

LOPES, L.S. et al. Efeito de diferentes formas de processamento da uréia na degradabilidade do feno de Coast Cross (*Cynodon dactylon*) através da técnica de produção de gás. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 832, 2010.



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Efeito de diferentes formas de processamento da uréia na degradabilidade do feno de Coast Cross (*Cynodon dactylon*) através da técnica de produção de gás

Leandro Sâmia Lopes¹, Otávio Rodrigues Machado Neto², Maria Cecília Lemes Alves³, Lorenya Thatiana Flora Chalfun⁴, Luthesco Lima Haddad Chalfun⁵

Doutor em Zootecnia – UFLA/DZO – leandrosamia@yahoo.com.br (1)

Doutorando em Zootecnia – UFLA/DZO (2)

Bolsista de Iniciação Científica em Zootecnia – UFLA/DZO (3)

Doutora em Ciências dos Alimentos – UFLA/DCA (4)

Mestre em Zootecnia – UFLA/DZO (5)

Resumo

Existem vários métodos disponíveis para avaliar a qualidade dos alimentos. Dentre eles está o método de produção de gás, no qual quantifica a produção total de gás liberada com a fermentação de amostra em líquido ruminal tamponado. Objetivou-se neste trabalho, avaliar o efeito de diferentes formas de processamento da uréia na degradabilidade ruminal do feno de Coast cross (*Cynodon dactylon*) através da técnica de produção de gás. Como fonte de NNP, foram utilizados quatro tipos de uréia: Amiréia 150S, Uréia Encapsulada NitroshureTM, Uréia Ultrapec Super Fina e Uréia comum. Foram utilizadas duas vacas da raça Jersey fistuladas no rúmen, para a coleta do líquido ruminal. Foi realizado um ensaio de degradabilidade *in vitro* pela técnica de produção de

LOPES, L.S. et al. Efeito de diferentes formas de processamento da uréia na degradabilidade do feno de Coast Cross (*Cynodon dactylon*) através da técnica de produção de gás. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 832, 2010.

gases da MS e FDN. As avaliações foram realizadas nos tempos de 1; 3; 6; 9; 12; 18; 24; 30; 36; 48; 60 e 72 horas após a adição do inóculo ruminal. Não houve efeito ($P>0,05$) de tratamentos. Possivelmente, a não significância dos tratamentos ocorreu em função do feno ter apresentado alto teor de PB. A produção cumulativa de gás não foi influenciada pelos tipos de uréias utilizadas como fonte de NNP. Porém, as uréias com processamentos diferenciados tenderam a apresentar maiores produções de gás, taxas de degradação e degradabilidade efetiva.

Palavras-chave: degradabilidade in vitro, nitrogênio não protéico, nutrição de ruminantes

Effects of different forms of urea processing in the Coast Cross (*Cynodon dactylon*) hay degradability by gas production technique

Abstract

There are many available methods to evaluate feed quality. Gas production technique is between these ones, as it quantifies total gas production resulting from the fermentation of the buffered ruminal liquid samples. The objective was to evaluate the effect of distinct urea processing forms in the ruminal degradability of Coast cross (*Cynodon dactylon*) hay by gas production technique. Four treatments based on urea as the non protein nitrogen (NPN) source were used: Amireia 150S, Nitroshure™ Encapsulated Urea, Ultrapec Super Fine Urea and animal feed Urea. Two rumen-cannulated Jersey cows were used for ruminal liquid collection. An *in vitro* degradability assay was done by the DM and NDF gas production technique. Evaluations were performed at 1; 3; 6; 9; 12; 18; 24; 30; 36; 48; 60 e 72 hours post ruminal inoculum addition. There was no treatment effect ($P>0.05$). This lack of effect may have possibly occurred due to the high CP content of the hay used. The cumulative gas production was not influenced by the various urea types used as NPN sources. However, ureas processed distinctly tended to yield greater gas productions, degradability rates and effective degradability.

Keywords: in vitro degradability, non protein nitrogen, ruminant nutrition

INTRODUÇÃO

As vantagens da utilização de técnicas laboratoriais *in vitro* para a determinação da digestibilidade dos alimentos estão na sua rapidez, na uniformidade físico-química do local de fermentação e na conveniência de se manter poucos animais fistulados.

A técnica da digestão *in vitro* tem sido largamente utilizada na análise dos mais variados tipos de alimentos fornecidos aos ruminantes. Esse fato se observa em razão da prática na determinação dos resultados, uma vez que grande parte do processo é desenvolvida no laboratório. Essa técnica procura simular as condições naturais da digestão. Portanto, torna-se imprescindível que cada etapa da operação seja representativa, o mas fiel possível, do processo digestivo para que os resultados sejam confiáveis (Alcade et al., 2001).

Em razão de a determinação do valor nutricional das forrageiras ser extremamente importante, novas metodologias têm sido constantemente desenvolvidas com o intuito de facilitar a determinação do valor nutricional desses alimentos. Um método que tem sido utilizado com sucesso nas respostas a degradabilidade da MS é a técnica de produção de gás.

A utilização de fontes de nitrogênio não protéico (NNP), como a uréia, tem se mostrado muito eficaz no sentido de aumentar a digestibilidade e degradabilidade ruminal, melhorando, de forma significativa, o aproveitamento de volumosos e, conseqüentemente, o desempenho dos animais.

A técnica de produção de gás (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 tamponado. 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).

Outros métodos *in vitro* são baseados em mensurações gravimétricas que seguem o desaparecimento do substrato (componentes que podem ou não

LOPES, L.S. et al. Efeito de diferentes formas de processamento da uréia na degradabilidade do feno de Coast Cross (*Cynodon dactylon*) através da técnica de produção de gás. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 832, 2010.

contribuir para a fermentação), enquanto a mensuração de gás concentra-se no surgimento de produtos de fermentação (substâncias solúveis, mas não fermentáveis, não contribuem para a produção de gás). Essa diferença no princípio do método faz com que essa técnica apresente alta correlação com a digestibilidade *in vivo*.

Além disso, o método de produção de gás 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. Esse método apresenta como desvantagem o baixo peso da amostra a ser incubada, o que dificulta a homogeneidade do material.

Objetivou-se com este trabalho, avaliar o efeito de diferentes formas de processamento da uréia na degradabilidade ruminal *in vitro* do feno de Coast cross (*Cynodon dactylon*) através da técnica de produção de gás.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e animais

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia da UFLA.

Para coleta do líquido ruminal (inóculo), foram utilizadas duas vacas Jersey, não-gestantes, não-lactantes, providas de fístula ruminal. A ração concentrada (27,5% de farelo de soja; 70% de milho moído; 1,0% de sal mineral; 1,0% de sal comum e 0,5% de uréia) foi fornecida em quantidade de 1,5 kg pela manhã e 1,5 kg à tarde, e o alimento volumoso foi feno de *Coast cross*, fornecido à base de 8 kg/dia. Os animais foram adaptados durante 14 dias antes das coletas de líquido ruminal.

Tratamentos *

Utilizou-se quatro alternativas de procesamento da uréia, mais um tratamento como testemunha. Os tratamentos utilizados foram:

LOPES, L.S. et al. Efeito de diferentes formas de processamento da uréia na degradabilidade do feno de Coast Cross (*Cynodon dactylon*) através da técnica de produção de gás. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 832, 2010.

T1 = Amiréia 150S (2% na MS) + Feno;

T2 = Uréia Encapsulada NitroshureTM (2% na MS) + Feno;

T3 = Uréia Ultrapec Super Fina (2% na MS) + Feno;

T4 = Uréia Pecuária comum (2% na MS) + Feno;

T5 = Feno (Controle);

* Adicionou-se quantidade equivalente de uréia com diferentes processamentos em cada tratamento.

Preparo das amostras

O feno de Coast cross foi analisado para matéria seca (MS) e proteína bruta (PB), de acordo com as metodologias descritas por AOAC (1990). Fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas de acordo com as metodologias propostas por Van Soest & Wine (1968), citado por Silva (1990). A composição bromatológica do feno encontra-se na Tab. 1.

Para as incubações, foi tomada uma amostra de aproximadamente 8 g, a qual foi submetida à fervura durante 1 hora em solução de detergente neutro. Posteriormente, o resíduo foi filtrado em saco de náilon com porosidade média de 60 µm e exaustivamente lavado com água quente, acetona, e novamente com água, para a retirada completa do detergente, sendo, então, colocado em estufa de ventilação forçada a 65°C durante 72 horas.

TABELA 1 – Composição bromatológica do feno utilizado no experimento, expressa em porcentagem da matéria seca.

Alimento	MS	PB	FDN	SDN ¹	FDA	HEM ²
Feno de Coast cross	90,1	10,0	72,2	27,8	50,3	21,9

¹ Fração solúvel em detergente neutro (SDN = 100 – FDN).

² Hemicelulose (HEM = FDN – FDA).

Coleta do inóculo e preparo do meio de cultura

O líquido ruminal foi filtrado em gaze e acondicionado em garrafa térmica pré-aquecida com água a 39°C. Nas vacas, a coleta foi feita manualmente na região ventral do rúmen. O inóculo foi composto por uma mistura de líquido ruminal retirado dos dois animais.

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 1 litro de tampão, uma solução redutora preparada momentos antes, composta de 891 mg de HClcisteína e 891 mg de sulfeto de sódio, 5,7 ml de NaOH1 N e água destilada até o volume de 77 ml; esse volume foi calculado para manter uma relação solução-tampão: solução redutora de 26:2. Então, a solução foi borbulhada com CO₂, para atingir pH entre 6,8 – 6,9.

Incubação

Aproximadamente 400 mg de MS integral e a devida proporção em FDN foram pesados em triplicata em frascos plásticos com capacidade de 100 ml. Esses, por sua vez, receberam 4 ml de água destilada para hidratação da amostra e 28 ml da solução tampão pré-reduzida. Cada frasco foi, então, aspergido por 10 segundos com CO₂, tampado com rolha de borracha e levado ao banho-maria a 39°C, permanecendo lá até que o líquido ruminal fosse coletado e filtrado. Então, os frascos foram retirados do banho-maria, receberam 8 ml do inóculo, aspergidos novamente com CO₂, imediatamente tampados com rolha de borracha e tampa plástica rosqueada e foram colocados em banho-maria a 39°C (Malafaia, 1997). Dessa maneira, as incubações foram realizadas separadamente para a matéria seca total (MS) e para a FDN.

Coleta de dados

As leituras de pressão e volume dos gases foram obtidas por meio de um manômetro (0-1 kgf/cm²) acoplado a uma seringa (20 ml), conforme descrito por Malafaia (1997), nos seguintes tempos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 30, 36,

LOPES, L.S. et al. Efeito de diferentes formas de processamento da uréia na degradabilidade do feno de Coast Cross (*Cynodon dactylon*) através da técnica de produção de gás. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 832, 2010.

48, 60 e 72 horas após o início da incubação. Com o somatório do volume de gás para cada tempo de leitura, foram construídas as curvas de produção cumulativa dos gases oriundos da MS e FDN, sendo a curva correspondente à fração solúvel em detergente neutro (SDN) obtida pela diferença entre o gás da MS e o da FDN para cada tempo de incubação, método esse denominado "curva de subtração".

Manipulação dos dados

A cinética da produção cumulativa dos gases foi analisada empregando-se o modelo logístico unicompartmental descrito por Schofield et al. (1994):

$$V(t) = \frac{V_f}{1 + \exp[2 - 4 * c * (T - L)]}$$

no qual V(t) é o volume acumulado no tempo t; V_f (ml) é o volume total de gás produzido a partir da fração em questão; c (%/h) é a taxa de degradação da fração; L(h) é o tempo de colonização e T (h) é o tempo de incubação.

Para a realização dos ajustes, utilizou-se o processo iterativo do algoritmo de Marquadt implantado no software SAEG, descrito por Euclides (1997).

Análises estatísticas

Após a obtenção das frações VF e c realizou-se a análise de variância, utilizando o procedimento GLM do SAS (SAS Institute, 2000) e, quando significativo, as mesmas foram submetidas ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Em que:

Y_{ij} = efeito do tratamento "i" na repetição "j";

μ = média geral;

LOPES, L.S. et al. Efeito de diferentes formas de processamento da uréia na degradabilidade do feno de Coast Cross (*Cynodon dactylon*) através da técnica de produção de gás. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 832, 2010.

T = efeito do tratamento i, sendo i = 1, 2, 3, 4 e 5;

e_{ij} = erro aleatório associado a cada observação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeito ($P>0,05$) de tratamentos para os dados referentes ao volume e taxa de degradação da MS, FDN, SDN e degradabilidade efetiva da MS e FDN do feno de Coast cross adicionado à uréia sob diferentes formas de processamento (Tab. 2).

TABELA 2. Volume final (Vf) e taxa de degradação (c) da MS, FDN e SDN e degradabilidade efetiva (DE) da matéria seca (MS) e fibra em detergente neutro (FDN) do feno de Coast cross adicionado à uréia sob formas de processamento.

Tratamentos	Vf (mL)*			c *			DE (%)*	
	MS	FDN	SDN	MS	FDN	SDN	MS	FDN
Feno + Amiréia 150S	13,9 8	9,00	4,61	0,04	0,08	0,23	52,3 8	32,9 8
Feno + uréia encapsulada	14,1 4	10,91	2,86	0,04	0,11	0,18	58,5 2	41,0 7
Feno + uréia moída	14,4 1	10,61	3,47	0,04	0,15	0,16	53,9 8	35,7 1
Feno + uréia comum	13,6 3	10,25	3,27	0,04	0,06	0,13	47,9 6	30,1 2
Feno	12,8 8	10,33	3,39	0,03	0,06	0,13	49,6 5	31,3 1

* Tukey ($P>0,05$).

Possivelmente, a não significância do efeito dos tratamentos utilizados, ocorreu devido ao fato de ter se utilizado um feno de Coast cross que apresentava alta quantidade de PB em sua composição (10% PB na MS), portanto a digestão da proteína contida nesta forragem já fornecia quantidade de amônia necessária para síntese de proteína microbiana pelos

LOPES, L.S. et al. Efeito de diferentes formas de processamento da uréia na degradabilidade do feno de Coast Cross (*Cynodon dactylon*) através da técnica de produção de gás. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 832, 2010.

microrganismos presentes no líquido ruminal. Isto pode ter prejudicado os possíveis resultados esperados quando na utilização das diferentes uréias como fonte de NNP para o aumento da síntese de proteína microbiana e conseqüente aumento na degradabilidade ruminal.

Segundo Teixeira & Santos (1991), um dos fatores que afetam a utilização de fontes de uréia na alimentação animal é o alto teor de nitrogênio na dieta, sendo que a eficiência da utilização da mesma em rações será maior quando o nível e a qualidade da proteína dietética forem baixos.

Embora estatisticamente não significativo (Tab. 2), pode-se observar uma maior produção de gás para a FDN em relação à fração solúvel em detergente neutro (SDN) para todos os tratamentos. O que caracteriza maior ou menor digestão (produção de gás) é a proporção entre as frações solúvel e insolúvel (Tab. 1), e o teor de fibra em detergente neutro (fração insolúvel) para o feno de Coast cross foi mais alto. Além disso, segundo Van Soest (1994), existe uma menor atividade de celulasas em líquido de rúmen filtrado, como este utilizado neste trabalho. Resultados semelhantes foram encontrados por Santos et al. (2003), que observou maior produção de gás para a FDN (45,65%) em relação SDN (33,8%) para o feno de Coast cross.

Com relação à degradabilidade efetiva da MS observou-se (Tab.2), embora estatisticamente não significativas, médias superiores foram encontradas para os tratamentos que continham uréia com processamento diferenciado, sendo a uréia encapsulada, amiréia 150S e uréia finamente moída as que apresentaram maiores porcentagens de degradação da MS (58,52%, 53,98% e 52,38%, respectivamente).

Os maiores valores encontrados para degradabilidade efetiva para o tratamento com uréia encapsulada, pode ser atribuído a menor taxa de hidrólise desta forma de uréia no rúmen, o que garante uma liberação mais lenta e conseqüentemente um aproveitamento mais eficiente ao longo do tempo de liberação pelas bactérias ruminais, principalmente as bactérias celulolíticas, que necessitam de nitrogênio na forma de amônia para suas

LOPES, L.S. et al. Efeito de diferentes formas de processamento da uréia na degradabilidade do feno de Coast Cross (*Cynodon dactylon*) através da técnica de produção de gás. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 832, 2010.

atividades metabólicas, garantindo assim uma maior taxa de degradação principalmente da fração fibrosa.

Através dos resultados obtidos, esperava-se maior degradabilidade efetiva da MS e da FDN para o tratamento contendo amiréia, pois a amiréia apresentava em sua constituição além de nitrogênio não protéico de liberação lenta, apresentava energia na forma de milho, o que poderia promover uma degradação mais efetiva ao longo do tempo, devido a uma melhora no ambiente ruminal.

Teixeira et al. (1998), encontraram valores mais elevados para para ganho de peso médio diário quando testou amiréia vs outras fontes de nitrogênio não protéico no suplemento de bovinos de corte em pastagem de *Brachiaria decumbens*, demonstrando que provavelmente a amiréia promoveu uma liberação moderada da uréia, aliada a uma fonte de energia, o que permite uma maior síntese de proteína microbiana e conseqüentemente maior atividade ruminal.

As curvas de degradação da MS, FDN e SDN podem ser observadas nas Fig. 1, 2 e 3. A estabilização da produção de gás para a MS foi obtida em torno de 30 horas após incubação das amostras. Já para FDN esta estabilização ocorreu entre 18 e 24 horas, observando uma maior produção de gás para as uréias encapsulada e moída, as quais apresentaram tempo de estabilização em torno de 12 horas. Com relação à fração SDN, estas estabilizações ocorreram entre 6 e 12 horas, sendo que a amiréia 150S teve sua estabilização às 6 horas após incubação das amostras, com maior produção de gás que os demais tratamentos.

LOPES, L.S. et al. Efeito de diferentes formas de processamento da uréia na degradabilidade do feno de Coast Cross (*Cynodon dactylon*) através da técnica de produção de gás. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 832, 2010.

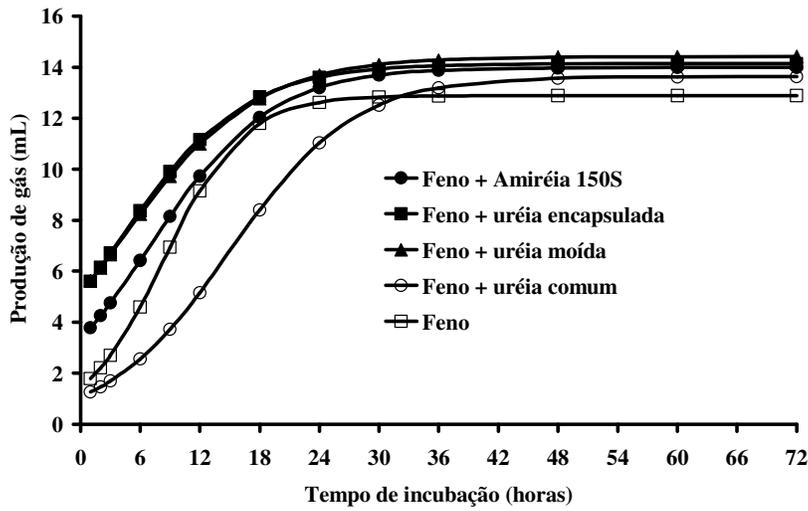


FIGURA 1. Produção de gás da MS do feno de Coast cross adicionado à uréia sob diferentes formas de processamento.

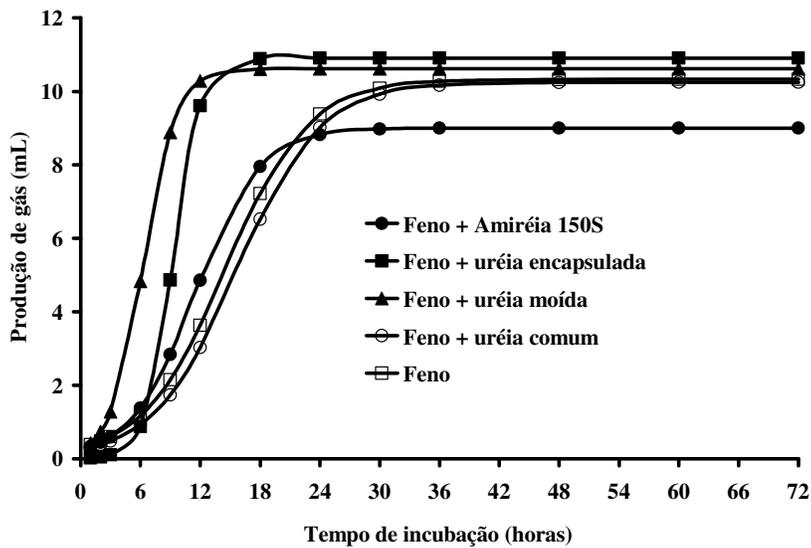


FIGURA 2. Produção de gás da FDN do feno de Coast cross adicionado à uréia sob diferentes formas de processamento.

LOPES, L.S. et al. Efeito de diferentes formas de processamento da uréia na degradabilidade do feno de Coast Cross (*Cynodon dactylon*) através da técnica de produção de gás. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 832, 2010.

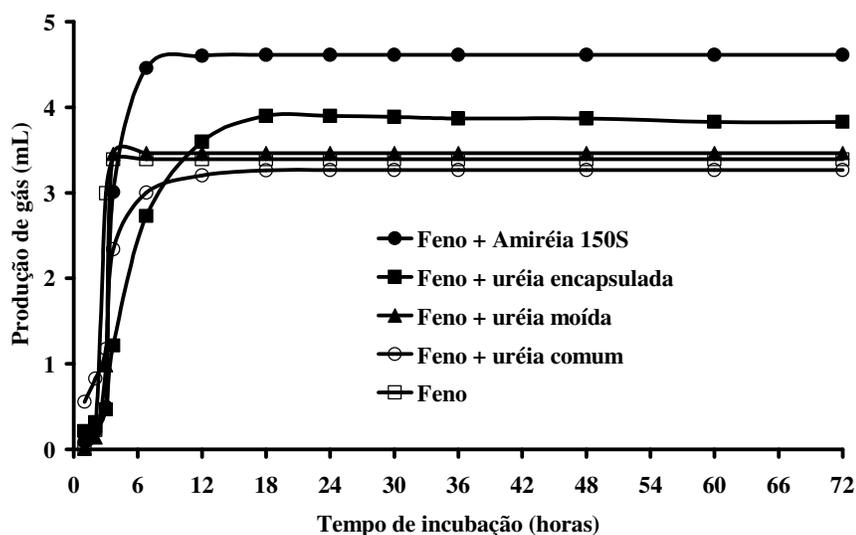


FIGURA 3. Produção de gás da SDN do feno de Coast cross adicionado à uréia sob diferentes formas de processamento.

CONCLUSÕES:

A produção cumulativa de gás não foi influenciada pelos tipos de uréias utilizadas como fonte de NNP. Porém, as uréias com processamentos diferenciados tenderam a apresentar maiores produções de gás, taxas de degradação e degradabilidade efetiva da matéria seca para o feno de Coast cross.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCADE, C.R.; MACHADO, R.M.; SANTOS, G.T.; PICOLLI, R.; JOBIM, C.C.; Digestibilidade *in vitro* de alimentos com inóculos de líquido de rúmen ou de fezes de bovinos. **Acta Scientiarum**, v.23, n.4, p. 917-921, 2001.

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

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

EUCLYDES, R. F. **Manual de utilização do programa SAEG: sistema para análises estatísticas e genéticas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 1997. 150 p.

LOPES, L.S. et al. Efeito de diferentes formas de processamento da uréia na degradabilidade do feno de Coast Cross (*Cynodon dactylon*) através da técnica de produção de gás. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 832, 2010.

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

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 of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 69, n. 4, p. 481-493, Dec. 1995.

MALAFAIA, P.A.M.; VALADARES FILHO S.C.; VIEIRA, R.A.M. Avaliação de alguns volumosos através da técnica de produção de gás e da subtração de curvas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34. 1997 Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: SBZ, 1997. p.103-105.

MENKE, K.H.; RAAB, L.; SALEWSKY, A. et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.93, n.1, p.217-223, Aug. 1979.

PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, n.9, p.1063-1073, Sept. 1993.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT User's guide**. Version 8. Cary, NC, 2000.

SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.72, n.11, p.2980-2991, Nov. 1994.

SANTOS, R. A. dos; TEIXEIRA, J. C. PÉREZ, J. R. O.; PAIVA, P. C de A.; MUNIZ, J. A. ARCURI, P. B. Estimativa da degradabilidade ruminal de alimentos utilizando a técnica de produção de gás em bovinos, ovinos e caprinos. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras. v.27, n.3, p.689-695, maio/jun., 2003

SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 2. ed. Viçosa: UFV, 1990. 165 p.

TEIXEIRA, J. C.; SANTOS, R. A. dos. **Utilização da amiréia (produto da extrusão amido/uréia) na alimentação animal**. 1991. 34P.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; McALLAN, A.B. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.48, n.1, p.185-197, Mar. 1994.

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

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.