = \frac{\text{M.S.inicial} - (\text{MS residual} - \text{MS branco}) \times 100}{\text{MS inicial}}$$

