

Comparação entre os métodos químico, *in situ* e *in vitro* para estimativa do valor nutritivo de silagens de milho

Comparison of chemical, *in situ* and *in vitro* methods to estimate the nutritive value of maize silages

Clóvis Clenio Diesel Senger^I Paulo Roberto Frenzel Mühlbach^{II} Luis Maria Bonnacarrère Sanchez^I
Gilberto Vilmar Kozloski^I Gerusa Pauli Kist^{III} Lisiane Dorneles de Lima^{IV}
Diego Perez Netto^{IV}

RESUMO

Diferentes silagens de milho foram avaliadas através de sua composição química e pelos métodos de degradabilidade *in situ*, digestibilidade *in vitro* convencional e produção de gases *in vitro*, com o objetivo de comparar os métodos entre si na estimativa do valor nutritivo das silagens. Foram confeccionados 36 mini-silos com três teores de matéria seca (MS) (200, 260 e 280g kg⁻¹), e duas densidades de compactação: Alta compactação (AC) e Baixa compactação (BC). Os valores de digestibilidade obtidos pelos métodos *in vitro* convencional e *in situ* somente foram afetados pelo teor de MS (P<0,05). Os valores de nutrientes digestíveis totais (NDT) estimados pela composição química foram afetados tanto pelos teores de MS e densidade, como pelas suas interações (P<0,05). As digestibilidades da matéria orgânica (MO) das silagens de milho estimadas tanto pelo método convencional *in vitro* como *in situ* foram menores que aquelas estimadas pela técnica de produção de gases *in vitro* ou dos valores de NDT calculados a partir da composição química (P<0,05). Comparado aos métodos *in vitro* convencional e *in situ*, a técnica de produção de gases foi mais sensível, permitindo detectar diferenças nos parâmetros de degradabilidade em função dos níveis de umidade e compactação, o que a torna mais precisa para avaliar o valor nutritivo de silagens de milho.

Palavras-chave: digestibilidade, técnicas, avaliação, composição química, estimativa.

ABSTRACT

The nutritional value of different maize silages was estimated and compared by means of chemical composition, or by tests *in situ*, conventional *in vitro* or by a semi-automated *in vitro* gas production technique. Thirty-six samples of maize silages prepared in mini-silos with three DM contents (200,

260 and 280g kg⁻¹) and two packing densities; higher density (HD) or lower density (LD), were evaluated. Digestibility values from *in situ* and conventional *in vitro* tests were affected only by silage moisture concentration (P<0.05). Total digestible nutrients values estimated from the chemical composition were affected by both moisture and density treatments, as well as by its interaction (P<0.05). OM digestibilities of maize silages estimated either by conventional *in vitro* or by *in situ* methods were lower than those estimated by *in vitro* gas fermentation or than the TDN values calculated from chemical composition (P<0.05). Compared to the traditional *in vitro* and *in situ* tests, the *in vitro* gas production technique was more accurate to evaluate the nutritional value of maize silages.

Key words: digestibility, techniques, evaluation, chemical composition, estimation.

INTRODUÇÃO

Os alimentos representam o principal custo nos sistemas de produção animal, sendo que as dietas precisam ser formuladas para maximizar a produção, diminuir custos e promover a conservação do ambiente. As determinações mais confiáveis do valor nutritivo, tais como digestibilidade, consumo e desempenho animal obtidas a partir de experimentos *in vivo*, demandam muito tempo, trabalho e um grande volume de alimento, o que inviabiliza o seu uso na avaliação rotineira de alimentos. Entretanto, estimativas confiáveis da qualidade dos alimentos podem ser

^IDepartamento de Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105 900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: clovisdiesel@mail.ufsm.br Autor para correspondência.

^{II}Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

^{III}Curso de Agronomia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^{IV}Programa de Pós-graduação em Zootecnia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

obtidas por técnicas laboratoriais mais simples e de baixo custo, tais como os métodos *in vitro*, *in situ* e químicos (TILLEY & TERRY, 1963; ORSKOV & McDONALD, 1979; WEISS et al., 1992).

A mensuração da produção de gás para avaliar forragens tem adquirido notoriedade, especialmente a partir do momento em que MENKE et al. (1979) reportaram altas correlações entre os valores de produção de gás *in vitro* e a digestibilidade aparente *in vivo*. Além disso, também foram observadas fortes correlações com os valores de energia metabolizável dos alimentos determinados *in vivo* (MENKE & STEINGASS, 1988). À despeito destes métodos alternativos já terem sido validados com experimentos *in vivo*, a sua precisão para detectar variações no valor nutritivo dos alimentos necessita de maiores estudos.

Este estudo teve por objetivo avaliar a exatidão de diferentes métodos laboratoriais para estimar o valor nutritivo de silagens de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Comparou-se o valor nutricional de silagens de milho obtido a partir da sua composição química (WEISS et al., 1992), ou pelos métodos *in situ* (ORSKOV & McDONALD, 1979), *in vitro* (TILLEY & TERRY, 1963) e pelo método semi-automatizado de produção de gases *in vitro* (MAURÍCIO et al., 1999).

Foram utilizadas 36 amostras de silagem de milho (híbrido comercial Ag 5011) obtidas de minissilos confeccionados com três teores de matéria seca (MS) (200, 260 e 280g kg⁻¹), obtida através do corte das plantas em diferentes estádios de desenvolvimento e dois níveis de compactação: Alta Compactação (AC) ou Baixa Compactação (BC).

A densidade foi obtida colocando-se uma maior ou menor quantidade de planta de milho picada em partículas com tamanho aproximado de 2cm em sacos plásticos duplos, sobrepostos, marcados no volume de vinte litros, compactados manualmente com um socador de madeira, pesando-se os mesmos ao final. O mesmo peso de silagem foi colocado nos seis minissilos de cada tratamento. A compactação (matéria verde em kg m⁻³) obtida nos diferentes tratamentos foi a seguinte: 200 AC = 700kg; 200 BC = 400kg; 260 AC = 625kg; 260 BC = 350kg; 280 AC = 625kg e 280 BC = 350kg.

Uma vez abertos os silos, as amostras foram secadas em estufa a 55°C, por 72 horas, e moídas em peneira de 1mm, com exceção daquelas utilizadas no ensaio *in situ*, as quais foram moídas em peneira de 2mm. O teor de matéria seca (MS) foi obtido pela presença a 55°C, por 72 horas, e por secagem em estufa

a 105°C, durante 4 horas a matéria mineral (MM) pela queima em forno mufla a 600°C, por duas horas (AOAC, 1995). O nitrogênio (N) foi determinado pelo método de Kjeldhal (AOAC, 1995), com as modificações descritas em KOZLOSKI et al. (2003).

A fibra em detergente neutro corrigida para cinzas (FDN_{mo}) foi obtida de acordo com ROBERTSON & VAN SOEST (1981), utilizando-se alfa-amilase termo-estável, porém sem adicionar sulfito. Já a lignina (LDA) foi obtida pela utilização de ácido sulfúrico. O nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e insolúvel em detergente ácido (NIDA) foram determinados de acordo com LICITRA et al. (1996). O extrato etéreo (EE) foi obtido em equipamento de imersão e refluxo (Soxtherm, Gerhardt) com éter etílico por duas horas. Os carboidratos não fibrosos (CNF) foram calculados utilizando-se a equação: CNF = 1000 - ((FDN_{mo} - (NIDN x 6,25)) + (N x 6,25) + EE + MM), de acordo com VAN SOEST et al. (1991).

Os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram estimados a partir da composição química de acordo com WEISS et al. (1992). Neste trabalho, utilizou-se a estimativa do NDT obtida a partir da composição química como referência para comparação com a digestibilidade obtida pelos demais métodos em função de que os sistemas de alimentação, como o NRC (2001), preconizam o emprego desta metodologia para o cálculo do NDT.

A digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) foi conduzida pela técnica de dois estágios de TILLEY & TERRY (1963). O fluido ruminal foi obtido de dois novilhos canulados no rúmen, alimentados duas vezes ao dia exclusivamente com feno de alfafa.

Foram utilizados dois bovinos holandeses canulados no rúmen para a condução do ensaio *in situ*. Os animais receberam silagem de milho à vontade além de 1kg de farelo de trigo por dia. A relação peso da amostra/superfície do saco foi de 15mg cm⁻². Os tempos de incubação foram 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 72 e 96 horas, sendo que as amostras do tempo zero foram apenas lavadas em água corrente por pelo menos 30 minutos juntamente com as que foram incubadas, de forma a estimar a fração solúvel em água. Os resultados de degradação da matéria orgânica (MO) foram ajustados ao modelo exponencial de ORSKOV & McDONALD (1979), ajustados para o tempo de colonização (McDONALD, 1981).

A degradabilidade efetiva da matéria orgânica foi obtida conforme ORSKOV & McDONALD (1979), utilizando-se uma taxa de passagem de 2,5%, similar àquela observada por MULLIGAN et al. (2002) em vacas leiteiras alimentadas com dietas à base de silagens.

As silagens também foram analisadas pela técnica semi-automatizada de produção de gases *in vitro* (MAURÍCIO et al., 1999). Aproximadamente 1,0g de amostra foi incubado a 39°C, em 100ml de fluido ruminal tamponado (relação tampão/fluido de 9:1). O fluido ruminal, obtido dos mesmos bovinos usados no ensaio *in situ*, foi filtrado e misturado a uma solução tampão/mineral anaeróbia (MENKE et al., 1979). As leituras de pressão por polegada quadrada (psi) foram obtidas nos tempos 1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72 e 96 horas após a incubação. Os valores de pressão (x) foram convertidos em volume de gás (y) utilizando-se a equação previamente determinada (SENGER, 2005):

$$y = -0,0593x^2 \text{ (s.e. 0,073)} + 5,01x \text{ (s.e. 0,053)} - 0,4694 \text{ (s.e. 0,008)}.$$

A produção de gás (PG) foi corrigida para a PG do fluido ruminal tamponado sem amostra. Os perfis de PG obtidos foram ajustados ao modelo logístico bi-compartimental descrito em SCHOFIELD et al. (1994): $V(t) = A / (1 + \exp(2 + 4 * B * (C - T))) + D / (1 + \exp(2 + 4 * E * (C - T)))$, em que V (t) é o volume total de gás no tempo t, A é o volume de gás oriundo da fração de rápida digestão, B é a taxa de degradação da fração de rápida digestão (horas⁻¹), C é o tempo de colonização (horas), T é o tempo da leitura de gás, D é o volume de gás oriundo da fração insolúvel e E é a taxa de degradação da fração insolúvel. Os dados foram ajustados ao modelo por regressão não-linear (PROC NLIN) do pacote estatístico SAS (1996).

A digestibilidade da matéria orgânica a partir da produção de gás (DMOgás) também foi estimada conduzindo-se análises de regressão múltipla usando

os dados de degradabilidade das silagens obtidos após 24 horas de incubação, seguida do tratamento do resíduo da incubação com solução de detergente neutro. A equação resultante foi: $Y(t) = 0,0245 + (0,0013 * PG(t)) + (0,00386 * PB) + (0,00052 * CNF)$ (R² = 0,9633), em que Y (t) é a DMOgás no tempo t, PG é a produção de gás (ml) no tempo t, PB é a proteína bruta (g kg de MS⁻¹) e CNF são carboidratos não-fibrosos (g kg de MS⁻¹).

Os resultados de digestibilidade da MO das amostras (% de DMO) obtidos pelos diferentes métodos foram convertidos para coeficiente (MOD g Kg⁻¹) (Tabela 4), a fim de comparar com os valores de NDT, uma vez que este é equivalente ao teor de MOD do alimento, com exceção de que, no cálculo do NDT, a proporção de gordura digestível é multiplicada por 2,25. Como os materiais analisados não diferiam significativamente nos teores de gordura, realizou-se a comparação direta dos dois parâmetros.

Os parâmetros de digestibilidade obtidos em cada método foram submetidos à análise de variância. Os valores de digestibilidade da MO obtidos a partir dos diferentes métodos foram comparados pelo teste t (dados pareados). Foram conduzidas ainda análises de correlação entre os parâmetros de degradação, a produção de gás e a digestibilidade. Para as análises estatísticas, utilizou-se o pacote estatístico SAS (1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição química das silagens é mostrada na tabela 1. Na tabela 2, são mostrados os

Tabela 1 - Composição química¹ das silagens de milho.

	Silagens ²					
	200 AC	200 BC	260 AC	260 BC	280 AC	280 BC
Kg m ⁻³	700	400	625	350	625	350
MS (g kg ⁻¹)	198	192	258	262	278	282
	Composição (g kg de MS ⁻¹):					
MO	950	945	958	951	955	953
N	10,2	12,2	10,4	11,7	12,0	12,2
EE	43	30	47	48	44	45
FDNmo	623	639	545	543	516	506
LDA	47	49	39	40	39	37
CNF	228	209	308	288	326	337
	Composição (g kg de N ⁻¹):					
NIDN	244	251	211	162	164	218
NIDA	128	112	92	94	79	67

¹MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; N: nitrogênio; EE: extrato etéreo; FDNmo: fibra em detergente neutro; LDA: lignina em detergente ácido; CNF: carboidratos não-fibrosos; NIDA: nitrogênio insolúvel em detergente ácido; NIDN: nitrogênio insolúvel em detergente neutro.

²AC, Alta Compactação; BC, Baixa Compactação.

Tabela 2 - Parâmetros de degradação¹ das silagens de milho calculados a partir dos resultados da incubação *in situ*.

	Silagens ²						Média	CV ³	P ⁴		
	200AC	200BC	260AC	260BC	280AC	280BC			U	D	U×D
<i>a</i>	150	88	193	222	298	283	200	44,0	*	ns	ns
<i>b</i>	523	639	617	650	522	513	580	17,4	ns	ns	ns
<i>c</i>	0,032	0,026	0,026	0,017	0,023	0,033	0,036	40,5	ns	ns	ns
<i>L</i>	7,9	6,9	6,3	7,5	6,4	4,4	6,6	37,4	ns	ns	ns

¹*a* é a fração rapidamente solúvel (g kg⁻¹); *b* é a fração insolúvel, porém potencialmente degradável (g kg⁻¹); *c* é a taxa fracional da degradação de *b* (h⁻¹) e *L* é o tempo de colonização (horas).

²AC, Alta Compactação; BC, Baixa Compactação.

³Coefficiente de Variação, onde n = 36.

⁴Probabilidade do erro tipo I dos efeitos de Umidade (U), Densidade (D) ou interação entre elas (U x D), onde ns = não-significativo e * = P<0,05.

resultados da degradabilidade *in situ*. Com exceção da fração solúvel *a*, para a qual foi observado efeito do teor de MS (P<0,05), todos os demais parâmetros obtidos *in situ* não apresentaram diferenças entre as silagens avaliadas. Entretanto, todos os parâmetros de produção de gás *in vitro* foram afetados (P<0,05) pelo teor de MS das silagens (Tabela 3). Além disso, os tempos de colonização obtidos pela PG foram também afetados pela densidade, e suas interações com o teor de MS (P<0,05).

Os valores de digestibilidade das silagens de milho estimados pelos diferentes métodos são mostrados na tabela 4. Os valores dos métodos *in situ* e *in vitro* somente foram afetados pelo nível de MS (P<0,05), o que está de acordo com a afirmação de JOHNSON et al. (1999) de que o estágio de maturidade é o principal fator determinante do valor nutritivo da silagem. Entretanto, os níveis de NDT estimados a partir

da composição química das silagens foram afetados tanto pelos teores de MS e densidade, bem como pelas suas interações (P<0,05). Os conteúdos de MO digestível estimados tanto pelo método convencional *in vitro* quanto pelo *in situ* foram menores que aqueles estimados pela PG *in vitro* e que os de NDT calculados pela composição química (P<0,05).

Foram observadas correlações significativas (P<0,01) entre os valores de digestibilidade estimados pelos métodos químico, *in vitro* convencional, *in vitro* gás e *in situ*. Entretanto, não foram observadas correlações entre os parâmetros obtidos na degradação *in situ* e de fermentação pelo método *in vitro* gás (Tabela 5).

As diferenças observadas na composição química que resultaram em diferentes conteúdos de NDT foram confirmadas apenas em parte pelas diferenças nos valores de digestibilidade obtidos nos

Tabela 3 - Parâmetros de fermentação¹ das silagens de milho calculados a partir dos resultados de produção de gases *in vitro*.

	Silagens ²						Média	CV ³	P ⁴		
	200AC	200BC	260AC	260BC	280AC	280BC			U	D	U×D
PG	190,5	183,2	185,3	182,6	203,6	202,6	191,2	5,9	*	ns	ns
A	60,9	68,8	52,7	63,2	61,4	57,8	60,8	11,3	*	ns	ns
B	0,070	0,071	0,013	0,082	0,013	0,019	0,011	51,2	*	ns	ns
C	9,4	11,8	9,7	10,7	8,1	8,9	9,8	10,2	*	*	*
D	123,5	108,5	125,0	112,7	133,7	135,6	123,2	7,9	*	ns	ns
E	0,021	0,021	0,023	0,022	0,024	0,025	0,023	5,4	*	ns	ns

¹PG: produção total de gás após 96 horas de incubação (ml); A: volume de gás originado da fração de rápida digestão (ml); B: taxa de degradação da fração de rápida digestão (h⁻¹); C: tempo de colonização (horas); D: volume de gás originado da fração de lenta degradação (ml); E: taxa de degradação da fração de lenta degradação (h⁻¹).

²AC, Alta Compactação; BC, Baixa Compactação.

³Coefficiente de Variação, onde n = 36.

⁴Probabilidade do erro tipo I dos efeitos de Umidade (U), Densidade (D) ou a interação entre elas (U x D), onde ns = não-significativo e * = P<0,05.

Tabela 4 – Teores de matéria orgânica digestível das silagens de milho obtidos *in vitro* (MODiv), *in situ* (MODis) e estimados pelo método *in vitro* gás (MODgás) e nutrientes digestíveis totais (NDT) a partir da composição química[†].

	Silagens ¹							CV ³	P ⁴		
	200AC	200BC	260AC	260BC	280AC	280BC	Média ²		U	D	U×D
MODiv	450	450	500	510	540	540	500 ^b	9,2	*	ns	ns
MODis	450	410	480	470	540	570	490 ^b	8,8	*	ns	ns
MODgás	600	620	620	650	710	710	650 ^a	3,6	*	ns	ns
NDT	610	590	640	640	670	670	640 ^a	1,6	*	*	*

[†]Equação de WEISS et al. (1992).

¹AC, Alta Compactação; BC, Baixa Compactação.

²Médias na coluna seguidas por letras iguais não diferem (P>0,05) pelo teste t para dados pareados.

³Coefficiente de Variação, onde n = 36.

⁴Probabilidade do erro tipo I dos efeitos de Umidade (U), Densidade (D) ou a interação (U x D) dentro de cada método, onde ns = não-significativo e * = P<0,05.

ensaio *in situ*, *in vitro* convencional e *in vitro* gás, bem como pela diferença nos parâmetros associados à curva de produção de gás. Os parâmetros da curva de degradação *in situ* não foram suficientemente precisos para detectar as diferenças na fermentação das silagens.

Menores teores de FDN e maiores valores de CNF foram observados por De BOEVER et al. (2005) e DEAVILLE & GIVENS (2001) em silagens de milho, o que resultou em maiores taxas de degradação e volumes de gás. O alto valor de MO solúvel (lavável) observado no presente estudo (290mg kg⁻¹, valores não-apresentados) também pode ter contribuído para as baixas taxas de degradação observadas no método *in situ*, já que especialmente o amido é perdido dos saquinhos pela lavagem, de forma similar aos resultados de De BOEVER et al. (2005).

Tabela 5 - Correlações entre os diferentes parâmetros¹ de digestibilidade *in situ*, *in vitro* e da composição química das silagens de milho.

Parâmetros	Correlação	P ²
c	B	0,01 ns
c	E	0,11 ns
L	C	0,04 ns
b	D	-0,07 ns
DMOiv	NDT	0,65 **
DMOiv	DMOgás	0,55 **
DMOiv	DMOis	0,48 **
NDT	DMOis	0,79 **
NDT	DMOgás	0,77 **
DMOis	DMOgás	0,64 **

¹ Ver tabela 4 para detalhamento dos parâmetros.

² Probabilidade das correlações (erro tipo I), onde ns = não-significativo e ** = P<0,01.

A ensilagem é um processo usual de conservação da forragem, no qual os açúcares presentes no material fresco são fermentados por microorganismos anaeróbios, produzindo ácidos orgânicos, especialmente o láctico e, em menor quantidade, o acético. Assim, o conteúdo de carboidratos solúveis das silagens pode variar consideravelmente, dependendo tanto da concentração inicial na forragem fresca como do processo de fermentação. Desta forma, o conteúdo de CNF foi a fração que apresentou a maior variação neste trabalho. O método de produção de gases *in vitro*, por sua vez, determina tanto a taxa de produção de gás da fração solúvel, bem como da fração insolúvel dos substratos, o que lhe confere maior sensibilidade para avaliar diferenças na fermentação das silagens.

Correlações significativas entre resultados *in situ* e *in vitro* gás foram verificados em alguns trabalhos (SILESHI et al., 1996; LÓPEZ et al., 1998), os quais avaliaram diferentes forragens. Entretanto, BLÜMMEL & ORSKOV (1993) e KHAZAAL et al. (1995), avaliando diferentes gramíneas e leguminosas forrageiras, não observaram correlações significativas entre os parâmetros da fermentação obtidos pelos métodos *in vitro* gás e *in situ*. Utilizando-se os valores de NDT (método químico) como referência do valor nutritivo, pode-se inferir que os métodos *in situ* e *in vitro* convencional subestimaram a digestibilidade da MO das silagens (Tabela 4). Outros estudos (CHIFFLET & ROSSO, 1993; ANTONIO, 1995) indicaram que o método convencional *in vitro* usualmente subestima a digestibilidade das forragens.

Por outro lado, as predições da digestibilidade da MO obtidas da equação que utiliza os dados de produção de gás resultaram em estimativas mais precisas em relação aos valores de NDT.

CONCLUSÃO

A técnica de produção de gases *in vitro* mostrou-se como o método mais sensível, por detectar efeitos de umidade e compactação nos parâmetros estudados, e também mais exato, ao produzir valores de digestibilidade mais próximos ao NDT obtido por métodos químicos para avaliar o valor nutritivo de silagens de milho, quando comparada aos métodos *in situ* e convencional *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ANTONIO, S. de D. **Modificações na técnica de digestibilidade 'in vitro' para avaliar forragens de baixa qualidade.** 1995. 88f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis.** Washington, DC, 1995. 1094p.
- BLÜMMEL, M.; ORSKOV, E.R. Comparison of *in vitro* gas production and nylon-bag degradability of roughage in predicting feed intake in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v.40, p.109-119, 1993.
- CHIFFLET, S.; ROSSO, O. Evaluacion de pasturas con animals de carne en la region templada de la República Argentina. In: PUIGNAU, J.P. (Ed). **Metodología de evaluacion de pasturas.** Montevideo: IICA-PROCISUR, 1993. Cap.3, p.65-94.
- DEAVILLE, D.R.; GIVENS, D.I. Use of the automated gas production technique to determine the fermentation kinetics of carbohydrate fractions in maize silage. **Animal Feed Science and Technology**, v.93, p.205-215, 2001.
- De BOEVER, J.L. et al. Evaluation of the nutritive value of maize silages using a gas production technique. **Animal Feed Science and Technology**, v.123, p.255-265, 2005.
- JOHNSON, L. et al. Nutritive value of corn silage as affected by maturity and mechanical processing: a contemporary review. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.2813-2825, 1999.
- KHAZAAL, K. et al. Prediction of apparent digestibility and voluntary intake of hays feed to sheep: comparison between using fiber components, *in vitro* digestibility or characteristics of gas production or nylon bag degradation. **Animal Science**, v.61, p.527-538, 1995.
- KOZLOSKI, G.V. et al. Potential nutritional assessment of dwarf elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum. Mott) by chemical composition, digestion and net portal flux of oxygen in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v.104, p.29-40, 2003.
- LICITRA, G. et al. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, p.347-358, 1996.
- LÓPEZ, S. et al. 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, p.99-113, 1998.
- MAURÍCIO, R.M. et al. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, p.321-330, 1999.
- MCDONALD, I. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, v.96, p.251-256, 1981.
- MENKE, K.H. et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. **Journal of Agricultural Science**, v.93, p.217-222, 1979.
- MENKE, K.H.; STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. **Animal Research and Development**, v.28, p.7-55, 1988.
- MULLIGAN, F.J. et al. Intake, digestibility, milk production and kinetics of digestion and passage for diets based on maize or grass silage fed to late lactation dairy cows. **Livestock Production Science**, v.74, p.113-124, 2002.
- NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle.** 7.rev.ed. Washington, DC: National Academy of Science, 2001. 408p.
- ORSKOV, E.R.; MCDONALD, I. 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.
- ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P.J. The detergent system of analysis. In: JAMES, W.P.T., THEANDER, O. (Eds). **The analysis of dietary fibre in food.** NY: Marcel Dekker, 1981. Chapter 9, p.123-158.
- SAS, **Statistical analysis system.** Software, Version 6. Cary: SAS Institute, 1996. (CD).
- SCHOFIELD, P. et al. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**, v.72, p.2980-2991, 1994.
- SENGER, C.C.D. **Comparação de técnicas na avaliação da qualidade de silagens de milho.** 2005. 126f. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- SILESHI, Z. et al. 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.
- TILLEY, J.M.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal of British Grassland Society**, v.18, p.104-111, 1963.
- VAN SOEST, P.J. et al. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharide in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583-3597, 1991.
- WEISS, W.P. et al. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, v.39, p.95-110, 1992.