

MODIFICAÇÕES NA TÉCNICA DE DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* PARA AVALIAR FORRAGENS DE BAIXA QUALIDADE¹

MODIFICATION ON TECHNIQUE FOR *IN VITRO* DIGESTIBILITY TO ASSESS LOW QUALITY FORAGE

Simone de David Antonio² Maria Beatriz Fernandez Gonçalves³
Luis Maria Bonnacarrère Sanchez⁴ Alfredo Acosta Backes⁵ Lisiane Furtado da Silva⁵

RESUMO

Dois experimentos foram desenvolvidos no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), para estudar modificações na técnica de digestibilidade *in vitro* para avaliar forragens de baixa qualidade. O experimento I consistiu na determinação dos coeficientes de digestibilidade *in vivo* da matéria orgânica (MO), envolvendo 10 fenos de gramíneas tropicais e 2 palhas provenientes da colheita de grãos. No experimento II, determinaram-se os coeficientes de digestibilidade *in vitro* através da técnica proposta por TILLEY and TERRY (1963), tratamento M1- 48 horas de incubação com inóculo ruminal (fermentação microbiana) + 48 horas de incubação com pepsina (fermentação enzimática) e estudaram-se modificações sobre esta, denominadas: M2- prolongação no período de incubação (de 48h para 96h), com renovação do inóculo ruminal, após 48h de incubação, (adição de novo inóculo sobre a fase sólida das amostras, após centrifugação e desprezada a fase líquida); M3- 96h de incubação com inóculo ruminal, com reinoculação, após 48h de incubação, (adição de novo inóculo sobre as amostras, sem a centrifugação e retirada da fase líquida); M4- 96h de incubação com inóculo ruminal diluído, com renovação do inóculo; M5- 96h de incubação com inóculo ruminal diluído, com reinoculação; M6- 96h de incubação com inóculo ruminal, renovação do inóculo e prolongação no período de incubação com pepsina (de 48h para 72h) e M7- 96h de incubação com inóculo ruminal, reinoculação, digestão com pepsina de 72 horas. Foi efetuada a análise de correlação entre as médias dos coeficientes de digestibilidade *in vivo* e a digestibilidade *in vitro* das modificações, para todas as forragens e a análise de regressão sobre o tratamento que apresentou correlações altas e significativas. Pelos resultados obtidos, pode-se constatar que o método *in vitro* de TILLEY and TERRY (1963) não apresentou boa precisão para estimar a digestibilidade de forragens de baixo valor nutritivo e que,

dentre as modificações testadas, a com 96h de fermentação com líquido de rúmen (LR), com reinoculação do LR após 48h de incubação + 48h com pepsina (M3), foi a que demonstrou melhor eficiência para estimativa da digestibilidade.

Palavras-chave: digestibilidade, forragens, baixa qualidade.

SUMMARY

Two experiments were undertaken at the Department of Animal Science at UFSM in order to study *in vitro* digestibility technique modifications to assess low quality forages. Experiment I consisted of organic matter (OM) *in vivo* digestibility coefficients estimation, involving 10 tropical grass hay and two grain harvest straws. On Experiment II, one determined the *in vitro* digestibility coefficients through the TILLEY and TERRY technique (1963), M1 treatment - 48 hours of incubation with ruminal liquor (microbian fermentation) + 48 hours of pepsin incubation (enzymatic fermentation) and one studied the modifications over this technique named as M2 - incubation period delay (from 48h to 96h), with ruminal liquor renewal after 48h of incubation (new ruminal liquor addition over the solid phase of the samples, after centrifugation and liquid phase disregard); M3 - 96h of incubation with ruminal liquor with reinoculation after 48h of incubation (new liquor addition over the samples, without the centrifugation and liquid phase withdrawal); M4 - 96h of incubation with diluted ruminal liquor, with liquor renewal; M5 - 96h of incubation with diluted ruminal liquor with reinoculation; M6 - 96h of incubation with ruminal liquor, liquor renewal and pepsin incubation period delay (from 48 h to 72h) and M7 - 96h of incubation with ruminal liquor, reinoculation, digestion with 72h pepsin. A correlation analysis was undertaken between *in vivo* digestibility coefficient means and *in*

¹Parte da Dissertação do primeiro autor apresentada à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

²Zootecnista, Aluno do Curso de Pós-graduação em Zootecnia da UFSM. Rua Demétrio Ribeiro, 227, 97070-270, Santa Maria, RS. Autor para correspondência.

³Zootecnista, Mestre, Professor Assistente, Departamento de Zootecnia da UFSM.

⁴Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor Titular, Departamento de Zootecnia da UFSM.

⁵Acadêmicos do Curso de Zootecnia da UFSM.

in vitro digestibility from the modifications to overall forages and a regression analysis over the treatment that presented high and significant correlations. From the results that were determined one could find that TILLEY and TERRY (1963) *in vitro* method does not present good precision to estimate low nutritional value forage digestibility and that among the tested modifications that one with 96h of fermentation with ruminal liquor (LR), with LR reinoculation after 48h of incubation + 48h with pepsin (M3) was the one that demonstrated to have the best efficiency to estimate the digestibility.

Key word: digestibility, low quality forage.

INTRODUÇÃO

Tem-se consciência da necessidade, cada vez maior, de se conhecer o valor nutritivo dos alimentos para poder utilizá-los, da melhor forma possível, em formulação de rações, de maneira a possibilitar o melhor desempenho animal e eficiência produtiva. Através das análises químicas bromatológicas, pode-se obter uma noção da composição nutricional de um alimento, mas somente através da digestibilidade, pode-se ter uma idéia melhor da qualidade e do valor nutritivo do mesmo. Atualmente, o método de avaliação da digestibilidade dos alimentos, utilizando animais (*in vivo*), é o único capaz de fornecer valores com alto grau de confiabilidade. No entanto, é dispendioso, demorado e apresenta limitações quanto à avaliação simultânea de um grande número de alimentos.

A técnica de digestibilidade *in vitro* em duas fases, desenvolvida por TILLEY & TERRY (1963) na Inglaterra, é a mais utilizada em todo o mundo. Apresenta um alto coeficiente de correlação com a técnica *in vivo* e também um erro médio padrão da estimativa menor, quando utilizada na avaliação de forragens de alta qualidade, POTT (1976). No entanto, FAY et al (1989a), observaram que a técnica de TILLEY & TERRY (1963), quando usada para alimentos de baixa qualidade, apresenta baixos coeficientes de correlação entre a digestibilidade *in vitro* e *in vivo*. Os autores justificam esta diferença de resultados entre *in vitro* e *in vivo*, pelo fato da Técnica de TILLEY & TERRY (1963) ter sido desenvolvida para avaliar forragens de média e alta qualidade.

Pela necessidade de maior conhecimento sobre a digestibilidade de alimentos forrageiros de espécies tropicais e palhas da resteva de lavoura, e também pela importância econômica que estas forragens possuem em muitas regiões, deve-se procurar aperfeiçoar e/ou desenvolver métodos mais eficientes na determinação da digestibilidade *in vitro*. De-

do a isto, conduziu-se o presente trabalho com o objetivo de estudar modificações na técnica de digestibilidade *in vitro* desenvolvida por TILLEY & TERRY (1963), a fim de melhorar sua precisão, quando empregada na avaliação de alimentos de baixo valor nutritivo.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento I foi conduzido no período compreendido entre maio e novembro de 1994. Os tratamentos, constituíram-se de 12 tipos de fenos de baixa qualidade (Tabela 1), que formaram as dietas dos animais. Os fenos de gramíneas tropicais foram confeccionados em diferentes estádios de crescimento das plantas e os fenos provenientes de resteva de lavoura foram obtidos após colheita de grãos. Foram avaliados os seguintes fenos: Feno de capim papuã (*Brachiaria plantaginea* (Link) Hitchc.) - estágio de maturação de semente; feno de pensacola (*Paspalum notatum* Flugge) - Cotrijuí; feno de milheto (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke) - Cotrijuí; feno de bermuda (*Cynodon dactylon* (L.) Pers. coast cross 1) - UFSM, estágio vegetativo, 45 dias de diferimento - (feno de bermuda C); feno de bermuda (*Cynodon dactylon* (L.) Pers. coast cross 1) - Cotrijuí A, estágio vegetativo - (feno de bermuda A); feno de bermuda (*Cynodon dactylon* (L.) Pers. coast cross 1) - Cotrijuí B, estágio de florescimento - (feno de bermuda B); feno de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.) - cortado com 1,0m. de altura - (feno de capim elefante 1); feno de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.) - cortado com 1,60m. de altura - (feno de capim elefante 2); feno de setária

Tabela 1 - Valores em porcentagem de matéria seca (MS) e percentual de matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra bruta (FB) e extrativos não nitrogenados (ENN) sobre a MS das forragens.

Forragem	MS	*MM	*PB	*EE	*FB	*ENN
Feno de capim papuã	85,72	7,52	4,61	1,56	33,56	52,75
Feno de capim elefante 1	85,58	9,67	11,91	2,11	32,11	44,31
Feno de pensacola	86,10	7,91	6,05	1,53	33,43	51,08
Feno de milheto	86,59	11,44	9,88	1,13	32,97	44,58
Palha de arroz	87,08	17,98	4,42	1,77	30,43	45,40
Feno de bermuda A	86,42	7,15	6,66	1,24	33,00	51,95
Feno de bermuda B	86,51	7,61	5,90	0,89	36,31	49,29
Feno de capim elefante 2	85,92	7,65	6,44	1,78	34,97	49,16
Feno de bermuda C	86,73	5,25	5,61	0,71	34,06	54,37
Feno de setária 2	87,36	6,84	4,78	1,25	37,11	50,02
Palha de aveia + azevém	85,02	5,87	5,87	0,89	36,27	51,10
Feno de setária 1	86,30	10,99	6,77	0,88	34,71	46,65

* Dados expressos na matéria seca.

(*Setaria sphacelata*) - estágio vegetativo - (feno de setária 1) e feno de setária (*Setaria sphacelata*) - estágio de florescimento - (feno de setária 2); Feno de palha de arroz (*Oriza sativa* L.) - (palha de arroz) e feno de aveia (*Avena sativa* L.) + azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) - (palha de aveia + azevém).

Os alimentos na forma de feno foram picados em desintegrador de forragem, para evitar a seleção e facilitar o consumo por parte dos animais. Para o estudo da digestibilidade *in vivo*, foram utilizados 24 ovinos machos, castrados, da raça Corriedale, com idade de 18 a 24 meses. Sendo a condução do experimento de digestibilidade *in vivo*, com ovinos, em gaiolas metabólicas, realizada seguindo-se as recomendações feitas por HARRIS (1970), técnica padrão.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completos ao acaso, sendo cada bloco representado pelo período de duração de cada ensaio de digestibilidade *in vivo* (3 ensaios *in vivo*), com dois animais por tratamento em cada bloco.

O experimento II foi conduzido no período compreendido entre dezembro de 1994 a junho de 1995. Os tratamentos foram compostos da combinação de dois fatores: 12 alimentos x 7 métodos (- sendo um a técnica de TILLEY & TERRY (1963), modificado por ALEXANDER (1967) e por PIRES *et al.* (1979), e os outros constituídos pelas 06 modificações na técnica de digestibilidade *in vitro*), em que: M1 - 48 horas de incubação com inóculo ruminal + 48 horas de incubação com pepsina, (técnica de TILLEY & TERRY, 1963); M2 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal, com renovação do inóculo, após 48 horas de incubação + 48 horas de incubação com pepsina; M3 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal, com reinoculação do inóculo, após 48 horas de incubação + 48 horas de incubação com pepsina; M4 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal diluído, com renovação do inóculo, após 48 horas de incubação + 48 horas de incubação com pepsina; M5 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal diluído, com reinoculação do inóculo, após 48 horas de incubação + 48 horas de incubação com pepsina; M6 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal, com renovação do inóculo, após 48 horas de incubação + 72 horas de incubação com pepsina; M7 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal, com reinoculação do inóculo, após 48 horas de incubação + 72 horas de incubação com pepsina. Em todas as modificações foi utilizada fonte de Nitrogênio (uréia adicionada na saliva artificial).

A renovação do inóculo ruminal foi realizada após 48h de fermentação, e consistiu na adição de novo inóculo ruminal sobre a fase sólida das amostras, após estas sofrerem centrifugação e ter sido desprezada a fase líquida. A reinoculação, também efetuada após 48h de fermentação, consistiu na adição de novo

inóculo sobre as amostras, sem a centrifugação do material e a retirada da fase líquida. A diluição do inóculo foi na proporção de 1 ml de líquido de rúmen para 50 ml de saliva artificial (modificação de Den BRAVER, 1977).

Os alimentos constituíram-se de 12 tipos de fenos, os mesmos utilizados no ensaio de digestibilidade *in vivo*, descritos no experimento I. A amostragem do alimento oferecido para cada animal foi realizada diariamente, compondo uma única amostra para o período, de onde se retirou uma subamostra para a digestibilidade *in vitro*. Foi utilizado um bovino, dotado de fístula ruminal, alimentado com uma dieta de feno de alfafa e água à vontade, como doador de líquido de rúmen.

O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso, sendo que cada bloco era representado por uma corrida, num total de 3; utilizou-se o esquema fatorial 7 x 12 (7 métodos x 12 alimentos) com 2 amostras para cada tratamento. Os dados das digestibilidades foram submetidos à análise de variância, análise de correlação e análise de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise de variância dos coeficientes de digestibilidade *in vivo* da matéria orgânica, observou-se que houve diferenças significativas entre os alimentos avaliados. A média da digestibilidade *in vivo*, obtida em seis repetições, para MO de cada um dos 12 alimentos avaliados, com seus respectivos coeficientes de variação, são apresentados na Tabela 2. Os valores médios de digestibilidade da MO variaram de 43,37% a 58,96%, com coeficientes de variação de 1,91% a 9,84%. Observa-se que os coeficientes de

Tabela 2 - Coeficiente de digestibilidade *in vivo* da matéria orgânica (MO), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), para cada tipo de forragem avaliada, expressos em porcentagem, Experimento I.

Forragem	MO	DP	CV
Feno de capim papuã	51,68	4,45	8,61
Feno de capim elefante 1	58,96	1,73	2,93
Feno de pensacola	43,96	3,18	7,23
Feno de milheto	52,94	1,01	1,91
Palha de arroz	44,49	4,28	9,62
Feno de bermuda A	48,91	2,19	4,48
Feno de bermuda B	44,93	4,07	9,06
Feno de capim elefante 2	45,82	1,84	4,01
Feno de bermuda C	47,46	3,78	7,96
Feno de setária 2	43,37	4,27	9,84
Palha de aveia + azevém	44,60	2,17	4,86
Feno de setária 1	54,11	4,14	7,65

variação apresentaram valores considerados aceitáveis, ou seja, abaixo dos 10% para todos os alimentos avaliados. Variações muito grandes foram constatadas por BARNES (1965) e CHIFFLET & ROSSO (1993), entre animais nos ensaios *in vivo*. Estas variações individuais são de maior magnitude quando os animais consomem forragens de baixa qualidade (Van ES and Van DER MEER, 1980).

Os coeficientes médios de digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (MO), para cada uma das modificações e tipo de forragem, são apresentados na Tabela 3. Pela análise de variância, observou-se que houve diferenças significativas entre as corridas (blocos), entre alimentos e entre os métodos estudados. O coeficiente de variação da matéria orgânica foi de 11,98%. Também constatou-se que a interação alimento X método foi altamente significativa ($P < 0,0001$), indicando que as forragens apresentaram comportamento diferenciado para a digestibilidade, em função do método estudado.

Foi efetuada a análise de correlação entre as médias dos coeficientes de digestibilidade *in vivo* e os coeficientes *in vitro* obtidos com as modificações no

método de TILLEY & TERRY (1963), da matéria orgânica dos 12 tipos de forragens utilizadas, Tabela 4. A modificação (M3) - que consistiu em 96h de fermentação com líquido ruminal (LR), com reinoculação do LR após 48h de incubação, + 48h com pepsina, apresentou o melhor coeficiente de correlação: 0,80 para DIVMO ($P < 0,0017$). Logo em seguida, a modificação (M6) - caracterizada por 96h de fermentação com líquido ruminal (LR), com renovação do LR após 48h de incubação, + 72h com pepsina, teve coeficientes de correlação com valor de 0,60 para DIVMO ($P < 0,04$).

Para as demais modificações, que também testaram o aumento no tempo de fermentação com líquido ruminal, os valores de correlação foram baixos e não significativos. Discordando de GRANT *et al.* (1974), que avaliando alimentos tropicais, submetidos aos períodos de fermentação de 48, 72 e 96h *in vitro*, constatarem diferenças altamente significativas na digestibilidade da matéria seca, para cada 24 h de aumento no período de fermentação. Também HOLECHEK *et al.* (1986), quando utilizaram vários períodos de digestão microbiana (0, 4, 8, 24, 36, 60,

Tabela 3 - Coeficientes de digestibilidade da matéria orgânica (MO), obtidos nos ensaios *in vivo* e *in vitro*, para cada tipo de forragem, expressos em porcentagem.

Forragem	<i>in vivo</i>	Modificações <i>in vitro</i> *						
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Feno de capim papua	51,68	46,67	49,08	57,24	27,03	52,19	48,75	51,82
Feno de capim elefante 1	58,96	25,49	59,40	59,93	29,68	27,92	63,06	49,40
Feno de pensacola	43,96	09,42	41,05	42,72	15,57	20,56	29,11	40,14
Feno de milho	52,94	47,79	54,66	51,50	21,82	21,62	56,74	56,93
Palha de arroz	44,49	32,92	47,01	49,67	13,74	15,68	20,60	54,38
Feno de bermuda A	48,91	39,72	41,64	45,56	21,12	20,88	49,80	46,32
Feno de bermuda B	44,93	28,77	35,72	42,63	27,72	40,98	33,88	29,10
Feno de capim elefante 2	45,82	31,14	45,69	47,77	11,73	26,75	49,76	39,00
Feno de bermuda C	47,46	29,50	42,64	44,66	16,08	19,34	43,18	19,21
Feno de setária 2	43,37	26,33	36,70	33,75	12,09	11,39	13,26	23,32
Palha de aveia + azevém	44,60	36,38	36,38	30,92	20,47	15,87	29,96	32,41
Feno de setária 1	54,11	29,18	15,14	52,95	11,91	17,30	18,94	42,26

* M1 - 48 horas de incubação com inóculo ruminal + 48 horas de incubação com pepsina, (técnica de TILLEY AND TERRY, 1963);

M2 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal, com renovação do inóculo, após 48 horas de incubação + 48 horas de incubação com pepsina;

M3 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal, com reinoculação do inóculo, após 48 horas de incubação + 48 horas de incubação com pepsina;

M4 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal diluído, com renovação do inóculo, após 48 horas de incubação + 48 horas de incubação com pepsina;

M5 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal diluído, com reinoculação do inóculo, após 48 horas de incubação + 48 horas de incubação com pepsina;

M6 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal, com renovação do inóculo, após 48 horas de incubação + 72 horas de incubação com pepsina;

M7 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal, com reinoculação do inóculo, após 48 horas de incubação + 72 horas de incubação com pepsina.

Fonte de Nitrogênio (uréia adicionada na saliva artificial) em todas as modificações.

Tabela 4 - Coeficiente de correlação linear (r) entre as médias de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* da matéria orgânica (MO) e o nível de significância, para as 12 forragens avaliadas com os sete métodos (M1 a M7).

	Modificações <i>in vitro</i> *						
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Correlação (r)	0,29	0,25	0,80	0,47	0,26	0,60	0,52
Significância	0,3570	0,4247	0,0017	0,1187	0,4190	0,0399	0,0840

* M1 - 48 horas de incubação com inóculo ruminal + 48 horas de incubação com pepsina, (técnica de TILLEY AND TERRY, 1963);

M2 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal, com renovação do inóculo, após 48 horas de incubação + 48 horas de incubação com pepsina;

M3 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal, com reinoculação do inóculo, após 48 horas de incubação + 48 horas de incubação com pepsina;

M4 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal diluído, com renovação do inóculo, após 48 horas de incubação + 48 horas de incubação com pepsina;

M5 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal diluído, com reinoculação do inóculo, após 48 horas de incubação + 48 horas de incubação com pepsina;

M6 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal, com renovação do inóculo, após 48 horas de incubação + 72 horas de incubação com pepsina;

M7 - 96 horas de incubação com inóculo ruminal, com reinoculação do inóculo, após 48 horas de incubação + 72 horas de incubação com pepsina.

Fonte de Nitrogênio (uréia adicionada na saliva artificial) em todas as modificações.

72, 84, e 96h), como também o período padrão de 48h, constataram que o período de 36h para leguminosas e 72-96h para as gramíneas poderia fornecer estimativas da digestibilidade *in vivo* mais precisas do que o período padrão de 48 horas.

A análise de regressão foi efetuada sobre os métodos M3 e M6 que apresentaram coeficientes de correlação (r) altos e significativos. A equação de regressão para o coeficiente de digestibilidade da MO pelo método M3 foi $Y_i = 26,91 + 0,46X_i$ onde, (Y_i)= coeficiente de digestibilidade determinado com a técnica *in vivo*, (X_i)= coeficiente de digestibilidade determinado com a técnica *in vitro*, com erro padrão da estimativa ($S_{y,x} = 3,11$) e coeficiente de determinação ($r^2 = 0,64$). Para o método M6, a equação de regressão foi $Y_i = 41,41 + 0,18X_i$, com erro padrão da estimativa ($S_{y,x} = 4,16$) e coeficiente de determinação ($r^2 = 0,36$). BARNES (1965) também encontrou erros padrões da estimativa da digestibilidade, variando de 2,0 a 4,0 para estimativa da digestão *in vivo*, pelos resultados *in vitro*. Também afirmou que uma equação de regressão, para ser de uso prático, deveria ser capaz de prever a digestibilidade com um erro padrão não maior que 2 unidades absolutas de digestão. Como no tratamento M6, também FAY *et al.* (1989a) e FREITAS *et al.* (1990) encontraram valores mais adequados de digestibilidade *in vitro*, quando houve

aumento no tempo de fermentação microbiana e enzimática para forragens de baixa qualidade, sendo que o período de fermentação ruminal (LR) de 96h +72 h com pepsina foi o que apresentou resultados mais confiáveis.

No presente trabalho, o método M1, de TILLEY & TERRY (1963), apresentou correlação baixa e não significativa com os coeficientes de digestibilidade *in vivo*, não sendo possível realizar a análise de regressão. No entanto, REID *et al.* (1973), através da técnica de TILLEY & TERRY, (modificada por BARNES, 1969), estudaram a relação entre a DMS *in vivo* e DIVMS, de amostras de gramíneas e leguminosas em vários estádios de crescimento. Encontraram uma correlação significativa de 0,74 e equação de regressão, $Y = 33,17 + 0,64X$, e erro padrão da estimativa ($S_{y,x} = 4,40$), para o conjunto de todos os dados. Em um trabalho posterior

com três forragens tropicais, os autores obtiveram uma equação de regressão: $Y = 29,00 + 0,56X$, e $S_{y,x} = 3,20$, para a relação entre digestibilidade da MS *in vitro* e *in vivo* obtida com ovinos.

Também os métodos (M4 e M5) que utilizaram inóculo ruminal diluído (1 ml de LR + 50ml de saliva artificial de McDougal, FAY *et al.*, 1989b) na incubação das amostras de forragem, não apresentaram resultados satisfatórios de digestibilidade *in vitro*, quando comparados com os coeficientes de digestibilidade *in vivo*. Entretanto, FAY *et al.* (1989b), que trabalhando com inóculo diluído (simulando o inóculo proveniente de um animal alimentado com forragem de baixa qualidade), juntamente com a adição de uréia e aumento do tempo de incubação para 96h, obtiveram aumento na digestibilidade *in vitro* para as forragens de baixa qualidade (DMS *in vivo* - 36,1 a 51,9%).

FREITAS *et al.* (1990), utilizando 96h de fermentação com líquido ruminal diluído (1 ml LR + 50ml de saliva artificial, com ou sem uréia), mais 72h de incubação com pepsina, para estimar a digestibilidade *in vitro* de amostras de feno de hemátria (*Hematria altissima*), silagem de milho (*Zea mays*) e feno de alfafa (*Medicago sativa*), observaram uma subestimação da digestibilidade *in vitro* da MO para os alimentos testados, embora os dados tenham sido obtidos em apenas uma corrida experimental.

Acredita-se que as diferenças e variações ocorridas entre os métodos para estimar a digestibilidade *in vitro* de forma precisa, devam-se a fatores relacionados à própria técnica laboratorial, empregada rotineiramente no laboratório onde foi desenvolvida a pesquisa, técnica esta que apresenta grande manipulação de ordem humana. Também, cabe discutir os fatores de maior variação que são diretamente ligados aos procedimentos descritos pela técnica *in vitro* original e que são amplamente abordados na literatura. Os fatores de maior importância que podem ter contribuído nos resultados finais são: tipo do animal doador de LR, variação no LR de dia para dia, temperatura e anaerobiose no recipiente de fermentação durante a manipulação do inóculo, pH do inóculo, temperatura de secagem das amostras, período decorrente da extração do LR até a incubação e quantidade de inóculo adicionado ao recipiente de incubação.

CONCLUSÕES

O método de digestibilidade *in vitro* proposto por TILLEY & TERRY (1963) não apresenta boa precisão para estimar a digestibilidade de alimentos de baixa qualidade (DMO < 55%). As técnicas de digestibilidade *in vivo* devem ser reavaliadas, e deve-se estabelecer uma padronização para melhor efeito de comparação entre os resultados obtidos em diferentes pesquisas. O aumento no tempo de fermentação ruminal associado à reinoculação do inóculo ruminal, mais a digestão enzimática, apresenta melhor eficiência para estimar a digestibilidade das forragens de baixo valor nutritivo. É necessário realizar um maior número de ensaios de digestibilidade, testando-se modificações sobre a técnica *in vitro*, para melhorar a eficiência da mesma com forragens de baixa qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, R.H. Estabelecimento de um sistema de digestibilidade *in vitro* en el laboratorio. In: PALADINES, O. L. **Metodos *in vitro* para determinar el valor nutritivo de las forrages**. Montevideo: Centro de Investigación y Enseñanza para la Zona Templada del IICA, 1967, cap. 4, p. 101-152.
- BARNES, R. F. Use of *in vitro* rumen fermentation techniques for estimating forage digestibility and intake. **Agronomy Journal**, Madison, n. 57, p. 213-216, 1965.
- BARNES, R.F. Collaborative research with the two-stage *in vitro* rumen fermentation technique. In: BARNES, R.F., CLANTON, D.C., GORDON, C.H., *et al.* **Proceedings of the National Conference on Forage Quality Evaluation and Utilization**, Lincoln, 3-4 Sept., 1969. Lincoln, Nebraska Center for Continuing Education, p. N1-20, 1969.
- CHIFFLET, S., ROSSO, O. Evaluación de pasturas con animales de carne en la región templada de la República Argentina. In: PUIGNAU J.P. **Metodología de evaluación de pasturas**. Montevideo: IICA-PROCISUR, 1993, cap. 3, p. 65-94.
- DEN BRAVER, E.J. The suitability of the RDOM-method to determine the metabolizable energy in forages. **European Association for Animal Production: 28th Annual Meeting**, Bruselas, 1977. Bélgica, p. 1-9, 1977.
- FAY, J.P., CHIFFLET DE VERDE, S., OVEJERO, F.M.A. Tratamientos que afectan a digestibilidad *in vitro* de forrages de baja calidad. I. Método de digestibilidad, suspensión de forrage en agua y tiempo de incubación con microorganismos. **Revista Argentina de Producción Animal**. Balcarce, v. 9, n. 5, p. 337-345, 1989a.
- FAY, J.P., OVEJERO, F.M.A., CHIFFLET DE VERDE, S. Tratamientos que afectan la digestibilidad *in vitro* de forrages de baja calidad. II. Atragados al medio de incubación, pretratamiento del forrage, e inóculos modificados. **Revista Argentina de Producción Animal**. Balcarce, v. 9, n. 5, p. 347-357, 1989b.
- FREITAS, E.A.G. de, VERGIL, A., ALVES, M.C.L.C. Teste de diferentes técnicas para determinação da digestibilidade *in vitro* de forrageiras de baixa digestibilidade. **Relatório preparado pelo Laboratório de Nutrição Animal da EMPASC**. Lages, SC, In Prelo, 1990.
- GRANT, R.J., VAN SOEST, P.J., McDOWELL, R.E. Influence of rumen fluid source and fermentation time on *in vitro* true dry matter digestibility. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 57, n. 10, p. 1201-1205, 1974.
- HARRIS, L.E. Métodos químicos e biológicos. In: **Compilação de dados analíticos e biológicos para o preparo de tabelas de composição de alimentos para o uso nos trópicos da América Latina**. Gainesville, Center for Tropical Agriculture, University of Florida, p. 1401-5301, 1970.
- HOLECHEK, J.L., WOFFORD, H., ARTHUN, D., *et al.* Evaluation of total fecal collection for measuring cattle forage intake. **Journal of Range Management**, Denver, v. 39, n. 1, p. 2-4, 1986.
- PIRES, M.B.G., FREITAS, E.A.G., TRINDADE, D.S., *et al.* Estabelecimento de um sistema de digestibilidade *in vitro* no laboratório da equipe de pesquisa em nutrição animal da Secretaria da Agricultura. **Anuário Técnico do IPZFO**, Porto Alegre, v. 6, p. 345-385, 1979.
- POTT, E.B. **Correlações entre os coeficientes de digestibilidade da matéria seca e entre os da matéria orgânica determinados com animais e por técnica *in vitro***. Porto Alegre - RS. 111 p. Tese (Mestrado em Zootecnia) Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1976.
- REID, R.L., AMY, J., OLSEN, F.J., *et al.* Studies on the nutritional quality of grasses and legumes in Uganda. I. Application of *in vitro* digestibility techniques to species and stage of growth effects. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 50, n. 1, p. 1-15, 1973.
- TILLEY, J.M.A., TERRY, R.A. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal of the British Grassland Society**. Hurley, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.
- Van ES, A.J.H., Van DER MEER, J. M. Methods of analysis for predicting the energy and protein value of feeds for farm animals. **Institute for Livestock Feeding and Nutrition Research Lelystad**. The Netherlands, p. 6-74, 1980.