

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS, AVALIADA PELA TÉCNICA SEMIAUTOMÁTICA *IN VITRO*, NA DIETA DE RUMINANTES COM DIFERENTES FONTES DE CARBOIDRATOS NA FRAÇÃO VOLUMOSA

PAULO CESAR MOREIRA,¹ RONALDO BRAGA REIS,² PEDRO LEONARDO DE PAULA REZENDE,³
ALBERTO CORREA MENDONÇA,¹ ROBERTO DE CAMARGO WASCHECK³ E APÓSTOLO FERREIRA MARTINS⁴

1. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás

2. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

3. Departamento de Zootecnia da Universidade Católica de Goiás. E-mail: peleonardo@hotmail.com

4. Médico veterinário do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás

RESUMO

Avaliou-se o efeito da adição ou não de fontes de carboidratos (milho dentado ou milho duro ou polpa de citros) a forragens (silagem de milho, silagem de sorgo + silagem de resíduo de milho, capim-elefante, cana-de-açúcar, silagem de resíduo de milho sem adição das fontes de carboidratos), pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases em função da produção de ácidos

graxos voláteis (AGVs) nos tempos de incubação de 2, 6, 12 e 24 horas. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas com o fator tempo nas subparcelas. As médias da produção de gases foram tratadas pelos parâmetros de France. O acetato foi o AGV de maior produção. Observou-se correlação alta e positiva entre todos os AGVs no presente estudo.

PALAVRAS-CHAVES: Acetato, polpa de citros, subproduto.

ABSTRACT

PRODUCTION OF VOLATILE FATTY ACIDS EVALUATED BY SEMIAUTOMATIC TECHNIQUE *IN VITRO* IN THE RUMINANT FEEDS WITH DIFFERENT CARBOHYDRATE SOURCES IN THE ROUGHAGES RATE

The effect of carbohydrates sources (dent corn or flint corn or citrus pulp) addition to forages (corn silage, sorghum silage + silage of corn residue, elephant grass, sugarcane, silage of corn residue) was measured, through volatile fatty acids (VFA's) production at the time of incubation of 2, 6, 12 e 24 hours. A completely randomized design in split plot

with the time factor in the subplots Was used. The averages gas productions were treated by the France parameters. The acetate was VFA of larger production. It observed high and positive correlation between all of VFA's of the present study.

KEY WORDS: Acetate, by-product, citrus pulp.

INTRODUÇÃO

Os modelos dinâmicos da digestão fornecem estimativa dos valores nutritivos para os alimentos,

com a mudança da dieta, da população microbiana e do estado fisiológico do animal, além de informações sobre os fatores que deprimem os processos digestivos (MERTENS, 1993). Com a estimativa

das variáveis da cinética dos nutrientes no trato gastrointestinal, é possível o fornecimento de dietas mais adequadas, visando à máxima eficiência de síntese de proteína microbiana, bem como a redução das perdas energéticas e nitrogenadas decorrentes da fermentação ruminal, observando entre os alimentos a sincronização na degradação de nitrogênio e carboidratos no rúmen.

Os sistemas atuais de adequação de dietas para ruminantes necessitam de informações sobre o alimento no que diz respeito às suas frações de carboidratos e proteínas, bem como de suas taxas de digestão, para que se possa estimar com maior exatidão o desempenho dos animais e maximizar a eficiência de utilização dos nutrientes (FOX et al., 1992; RUSSELL et al., 1992; SNIFFEN et al., 1992).

Técnicas *in vitro* permitem a avaliação rotineira da fermentação no rúmen empregando a fração líquida do conteúdo ruminal como inóculo, como a desenvolvida por TILLEY & TERRY (1963), ou do método de produção de gases (MENKE et al., 1979). Diversos estudos têm indicado que, no método *in vitro*, a digestibilidade da MS ou da fibra inicia-se na própria forragem, independentemente da fonte de inóculo ruminal (MARINUCCI et al., 1992).

A técnica de produção de gases (MENKE et al., 1979; PELL & SCHOFIELD, 1993; THEODOROU et al., 1994) consiste basicamente em medir a produção total de gás liberada pela fermentação de uma amostra incubada em líquido ruminal tampado ou a quantidade de AGVs produzidos dessa fermentação. As vantagens dessa técnica sobre as outras técnicas *in vitro*, como a de TILLEY & TERRY (1963), para a avaliação de alimentos, foram destacadas por BLÜMMEL & ØRSKOV (1993) e MAKKAR et al. (1995). Além disso, o método de produção de gases tem como vantagem determinar a cinética de fermentação em uma única amostra, sendo necessária uma quantidade relativamente pequena permitindo que um maior número de amostras possa ser avaliado ao mesmo tempo.

O método do transdutor de leitura acoplado a uma seringa para verificação da pressão cumulada de gases através da técnica semiautomática foi utilizado por MAURICIO et al. (1999), propondo-se

alterações na técnica anterior. Resultados semelhantes com utilização da técnica semiautomática de produção de gases e leitura através de transdutor acoplado foram obtidos em estudos posteriores de avaliação de alimentos para ruminantes por MAURÍCIO et al. (1999), comparando-se os resultados com os obtidos por THEODOROU et al. (1994). A medida da pressão foi usada para estimação da produção acumulada de gás mediante o emprego de uma função quadrática derivada simultaneamente da medida da pressão e do volume dos gases para obtenção da avaliação final. Os autores realizaram modificações na técnica a fim de reduzirem-se os erros operacionais e redução no volume de material utilizado (frascos).

As produções direta e indireta de gases estão diretamente relacionadas à produção de AGVs. Experimentos de BLÜMMEL & ØRSKOV (1993) e GETACHEW et al. (1998) relatam correlação acentuada entre a produção de AGVs e volume dos gases produzido *in vitro*.

Objetivou-se com este estudo avaliar a produção de AGVs de diferentes fontes de carboidrato adicionadas a forragens utilizadas na alimentação de ruminantes, pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Gases do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG, no período de 14 de outubro a 3 de novembro de 2004.

Utilizaram-se como substrato os volumosos: cana-de-açúcar picada; silagem de milho; silagem de sorgo + silagem de resíduo de milho; capim-elefante com 32 dias de idade e silagem de resíduo de milho. Esses volumosos foram acrescidos de concentrados energéticos: polpa de citros; milho dentado AG-4051 (Monsanto[®], ciclo normal); e milho duro TORK (Syngenta[®], precoce). O resíduo de milho verde foi obtido das sobras da indústria alimentícia humana, composto por palhas, sabugo e grãos pré-cozidos, armazenados depois em silos tipo trincheira.

Os substratos foram pré-secos em estufas de ventilação forçada a 60 °C por 48 horas. Depois

foram moídos em moinho mecânico com peneira de 5 mm (forrageiras), e 1 mm (concentrados), para determinação da matéria seca (MS) em estufa a 105 °C (AOAC, 1990), proteína bruta (PB) pelo método de Kjeldhal (AOAC, 1990), e componen-

tes da parede celular pelo método de detergentes (VAN SOEST et al., 1991).

O resultado da análise bromatológica dos alimentos utilizados no experimento está expresso na Tabela 1.

TABELA 1. Análise bromatológica dos alimentos volumosos e concentrados (%MS)

Substratos	MS	FDN	FDA	PB	EE	Ca	P	NIDA
Silagem de sorgo	30,93	58,08	37,74	5,95	3,02	0,22	0,18	0,52
Silagem de milho	33,56	48,39	29,93	8,58	4,56	0,24	0,07	0,58
Capim-elefante	22,63	70,57	40,61	8,11	3,43	0,48	0,29	1,21
Silagem de resíduo de milho	25,47	78,15	36,36	8,05	3,72	0,09	0,18	0,41
Cana-de-açúcar	28,75	51,13	32,36	4,01	1,33	0,10	0,05	0,84
Polpa de citros	87,97	20,45	24,42	7,32	3,13	2,19	0,09	1,55
Milho duro	88,94	22,31	4,08	7,41	5,80	0,03	0,26	-
Milho dentado	87,68	20,95	5,5	8,81	7,46	0,05	0,41	-

MS = matéria seca; FDN= fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; Ca = cálcio; P = fósforo; NIDA = nitrogênio insolúvel em detergente ácido.

Os volumosos utilizados como substrato foram acrescidos dos concentrados energéticos polpa de citros, milho dentado moído e milho duro moído, simulando-se condições de campo, nas seguintes proporções:

Tratamento 1: silagem de sorgo (27,5%) + silagem de resíduo de milho verde (27,5%) + milho dentado (45%) – (SRDE).

Tratamento 2: silagem de sorgo (27,5%) + silagem de resíduo de milho verde (27,5%) + milho duro (45%) – (SRDU).

Tratamento 3: silagem de sorgo (27,55%) + silagem de resíduo de milho verde (27,5%) + polpa de citros (45%) – (SRPC).

Tratamento 4: capim-elefante (55%) + milho dentado (45%) – (CEDE).

Tratamento 5: capim-elefante (55%) + milho duro (45%) – (CEDU).

Tratamento 6: capim-elefante (55%) + polpa de citros (45%) – (CEPC).

Tratamento 7: cana-de-açúcar (55%) + milho dentado (45%) – (CADE).

Tratamento 8: cana-de-açúcar (55%) + milho duro (45%) – (CADU).

Tratamento 9: cana-de-açúcar (55%) + polpa de citros (45%) – (CAPC).

Tratamento 10: silagem de milho (55%) + milho dentado (45%) – (SMDE).

Tratamento 11: silagem de milho (55%) + milho duro (45%) – (SMDU).

Tratamento 12: silagem de milho (55%) + polpa de citros (45%) – (SMPC).

Tratamento 13: silagem de resíduo de milho verde (100%) – (SRM).

Para coleta do líquido ruminal (inóculo), utilizou-se uma vaca da raça Holandês, não lactante, provida de cânula ruminal permanente e adaptada às dietas propostas (45% concentrado + 55% de volumoso), balanceadas de acordo com o NRC (2001).

A coleta foi realizada manualmente no saco ventral do rúmen, quatro horas pós-alimentação. Filtrou-se o líquido ruminal em gaze, sendo acondicionado em garrafas térmicas pré-aquecidas com água a 39 °C. Compôs-se o inóculo por uma amostra de líquido ruminal retirado da vaca citada. O meio utilizado foi o “tampão de McDougal” (McDOUGAL, 1949). Depois de preparada, a

solução tampão foi colocada em banho-maria e adicionou-se, para cada litro de tampão, uma solução redutora preparada momentos antes, composta de 891 mg de HCl mais cisteína e 891 mg de sulfeto de sódio (Na_2S), 5,7 mL de NaOH 1 N e água destilada até o volume de 77 mL. Calculou-se esse volume para manter uma relação solução tampão:solução redutora de 26:2. Então, a solução foi borbulhada com CO_2 , para atingir pH entre 6,8 a 6,9.

Para as incubações, tomou-se uma amostra de aproximadamente 1 g de volumoso + concentrado, obedecendo-se às proporções volumoso:concentrado, pesando-se, em balança digital, um grama (1 g) de matéria seca da mistura, conforme os tratamentos propostos (55% de volumoso + 45% de cada concentrado; ou 100% de volumoso). As amostras dos substratos acrescidos ou não de concentrados energéticos, em triplicata, foram colocadas em frascos de vidro com capacidade de 160 mL, no volume de um grama, acrescentados nesses 90 mL de meio de cultura tamponado (MAURÍCIO et al., 1999). Os frascos foram aspergidos novamente com CO_2 , imediatamente tampados com rolha de borracha e colocados em banho-maria a 39°C (MALAFAIA, 1999). Para cada tempo dos tratamentos, incubaram-se dois frascos “brancos”, apenas com inóculo e solução tampão, para funcionar como “controle”, quantificando-se assim a produção de gases oriunda da fermentação produzida pelo inóculo. Para evitar contaminações e/ou fermentação antes da adição do inóculo, mantiveram-se os frascos em geladeira a uma temperatura de 4 °C. Cinco horas antes da inoculação os frascos foram retirados da geladeira e levados para estufa de ventilação forçada a 39°C. A inoculação foi realizada através da injeção de 10 mL de líquido ruminal em cada frasco, sob aspersão contínua de CO_2 , para manter-se anaerobiose. Após inoculação fecharam-se novamente os frascos com tampas de borracha siliconizada. A fim de garantir-se pressão uniforme em todos os frascos inseriu-se uma agulha (25 x 0,7 mm) em cada um dos vidros passando-se as tampas de borracha, possibilitando-se assim o equilíbrio entre a pressão interna dos frascos e a pressão atmosférica. Após o procedimento, retiraram-se as

agulhas e o material foi novamente levado à estufa de ventilação forçada a 39 °C, sendo retirados apenas nos tempos de leitura.

Para análise da produção de AGVs retiraram-se os frascos em triplicata nos tempos 2, 6, 12 e 24. Após a filtração do material incubado em cadinhos de vidro com porosidade de 1 μ (Pirex - Vidrotec®) retiraram-se, com pipeta, 5 mL do líquido nos tempos 2, 6, 12, e 24 horas pós-incubação, sendo armazenados em vidro âmbar de 90 mL, perfazendo-se três repetições por tratamento, e acondicionados em *freezer* vertical para análise posterior. As leituras foram realizadas por cromatografia de camada líquida a partir de padrões pré-determinados para os ácidos, acético, propiônico e butírico.

O delineamento experimental utilizado para análise estatística da produção de AGVs foi o inteiramente casualizado com parcelas subdivididas, sendo as parcelas representadas pelas forragens utilizadas com ou sem associações, e as subparcelas pelos tempos de retirada dos frascos (2, 6, 12, 24, 48, e 96 horas), num total de três repetições.

Em razão da instabilidade, transformaram-se os dados em base logarítmica (base decimal), de acordo com SAMPAIO (2002). As médias foram comparadas por contrastes ortogonais, contidos no programa estatístico SAS (1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases para as concentrações de ácidos graxos voláteis (acético, propiônico e butírico) estão expressos nas Tabelas 2, 6, 10, e 14. Os contrastes ortogonais e valor de p para as interações entre os tratamentos nos tempos estão expressos nas Tabelas 3 a 5, 7 a 9, 11 a 13 e 15 a 17.

Não houve diferenças para acetato entre os tratamentos, nos mesmos tempos pós-incubação. A comparação das médias dos tratamentos não apresentou diferenças estatísticas para o ácido acético, dentro dos mesmos tempos de incubação.

Os valores absolutos do tratamento CAPC (cana-de-açúcar + polpa de citros) são maiores até seis horas, após o qual se assemelham. Esses

resultados podem ser explicados pela fermentação rápida disponibilização da pectina da polpa para dos açúcares disponíveis na cana, bem como pela fermentação microbiológica.

TABELA 2. Valores médios de AGVs (mMol/100mL), obtidos nos tempos (H) pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases para CADE, CADU e CAPC

Tempo (h)	CADE			CADU			CAPC		
	C2	C3	C4	C2	C3	C4	C2	C3	C4
2	0,26	0,24	0,19	0,34	0,32	0,25	0,49	0,68	0,31
6	1,77	1,46	1,22	1,73	1,32	1,04	2,32	1,79	1,14
12	1,91	1,58	1,30	1,82	1,60	1,41	2,14	1,89	1,30
24	2,34	2,84	1,75	2,16	2,81	1,91	2,16	2,44	1,24

C2 = ácido acético; C3 = ácido propiônico; C4 = ácido butírico.

CADE = cana-de-açúcar associada a milho dentado; CADU = cana-de-açúcar associada a milho duro; CAPC = cana-de-açúcar associada a polpa de citros.

TABELA 3. Comparações entre as médias dentro dos tempos de coleta das observações para o ácido acético obtido pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases para CADE, CADU e CAPC

Comparação entre as médias	p valor			
	2	6	12	24
CADE vs CADU	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
CADE vs CAPC	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
CADU vs CAPC	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

CADE = cana-de-açúcar associada ao milho dentado; CADU = cana-de-açúcar associada ao milho duro; CAPC = cana-de-açúcar associada à polpa de citros; p valor = nível de significância.

TABELA 4. Comparações entre as médias dentro dos tempos de coleta das observações para o ácido propiônico obtido pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases para CADE, CADU e CAPC

Comparação entre as médias	p valor			
	2	6	12	24
CADE vs CADU	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
CADE vs CAPC	0,9813	0,9999	1,0000	0,9955
CADU vs CAPC	0,9996	0,9561	1,0000	0,9991

CADE = cana-de-açúcar associada ao milho dentado; CADU = cana-de-açúcar associada ao milho duro; CAPC = cana-de-açúcar associada à polpa de citros.

TABELA 5. Comparações entre as médias dentro dos tempos de coleta das observações para o ácido butírico obtido pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases para CADE, CADU e CAPC

Comparação entre as médias	p valor			
	2	6	12	24
CADE vs CADU	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
CADE vs CAPC	1,0000	1,0000	1,0000	0,0514
CADU vs CAPC	1,0000	1,0000	1,0000	0,0006

CADE = cana-de-açúcar associada ao milho dentado; CADU = cana-de-açúcar associada ao milho duro; CAPC = cana-de-açúcar associada à polpa de citros; p valor = nível de significância.

As concentrações molares de ácido acético e propiônico não apresentaram diferenças estatísticas entre as médias dentro dos tempos estudados. As comparações entre as dietas CADE vs CADU e CADE vs CAPC não apresentaram diferenças estatísticas nos tempos pós-incubação para ácido

butírico. Quando se comparou CADU vs CAPC, observou-se diferença estatística ($p > 0,0005$) para o tempo 24 horas pós-incubação, o que pode ser explicado pela fermentação da polpa de citros e pela interconversão de acetato proveniente em butirato.

TABELA 6. Valores médios de AGVs (mMol/100mL), obtidos nos tempos (H) pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases para CEDE, CEDU e CEPC

Tempo (h)	CEDE			CEDU			CEPC		
	C2	C3	C4	C2	C3	C4	C2	C3	C4
2	0,48	0,25	0,26	0,39	0,21	0,23	0,38	0,30	0,19
6	0,71	0,64	0,40	0,83	0,72	0,52	1,87	1,38	0,82
12	1,99	1,27	1,01	1,80	1,32	1,13	2,18	1,47	1,06
24	2,68	2,35	1,43	3,73	2,53	1,47	5,17	2,68	1,33

C2 = ácido acético; C3 = ácido propiônico; C4 = ácido butírico.

CEDE = capim-elefante associado a milho dentado; CEDU = capim-elefante associado a milho duro; CEPC = capim-elefante associado à polpa de citros.

Os valores absolutos do acetato, no tratamento CEPC, foram maiores que nos tratamentos CEDU e CEDE, nos tempos seis e doze horas. O acetato do CEPC aumentou 378% de duas para seis horas, enquanto que aumentou 110% e 49% para CEDU e CEDE, respectivamente.

Esse aumento potencial também aconteceu com propionato e butirato, evidenciando o alto potencial da fermentação da polpa de citros associada ao capim-elefante. A exposição dos grânulos de amido ao ataque bacteriano favorece a disponibilidade e a consequente fermentação.

A disponibilização de esqueletos de carbono para crescimento da microbiota, além da maior disponibilidade de energia, favorece o crescimento no meio que contém carboidratos e produtos secundários para digestão.

Ao final de 24 horas, CEPC possuía 37% e 92% mais acetato que CEDU e CEDE, respectivamente. A fermentação e a consequente produção de AGVs podem ser afetadas pela composição e a forma física do grânulo, além da interação com outros carboidratos, no caso a pectina.

TABELA 7. Comparações entre as médias dentro dos tempos de coleta das observações para o ácido acético obtido pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases para CEDE, CEDU e CEPC

Comparação entre as médias	p valor			
	2	6	12	24
CEDE vs CEDU	1,0000	1,0000	1,0000	0,7135
CEDE vs CEPC	1,0000	0,4967	1,0000	<0,0001
CEDU vs CEPC	1,0000	0,7473	1,0000	<0,0001

CEDE = capim-elefante associado ao milho dentado; CEDU = capim-elefante associado ao milho duro; CEPC = capim-elefante associado à polpa de citros; p valor = nível de significância.

Não foram detectadas diferenças estatísticas para concentração de ácido acético até o tempo de doze horas. No tempo 24 horas pós-incubação notam-se diferenças estatísticas quando se compa-

ra o tratamento CEDE com CEPC e CEDU com CEPC, evidenciando a degradabilidade ruminal da polpa de citros em função da fermentabilidade da pectina.

TABELA 8. Comparações entre as médias dentro dos tempos de coleta das observações para o ácido propiônico obtido pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases para CEDE, CEDU e CEPC

Comparação entre as médias	p valor			
	2	6	12	24
CEDE vs CEDU	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
CEDE vs CEPC	1,0000	0,1399	1,0000	0,9999
CEDU vs CEPC	1,0000	0,3229	1,0000	1,0000

CEDE = capim-elefante associado ao milho dentado; CEDU = capim-elefante associado ao milho duro; CEPC = capim-elefante associado à polpa de citros; p valor = nível de significância.

As concentrações de ácido propiônico não apresentaram diferenças estatísticas, dentro dos mesmos tempos de incubação. Resultados semelhantes foram verificados por GETACHEW et al. (1998), estudando a produção e proporção de AGVs em dietas com diferentes fontes de

carboidratos solúveis. Esses autores observaram constância de fermentabilidade nos tempos de incubação e atribuíram, a tal fato, a velocidade de fermentação do ácido propiônico em função do substrato alimentar.

TABELA 9. Comparações entre as médias dentro dos tempos de coleta das observações para o ácido butírico obtido pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases para CEDE, CEDU e CEPC

Comparação entre as médias	p valor			
	2	6	12	24
CEDE vs CEDU	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
CEDE vs CEPC	1,0000	0,3652	1,0000	1,0000
CEDU vs CEPC	1,0000	0,9500	1,0000	1,0000

CEDE= capim-elefante associado ao milho dentado; CEDU = capim-elefante associado ao milho duro; CEPC = capim-elefante associado à polpa de citros; p valor = nível de significância.

Não se observaram diferenças estatísticas para o ácido butírico dentro dos mesmos tempos de incubação. Atribuiu-se esse fato à maior proporção molar de ácido butírico advinda da fermentação do capim-elefante; já a fermentação dos demais componentes das dietas é primordialmente acética e propiônica. Resultados semelhantes foram

verificados por MALAFAIA (1999), estudando a proporção molar dos AGVs em dietas de ruminantes com diferentes níveis de fibra. Esse autor não observou interação da solubilidade das diferentes fontes de carboidratos sobre a proporção molar de butirato.

TABELA 10. Valores médios de AGVs (mMol/100mL), obtidos nos tempos (H) pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases, para SMDE, SMDU e SMPC

Tempo (h)	SMDE			SMDU			SMPC		
	C2	C3	C4	C2	C3	C4	C2	C3	C4
2	1,70	0,97	0,52	1,59	0,99	0,49	1,43	0,74	0,43
6	1,39	0,70	0,72	1,34	0,55	0,75	1,65	1,09	0,77
12	2,40	1,29	1,65	1,82	1,35	1,94	1,52	1,78	1,38
24	2,61	2,20	1,61	2,84	2,39	1,61	3,44	2,48	1,53

C2 = ácido acético; C3 = ácido propiônico; C4 = ácido butírico.

SMDE = silagem de milho associada ao milho dentado; SMDU = silagem de milho associada ao milho duro; SMPC = silagem de milho associada à polpa de citros

Apesar de o amido de cereais ser mais facilmente digerido que amido de tubérculos e/ou leguminosas, não se encontraram valores absolutos muito diferentes para adição de carboidratos à silagem de milho. Apesar da forma física do grão

(dentado ou duro), a disponibilidade do substrato para fermentação microbológica pode ter sido facilitada pelo processamento (moagem), enquanto a polpa cítrica apresenta rápida degradabilidade em função da solubilidade da pectina.

TABELA 11. Comparações entre as médias dentro dos tempos de coleta das observações para o ácido acético obtido pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases para SMDE, SMDU e SMPC

Comparação entre as médias	p valor			
	2	6	12	24
SMDE vs SMDU	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
SMDE vs SMPC	1,0000	1,0000	0,9480	0,9767
SMDU vs SMPC	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

SMDE = silagem de milho associada ao milho dentado; SMDU = silagem de milho associada ao milho duro; SMPC = silagem de milho associada à polpa de citros; p valor = nível de significância.

As médias dos tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas para o ácido acético, dentro dos mesmos tempos de incubação, talvez

pelo fato de a maior proporção molar de acetato ser em função da fração de forragem da dieta e não da adição de diferentes fontes de carboidratos.

TABELA 12. Comparações entre as médias dentro dos tempos de coleta das observações para o ácido propiônico obtido pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases para SMDE, SMDU e SMPC

Comparação entre as médias	p valor			
	2	6	12	24
SMDE vs SMDU	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
SMDE vs SMPC	1,0000	0,9965	0,9904	1,0000
SMDU vs SMPC	1,0000	0,7742	0,9866	1,0000

SMDE = silagem de milho associada ao milho dentado; SMDU = silagem de milho associada ao milho duro; SMPC = silagem de milho associada à polpa de citros; p valor = nível de significância.

Não foram detectadas diferenças estatísticas para o ácido propiônico, dentro dos mesmos tempos de incubação. Resultados semelhantes foram obtidos por THEODOROU et al. (1994), em estudo da produção e proporção molar de ácido propiônico avaliada pela mesma metodologia descrita neste estudo. Esses autores utilizaram dietas de vacas em lactação, com diferentes fontes de carboidratos na fração volumosa, evidenciando que, pelo fato de as fontes de carboidratos serem

constituídas principalmente de amido em todos os tratamentos, exceto com a inclusão de polpa de citrus, existe estabilidade de fermentação propiônica.

No tempo doze horas pós-incubação, notam-se diferenças estatísticas ($p > 0,0005$) entre as médias obtidas para a silagem de milho, associada ao milho duro vs silagem de milho associada à polpa de citros. Esse fato pode ser explicado pelo tipo de processamento do milho, em que a gelatinização

do amido ofereceria maior eficiência de fermentação butírica no tempo doze horas. Os demais tempos de incubação não apresentaram diferenças estatísticas para o ácido butírico.

TABELA 13. Comparações entre as médias dentro dos tempos de coleta das observações para o ácido butírico obtido pela técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases para SMDE, SMDU e SMPC

Comparação entre as médias	p valor			
	2	6	12	24
SMDE vs SMDU	1,0000	1,0000	0,9725	1,0000
SMDE vs SMPC	1,0000	1,0000	0,9871	1,0000
SMDU vs SMPC	1,0000	1,0000	0,0154	1,0000

SMDE = silagem de milho associada ao milho dentado; SMDU = silagem de milho associada ao milho duro; SMPC = silagem de milho associada à polpa de citros.

TABELA 14. Valores médios de AGVs (mMol/100mL), obtidos nos tempos (H) pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases para SRM e SRDE

Tempo	SEM			SRDE		
	C2	C3	C4	C2	C3	C4
2	1,05	0,34	0,27	0,31	0,26	0,23
6	1,35	0,85	0,65	1,36	1,17	0,62
12	1,40	1,54	0,71	2,30	1,92	1,57
24	1,05	0,34	0,27	0,31	0,26	0,23

C2 = ácido acético; C3 = ácido propiônico; C4 = ácido butírico milho; SRDE = silagem de resíduo de milho associada à silagem de sorgo e milho dentado; SRM = silagem de resíduo de milho verde

TABELA 15. Valores médios de AGVs (mMol/100mL), obtidos nos tempos (H) pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases para SRDU e SRPC

SRDU			SRPC		
C2	C3	C4	C2	C3	C4
0,43	0,35	0,33	0,50	0,46	0,31
0,76	0,86	0,48	0,82	1,07	0,55
2,22	1,58	1,45	2,04	1,68	1,11
0,43	0,35	0,33	0,50	0,46	0,31

C2 = ácido acético; C3 = ácido propiônico; C4 = ácido butírico milho; SRDU = silagem de resíduo de milho associada à silagem de sorgo e milho duro; SRPC = silagem de resíduo de milho associada à silagem de sorgo e polpa de citros.

O tratamento físico de pré-cozimento do resíduo de milho (SRM) pode ter influenciado na disponibilização de carboidratos para fermentação, o que explica as taxas absolutas mais altas nos tempos iniciais pós-incubação mostradas na

Tabela 14, basicamente para produção de ácido acético, quando comparados aos demais tratamentos. Esse mecanismo pode estar associado à gelatinização dos grânulos de amido.

TABELA 16. Comparações entre as médias dentro dos tempos de coleta das observações para o ácido acético obtido pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases para SRM, SRDE, SRDU e SRPC

Comparação entre as médias	p valor			
	2	6	12	24
SRDE vs SRDU	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
SRDE vs SRPC	1,0000	1,0000	1,0000	0,1447
SRDU vs SRPC	1,0000	1,0000	1,0000	0,9949

SRDE = silagem de resíduo de milho associada à silagem de sorgo e milho dentado; SRDU = silagem de resíduo de milho associada à silagem de sorgo e milho duro; SRPC = silagem de resíduo de milho associada à silagem de sorgo e polpa de citros.

A análise comparativa das médias dos tratamentos não apresentou diferenças estatísticas para o ácido acético, dentro dos mesmos tempos de incubação.

TABELA 17. Comparações entre as médias dentro dos tempos de coleta das observações para o ácido propiônico obtido pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases para SRM, SRDE, SRDU e SRPC

Comparação entre as médias	p valor			
	2	6	12	24
SRDE vs SRDU	1,0000	1,0000	0,9999	1,0000
SRDE vs SRPC	1,0000	1,0000	1,0000	0,6178
SRDU vs SRPC	1,0000	1,0000	1,0000	0,9975

SRDE = silagem de resíduo de milho associada à silagem de sorgo e milho dentado; SRDU = silagem de resíduo de milho associada à silagem de sorgo e milho duro; SRPC = silagem de resíduo de milho associada à silagem de sorgo e polpa de citros.

As comparações das dietas não apresentaram diferenças estatísticas entre as médias, para a mesma característica estudada, dentro dos mesmos tempos.

TABELA 18. Comparações entre as médias dentro dos tempos de coleta das observações para o ácido butírico obtido pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases para SRM, SRDE, SRDU e SRPC

Comparação entre as médias	p valor			
	2	6	12	24
SRDE vs SRDU	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
SRDE vs SRPC	1,0000	1,0000	0,1650	0,9998
SRDU vs SRPC	1,0000	1,0000	0,8067	1,0000

SRDE = silagem de resíduo de milho associada à silagem de sorgo e milho dentado; SRDU = silagem de resíduo de milho associada à silagem de sorgo e milho duro; SRPC = silagem de resíduo de milho associada à silagem de sorgo e polpa de citros.

Não foram observadas diferenças estatísticas para o ácido butírico, dentro dos mesmos tempos de incubação. A matriz de correlação entre os AGVs está expressa na Tabela 18.

TABELA 19. Correlação entre os ácidos graxos voláteis aferidos pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases

	C2	C3	C4
Acético	1,0000	0,8530 < 0,0001	0,7541 < 0,0001
Propiônico		1,0000	0,8448 < 0,0001
Butírico			1,0000

C2 = ácido acético; C3 = ácido propiônico; C4 = ácido butírico.

Observa-se correlação alta e positiva entre todos os AGVs do presente estudo. O acetato foi o AGV de maior produção, talvez em função da grande participação percentual de carboidratos estruturais em todos tratamentos, com a alta inclusão de volumoso das dietas.

CONCLUSÕES

A adição de fontes de carboidratos fermentáveis a volumosos, quando avaliada pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases, não apresentou diferenças nos perfis de AGVs das associações estudadas. Entretanto a forma física do alimento pode influenciar a proporção e a produção absoluta dos ácidos graxos voláteis.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC. **Official methods of the Association of Official Analytical Chemist.** 15. ed. Washington, 1990. v.1, 684 p.

BLÜMMEL, M.; ØRSKOV, E.R. Comparison of gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 40, p.109-119, 1993.

FOX, D.G.; SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D. RUSSELL, J.B.; VAN SOEST, P.J.. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle requirements and diet adequacy. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 70, n.12, p. 3578-3596, 1992.

GETACHEW, G.; BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 72, n. 3, p. 261-281, 1998.

MAKKAR, H.P.S.; BLÜMMEL, M.; BECKER, K. *In vitro* effects and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. **Journal Science Food Agriculture**, London, v. 69, n. 4, p. 481-493. 1995.

MALAFAIA, P.A.M.; VALADARES FILHO, S.C.; VIEIRA, R.A.M. Kinetic parameters of ruminal degradation estimated with a non-automated system to measure gas production. **Livestock Production Science**, Amsterdam, n. 58, p. 65-73, 1999.

MARINUCCI, M.T.; DEHORITY, B.A.; LOERCH, S.C. *In vitro* and *in vivo* studies of factors affecting digestion of feeds in synthetic fiber bags. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 70, n.1, p.296-307, 1992.

MAURICIO, R. M.; MOULD, F. L.; DHANOA, M. S.; OWEN, E.; CHANNA, K. S.; THEODOROU, M. K. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 321-330, 1999.

McDOUGAL, E.I. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. **Biochemical Journal**, London, v. 43, n.1. p. 99-109, 1949.

MENKE, B.K.H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A. 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**, Cambridge, v. 93, n.1, p.217-223, 1979.

MERTENS, D.R. Rate and extent of digestion. In: FORBES, J. M.; FRANCE, J. (Ed.). **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism.** Cambridge: CAB International, Cambridge University Press, 1983. p.13-51.

NRC. National Research Council. **Nutrient requirements of dairy cattle** . 7.th. Washington: National Academy Press, 2001. p. 8-134.

PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*.

Journal of Dairy Science, Champaign, v. 76, n. 4, p.1063-1073, 1993.

RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.J. VAN SOEST, P.J.; SNIFFEN, C.J. A net carbohydrate and protein system for evaluation for cattle diets: Ruminant fermentation. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 70, n. 12, p. 3551-3581, 1992.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.

SAS®, **Statistical Analytical System**. System for Mixed Models. Users guide: statistics. SAS Inst. Inc. Cary, NC, 1999

SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J. FOX, D.G., RUSSELL, J.B. A net carbohydrate and protein sys-

tem for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. **Journal Animal Science**, Savoy, v. 70, n. 7, p. 3562-3577, 1992.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; McALLAN, A.B.; FRANCE, J. Simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 3, p.185-197, 1994.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the digestion of forage crops. **Journal of the British Grassland Society**, Aberystwyth, v.18. p.104-111, 1963.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch in relation to animal nutrition. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 2, p. 3583-3596, 1991.

Protocolado em: 17 fev. 2007. Aceito em: 14 fev. 2009.