

REVISTA

CERES

BIBLIOTECA CENTRAL
U F V

PRELÓGIO
ASSUNTO
ENTRADA

Janeiro a Dezembro de 1964

VOL. XII

N. 68

Viçosa — Minas Gerais

UNIVERSIDADE RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DA DIGESTIBILIDADE "IN VITRO" DE ALGUMAS
FORRAGEIRAS TROPICAIS (¹)

Dirceu Jorge da Silva, Joaquim Campos
e Joseph H. Conrad (²)

1. INTRODUÇÃO

Considerando que o Brasil possui o quarto rebanho bovino do mundo e considerando, ainda, a situação das demais espécies ruminantes que se utilizam de forrageiras para sua manutenção, é de interêsse conhecer as qualidades nutritivas dessas forrageiras.

As tentativas para o estudo da digestibilidade "in vitro" datam de há muito tempo. Entretanto, somente MARSTON (1948) estabeleceu as primeiras bases para estudos mais definitivos, produzindo um meio semelhante àquele encontrado no rúmen.

ANNISON e LEWIS (1959) dizem que há muito interêsse em examinar a população de rúmen pelo processo "in vitro".

(¹) Tese apresentada à Escola de Pós-Graduação da Universidade Rural do Estado de Minas Gerais, como parte das exigências do Curso de Nutrição Animal, para o grau de "Magister Scientiae".

(²) Respectivamente, Prof. Assist. de Nutrição Animal, Prof. Catedrático de Nutrição Animal da E. S. A. da U. R. E. M. G. e Professor da Universidade de Purdue.

A técnica usada é denominada de rúmen artificial que, em princípio, envolve a incubação do conteúdo do rúmen em recipiente onde o substrato é adicionado, havendo degradação deste substrato com o aparecimento dos produtos finais. Muitos métodos foram preconizados para reproduzir as condições "in vivo", principalmente quando à concentração de sais, poder tampão, anaerobiose e a natureza do substrato.

LOUW et al., em 1949, citados por ANNISON e LEWIS (1959), fizeram incubação em recipiente semipermeável que permitia separar por difusão os produtos de fermentação. Esse sistema é o que mais se assemelha à situação "in vivo", onde os produtos finais de fermentação são absorvidos ou são eliminados do rúmen.

Os melhoramentos mais recentes foram introduzidos por WARNER em 1956, usando um sistema de rúmen artificial que é, provavelmente, o melhor até agora surgido. Pormenores sobre a técnica encontram-se em ANNISON e LEWIS (1959).

TILLEY e TERRY (1960) dizem que a técnica da digestibilidade "in vitro" apresenta os mesmos estádios que ocorrem no processo digestivo dos ruminantes. No primeiro estádio, as forragens são digeridas pelos microorganismos anaeróbicos oriundos do rúmen de carneiros fistulados, e, no segundo, são digeridas por uma solução de pepsina ácida. Durante o primeiro estádio, os carboidratos estruturais (celulose e hemicelulose) são digeridos e convertidos em produtos solúveis pelas enzimas dos microorganismos do rúmen, sendo os produtos iniciais (açúcares simples) convertidos em ácidos graxos voláteis, metano, dióxido de carbono e outros.

Os componentes digestíveis e solúveis da forragem são também degradados durante este estádio. Entretanto, somente parte da proteína é tornada solúvel pela ação dos microorganismos do rúmen, de modo que no segundo estádio do processo é feito um tratamento com pepsina (enzima proteolítica) para a conversão das proteínas em frações solúveis em água.

O uso da técnica da digestibilidade "in vitro" é hoje aconselhada na avaliação do valor nutritivo das forrageiras. Vários pesquisadores, entre eles QUICKE et al. (1959), afirmam que não foram encontradas diferenças entre as digestibilidades "in vivo" e "in vitro" de sete feno por eles estudados e, ainda, que as variações são menores no méto-

do "in vitro". Entretanto, há algumas limitações e dificuldades para o emprêgo da técnica do rúmen artificial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

MARSTON (1948), em seu trabalho sôbre fermentação "in vitro", da celulose pelos organismos do rúmen de carneiro, cita os trabalhos de WILDT em 1874, ZUMTZ em 1879, DECLAUX em 1882, HAUBNER em 1885, TAPPEINER em 1882, 1883, 1884 e 1888, HONNEMBERG and STOHEMAUN em 1885, WILSING em 1885, von KNIERIEM em 1885, LEHMAN em 1889 e MARKOFF em 1911 e 1913. Êsses estudiosos da fermentação "in vitro" da celulose concluíram: que os microorganismos são os responsáveis pela decomposição da celulose no trato alimentar, e que se transforma durante a passagem da fibra crua através do animal. Ao investigar as celulosas do papel e do algodão, quando incubadas sob condições anaeróbicas com fluido de rúmen, verificaram que se dissolvem lentamente com formação de metano, dióxido de carbono e formação de ácidos graxos. O fato de que sômente traços de ácidos graxos aparecem nas excreções indica que êles são absorvidos e oxidados. Já existem evidências positivas do valor nutritivo da celulose. Finalmente, a destilação de uma demorada fermentação "in vitro" de celulose apresentou os ácidos acético e butírico como principais produtos da fermentação.

ANNISON e LEWIS (1959) citam KELLNER que, em 1900, afirmava ter a celulose o mesmo valor energético do amido, quando dada a carneiros. Citam, também, o trabalho de WOODMAN, em 1930, no qual foi concluído que os ácidos graxos voláteis encontrados no rúmen provinham da fermentação dos carboidratos existentes na dieta. Êstes ácidos constituem a maior fonte de energia para ruminantes, desde que sômente pequena porção do carboidrato ingerido escape à degradação no rúmen.

Mc ANALLY e PHILLIPSON em 1942 e BANCROFT et al. em 1944, citados por ANNISON e LEWIS (1959), em seus estudos em Cambridge com carneiros, revelaram que quantidades consideráveis de ácidos graxos voláteis produzidos pela fermentação no rúmen eram absorvidas por aquele órgão.

BYER et al. (1961) comparam o uso de caprinos e bovinos na medição da digestibilidade "in vivo" do feno de al-

fafa, em quatro estádios de desenvolvimento. Concluem que não há diferença significativa na digestão da celulose e energia digestível, quando se usam bovinos ou caprinos. Apresentam, como resultado os dados da Tabela 1.

QUICKE *et al.* (1959) estudando a digestibilidade "in vitro", com inoculação obtida de novilho, e a digestibilidade "in vivo", com carneiros, chegaram às seguintes conclusões: não foram observadas diferenças significativas entre os resultados "in vivo" e "in vitro" com fenos de gramíneas mas, com alguns fenos de leguminosas, a celulose digestível, medida pelos dois métodos, foi significativamente diferente. A técnica "in vitro" apresentou mais uniformidade.

BAUMGARDT *et al.* (1962) realizaram seus trabalhos usando uma vaca fistulada, cuja cânula ficava permanentemente no rúmen. Esta vaca foi mantida com dieta uniforme de feno, suplementada com traços de sais minerais, farinha de ossos e água. No dia da extração do líquido de rúmen, o feno e água foram suspensos às 8:00 horas da manhã e a coleta realizada às 13:00 horas.

TABELA 1 - Digestibilidade da Celulose da Alfafa

Fenos	Estádio	Data do Corte	Celulose Digestível %	
			Bovinos	Caprinos
I	Suculento	Maior, 24	72,1	74,2
II	Início da Floração	Junho, 7	67,0	66,6
III	Floração	Junho, 23	62,4	61,3
IV	Início da Granulação	Julho, 6	60,3	57,6
Média	-	-	65,4	64,9

Fonte: BYER, W, J. *et al.* 1961. Am. Meeting Am. Dairy Sc. Ass. 56th Madison 3 p. (mimeografado).

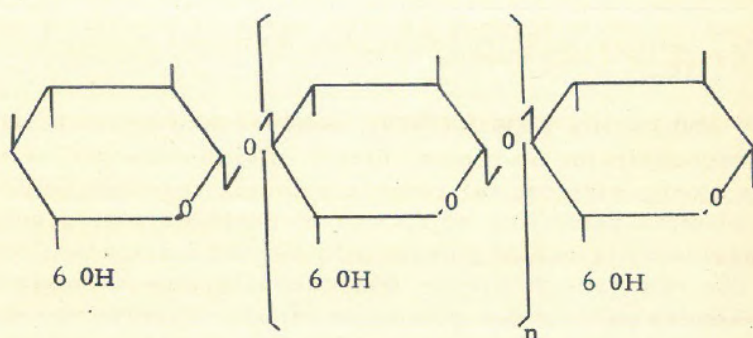
KOMAREK e LEFFEL (1961) afirmam que ruminantes fistulados têm desempenhado papel importante nas pesquisas relativas ao rúmen e nutrição dos ruminantes. Dizem, ainda, que a cânula para se usar em rúmen fistulado pode ser feita facilmente com material barato e deve ser fechada hermêti-

camente, à prova de gás e líquido, mantendo assim as condições normais do rúmen.

O material usado é uma garrafa de polietileno de 1 litro, cortada convenientemente, e uma tampa de borracha com pressão. Outros pormenores referentes à fístula e ao processo operatório podem ser encontrados na obra citada.

WILWERTH (1956), descrevendo a cânula usada em seu trabalho, diz que a mesma se conserva firmemente na posição devido à pressão exercida pelo disco situado no interior do rúmen e a pressão exercida pelo disco externo contra a pele. Deve-se manter assepsia perfeita durante a operação e administrar-se antibióticos como cuidado pós-operatório.

BRUNE (1961) diz que a celulose é um polissacarídeo constituído de B - D - glucose, e tem a seguinte estrutura como geralmente aceita:



Segundo NOLLER (1961), a celulose ocorre nas paredes da célula em quantidades variáveis de polissacarídeos associados, sendo a principal substância responsável pelas propriedades físicas da parede celular. Hidrólise ácida da celulose resulta em alto fornecimento de B-D-glucose. A celulose, quando se deposita na parede celular, não pode ser mais considerada disponível, como fonte de energia para a planta. Outrossim, não é atacada por enzimas produzidas pelo organismo. Os ruminantes são capazes de utilizar a celulose por intermédio das celulasas, produzidas pelas bactérias do rúmen. A quantidade de celulose é pequena em plantas novas aumentando à medida que a planta amadurece. Os dados da Tabela 2 indicam o teor de celulose de alguns volumosos.

TABELA 2 - Porcentagem de Lignina e Celulose na Matéria Sêca de Produtos Forrageiros

Forragem	Lignina (%)	Celulose (%)
Feno de Alfafa, antes da Florada, 15-18cm	3,6	17,7
Feno de Alfafa, antes da Florada, 41-46cm	8,0	29,9
Sabugo de Milho, Farelo Grosso	11,6	59,8
Sabugo de Milho, Farelo Fino	11,1	49,4
Plantas de Aveia, 21 Dias	1,6	21,0
Plantas de Aveia, 63 Dias	6,7	38,4
Plantas de Aveia, 105 Dias	10,0	47,0
Palha de Trigo	20,7	52,9

Fonte: Seminário de Nutrição dos Ruminantes, São Paulo, 1961.

ANNISON e LEWIS (1959), descrevendo o metabolismo dos carboidratos no rúmen, dizem inicialmente que os animais monogástricos, tal como o homem, recebem muita de sua energia calorífica na forma de carboidrato, o qual é absorvido na forma de glucose pelo intestino delgado. Contudo, nos ruminantes, muitos dos carboidratos da dieta são degradados para ácidos graxos no rúmen. A parte dos carboidratos que alcança o intestino delgado dos ruminantes consiste em carboidratos dos microorganismos do rúmen.

Afirmam, ainda, que a utilização pelos ruminantes da celulose na dieta foi reconhecida desde a última parte do século XIX. Sua importância quantitativa como componente dos alimentos dos ruminantes levou a muitas investigações sobre o seu valor nutritivo e digestibilidade. Em anos recentes, têm sido relatados estudos pormenorizados de sua digestão pelos microorganismos do rúmen.

Há três modos pelos quais o desdobramento da celulose no rúmen pode ser alcançado: por meio da celulase secretada no rúmen, pelas enzimas das plantas presentes nos alimentos e pela fermentação microbiológica. Entretanto, não existe evidência de que sejam secretadas celulasas no trato alimentar dos ruminantes (ou outros mamíferos), e as celulasas das plantas não são significantes, desde que não pudes-

ram ser obtidas por SCHMUNER e GRIMMER em 1915, em qualquer dos muitos alimentos que êles examinaram.

Ainda NOLLER (1961) comentando a digestão da celulose, afirma que pouco tem sido estabelecido quanto à bioquímica dos desdobramentos da celulose pelas bactérias do rúmen mas, aos poucos, está havendo progresso. Tem-se empregado novos métodos para o estudo da digestão no rúmen, "in vitro", métodos êstes que, sob condições experimentais, permitem maior contrôlo e observações mais minuciosas do que os métodos "in vivo". Infelizmente, a velocidade do desdobramento "in vitro" da celulose é invariavelmente mais lenta do que no próprio rúmen. A explicação disto reside no fato de existirem no rúmen muitas espécies diferentes de bactérias, que trabalham conjuntamente em simbiose. Aquelas que não estão diretamente envolvidas no desdobramento da celulose podem fermentar os produtos finais da fermentação desta, evitando, assim, o acúmulo dêstes produtos finais e a inibição da reação.

A evidência ora disponível indica que uma série de enzimas elaboradas pelas bactérias do rúmen estão envolvidas na hidrólise da celulose natural. Por algum tempo, as pesquisas "in vitro" foram efetuadas principalmente para averiguar o volume de digestão que ocorre dentro de certo período como, por exemplo, 24 horas. Os resultados mostraram que havia diferenças consideráveis no volume digerido e na taxa da celulose digerida. Há algum tempo, chegou-se à conclusão de que a velocidade da digestão é ponto muito importante na nutrição de ruminantes, porque determina o tempo que a forragem permanece no rúmen. Quanto mais tempo um material permanecer no rúmen, mais tempo será necessário para que outro possa entrar. Quanto mais rápida a digestão, mais rápida é a transformação de alimentos, e, conseqüentemente, há mais nutrientes disponíveis para o animal. A produção x animal é função do consumo de nutrientes em excesso às exigências para manutenção.

Para digestão eficiente da celulose, é necessário determinada quantidade de nitrogênio dietético. A falta de proteína dietética não só reduz a digestibilidade da celulose como também reduz a taxa de consumo.

Um dos pontos mais discutidos, quando se estuda a digestibilidade "in vitro", é a duração do tempo de fermentação.

Para o estudo do período ótimo de fermentação "in vitro", foi determinado por Baumgardt et al. (1962) a digestão

da celulose de forragens durante o período de 48 horas. Desde que se deva esperar que a digestão varie com a qualidade da forragem, foram usados como substrato um feno de alfafa de alta qualidade e uma gramínea (orchardgrass) de baixa qualidade e pobre em nitrogênio. Observaram que o índice inicial de digestão da alfafa foi maior, e que o máximo foi obtido ao completar 42 horas de fermentação. Aparentemente, a digestão máxima da celulose da gramínea não tenha sido obtida ao completar 48 horas. Isto realmente vem confirmar os resultados apresentados por QUICKE et al. (1959), quando foi necessária fermentação mais longa para se obter digestão máxima de celulose com forragens maduras.

Afirmam ainda BAUMGARDT et al. (1962) em estudo com 31 forrageiras, que a média de valores da digestibilidade da celulose foi de 47,6 e 60,0% durante 24 e 48 horas, respectivamente, de fermentação "in vitro". Assim, o aumento da digestão da celulose, em média de 12,4%, foi devido ao período mais longo de fermentação.

ANNISON e LEWIS (1959) dizem que a celulose é diretamente degradada quando fermentada em boas condições, com uma suspensão do líquido de rúmen. Incubação por longo período, de 20 a 60 horas, é usualmente necessária para ocorrer digestão apreciável.

MOTT (1961), em trabalho sobre digestibilidade, usou 24 horas na fermentação "in vitro".

BAUMGARDT et al. (1962), referindo-se à quantidade de substrato na fermentação, concluem dizendo que um grama de forragem ofereceria concentração adequada, pois mesmo com extremos de conteúdo em celulose, permaneceria ainda entre 15 a 35%.

REDER (1954), comentando a importância econômica do efeito desfavorável da fração fibrosa da planta na digestibilidade pelos animais, diz que investigações sobre o conteúdo de fibra crua, celulose e lignina das forrageiras, têm constituído a principal preocupação desse campo de estudo.

Os pesquisadores presentes à 4th "in vitro" Evaluation Work Conference (1962), referem-se às páginas 9 e 10 sobre a fonte, coleta do líquido de rúmen (L.R.) e sobre algumas técnicas de fermentação "in vitro".

TÉCNICAS DE FERMENTAÇÃO "IN VITRO"FONTE E COLETA DO L. R.AUTORESLOCALIDADE

Todo o L. R. extraído através de 4 camadas de gaze grosseira de algodão. Solução de McDougall's com glicose e ureia. O CO₂ é passado através das amostras, com borbulhamento contínuo.

Carneiro alimentado com feno de alfafa 2 vezes ao dia, 8:30 e 16:45 horas. Água removida às 8:30 e coletada às 13:30 horas.

R. F. Barnes
G. O. Mott

Purdue University
Lafayette,
Indiana

Todo o L. R. extraído através de 2 camadas de gaze grosseira de algodão e centrifugada a 2.000 rotações por minuto, durante 2 minutos.

Bovino alimentado com feno de timóteo e gramínea. Coleta feita 7 horas após alimentação da manhã. Sem restrição de água.

R. D. Mochrie
J. D. Pettyjohn

North Carolina
State College,
Raleigh

Veja Quicke et al. J. An. Sci. 122:275. 1959.

Vaca leiteira alimentada com feno de alfafa pela manhã. Coleta antes da primeira alimentação. Sem restrição de água.

W. C. Weir
G. W. Van Dyne
A. Aguirre

University of
California,
Davis

PERIÓDICO

28 JUN 1971

BIBLIOTECA CENTRAL
- FV -

(continua)

LOCALIDADE	AUTORES	FONTE E COLETA DO L. R.	TÉCNICAS DE FERMENTAÇÃO "IN VITRO"
Canadian Dept. of Agr. Current - Canadá	J. E. Troelsen	Carneiro alimentado duas vezes ao dia com uma ração composta de 72% de alfafa e 28% de palha de trigo. Coleta feita às 8:30 horas da manhã antes do uso do alimento e água.	Todo "líquor de rúmen (L. R.) extraído através de 4 camadas de gases. Solução de McDougall's com glicose a uréia. O CO ₂ é borbulhado através do tubo de vidro. O pH é ajustado de 6,0 a 6,9 nas 24-30 e 45 horas, após o início da fermentação.
Ohio A. E. S. Wooster	R. R. Johnson B. A. Dehority	Novilho alimentado com feno de alfafa de boa qualidade. Coleta feita às 8:00 horas e última alimentação feita às 15:00 horas do dia anterior. Sem restrição de água.	Veja Johnson et al. J. An. Sci. 17:431. 1958.
University of Wisconsin, Madison	B. R. Baumgardt Hi Kon Oh	Vaca Jersey alimentada com feno de alfafa e de brome grass, dieta a livre escolha. Feno e água removidos às 8:00 horas da manhã e coleta feita às 13:00 horas.	Todo L. R. extraído através de 4 camadas de gaze grosseira de algodão. Solução McDougall's mais uréia e glicose. O CO ₂ foi introduzido na superfície, sem borbulhamento contínuo.

3. MATERIAL E MÉTODO

Coleta do Material no Campo

As amostras das diversas forrageiras usadas no presente trabalho foram colhidas na Secção de Agrostologia da Escola Superior de Agricultura da U.R.E.M.G. - Viçosa. A referida Secção está situada em terreno plano e é composta de canteiros diversos de gramíneas e leguminosas.

Trabalhou-se com seis gramíneas e duas leguminosas, em diferentes períodos, isto é, com 30, 60 e 90 dias após a ceifa. Com isto, os dados finais seriam mais bem comparados, ou melhor visão da variação da digestibilidade seria obtida. As leguminosas e gramíneas pesquisadas foram as seguintes:

- Soja Perene (Glycine javanica Linn.)
- Centrosema (Centrosema pubescens Benth.)
- Capim Elefante-Napier (Pennisetum purpureum Scham.)
- Capim Guatemala (Tripsacum fasciculatum Trin.)
- Capim Sempre-Verde (Panicum maximim Jacq.)
- Capim Jaraguá (Hyparrhenia rufa (Nees.), Stapt.)
- Capim Gordura (Melinis minutiflora Pal. de Beauv.)
- Capim Pangola (Digitaria decumbens Stent.)

As amostras foram colhidas de 18 de fevereiro a 15 de maio, dentro portanto, da época considerada chuvosa, para a região.

Em diversos cortes afetuosos, foi calculada a altura média das diversas forrageiras, com auxílio de uma mira de topógrafo.

As forrageiras foram coletadas em canteiros retangulares de 2x6 m, e ceifadas no início dos trabalhos. Decorridos 30 dias, foi ceifado o material de um terço desses canteiros; aos 60 e 90 dias, respectivamente, as duas terças partes restantes foram ceifadas. Cerca de 20 plantas foram escolhidas ao acaso e levadas ao laboratório, onde eram picadas e misturadas, antes de passar às análises químicas. As amostras compreendiam toda a parte aérea da planta.

Coleta do Líquor de Rúmen

A escolha de ovinos para a realização do trabalho foi feita mediante a consideração de várias vantagens por eles apresentadas: sendo mais dóceis, facilitariam a fistulação e

a coleta periódica do líquido; são de custo mais baixo e de fácil contenção.

Utilizaram-se dois carneiros com a idade aproximada de um ano, e com 26 quilos de peso médio.

TABELA 3 - Época do Corte das Forrageiras

Forrageiras	Época do Corte (Dia do Mês)			
	Fevereiro	Março	Abril	Maior
Soja Perene	18	18	18	-
Capim Pangola	25	25	25	-
Capim Gordura	26	26	26	-
Capim Guatemala	-	4	4	4
Capim Sempre-Verde	-	5	5	5
Centrosema	-	6	6	6
Capim Jaraguá	-	12	12	12
Capim Elefante-Napier	-	15	15	15

TABELA 4 - Altura das Diversas Forrageiras na Época do Corte

Forrageiras	Altura das Diversas Forrageiras		
	30 Dias (cm)	60 Dias (cm)	90 Dias (cm)
Soja Perene	35	40	90
Capim Pangola	20	20	25
Capim Gordura	20	50	95
Capim Guatemala	70	100	120
Capim Sempre-Verde	80	110	150
Centrosema	10	20	60
Capim Jaraguá	50	70	150
Capim Elefante-Napier	60	110	160

Os carneiros, antes da fistulação, passaram por um período preparatório de aproximadamente um mês. Durante este período receberam uma dose de vermífugo e mistura de sais minerais - produto comercial. Receberam, também, água, farinha de ossos e capim Guatemala tudo à vontade, tratamento este que se estendeu até o final do trabalho.

Quanto à gramínea usada, preferiu-se o capim Guatemala por apresentar ainda bom aspecto na ocasião do trabalho, isto é, durante os meses de agosto, setembro e outubro. O capim cortado era em seguida picado e distribuído em cochos, dentro de um piquete para bezerros contendo capim kikuiu. Durante o dia, permitia-se a saída dos animais para exercícios.

Uma semana antes da "fistulação" os animais foram abrigados em uma dependência do estábulo da Escola Superior de Agricultura. São abrigos individuais próprios para bezerros.

A distribuição da água, dos sais minerais, da farinha de ossos e da gramínea, fazia-se em baldes, comumente usados no aleitamento artificial de bezerros.

Pode-se observar, à página 76 alguns pormenores da cânula usada no trabalho presente. Esta comumente consiste de um tubo de borracha com dois discos também de borracha, porém de maior resistência. O disco inferior é preso no próprio tubo e, o outro, móvel. O fixo fica adaptado à parede interna do rúmen, e o móvel na parte externa da pele WILWERTH, (1956).

Veja-se, pormenorizadamente, a cânula e o Erlenmeyer usado na fermentação "in vitro" do presente trabalho (Figura 1).

- a. Parte terminal do tubo de borracha com aproximadamente 6,0 centímetros de comprimento. É fechado, não permitindo a saída de gás durante a fermentação;
- b. Corte no tubo de 1,0 cm de comprimento. Permite a saída de gás sobre pressão interna mas não permite a entrada;
- c. Tubo de vidro de 10 cm de comprimento. Na parte inferior atravessa a rôlha de borracha;
- d. Rôlha de borracha número 24. Tamanho ideal para erlenmeyer de 125 ml;
- e. Diâmetro total do disco externo da cânula, 4,5 cm;
- f. Diâmetro interno do disco, que permite a passagem do tubo de borracha com certa pressão;

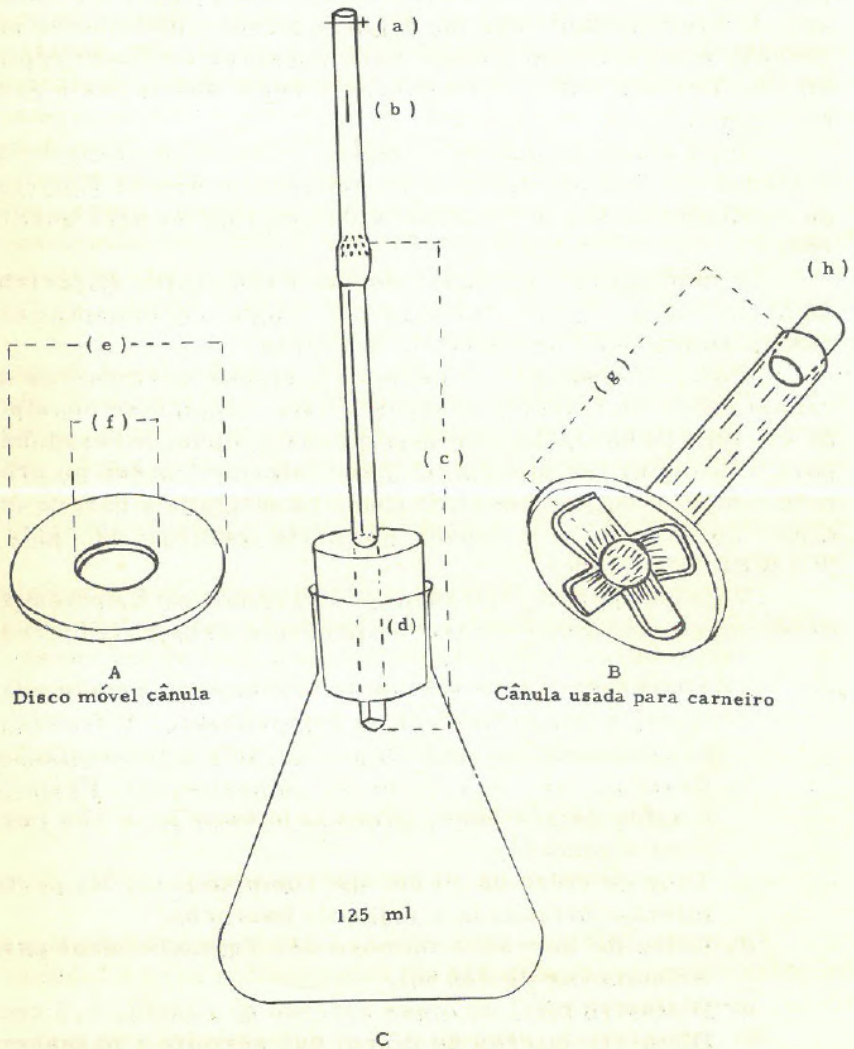


FIG. 1 - Erlenmeyer equipado para fermentação "in vitro"

- g. Comprimento total da cânula. É um tubo de borra-
cha comum, de relativa resistência;
- h. Rôlha de borracha número 12 que veda a extremida-
de da cânula. Só é retirada na ocasião das cole-
tas do líquido de rúmen, e é protegida com esparadra-
po.

As Figuras 2 e 3 às páginas 78 e 79 mostram um dos animais do presente trabalho, após três meses de "fistulação", e detalhes da fístula.

Após muitas tentativas para se colher o líquido de rúmen, decidiu-se pelo uso de uma bomba a vácuo, com adapta-
ção de uma pipeta de 200 ml em sua extremidade, conforme mostra a figura 4 da página 80. A parte mais fina da pipeta, que entrava em contato com o rúmen, tinha sua extremidade cortada anteriormente, evitando, com isso, entupimentos.

Semanalmente, fazia-se a coleta do líquido. Antes, po-
rém, os carneiros passavam por um jejum, que durava das 7 às 14 horas, ocasião em que se iniciava a coleta prôpriamente dita. Entretanto, a água continuava à disposição dos mesmos, facilitando a retirada do líquido.

Para a coleta retirava-se a rôlha de borracha de cânula, (B) e, em seguida, introduzia-se a extremidade da pipeta até alcançar o rúmen. Colocava-se a bomba de vácuo em funcionamento, vindo o líquido do rúmen alojar-se no bôjo da pipeta. Uma garrafa térmica pré-aquecida a 39°C recebida imediatamente o líquido, quando a pipeta se apresentava mais ou menos cheia.

Geralmente, era retirado meio litro de líquido dos dois carneiros e, imediatamente, transportado para o laboratório. Em seguida, era filtrado em gaze por duas vêzes consecutivas, de três e cinco dobras, respectivamente. Finalmente, procedia-se à terceira e última filtração em linho.

Análises do Material no Laboratório

Determinação da Matéria Sêca

Uma vez colhidas as diversas forrageiras no campo, as amostras eram transportadas em saco plástico para o laboratório, imediatamente.

No laboratório, procedia-se à determinação da matéria sêca, em estufa a 65°C, operação denominada de pré-se-



FIG. 2 - Carneiro após 3 meses da fistulação.



FIG. 3 - Carneiro com detalhes da fístula

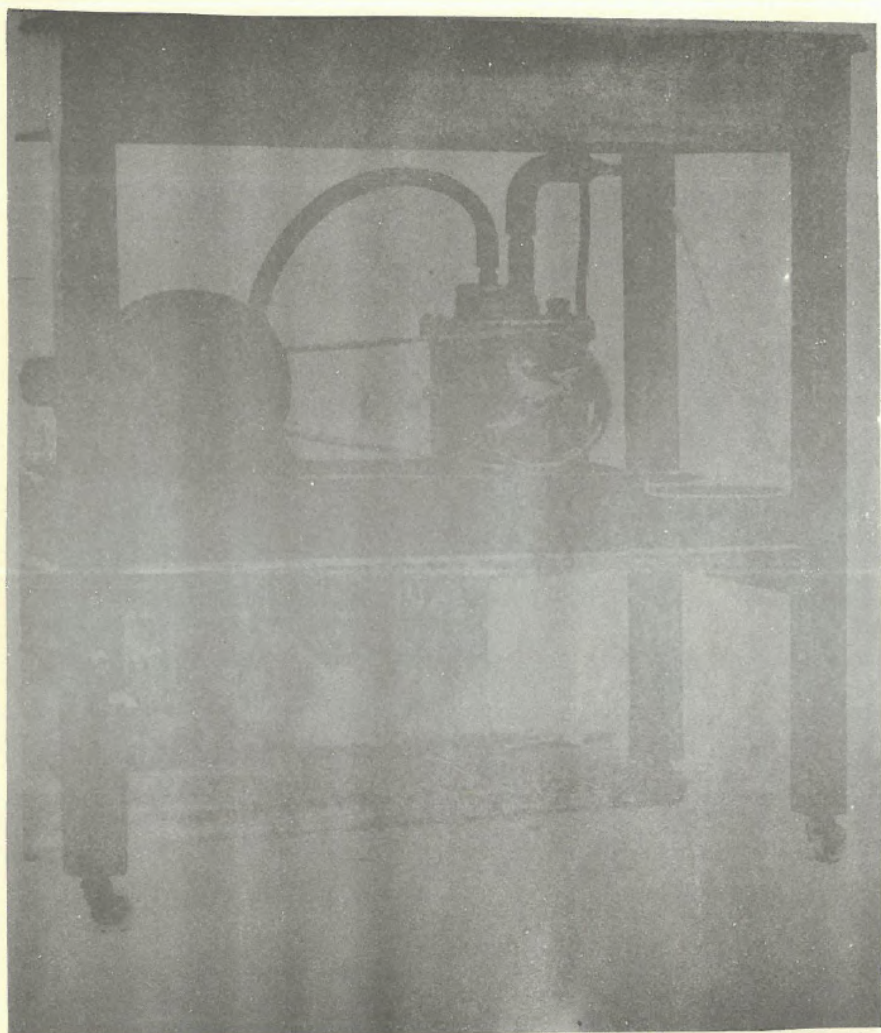


FIG. 4 - Bomba a vácuo para coleta do "líquor de rúmen"

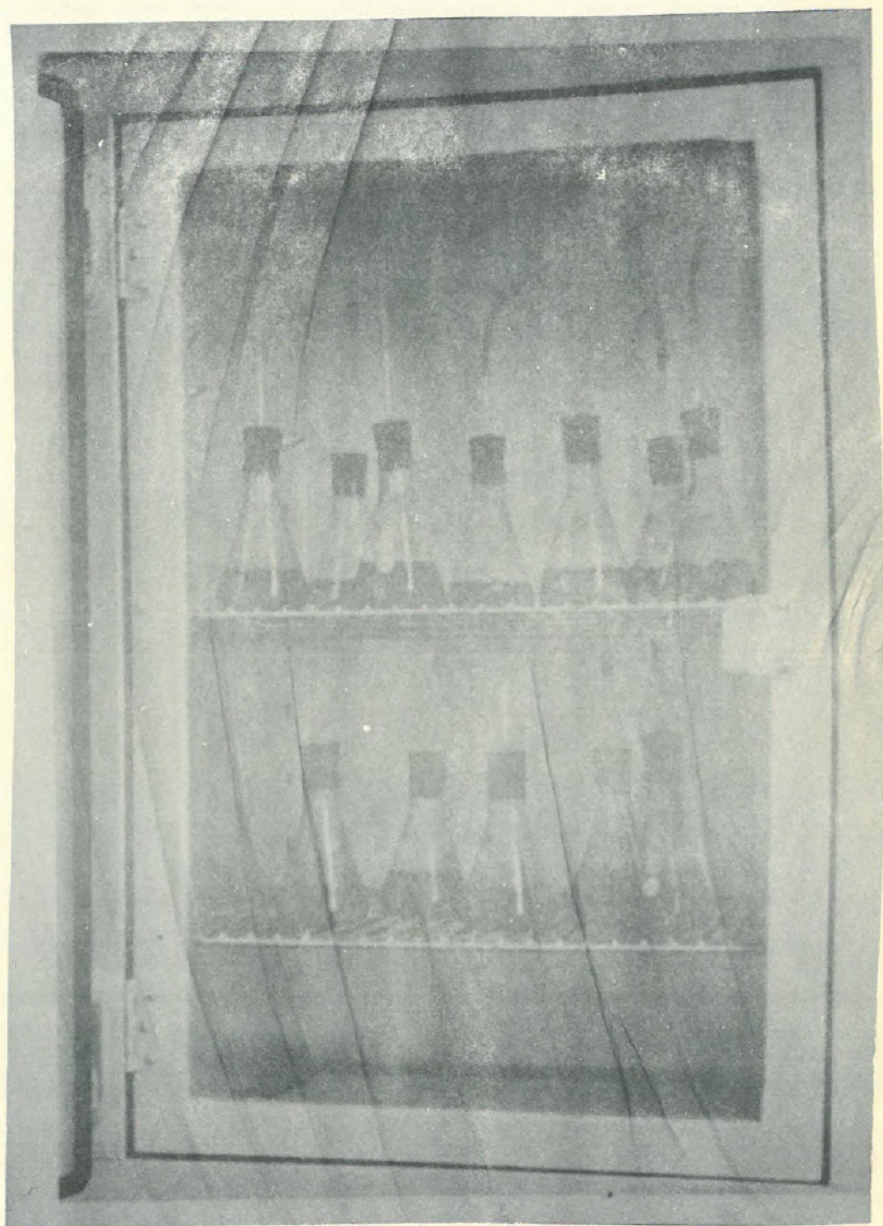


FIG. 5 - Fermentação "in vitro" a 39°C.

cagem. Em seguida, passava-se o material no moinho com peneiras de 40 "mesh", armazenando, em vidro com tampa de polietileno, o produto final, para futuras análises. A secagem definitiva era também feita em estufa a 105°C, até constância de peso. Isto de acordo com BRIEGER (1931).

Para o cálculo da matéria seca final foram feitas três repetições, sendo o resultado final a média dessas três repetições.

Determinação da Celulose das Forrageiras

Uma vez preparada as 24 amostras das forrageiras do presente trabalho, passou-se à determinação da celulose. O método usado foi o de CRAMPTON e MAYNARD (1938).

Os reagentes químicos para esta análise são os seguintes:

- a. Reagente ácido
 - 800 ml de ácido acético
 - 200 ml de água destilada
 - 100 ml de ácido nítrico
- b. Etanol 95%
- c. Benzeno
- d. Éter sulfúrico
- e. Ácido sulfúrico 1835/40
- f. "Celite" para ajudar na filtração.

A marcha propriamente dita, usada pelos citados autores, é assim resumida:

- a. Pesa-se uma alíquota de aproximadamente 1 g de amostra em copo de 100 ml. Sendo para determinar a celulose do material após a fermentação "in vitro" adicionar, antes, 1 ml de ácido sulfúrico 2N ao erlenmeyer, após a etapa da fermentação, e, transferir para copo de 100 ml com auxílio de água destilada;
- b. Seca-se o conteúdo do copo na estufa de ventilação a 80°C durante 24 horas;
- c. À amostra seca adicionam-se 16,5 ml do reagente ácido;
- d. Colocam-se os copos em banho-maria, deixando-os 20 minutos em ebulição leve. Anotar o tempo do início da ebulição;
- e. Adicionam-se 25 ml de etanol frio 95% ao copo. Fil-

- tra-se através de bastões de filtro de porosidade média, recobertos com "celite", ou em "gooch" com amianto;
- f. Lava-se sucessivamente o conteúdo dos bastões com porções de 20 ml dos seguintes solventes; Etanol frio, etanol quente, benzeno quente, etanol quente e éter sulfúrico;
 - g. Colocam-se os "goochs" na estufa e deixam-se secar, até constância de peso, a 105°C durante aproximadamente 3 horas;
 - h. Pesa-se;
 - i. Incinera-se a 550-600°C durante 3 horas;
 - j. Pesa-se e determinam-se as porcentagens de celulose pela perda de peso observada durante a incineração.

Dos resultados obtidos em celulose eram considerados somente aqueles dentro de 5% de erro, limite permitido nas análises químicas. Para cada amostra foram feitas três determinações; porém, houve caso de quatro, pois era comum perder-se algum material durante a filtração em gooch.

Determinação da Celulose do Líquor de Rúmen

Sempre que se coletava líquido, determinava-se seu teor de celulose, o qual era somado aos teor de celulose de cada forrageira fermentada pelo líquido. Veja-se a marcha de tal análise:

- a. Usar uma amostra de forragem na qual a matéria seca e celulose já tenham sido determinadas. Pesar em copo de 100 ml;
- b. À amostra adicionar 25 ml do líquido e 1 ml de H_2SO_4 2N. Secar a 80°C, durante 24 horas e determinar a celulose pelo método visto anteriormente. A celulose de cada forrageira "Standard" com a celulose do líquido de rúmen, menos a da "Standard", dará a celulose do líquido;
- c. Adicionar a quantidade de celulose encontrada para o líquido à existente em cada amostra, ou seja, a cada forrageira, a fim de obter o "contrôle", que deve ser usado no cálculo da porcentagem de digestibilidade.

Fermentação "in vitro"

Os reagentes e as soluções químicas indispensáveis ao processo da fermentação são os seguintes:

A. Solução tampão (McDougall's - 1948)

Ingredientes		g/litro
	NaHCO ₃	9,80
	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	7,00
ou,	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	4,65 g
ou,	Na ₂ HPO ₄ · anidro	3,71 g
	KCl	0,57
	NaCl	0,47
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,12
	CaCl ₂	0,04
ou,	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,05 g

Cada reagente deve ser completamente dissolvido, antes que outro reagente seja adicionado.

B. Solução padrão (stock) de uréia:

5,5 g de uréia em balão volumétrico de 100 ml. Conservar no refrigerador.

C. Solução padrão (stock) de glucose:

5,5 g de glucose em balão volumétrico de 100 ml. Conservar no refrigerador.

D. Ácido sulfúrico 2N - prepara-se a partir de 56,2 ml de H₂SO₄ concentrado (d = 1,84) por litro.

Preparo do Reagente (McDougall's, 1948): Um dia antes da fermentação "in vitro", adicionar, a cada 300 ml desta solução, 5 ml da solução de uréia e 5 ml da de glucose. Deixar dormir na estufa a 39°C. Cada vez, antes do uso, abaixar o pH até 6,8 - 6,9 por borbulhagem CO₂ (o pH no início é quase sempre 8,6). A solução deve ser agitada para evitar sedimentação.

A marcha da fermentação "in vitro", seguida no trabalho, foi a seguinte, de acordo com Mott (1961):

- Pesar 1,0 g de amostra com celulose predeterminada em erlenmeyer de 125 ml;
- Adicionar 30 ml da solução tampão mineral (McDougall's, 1948) com uréia e glicose;
- Adicionar 20 ml do líquido de rúmen;

- d. Passar CO_2 sobre a superfície do conteúdo e arrolhar imediatamente.
- e. Incubar a 39°C durante 24 horas em estufa de temperatura controlada;
- f. Girar o frasco pelo menos duas vezes durante a fermentação para expulsar o gás;
- g. No final da incubação adicionar 1 ml de ácido sulfúrico 2N e transferir para um copo de 100 ml com auxílio de água destilada. Verificar o pH de alguns frascos com "potenciômetro", antes da adição do ácido. Com pH superior a 7,1 e inferior a 6,2 eliminar o conjunto;
- h. Secar em estufa com ventilação a 80°C , 24 horas;
- i. Esfriar e pesar para se ter o peso da matéria seca, antes do cálculo final da celulose;
- j. A porcentagem da digestão da celulose, ou de digestibilidade, é calculada do seguinte modo;

$$\% = \frac{100 \times (\text{cel. da amostra} + \text{cel. L. R.}) - (\text{Cel. após Fermentação})}{\text{Celulose da amostra} + \text{cel. do L. R.}}$$

Esta marcha, seguida no presente estudo, é recomendada por MOTT (1961) e BAUMGARDT *et al.* (1962), apenas com duas modificações: os autores acima afirmam que não há diferença significativa entre usar 24 ou 48 horas no período de fermentação da celulose, mas, como as forrageiras do presente trabalho contêm, em média, porcentagem mais elevadas de celulose, decidiu-se pelo uso de 48 horas de fermentação. Usou-se, ainda, 0,9 g de amostra (substrato) em cada erlenmeyer ao invés de 1,0 g conforme a marcha.

Nota: No presente trabalho encontrou-se de 5 a 9% de celulose no líquido de rúmen.

4. RESULTADOS

Matéria Seca

Apresentam-se, as porcentagens de matéria seca (M.S.) encontradas nas diversas forrageiras estudadas (Tabela 5).

TABELA 5 - Porcentagem de Matéria Sêca das Forrageiras, nos Diversos Cortes

Forrageiras	% M.S.		
	30 Dias	60 Dias	90 Dias
Soja Perene	16,27	23,12	31,97
Capim Pangola	20,89	39,53	30,54
Capim Gordura	23,51	34,41	24,87
Capim Guatemala	11,63	24,99	24,91
Capim Sempre-Verde	21,16	27,96	26,03
Centrosema	23,36	29,46	27,20
Capim Jaraguá	34,61	35,68	37,08
Capim Elefante-Napier	16,41	20,96	23,25

Teor de Celulose

As porcentagens de celulose, na matéria sêca, estão apresentadas na Tabela 6.

TABELA 6 - Porcentagem de Celulose das Forrageiras na Matéria Sêca

Forrageiras	Porcentagem da Celulose das Forrageiras		
	30 Dias	60 Dias	90 Dias
Soja Perene	34,81.	37,40	34,68
Capim Pangola	32,34	33,57	34,62
Capim Gordura	36,20	37,54	42,11
Capim Guatemala	36,70	35,68	37,29
Capim Sempre-Verde	39,28	40,17	40,84
Centrosema	33,93	34,19	33,09
Capim Jaraguá	34,27	34,07	39,83
Capim Elefante-Napier	32,85	37,38	39,27
= M	35,05	36,25	37,72

Os resultados encontrados para celulose foram submetidos à análise de variância Tabela 7 .

TABELA 7 - Análise de Variância da Porcentagem de Celulose

Fontes de Variações	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Médias dos Quadrados	F
Época do Corte	83,3881	2	41,6940	4,31 ¹
Espécie	312,9319	7	44,7045	4,62 ¹
Interação				
Época x Espécie	135,4987	14	9,6785	25,50 ¹
Erro	18,2142	48	0,3795	
Total	550,0329	71		

¹ Significante ao nível de 5% de probabilidade.

² Significante ao nível de 1% de probabilidade.

Teor de Digestibilidade

Finalmente, são apresentadas as porcentagens médias de digestibilidade "in vitro" das diversas forrageiras estudadas Tabela 8.

TABELA 8 - Porcentagem de Digestibilidade "in vitro" das Forrageiras Estudadas na Matéria Sêca.

Forrageiras	Porcentagem de Digestibilidade "in vitro"		
	30 Dias	60 Dias	90 Dias
Soja Perene	78,28	68,51	69,92
Capim Pangola	74,54	68,86	69,76
Capim Gordura	75,12	68,66	73,21
Capim Guatemala	82,86	77,39	73,03
Capim Sempre-Verde	80,62	69,94	68,62
Centrosema	75,41	64,81	61,62
Capim Jaraguá	84,50	74,77	70,85
Capim Elefante-Napier	88,48	77,79	72,15
M	80,00	71,34	69,90

Os resultados obtidos para digestibilidade "in vitro" foram submetidos à análise da variância Tabela 9.

TABELA 9 - Análise de Variância para Digestibilidade "in vitro".

Fontes de Varia- ções	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Médias dos Quadrados	F
Época do Corte	475,431	2	237,715	34,401"
Espécie	334,479	7	47,783	6,915"
Erro	96,740	14	6,910	
Total	906,650	23	39,419	

" Significante ao nível de 1% de probabilidade.

Para se determinar o efeito da época do corte sobre cada uma das espécies, foram feitas as análises de regressão cujos resultados estão indicados na Tabela 10. O coeficiente linear indica o efeito médio, por mês, (30 dias) e o coeficiente quadrático indica o efeito médio de termo do segundo grau. Quando este último coeficiente não é significativo, pode-se tomar a função como sendo linear. Quando ele é positivo, a função é uma curva côncava, como a da digestibilidade da Soja Perene ou do Capim Gordura. Quando é negativo, a função é uma curva convexa como a da celulose da Soja Perene (página 89).

Chama-se a atenção para os efeitos quadráticos da digestibilidade que não são significantes, considerando-se somente uma função linear para todas as espécies.

Nas páginas 90, 91, 92 e 93 apresentam-se, em gráficos, as porcentagens de celulose e de digestibilidade das forrageiras estudadas nos respectivos cortes efetuados.

Nota: As análises estatísticas foram feitas de acordo com PIMENTEL GOMES (1963) e SNEDECOR (1956).

TABELA 10 - Análise da Regressão da Porcentagem de Celulose e da Porcentagem de Digestibilidade sobre a Época do Corte.

Forrageiras	Celulose		Digestibilidade	
	Linear	Quadrático	Linear	Quadrático
Soja Perene	- 0,07	- 0,89 "	- 4,18 "	1,85
Capim Pangola	1,14 "	- 0,03	- 2,39	1,10
Capim Gordura	2,96 "	0,54 "	- 0,95	1,83
Capim Guatemala	0,30	0,44 "	- 4,91 "	0,18
Capim Sempre-Verde	0,78 "	- 0,04	- 6,00 "	1,56
Centrosema	- 0,42	- 0,23 "	- 6,89 "	1,23
Capim Jaraguá	2,78 "	0,99 "	- 6,82 "	0,97
Capim Elefante-Napier	3,21 "	- 0,44 "	- 8,16 "	0,84
Erro Padrão	0,251	0,102	1,864	1,073

" Efeitos significantes ao nível de 5% de probabilidade.

" Efeitos significantes ao nível de 1% de probabilidade.

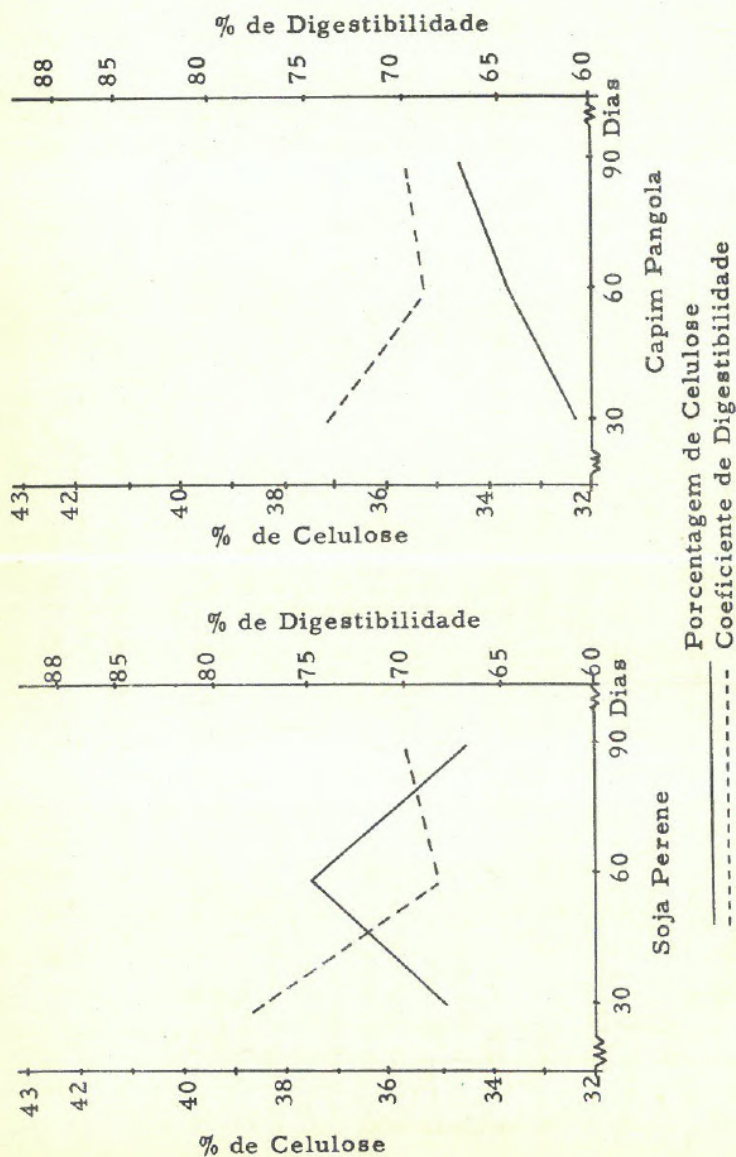


FIG. 6 - VARIAÇÃO DOS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE SEGUNDO OS TEORES DE CELULOSE

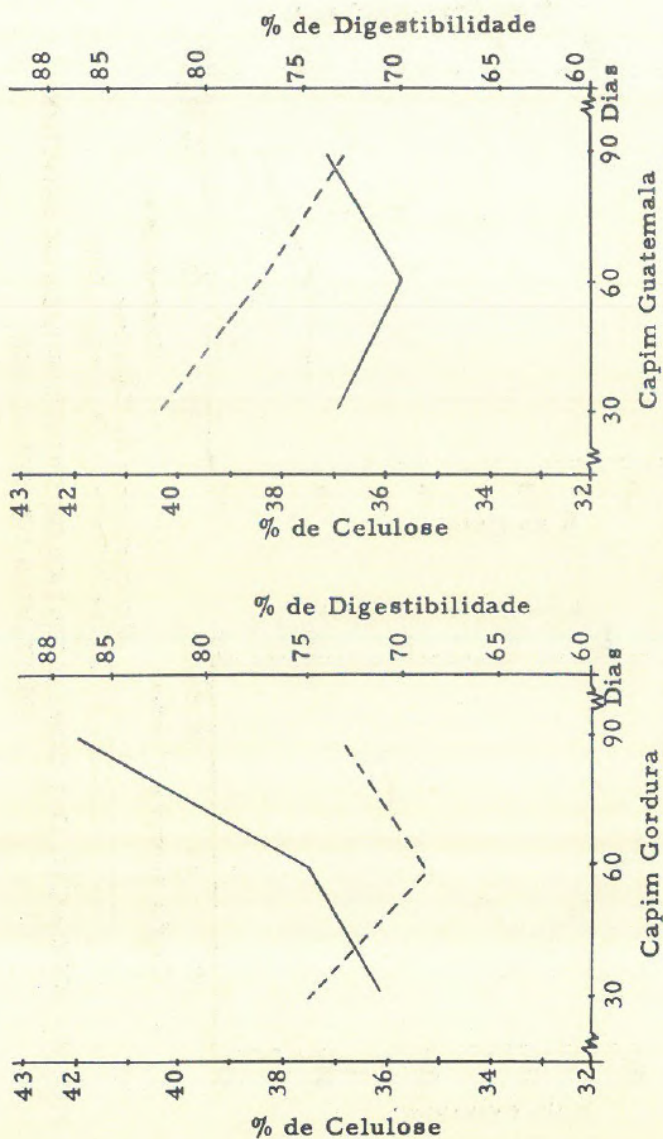


FIG. 7 - VARIAÇÃO DOS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE SEGUNDO OS TEORES DE CELULOSE

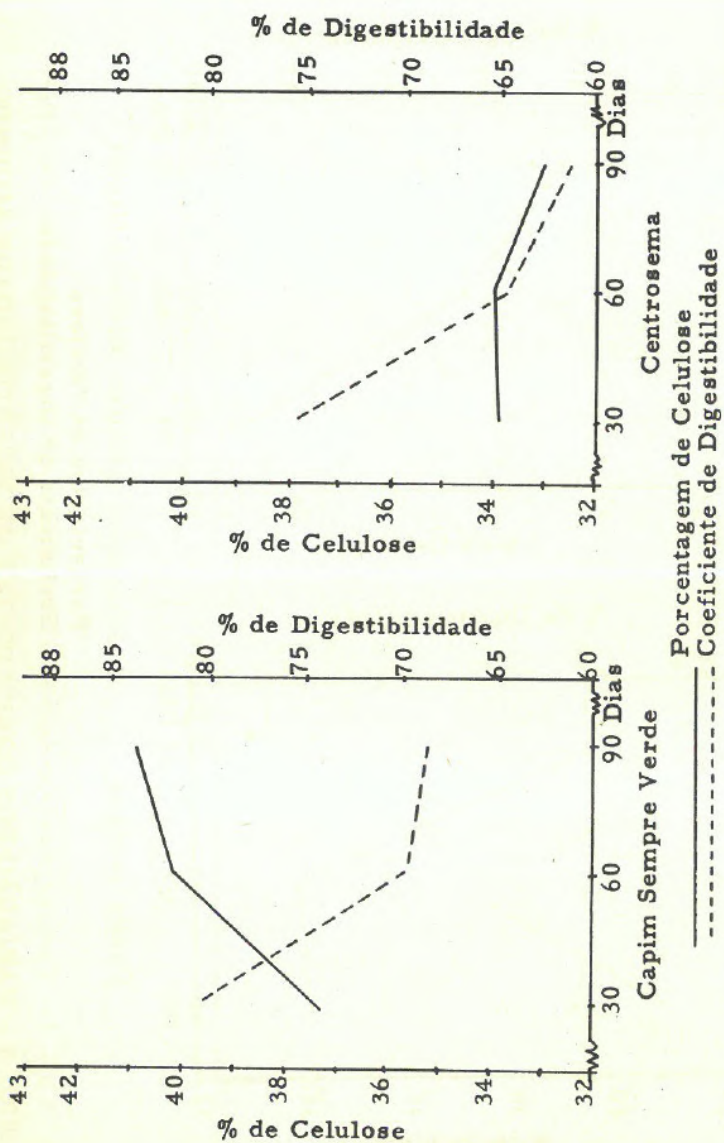


FIG. 8 - VARIAÇÃO DOS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE SEGUNDO OS TEORES DE CELULOSE

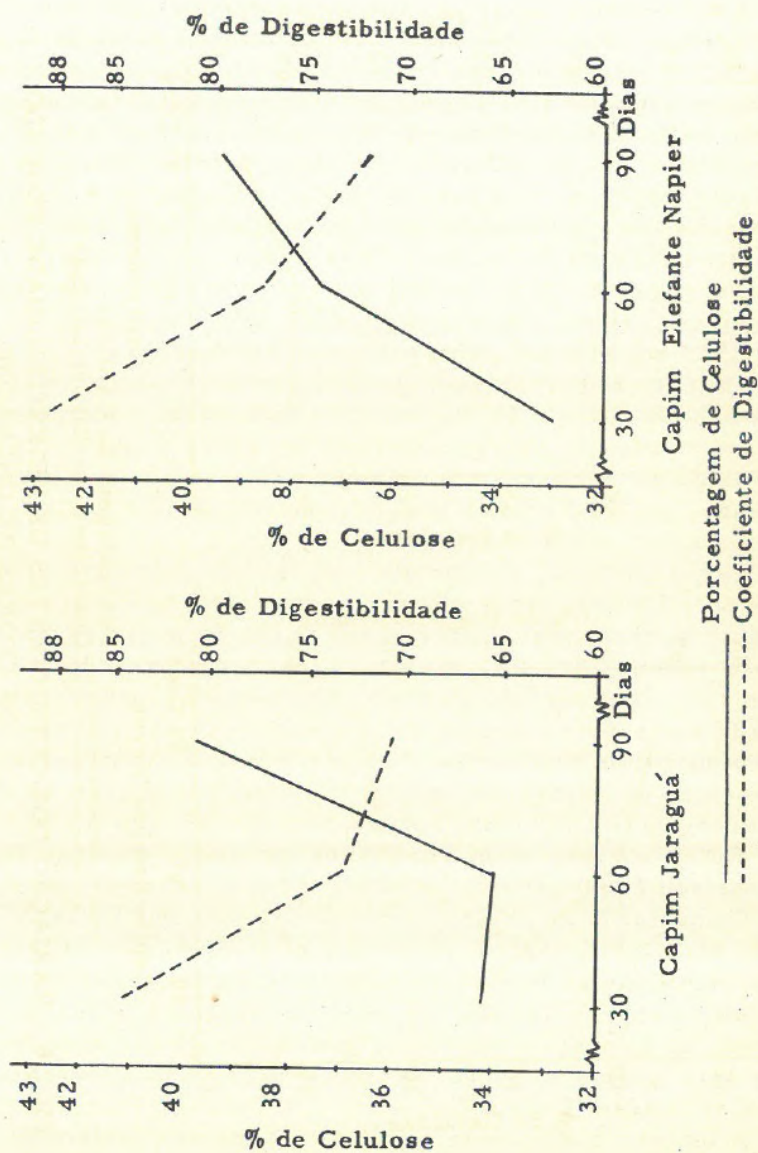


FIG. 9 - VARIAÇÃO DOS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE SEGUNDO OS TEORES DE CELULOSE

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados encontrados no presente trabalho, relacionados com a matéria seca, merecem algumas considerações. Principalmente aqueles referentes ao terceiro período, ou terceiro estágio.

Normalmente, o que se espera é o aumento mais ou menos constante da matéria seca com o aumento da idade das forrageiras; entretanto, não se coletando as oito forrageiras de cada período, de uma só vez, fez com que a ocorrência de chuvas, no final do segundo estágio, interferisse na matéria seca e, talvez, na digestibilidade de algumas forrageiras, aos 90 dias de idade. Apenas para exemplificar, quando o capim Elefante-Napier, o último a ser cortado em cada estágio, completava 30 dias de idade, a Soja Perene já quase alcançava seu segundo corte. Vejam-se as épocas de corte das forrageiras (Tabela 3) e a precipitação do primeiro semestre de 1963 em Viçosa - Minas Gerais (Figura 10).

Voltando às porcentagens da matéria seca das forrageiras estudadas (Tabela 5), vê-se que a Soja Perene aumentou no terceiro estágio, ou seja, no terceiro corte efetuado. Isto talvez possa ser explicado pelo período seco que a soja atravessou, pois as chuvas somente ocorreram em abril, já às vésperas do seu terceiro corte.

Por outro lado, as demais forrageiras cortadas dias após a Soja Perene, diminuíram em suas respectivas porcentagens de matéria seca. Entre essas citam-se o capim Pangola e o capim Gordura, que talvez fôssem os mais beneficiados com este período chuvoso. Em seguida, houve certa constância nas porcentagens da matéria seca das forrageiras, como capim Guatemala, Sempre-Verde e Centrosema. Finalmente, os capins Jaraguá e Elefante-Napier, as últimas forrageiras coletadas, apresentam aumento na matéria seca. Estes cortes foram realizados em maio, mês que se caracterizou como seco.

Comentando as porcentagens de celulose das forrageiras em seus três estágios, vê-se que há aumento estatisticamente significativo. Por outro lado, há diferença altamente significativa no teor da celulose, entre as espécies estudadas. Contudo, há interação também significativa, o que obriga a partir para análise individual de cada espécie, nas diferentes épocas estudadas (Tabela 7).

A interação altamente significativa mostra exatamente

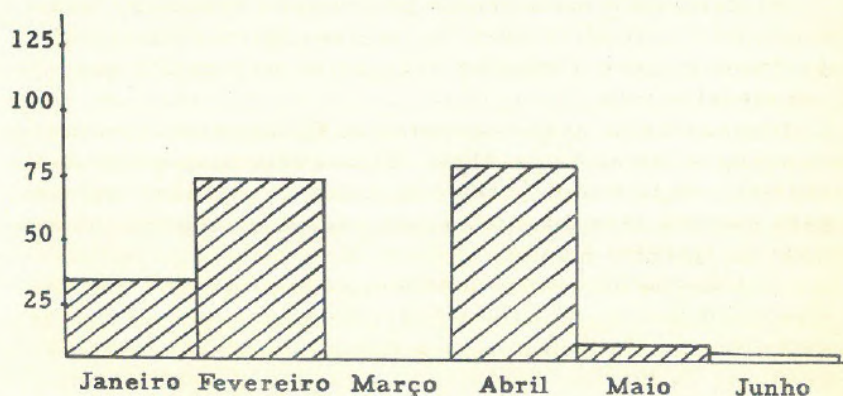


FIG. 10 - Precipitação Média Mensal do Primeiro Semestre de 1963

Fonte: Serviço de Meteorologia. Estação de Viçosa, Estado de Minas Gerais. 1963.

que as diversas espécies não se comportam da mesma maneira, quanto à variação da porcentagem de celulose em diferentes estádios de desenvolvimento.

Confirmando o aumento da celulose com o desenvolvimento das plantas, NORMAN, em 1943 citado por REDER (1954), afirma que a celulose aumentou de 19% nas plantas com 21 dias de idade, para 32, 3% (Matéria Sêca) aos 70 dias, e a lignina de 1,48% com 7 dias para 7,47% na planta madura. Afirma, ainda, que há aumento de celulose, hemicelulose e lignina com o crescimento da planta e com a idade.

Ainda REDER (1954) confirma a existência de relação entre umidade do solo e porcentagem dos componentes da planta. Cita BRULDSON e MORGAN, em 1935, afirmando que há relação direta entre umidade e componentes de planta, e que a fibra crua aumentou de 15,2 a 19,3% com níveis variáveis de irrigação, isto é, houve aumento de fibra crua com o aumento de água aplicada.

O capim Gordura do presente trabalho vem confirmar exatamente o que foi dito por êsses autores, isto é, sendo aparentemente o mais beneficiado pelas chuvas, apresentou também o mais alto índice de celulose entre tôdas as forrageiras estudadas. Outra observação interessante é que, com o mais alto teor de celulose aos 90 dias de idade, o capim Gordura, mesmo assim, apresentou a mais alta digestibilidade de entre tôdas as forrageiras. Talvez isso seja decorrência, também, do fato de o canteiro do capim Gordura ter sido irrigado durante três dias consecutivos, por engano do encarregado da referida secção.

Entretanto, outros autores, como BROWN, em 1943, citado ainda por REDER (1954), mostram que a fibra crua aumentou de 15,9% (Matéria Sêca) no dia primeiro de abril, para 24,2% no dia 15 de maio. Alcançou o máximo, 26,2%, no verão, mas, tendo chovido neste período, a fibra crua decresceu.

Comentando as porcentagens da digestibilidade, pode-se facilmente concluir que há também diferença altamente significativa na digestibilidade entre épocas ou estádios, assim como entre as espécies de forrageiras estudadas (Tabela 9).

Verifica-se (Tabela 8) que, entre 30 e 60 dias, houve decréscimo bastante acentuado na digestibilidade das forrageiras. Êsses resultados estão em consonância com o trabalho de BYER et al. (1961). Por outro lado, entre 60 e 90 dias, o mesmo não aconteceu, conforme mostra a tabela, e isto, talvez se explique pela ocorrência de chuvas, já referidas anteriormente.

Feita esta análise de variância preliminar, que mostrou haver variação entre as diferentes épocas de corte e entre as diversas espécies, fêz-se, em seguida, análises da regressão para a porcentagem de celulose e para a porcentagem de digestibilidade "in vitro", com o objetivo de verificar o comportamento de cada espécie nos diferentes cortes.

Os resultados encontrados em celulose para as leguminosas Soja Perene e Centrosema, parecem não ser indicativos da espécie. O mesmo se conclui da digestibilidade do capim Gordura e capim Pangola, que tanto destoaram dos demais resultados. Portanto, não se poderá tirar conclusões positivas, quanto a êsses resultados.

O capim Guatemala apresentou um pequeno aumento mensal de celulose, o que não chegou a ser significativo. Entretanto, sua digestibilidade decresceu em quase 5% ao mês.

Finalmente, os resultados das forrageiras que tiverem comportamentos semelhantes nos diferentes estádios de desenvolvimento: capim Sempre-Verde, capim Jaraguá e capim Elefante-Napier. Observa-se nestas forrageiras que, quanto maior a porcentagem de celulose, menor é a digestibilidade. O capim Elefante-Napier, por exemplo, aumentou 3,21% ao mês em celulose, mas, por outro lado, decresceu, 8,16% em sua digestibilidade em cada estágio estudado.

6. CONCLUSÕES

1. Houve diferença significativa na porcentagem da celulose das forrageiras entre as épocas estudadas. Houve, ainda, diferença altamente significativa em celulose, entre as espécies estudadas no presente trabalho.
2. Houve, também, diferença altamente significativa na digestibilidade "in vitro", entre as espécies e entre épocas de cortes das forrageiras.
3. Houve tendência para aumentar a celulose e diminuir a digestibilidade com o aumento da idade das forrageiras.
4. Os capins Jaraguá, Sempre-Verde e Elefante-Napier foram dos que mais aumentaram em celulose, mas foram também os que mais decresceram em suas respectivas digestibilidades. Apresentaram, entretanto, os maiores desenvolvimentos vegetativos, conforme mostra a Tabela 4.
5. O aumento mensal em celulose das leguminosas Soja Perene e Centrosema é menor do que o das gramíneas. Entretanto, decrescem em digestibilidade de modo semelhante.
6. O capim Guatemala, que apresentou pequeno aumento mensal na porcentagem de celulose, manteve-se com boa digestibilidade durante os três estádios. Por outro lado, o capim Elefante-Napier, que possuía maior digestibilidade no primeiro corte, teve decréscimo mensal de 8%.
7. Os resultados encontrados para o capim Pangola e capim Gordura revelaram aumento altamente significativo em celulose, mas com decréscimo não significativo em suas respectivas digestibilidades. Talvez a umidade do solo fôsse o fator causal no caso.
8. O capim Sempre-Verde, um dos que apresentaram bom desenvolvimento vegetativo nos três estádios estudados, teve a seu favor aumento não muito elevado na porcentagem

de celulose mensal, assim como, também no decréscimo da sua digestibilidade.

7. SUMMARY

The present study began with the cutting of 8 forages; Perennial Soybean (*Glycine javanica*); Centrosema (*Centrosema pubescens*); Elephant Grass-Napier (*Pennisetum purpureum*); Guatemala Grass (*Tripsacum fasciculatum*); Sempre Verde Grass (*Panicum maximum*); Jaragua Grass (*Hyparrhenia rufa*) Molasses Grass (*Melinis minutiflora*); Pangola Grass (*Digitaria decumbens*). Each forage, after the first cutting, was respectively collected when completing 30, 60 and 90 days of age, Initially dry matter was determined then cellulose; before and after fermentation "in vitro" with rumen liquor.

1. The cellulose content of the grasses studied increased significantly as the season progressed. There was also a highly significant difference among the species as to their cellulose content.

2. The "in vitro" digestibility study showed a highly significant difference among species as well as among the stages of growth considered.

3. As the ages increased the cellulose content of the species increased while the digestibility decreased.

4. The grasses Jaragua, Sempre-Verde and Elephant-Napier were the ones that had the greatest increase in cellulose and decreased markedly in the digestibility as their stage of maturity advanced (Table 4). These grasses were also tallest when cut at 90 days.

5. The monthly increase in cellulose content was found to be less for the legumes, Perennial Soybean and Centrosema, than for the grasses. However, the digestibility of these legumes decreased in the same pattern as that of the grasses.

6. The monthly increase in the cellulose content of Guatemala grass was very small and the digestibility of this grass remained high during the three stages of growth. On the other hand the digestibility of Napier grass, which was the most digestible at the first cutting, decreased 8% monthly.

7. The Pangola and Molasses grasses, though exhibiting a highly significant increase in their cellulose content, showed no significant decrease in their digestibility.

8. The Sempre-Verde grass was among those which had good vegetative production in all three stages of maturity, in addition its monthly increase in cellulose content was not very great and its decrease in digestibility was small.

8. BIBLIOGRAFIA

- ANNISON, E. F. e D. Lewis. 1959. Metabolism in the rumen. Methven & Co, 1a. ed. 184 p.
- BARNES, R. F. 1962. "In vitro" forage evaluation work conference, Fourth. Chicago, [Mimeografado].
- BAUMGARDT, R. B., M. W. Taylor e J. L. Cason. 1962. Evaluation of forages in the laboratory. I. Comparative accuracy of several methods.
II. Simplified artificial rumen procedure for obtaining repeatable estimates of forage nutritive value. Journal of Dairy Science 45: 62-68.
- BRIEGER, R. 1931. Behandlung und Gesamtanalyse des Pflanzenmaterials em Handbuca du Pflanzen materials. I volume. Editado por G. Klein, Springer, Wien.
- BRUNE, Walter. 1961. Bioquímica - parte sistemática. Viçosa. U.R.E.M.G. apostila. p. 22.
- BYER, W. J., H. F. Jumah, B. R. Baumgardt e R. P. Niedermeier. 1961. Digestion in the steer, goat, and artificial rumen as measures of the nutritive value of alfalfa harvested at four stages of maturity. Madison, American Dairy Science Association, 3 p. [Mimeografado].
- CRAMPTON, E. W. e L. A. Maynard. 1938. The relation of cellulose and lignin content to the nutritive value of animal feeds. Journal of Nutrition 15: 383-395.
- "IN VITRO" Evaluation Work Conference, Fourth. 1962. Personnel and "In vitro" fermentation techniques in use at various locations. Chicago, 3p. [Mimeografado].
- KOMAREK, R. J. e E. C. Leffel. 1961. Gasttight cannula for rumen fistula. Journal of Animal Science 20: 782-784.
- MARSTON, H. R. 1948. The fermentation of cellulose "in vitro" by organisms from the rumen of sheep. The Biochemical Journal 42: 564-574.
- MCDOUGALL, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. The Biochemical Journal 43: 99-109.
- MOTT, G. O. 1961. "In vitro" rumen fermentation procedure. [Mimeografado]. s.n.t.

- NOLLER, C. H. 1961. Metabolismo dos hidratos de carbono e ácidos graxos voláteis. In Seminário de nutrição dos ruminantes, São Paulo, Anais, 12 p.
- PIMENTEL, G. F. 1963. Curso de Estatística Experimental. Universidade de S. Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2a.ed., 384 p.
- QUICKE, George V., Orville G. B., Harold, W. S. e A. L. Moxon. 1959. Cellulose digestion "in vitro" as a measure of the digestibility of forage cellulose in ruminants. Journal of Animal Science 18: 275-278.
- REDER, Ruth. 1954. Effect of environment on the crude fiber content of plants. In influence of environment on the chemical composition of plants. Ithaca, USDA, 12p. (Bul. 36).
- SERVIÇO de Meteorologia. 1963. Mapa de Observação Climatológica. Estação de Viçosa. Estado de Minas Gerais.
- SNEDECOR, G. W. 1956. Statistical Methods. The Iowa States College Press Ames, U.S.A., 5a. ed. 328 p.
- TILLEY, J. M. A. e R. A. Terry. 1960. Technique of "In vitro" digestibility of herbage, Hurley, The Grassland Research Institute, 3 p. [Mimeografado].
- WILVERTH, A. M. 1956. O efeito de variações glicêmicas sobre a motilidade do rumen em carneiros. Arquivos da ESV da UREM. 9: 219-246.