PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Avaliação das silagens de sorgo com níveis crescentes de guandu pela técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases¹

Lerner Arévalo Pinedo², Fernanda Cristina de Campos³, Maria Regina Rodeiro Peçanha⁴, Adibe Luiz Abdalla⁵

¹Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

²Pós-Doutorando do Departamento de Nutrição e Produtividade Animal, FMVZ/USP, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP: 13635-900, Pirassununga, SP/Brasil. Bolsista da FAPESP. e.mail: lerner38@yahoo.com.br

³Aluna de Mestrado do Laboratório de Nutrição Animal do CENA/USP, Av. Centenário, 303, São Dimas, Piracicaba, SP, Brasil.

⁴Laboratorista do Laboratório de Nutrição Animal do CENA/USP.

⁵Professor do Laboratório de Nutrição Animal do CENA/USP.

Resumo

O objetivo do presente ensaio foi avaliar a produção total de gases, a produção de metano, a degradabilidade da matéria seca (DMS) e da matéria orgânica (DMO), usando a técnica *in vitro* de produção de gases de silagem de sorgo granífero com adição de guandu. Para medir o possível efeito do tanino presente nas silagens, foi utilizado o PEG para quantificar o incremento na produção de gás e de metano. Observou-se que na presença do PEG no substrato que tinha 25% de guandu a produção de gases foi maior ($P < 0,01$) em comparação com o sem PEG; enquanto que para a produção de metano, o

substrato com 50 % de guandu apresentou maior produção ($P < 0,01$) com o PEG. Quanto aos incrementos de produção de gases e metano, os resultados foram muito variados, havendo maior incremento de produção de gases no substrato com 25% de guandu e para o metano maior incremento no substrato com 50% de guandu. As variáveis DMS e DMO aumentaram à medida que aumentou os níveis de guandu na silagem de sorgo, sendo maiores essas variáveis quando foi adicionado o PEG em relação ao sem PEG. A avaliação das silagens estudadas mostrou que o teor de tanino presente pode interferir na fermentação *in vitro* e produção de metano, conforme observado quando os substratos foram incubados na presença do PEG.

Palavras-chave: Taninos, metano, fermentação ruminal, carneiro.

***In vitro* evaluation of sorghum silage with increasing levels of guandu using semi-automatic gas production technique**

Abstract

The objective of this study was to evaluate the sorghum silage with the addition of guandu using *in vitro* semi automated gas production technique. Total gas production, methane production, the dry matter degradability (DMD) and organic matter (OMD) were estimated. PEG was used to measure the possible effect of tannins of sorghum silage on methane and gas production. The results indicated that the presence of PEG in the sorghum silage in the level of 25% and 50% inclusion of guandu were the highest ($P < 0.05$) in the gas and methane production, respectively compared with the other levels. For the gas and methane production increment, the results varied, the highest ($P < 0.01$) increment of gas production and methane production were found with the levels of 25% 50% inclusion of guandu, respectively. DMD and OMD increased with the increasing of pigeon pea levels with sorghum silage, these variables were greater ($P < 0.01$) when PEG was added compared to without PEG. This evaluation of the silages showed that the presence of tannin in sorghum silage can interfere in the rumen fermentation and methane

production *in vitro* especially identified when the substrates were incubated in the presence of PEG.

Keywords: Tannins, methane, ruminal fermentation, ovine.

Introdução

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é uma das plantas forrageiras mais adaptada ao processo de ensilagem, por sua facilidade de cultivo e alto rendimento, além de não haver necessidade de aplicação de aditivos para estimular a fermentação (Neuman et al., 2002). Apresenta ainda uma importante característica de manter vivo o seu sistema radicular após a colheita para ensilagem, o que possibilita a utilização da rebrota, sendo capaz de produzir até 60% da matéria seca do primeiro corte. Entretanto, a silagem de sorgo apresenta um baixo teor de proteína o que constitui uma limitação ao seu uso, principalmente para animais de altas exigências nutricionais (Evangelista et al., 2005). Uma alternativa para melhorar o valor nutritivo desta silagem, é a inclusão da forragem de guandu no momento da ensilagem, principalmente para proporcionar aumento no teor de proteína bruta.

O guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) ocupa mundialmente o 6º lugar em importância alimentar, sendo usada extensivamente na Ásia como fonte de proteína na alimentação animal e humana (Godoy et al., 2005). No Brasil é usado na alimentação animal, tanto como pastagem exclusiva ou consorciada, como também, na forma de forragem verde, feno e componente de mistura de silagem (Godoy, 2007).

Muitas dessas forrageiras, que são usadas na alimentação animal podem conter altos teores de taninos. Entretanto, os efeitos da presença destas substâncias em dietas dos ruminantes, na maioria das vezes são negativos, observando-se a diminuição na aceitabilidade, digestibilidade da proteína, taxas de ganho de peso e produção de leite (Magalhães; Rodrigues; Durães, 2003).

A avaliação *in vitro* de plantas ricas em taninos pode ser realizada utilizando o polietileno glicol (PEG) como agente complexante de tanino condensado no pH do rúmen (Makkar; Blummel; Becker, 1995). Segundo Makkar (2003), o PEG possui o potencial de aumentar a utilização de dietas contendo alto teor de taninos, sendo também responsável pela quebra de complexos tanino-proteína, em função de sua maior afinidade pelos taninos do que as proteínas.

O bioensaio, metodologia desenvolvida por Makkar (1995), tem como base o uso do PEG na determinação dos efeitos dos taninos condensados na produção de gases *in vitro*. A afinidade das moléculas de taninos pelo PEG resulta em acréscimos na produção de gases e, por meio de diferenças, é possível avaliar a atividade dos taninos presentes nos alimentos (Bueno et al., 2008).

Getachew et al. (2005) utilizaram satisfatoriamente a metodologia *in vitro* de produção de gases para estimar a produção de metano em dietas para vacas leiteiras. Longo et al. (2006) adequaram a metodologia descrita por Bueno et al. (2005) para as necessidades de quantificar o metano produzido por plantas taniníferas pela técnica *in vitro* de produção de gases semi-automática. Jayanegara et al. (2009), utilizaram o PEG em bioensaio para avaliar o potencial de mitigação de metano em plantas taniníferas e concluíram que o teor de tanino nos substratos taniníferos teve efeito significativo sobre a produção de metano e que existe uma correlação entre o teor de tanino e a produção de metano que pode ser estimada pelo bioensaio proposto.

O objetivo do presente ensaio foi avaliar a produção total de gases, a produção de metano, a degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica, usando a técnica *in vitro* de produção de gases de silagem de sorgo granífero com adição de níveis crescentes de guandu.

Material e Métodos

O cultivo do sorgo e do guandu e o preparo das silagens foram realizados nas dependências do laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), Piracicaba, SP. Para o plantio foram utilizadas sementes certificadas das plantas forrageiras de sorgo granífero cv. BR 306 e guandu cv. IAPAR 43 de alta produção e valor nutritivo, obtidas na empresa Piraí do Município de Piracicaba-SP. Este material foi ensilado em tubos de PVC com capacidade para 2 kg, abertos após 56 dias de fermentação para ensaio de produção de gases.

Como substratos, foram usados cinco tipos de silagens: T1 – 100% de silagem de sorgo; T2 – 75% silagem de sorgo + 25% de silagem de sorgo; T3 – 50% de silagem de sorgo + 50% de silagem de guandu; T4 – 25% de silagem de sorgo + 75% de silagem de guandu e T5 – 100% de silagem de guandu.

A secagem das silagens foi realizada por liofilização por um período de 72 horas. Nas amostras pré-secas, foram determinados o teor de matéria seca (MS), matéria mineral (MM) e proteína bruta (PB), de acordo com método da AOAC (1995); e os componentes da parede celular (FDN, FDA), pelo método seqüencial (Van Soest 1994), utilizando-se 2 mL por amostra de uma solução de amilase 1%, na determinação do FDN. Determinou-se o pH no suco da silagem, utilizando-se potenciômetro “Beckman Expandomatic SS-2” com escala expandida. A capacidade tampão (CT), pelo método de Playne & McDonald (1966). Os carboidratos totais (CHOT) foram determinados de acordo com a metodologia de Dubois et al. (1966) e o ácido lático (AL), segundo metodologia descrita por Erwin et al. (1961).

Os resultados da análise bromatológica das silagens de sorgo com inclusão de guandu podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição bromatológica das silagens de sorgo com adição de guandu.

Nutrientes *	Níveis de adição de guandu (%)				
	0	25	50	75	100
MS	30,05	27,50	26,40	25,32	23,92
pH	3,71	3,80	3,90	4,00	4,90
PT	22,10	25,10	31,60	35,10	39,00
AL	5,93	4,70	4,50	3,22	3,11
PB	8,22	10,19	11,89	12,90	17,33
CHOT	52,80	68,01	83,03	79,00	33,10
FDN	67,80	60,11	58,16	57,20	51,99
FDA	36,04	35,55	34,31	32,25	31,73
FT	1,81	1,93	1,91	1,98	2,27
TT	1,49	1,44	1,44	1,45	1,63
TC	1,17	0,61	0,61	0,28	0,13

*MS: matéria seca (%); pH; PT: capacidade tampão (meq./100 g MS forragem); AL: ácido láctico (% MS); PB: proteína bruta (% MS); CHOT: carboidratos totais (% MS); FDN: fibra em detergente neutro (% MS); FDA: fibra em detergente ácido (% MS); FT: fenóis totais (% MS); TT: taninos totais (% MS) e TC: taninos condensados (% MS).

Os conteúdos de fenóis totais (FT) e taninos totais (TT) foram analisados pelo método de Folin-Ciocalteu e taninos condensados (TC) pelo método butanol-HCl (Makkar, 2000). Parte desse material foi amostrada para ensaio *in vitro*, por intermédio da técnica de produção de gases totais e de metano e degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica. Foi adotada a técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases e bioensaio proposta por Maurício et al. (1998) e adaptada por Bueno et al. (2005) às condições do LANA-CENA/USP. Para medir o efeito do tanino presente nas silagens, foi utilizado o polietileno glicol (PEG), conforme procedimentos propostos por Bueno et al. (2008) e Longo et al. (2006).

Foram utilizadas 0,5g de amostra de cada silagem colocados em frascos de fermentação (160 mL) previamente injetados com CO₂. Foram utilizados 16 frascos para cada substrato, sendo oito com PEG e oito sem PEG. Também foram utilizados quatro frascos de brancos (frascos contendo apenas o meio de cultura e o inóculo, sendo dois com PEG e dois sem PEG) e mais quatro frascos com substrato padrão do LANA, utilizando como padrão interno entre corridas

de acordo com Makkar, Blummel e Becker (1995), em seguida, foram adicionados manualmente, utilizando uma proveta, 50 mL de meio de cultura conforme descrito em Theodorou et al. (1994) e Bueno et al. (2005). Os frascos foram vedados com rolhas de borracha (14 mm) para evitar perda de gases e colocados na estufa a 39°C até o momento da inoculação.

A inoculação foi feita usando líquido ruminal obtido de três ovinos machos castrados da raça Santa Inês, fistulados, mantido em dieta à base de volumoso (silagem de sorgo misturado com guandu) à vontade e 400 g de concentrado por dia (18% de PB). Para o preparo do inoculo, as frações líquida e sólida do conteúdo ruminal foram coletadas separadamente com auxílio sonda acoplada a seringa e pinça, sendo misturadas na proporção de 50% de cada material e liquidificado por 10 segundos, para recuperação dos microrganismos celulolíticos que se aderem fortemente à fração sólida. O material resultante foi filtrado em três camadas de tecido de algodão (fralda). A

As leituras de pressão geradas pelos gases acumulados em cada frasco de fermentação foram feitas utilizando um "transdutor" medidor de pressão conectado a uma agulha de 25 mm x 7 mm (Theodorou et al., 1994), nos tempos de 6, 14 e 24 horas após a inoculação dos substratos, sendo a leitura realizada por um leitor digital e registrada na memória do equipamento (PDL800, LANA/CENA- USP, Piracicaba/SP). Após a leitura, com o auxílio de seringa plástica de 10 mL acoplada ao transdutor, uma alíquota do gás produzido foi retirada para posterior quantificação de metano. O restante do gás no interior do frasco foi liberado até a indicação da pressão pelo transdutor acusar valor igual a 0,53 (linha basal do equipamento) e rapidamente a agulha com o "transducer" foram retirados.

Os dados de pressão foram utilizados para o cálculo da produção total de gases produzidos calculados através da equação:

$$PTG = -0,053p^2 + 7,335p \quad (r^2 = 0,99)$$

Onde: PTG = produção total de gases (mL/g MS) e P = pressão (psi).

O gás metano (CH₄) foi determinado em cromatógrafo a gás (Chimadzu GC2014) usando como padrão o gás metano (99%), com detector de Ionização de chama a 240°C e coluna Shincarbon a 60°C.

O volume de metano produzido foi calculado conforme descrito por Longo et al. (2006) para as condições do ensaio:

$$\text{CH}_4 \text{ (mL/g MS)} = (\text{PTG}_{24\text{h}} + 85) \times [\text{CH}_4]$$

Onde:

CH₄ = emissão de metano 24 h (mL/g MS); PTG_{24h} = produção total de gases em 24 horas (mL/g MS); 85 = volume do espaço vazio dentro do frasco e [CH₄] = concentração de metano em %.

Os incrementos na produção de gases e de metano na presença do PEG para cada tratamento foram determinados segundo metodologia descrita por Jayanegara et al. (2009):

$$\text{Incremento gás total (\%)} = \frac{[(\text{PGT}_{24\text{h}} \text{ com PEG} - \text{PGT}_{24\text{h}} \text{ sem PEG}) \times 100]}{\text{PGT}_{24\text{h}} \text{ sem PEG}}$$

PGT_{24h} sem PEG

$$\text{Incremento CH}_4 \text{ (\%)} = \frac{[(\text{CH}_{4 \text{ 24h}} \text{ com PEG} - \text{CH}_{4 \text{ 24h}} \text{ sem PEG}) \times 100]}{\text{CH}_{4 \text{ 24h}} \text{ sem PEG}}$$

Onde: PTG_{24h} com PEG é a produção líquida de gás (mL) em 24 h dos substratos com a adição de PEG e PTG_{24h} sem PEG é a produção líquida de gás (mL) em 24 h dos substratos sem a adição de PEG; e respectivamente, CH₄ com PEG e CH₄ sem PEG é a produção líquida de metano (mL) em 24 h dos substratos com e sem a adição de PEG. Produção líquida de gás ou de metano é o volume produzido pelo substrato, descontado do volume produzido pelo branco.

Os resíduos da fermentação ruminal após 24 horas, foram filtrados em cadinhos de vidro com placas de porcelana. Os resíduos foram secos em estufa a 105°C durante 24 horas e pesados para que fossem calculados os

valores de degradabilidade da matéria seca (DMS) por diferença de pesos em relação ao peso seco do substrato inicial (g/kg MS). Os cadinhos com resíduo de matéria seca foram levados para mufla a 500°C durante 4 horas para determinação da matéria mineral, que foi utilizada para determinar a degradação da matéria orgânica (DMO) por diferença de pesos em relação à matéria orgânica.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Estudaram-se cinco tipos de silagens: T1 – 100% de silagem de sorgo; T2 – 75% silagem de sorgo + 25% de silagem de sorgo; T3 – 50% de silagem de sorgo + 50% de silagem de guandu; T4 – 25% de silagem de sorgo + 75% de silagem de guandu e T5 – 100% de silagem de guandu, utilizados como substratos para verificar o efeito dos taninos presente nas silagens quando adicionado o PEG na produção de gases totais, produção de metano, DMS e DMS. Foi realizada a análise de variância e regressão polinomial utilizando o PROC GLM do programa estatístico SAS (SAS, 2000). A escolha dos modelos foi baseada na significância dos efeitos em linear, quadrático, cúbico e desvios da linearidade ao nível de 1% de probabilidade.

Resultados e Discussão

O bioensaio foi avaliado através dos acréscimos de produção de gases e produção de metano das amostras de silagens utilizadas como substratos incubadas com a presença do PEG em 24 horas. Os resultados são apresentados na Tabela 2. Não houve diferença significativa ($P>0,01$) na produção de gases com e sem a presença do PEG. Por outro lado, quando analisado o contraste com a silagem do nível 0% de guandu x média de 25, 50, 75 e 100% de guandu foi observada diferença significativa linear decrescente ($P<0,01$) como observado na Figura 1.

Para a porcentagem de incremento na produção de gases após 24 horas de incubação das silagens incubadas na presença do PEG, a análise de regressão não detectou diferença significativa ($P>0,01$) para os incrementos, mesmo após realizado o contraste entre os níveis.

PINEDO, L.A. et al. Avaliação das silagens de sorgo com níveis crescentes de guandu pela técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases. **PUBVET**, Londrina, V. 6, N. 22, Ed. 209, Art. 1394, 2012.

Figura 1 - Representação gráfica da equação de regressão para os resultados do contraste da produção de gases sem e com a presença de PEG (mL/g MS) nos substratos incubados.

Tabela 1- Médias de produção de gases (PG 24 h), metano (CH₄) e incrementos (%) das silagens usados como substratos na presença do PEG após 24 h de incubação.

Variáveis	PEG	Níveis de guandu (%)					Média	CV ¹	Probabilidade ²			Desvio	Contraste ³
		0	25	50	75	100			L	Q	C		
PG 24h (mL/g MS)	sem	114,8	117,6	114,9	106,3	111,0	112,9	5,2	ns	ns	ns	ns	0,0008
	com	116,4	124,4	119,1	106,7	112,0	115,7	4,1	ns	ns	ns	ns	
Incremento (%)		1,4	5,8	3,7	0,4	0,9	2,5	253,4	ns	ns	ns	ns	ns
CH ₄ 24h (mL/g MS)	sem	17,3	19,4	23,4	19,9	18,5	19,7	19,5	ns	ns	ns	ns	0,0023
	com	18,8	21,4	26,8	22,6	20,5	22,0	16,8	ns	ns	ns	ns	
Incremento (%)		8,7	10,0	14,7	13,4	10,6	11,7	178,3	ns	ns	ns	ns	

¹Coefficientes de variação (%)

²Probabilidade: L = probabilidade para o efeito linear; Q = probabilidade para o efeito quadrático; C = probabilidade para o efeito cúbica; Desvio = probabilidade para o desvio da linearidade

³Contraste: sem e com PEG = 0% x média de 25, 50, 75 e 100%

ns = não significativo.

A produção acumulada de metano em 24 horas, assim como na variável discutida anteriormente de produção de gases (PG), a análise de regressão não detectou ($P>0,01$) qualquer influencia sem e com adição do PEG nos substratos utilizados.

Houve diferença significativa quadrática quando foi aplicado o contraste dentro de cada nível. Após 24 horas de incubação, a produção de metano foi maior em 50% de guandu quando adicionado o PEG, em quanto a incubação com 0, 25, 75 e 100% apresentaram menores valores, Figura 2.

Figura 2. Representação gráfica da equação de regressão para os resultados do contraste da produção de CH₄ sem e com a presença de PEG (mL/g Ms) dos substratos incubados.

Os resultados observados na produção de metano estão de acordo com os resultados de Jayanegara et al. (2009) que houve maior produção de metano quando foi adicionado o PEG nos diferentes substratos estudados após 24 horas de fermentação.

A Tabela 3 apresenta as médias dos parâmetros de DMS em 24 horas dos substratos utilizados sem e com a presença do PEG. A análise de regressão não detectou qualquer efeito significativo para essa variável.

Embora por meio do contraste também não foi detectado qualquer efeito significativo em cada um dos níveis estudados quando adicionado o PEG. Houve aumento da DMS à medida que se aumentaram os níveis de guandu. Pode-se notar que quando foi adicionado o PEG nos substratos estudados apresentaram valores de DMS superiores em relação ao sem PEG, indicando uma maior ação do PEG sobre os taninos, disponibilizando maiores quantidades de substrato, nas 24 horas de degradação. Cabral Filho (2004) trabalhando com a mesma cultivar de sorgo granífero BR 306 encontraram valores de DMS nos grãos *in natura* (830 g/kg MS), valores estes superiores aos encontrados no presente experimento.

Godoy (2007) trabalhando com a forragem fresca *in natura* de guandu encontraram menores valores de DMS (269 g/kg MS) quando comparado com o presente experimento.

Lima et al. (2008), avaliando a digestibilidade de nutrientes na silagem de sorgo com níveis crescentes (0, 25, 50, 75 e 100) de girassol encontraram valores de 545,9; 516,8; 561,6; 559,9 e 543,5g/kg MS, sendo estes valores semelhantes aos encontrados nesse experimento.

Assim, pode-se sugerir que o aumento verificado na DMS nas silagens com mistura de até 100% de guandu ocorreu possivelmente pela maior disponibilidade de nitrogênio nos substratos estudados, devido ao maior conteúdo de PB da forragem de guandu utilizada, o que levaria à maior degradabilidade do alimento, conforme encontrado por Carvalho (2008).

Tabela 3. Médias de degradabilidade ruminal da matéria seca (DMS) e matéria orgânica (DMO) das silagens usados como substratos na presença do PEG após 24 horas de incubação.

Variáveis	PEG	Níveis de guandu (%)					Média	CV ¹	Probabilidade ²			Desvio	Contraste ³
		0	25	50	75	100			L	Q	C		
DMS 24h (g/kg/MS)	sem	531,0	551,3	553,5	554,5	622,6	562,6	7,2	ns	ns	ns	ns	ns
	com	575,2	575,2	582,7	588,3	648,9	594,0	10,4	ns	ns	ns	ns	
DMO 24h (g/kg/MS)	sem	522,3	548,1	536,0	541,0	619,3	553,3	7,8	ns	ns	ns	ns	0,0150
	com	567,4	546,6	549,9	556,8	622,8	568,7	10,1	ns	ns	ns	ns	

¹Coeficientes de variação (%)

²Probabilidade: L = probabilidade para o efeito linear; Q = probabilidade para o efeito quadrático; C = probabilidade para o efeito cúbica; Desvio = probabilidade para o desvio da linearidade

³Contraste: sem e com PEG = 0% x média de 25, 50, 75 e 100%

ns = não significativo.

Para os resultados da DMO dos substratos a análise não detectou diferença significativa sem e com a presença do PEG em cada um dos substratos (Tabela 8). Quando comparados pelo teste de contraste 0% x média de 25, 50, 75 e 100% de guandu a análise de regressão encontrou diferença significativa do tipo quadrática ($P < 0,01$) Figura 17.

O PEG proporcionou um maior aumento na DMO quando comparado sem a presença do PEG, a exceção do substrato com 25% de guandu que foi observado um valor menor.

Godoy (2007) também utilizando o guandu como forragem na alimentação de ovinos, observou menores valores de DMO (271 g/kg MS) do que mostrou a silagem de guandu neste estudo (553 g/kg MS) após 24 horas de incubação.

Figura 3 - Representação gráfica da equação de regressão para os resultados do contraste da DMO (g/kg MS) sem e com a presença do PEG nos substratos incubados.

Conclusões

A produção de gases no substrato utilizado com 25% de guandu com a presença do PEG foi maior, levando a acreditar que houve maior complexação do PEG com os taninos. Também aumentou a produção de

CH₄ no substrato utilizado com 50% de guandu e redução com 75 e 100% de guandu. O substrato utilizado com 25% de guandu possivelmente poderia ser incluído na dieta de ruminantes com a finalidade de suplementação protéica e na mitigação de metano por ter menor emissão da mesma e menor incremento.

As variáveis de DMS e DMO foram maiores com a presença do PEG no substrato com 100% de guandu.

Em geral os taninos encontrados nas silagens podem influenciar negativamente a fermentação ruminal e consequentemente a degradabilidade, devendo levar em consideração o tipo de tanino e sua estrutura, apesar de não estar ainda bem esclarecido na literatura de que forma as diferentes estruturas ou composição dos monômeros afetam sua atividade biológica.

Referências bibliográficas

- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official *methods of analysis*. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995.
- BUENO, I. C. S.; CABRAL FILHO, S. L. S.; GOBBO, S. P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M. S.; ABDALLA, A. L. Influence of inoculum source in a gas production methods. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 123-124, p. 95- 105, 2005.
- BUENO, I. C. S.; VITTI, D. M. S. S.; LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A. L. A new approach for *in vitro* bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 141, p. 153-170, 2008.
- CABRAL FILHO, S. L. S. Efeito do teor de tanino do sorgo sobre a fermentação ruminal e parâmetros nutricionais de ovinos. 2004, 88 f. Tese (Doutorado em Ciência) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- CARVALHO, W. T. V.; GONÇALVES, L. C.; MAURÍCIO, R. M.; SOUZA, L. F.; VEIGA, I, R. F. M.; MOREIRA, G. H. F. A. Avaliação do polietileno glicol (PEG) sobre a cinética de fermentação ruminal e a degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica de grãos de sorgo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45., 2008, Lavras. Anais... Lavras: SBZ; UFLA, 2008. 1 CD-ROM.
- DUBOIS, M.; GUILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1966.
- ERWING, W. S.; MARCO, G. J.; MERY, E. M. Volatile fatty acids analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, v. 44, n. 9, p. 1768-1771, 1961.

- EVANGELISTA, A. R.; ABREU, J. G.; AMARAL, P. N. C.; PEREIRA, R. C.; SALVADOR, F. M.; LOPES, J.; SOARES, L. Q. Composição bromatológica de silagens de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) aditivadas com forragem de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) Dewit). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 29, n. 2, p. 429-435, 2005.
- GETACHEW, G.; ROBINSON, P. H.; DePETERS, E. J.; TAYLOR, S. J.; GISI, D. D.; HIGGINBOTHAM, G. E.; RIORDAN, T. J. Methane production from commercial dairy rations estimated using an *in vitro* gas technique. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 123-124, p. 391-402, 2005.
- GODOY, P. B. Aspectos nutricionais de compostos fenólicos em ovinos alimentados com leguminosas forrageiras. 2007. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- GODOY, R.; BATISTA, L. A. R.; SANTOS, P. M.; SOUZA, F. H. D. Avaliação de linhagens selecionadas de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.34, n.1, p. 7 – 19, 2005.
- JAYANEGARA, A.; TOGTOKHBAYAR, N.; MAKAR, H. P. S.; BECKER, K. Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an *in vitro* rumen fermentation system. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 150, p. 230-237, 2009.
- LIMA, G. F. C.; AGUIAR, E. M.; RÊGO, M. M. T.; MELO, A. B.; MACIEL, F. C.; LÔBO, R, N. B.; LIRA, M. A. Digestibilidade de nutrientes da silagem de sorgo com níveis crescentes de girassol. In: *Congresso Nordestino de Produção Animal*, 5., 2008, Aracaju. Anais... Aracaju: SNPA, 2008. 1 CD-ROM.
- LONGO, C.; BUENO, I. C. S.; NOZELLA, E. F.; GODDOY, P. B.; CABRAL FILHO, S. L. S.; ABDALLA, A. L. The influence of head-space and inoculum dilution on *in vitro* ruminal methane measurements. *International Congress Series*, Amsterdam, v. 1293, p. 62-65, 2006.
- MAGALHÃES, P. C.; RODRIGUES, W. A.; DURÃES, F. O. M. Tanino no grão de sorgo. Sete Lagoas: *Embrapa Milho e Sorgo*, 2003. 2 p. (Comunicado Técnico, 88).
- MAKKAR, H. P. S. Quantification of tannins in tree foliage. Vienna: FAO; IAEA, 2000. (Laboratory Manual).
- MAKKAR, H. P. S. Effect and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, Amsterdam, v. 49, p. 241-256, 2003.
- MAKKAR, H. P. S.; BLÜMMEL, M.; BECKER, K. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in vitro techniques. *British Journal of Nutrition*, Cambridge, v. 73, p. 897-913, 1995.
- MAURÍCIO, R. M.; MOULD, F. L.; DHANOA, M. S.; OWEN, E.; CHANNA, K. S.; THEODOROU, M. K. Semi automation of the in vitro gas production technique using a pressure transducer. In: ANNUAL MEETING OF THE BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, 1998, Scarborough. Posters... Penicuik: BSAS, 1998. p. 70.
- NEUMANN, M.; RESTLE, J.; FILHO, D. C. A.; BRONDANI, I. L.; PELLEGRINI, L. G.; FREITAS, A. K. Avaliação do valor nutritivo da planta e da silagem de diferentes híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 31, p. 293-301, 2002. Suplemento 1.
- PLAYNE, M. J.; McDONALD, P. T. The buffering constituents of herbage and of silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 17, p. 264-268, 1966.
- SAS INSTITUTE. The SAS System for Windows. Release 8.01, Cary, 2000.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; McALLAN, A. B.; FRANCE, J. A. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 185-197, 1994.

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