

MANUAL PARA UTILIZAÇÃO DO SISTEMA AUTOMÁTICO ANKOM RF PARA MENSURAÇÃO DA PRODUÇÃO DE GASES *IN VITRO* (FERMENTAÇÃO RUMINAL)

Introdução

A técnica da produção de gases (MENKE et al., 1979; PELL & SCHOFIELD, 1993; THEODOROU et al., 1993; CONE et al., 1995), permite a avaliação *in vitro* da fermentação ruminal bem como inferências quantitativas e qualitativas dos processos de digestão ruminal. Basicamente, as amostras moídas são incubadas em garrafas hermeticamente fechadas, mantidas a 39°C, com um meio anaeróbio, inoculado com líquido ruminal. Conforme a fermentação avança, o gás acumulado no espaço superior dessas garrafas é mensurado. As curvas de produção de gás são estabelecidas, repetindo-se as medidas e liberação dos gases, a intervalos regulares, durante o tempo total de incubação. Estes dados permitem a estimativa dos parâmetros de cinética fermentativa.

Determinação da produção de gases em processos fermentativos pelo equipamento automático ANKOM^{RF}

Descrição do equipamento



Figura 1. Componentes do equipamento ANKOM^{RF}. Fonte: Manual ANKOM.

O sistema ANKOM^{RF} foi desenvolvido para mensurar a cinética da fermentação microbiana através de um sistema automatizado de monitoração da pressão dos gases produzidos e temperatura em cada módulo, cujos dados são remotamente gravados em planilhas no computador (Microsoft Office – Excel). Os módulos se comunicam com o computador utilizando a transmissão de rádio frequência (RF). Através da interface com

o computador (Figura 2), é possível controlar os intervalos dos dados gravados e a liberação automática da pressão através da válvula interna em cada módulo.



Figura 2. Equipamento ANKOM^{RF} em funcionamento durante ensaio. Fonte: Carolina Tobias Marino.

Teste de Validação do equipamento ANKOM^{RF}

O primeiro passo para utilização do equipamento ANKOM^{RF} foi a validação de seu correto funcionamento, segundo o procedimento 04 do manual ANKOM. Assim, foram realizados ensaios experimentais de fermentação alcoólica com três repetições para cada módulo. Foram testados: (1) a funcionalidade das baterias, responsáveis pela autonomia de cada módulo, (2) a capacidade de detecção e mensuração da pressão dos gases formados durante a fermentação pelo equipamento, (3) gravação e armazenamento dos dados e (4) repetibilidade dos módulos.

O procedimento consistiu na adição em cada frasco de 100 mL de água destilada, 0,5 g de açúcar refinado e 300 mg de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*), seguida da aspersão de CO₂ e fechamento do frasco. Os frascos foram mantidos em banho-maria a 40°C. O equipamento foi ligado e o processo de fermentação acompanhado por 24 h com mensurações dos valores de pressão (psi) a cada 30 min.

Com relação às baterias, foi feita uma planilha que permitiu identificar aquelas já com desgaste e conseqüente menor autonomia. A informação obtida com essa atividade permitiu criar estratégias que permitem o uso destas baterias desgastadas ao longo do tempo, com substituições em prazos determinados em função da duração estimada de cada uma delas. Não fosse esse trabalho, não teríamos condições de usar todos os módulos sem novo dispêndio financeiro para aquisição de novas baterias.

O correto funcionamento dos módulos foi verificado pela semelhança entre as curvas obtidas nos ensaios (Figura 4) e as descritas no procedimento. Os ensaios permitiram a detecção do mau funcionamento de um dos módulos que pode ser encaminhado para manutenção na empresa fabricante.



a.



b.

Figura 3. Bateria (a.) e bateria instalada (b.) no módulo ANKOM^{RF}. Fonte: Carolina Tobias Marino.

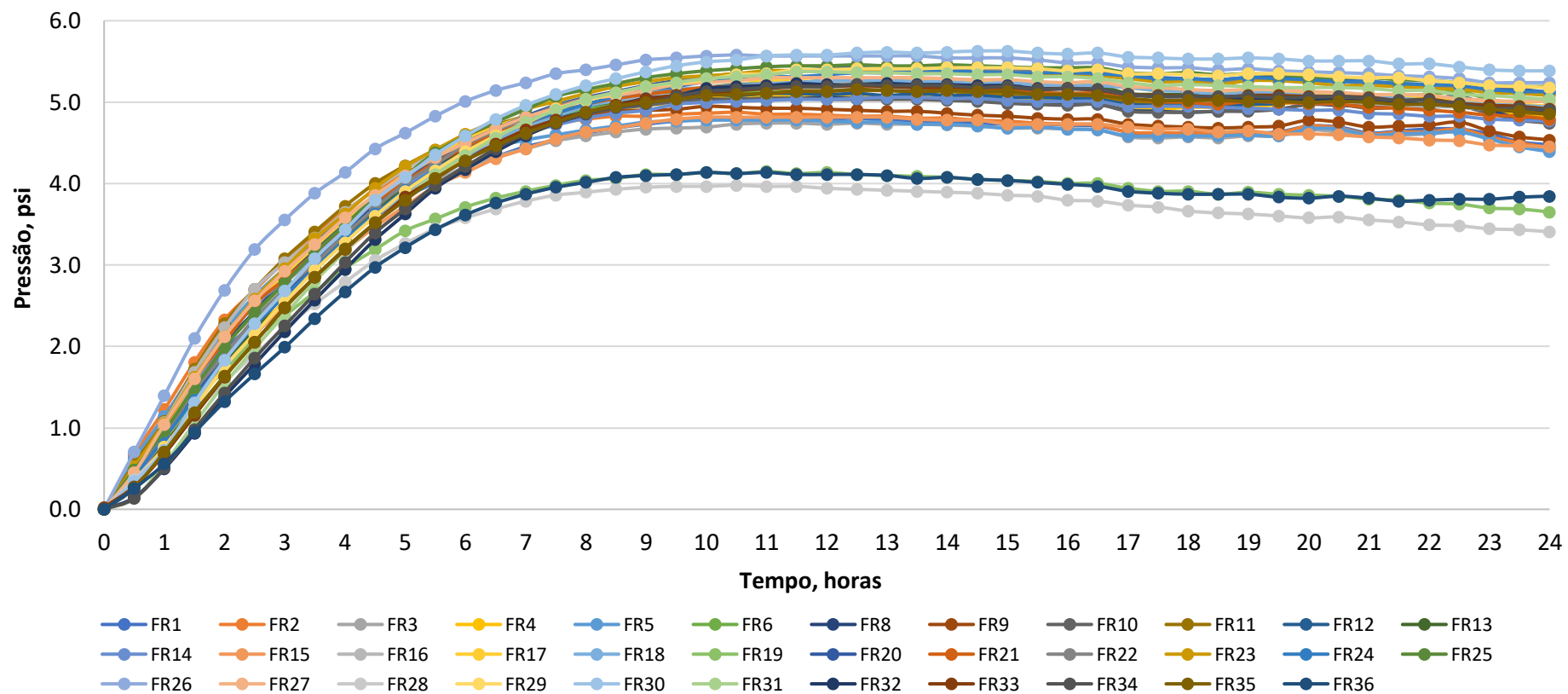


Figura 4. Pressão dos gases (psi) a partir da fermentação alcoólica em função do tempo (horas).

Padronização da técnica de produção de gases pelo equipamento automático ANKOM^{RF}

Produção de gases por fermentação ruminal

A técnica de produção de gases *in vitro* tem sido amplamente utilizada para avaliar o efeito de moléculas bioativas na cinética de fermentação microbiana ruminal (MAKKAR, 2005). Nesta técnica, basicamente, as amostras são incubadas em frascos mantidos a 39°C em meio anaeróbio, inoculado com líquido ruminal com a presença de uma solução de digestão/tampão contendo macro e micro minerais, como também agentes tamponantes simulando as condições ruminais. Conforme a fermentação avança, o gás acumulado no espaço superior dessas garrafas é mensurado. As curvas de produção de gases são estabelecidas, repetindo-se as medidas e liberação dos gases, a intervalos regulares, durante o tempo total de incubação.

Preparo da solução de digestão/tampão e coleta de inóculo ruminal

O preparo da solução digestão/tampão e coleta de inóculo ruminal, descritos passo a passo a seguir, são realizados de acordo com GOERING & VAN SOEST (1970), conforme descrito no procedimento 07 do manual ANKOM. O preparo da solução digestão/tampão é realizado no dia anterior ao início do ensaio.

Preparo do meio de digestão

- Quantidade necessária = número de garrafas x 50 mL.

Adicionar os ingredientes na ordem indicada a seguir, permitindo a completa dissolução após cada adição:

- Água destilada..... 500 mL
- Peptona (de digestão ácida de caseína)..... 0,2 g
- Solução micromineral..... 0,1 mL
- Solução tampão..... 200 mL
- Solução macromineral..... 200 mL
- Solução resazurina..... 1 mL

Preparo das soluções

Todas as soluções devem ser guardadas no escuro, a uma temperatura de 4°C.

- Solução micromineral (gramas por 100 mL):

- Cloreto de cálcio diidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)13,20

- Cloreto de manganês diidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)8,18
- Cloreto de cobalto hexaidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)1,00
- Cloreto férrico (FeCl_3)4,80

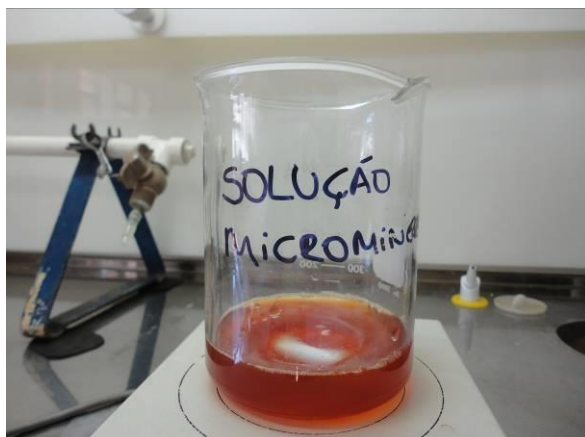


Figura 5. Homogeneização da solução micromineral por meio de agitador magnético.

Fonte: Carolina Tobias Marino.

- Solução tampão (gramas por litro):

- Bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3)4
- Bicarbonato de sódio (NaHCO_3)35

- Solução macromineral (gramas por litro):

- Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4)3,75
- Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)6,2
- Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)0,6

- Solução de resazurina (gramas por 100 mL):

- Resazurina (indicador redox)0,1

Preparo do agente redutor

- Quantidade = número de garrafas x 3 mL.

Solução nº 1:

- Água destilada47,5 mL
- Cisteína clorohidrato0,625 g
- Hidróxido de sódio (NaOH) a 1 M4 mL

Solução nº 2:

- Água destilada47,5 mL
- Sulfeto de sódio nonahidratado ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)..... 0,625 g

Imediatamente antes do seu uso e dentro de uma capela, a solução nº 1 é transferida para uma garrafa limpa. Em seguida, a solução nº 2 é adicionada. A garrafa é tampada rapidamente e agitada para misturar bem os componentes.

Coleta do inoculo de rúmen

- Quantidade = número de garrafas x 25 mL.

O conteúdo do rúmen é retirado de um bovino canulado no rúmen alimentado com feno de *Panicum maximum* cv. Massai e é espremido com as mãos. O líquido ruminal obtido é coletado em um balde após filtragem em duas camadas de pano. O líquido filtrado é recolhido diretamente em uma garrafa térmica pré-aquecida (39°C), e imediatamente levado para o laboratório (Figura 6).



Figura 6. Animal canulado no rúmen (a.) Procedimento de coleta do líquido ruminal: retirada do conteúdo por meio da cânula ruminal (b.); líquido coletado e espremido em um balde com duas camadas de pano (c. e d.). Fonte: Carolina Tobias Marino.

Procedimento da técnica de produção de gases *in vitro* pelo sistema automático ANKOM^{RF}

Dia 1: As bolsas de filtro de TNT são identificadas numericamente a lápis com as respectivas repetições de cada amostra. As mesmas são colocadas em uma estufa de ventilação forçada a 55°C, após lavagem com água e sabão antes de adicionados os respectivos substratos. Após a pesagem de cada saco vazio, duas repetições de 0,5 g de amostra do substrato (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) são pesadas e depositadas em cada bolsa.

Os valores nutricionais do substrato utilizado *Brachiaria brizantha* cv. Marandu foi realizado no laboratório de nutrição animal da Embrapa Gado de Corte usando um espectrofotômetro de infravermelho próximo (NIRS) e os valores são os seguintes:

- Proteína Bruta (PB) = 6,30 %MS;
- Fibra detergente neutro (FDN) = 78,0 %MS;
- Fibra detergente ácido (FDA)= 43,50 %MS;
- Lignina = 9,40 %MS;
- Celulose = 32,0 %MS

Os saquinhos são fechados usando uma seladora térmica e transferidos para as garrafas de fermentação identificadas.

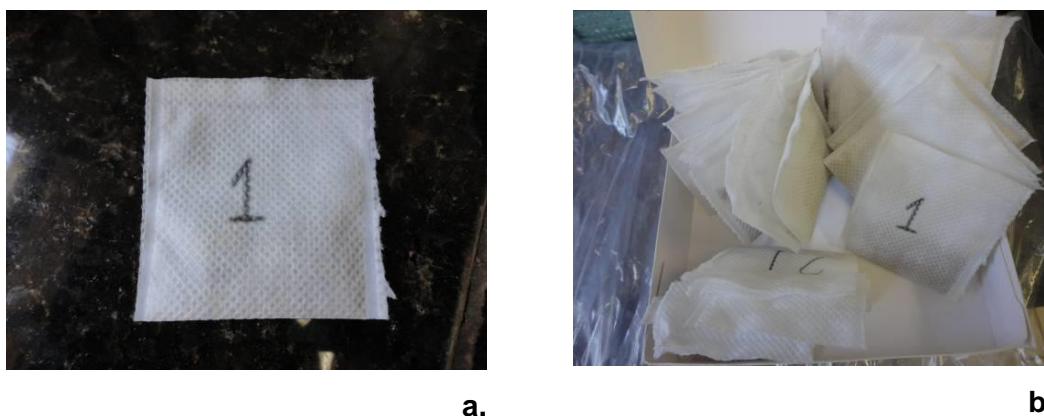


Figura 7. Identificação numérica das bolsas de filtro de TNT (a. e b.). Fonte: Carolina Tobias Marino.

No período da tarde, antes do dia da coleta, 47 mL do meio de digestão são adicionados em cada garrafa, gaseificadas com CO₂, e imediatamente fechadas. Na capela, 3 mL do agente redutor são adicionados e novamente o frasco é gaseificado com CO₂ e tampado. É observado que a cor da solução muda de azul para rosa e logo

se torna incolor, caracterizando a completa redução (Figura 8 a). As garrafas são acondicionadas em geladeira a 4°C até seu uso.

Neste dia as baterias também devem ser recarregadas por no mínimo três horas para atingir sua carga completa (Figura 8 b).



a.



b.

Figura 8. Frascos com a solução digestão (a.) e baterias no carregador (b.). Fonte: Carolina Tobias Marino.

Dia 2: No início da manhã, o banho-maria é ligado e estabilizado a 39°C. Os frascos são retirados da geladeira e colocados no banho-maria três horas antes do início da inoculação. Após a coleta do inóculo ruminal, cada frasco recebe 25 mL de líquido ruminal, em ordem sequencial. Neste momento, cada frasco deve conter 0,5 g de amostra, 50 mL de solução digestão/tampão e 25 mL de inóculo ruminal. Após a inoculação, o software do equipamento é programado (Figura 9) e o ensaio é iniciado.

Os passos para a programação do software são:

- 1- Configurar a duração do tempo de intervalo (**Live Interval**). Este é o número de segundos que cada módulo vai demorar para se comunicar com o computador. Maior tempo de intervalo aumenta a vida útil da bateria;
- 2- Configurar o intervalo de mensuração (**Recording Interval**). Esse é o intervalo de tempo entre cada registro de pressão.
- 3- Configurar a válvula de liberação de pressão (**Global release**) para cada módulo. Esta é a pressão que, quando alcançada, vai iniciar a abertura da válvula do módulo durante o período;
- 4- Configurar a unidade de pressão (**Pressure units**) (psi ou mbar);
- 5- Configurar o nome do arquivo local de gravação automática (**Auto Save location**) para estabelecer o local para armazenar os dados.
- 6- Para iniciar a gravação é só clicar em **RECORD** e quando finalizado em **STOP**.

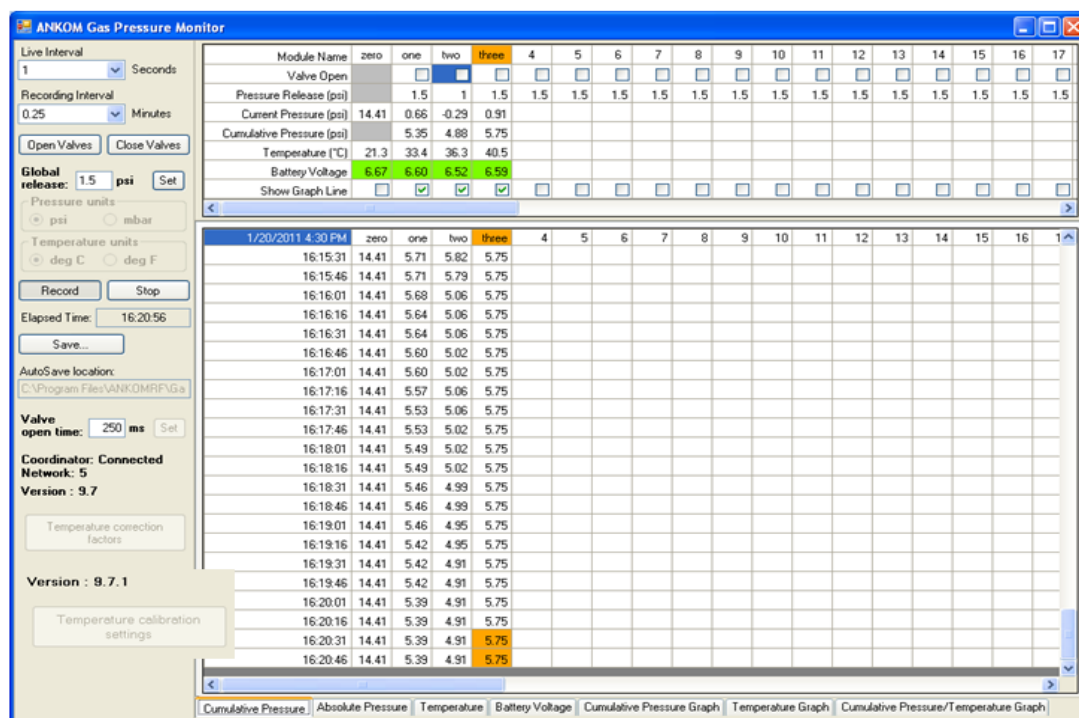


Figura 9. Tela de configuração do software.

Dados obtidos durante os ensaios

Os dados de pressão acumulada, absoluta, temperatura e voltagem das baterias de cada módulo mensurados no intervalo de tempo determinado são enviados ao computador para planilha do Excel (Figuras 10-13).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	19/06/2017 09:40	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2	9:40:01 AM	14.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	9:55:02 AM	14.00	0.04	0.04	0.04	0.11	0.15	0.15	0.15	0.15	0.18	0.15	0.29	0.29	0.33	0.36
4	10:10:02 AM	13.97	0.07	0.07	0.07	0.22	0.25	0.29	0.29	0.25	0.25	0.29	0.47	0.51	0.58	0.66
5	10:25:02 AM	13.97	0.15	0.15	0.15	0.33	0.40	0.40	0.40	0.33	0.44	0.40	0.66	0.73	0.76	0.91
6	10:40:03 AM	13.97	0.15	0.15	0.18	0.36	0.44	0.47	0.47	0.44	0.51	0.47	0.84	0.95	0.98	1.13
7	10:55:03 AM	13.97	0.25	0.18	0.22	0.47	0.58	0.58	0.58	0.51	0.62	0.62	1.02	1.09	1.13	1.35
8	11:10:03 AM	13.97	0.25	0.22	0.25	0.55	0.66	0.66	0.69	0.58	0.73	0.73	1.16	1.31	1.31	1.56
9	11:25:03 AM	13.97	0.33	0.29	0.33	0.66	0.73	0.76	0.76	0.62	0.84	0.84	1.31	1.46	1.49	1.75
10	11:40:03 AM	13.97	0.36	0.29	0.33	0.69	0.80	0.84	0.84	0.69	0.91	0.98	1.49	1.67	1.67	1.97
11	11:55:03 AM	13.97	0.40	0.33	0.36	0.76	0.87	0.91	0.91	0.76	1.06	1.09	1.64	1.86	1.86	2.15
12	12:10:03 PM	13.97	0.44	0.36	0.40	0.84	0.95	0.95	0.95	0.80	1.13	1.20	1.75	2.00	2.00	2.33
13	12:25:03 PM	13.97	0.47	0.40	0.44	0.91	0.98	1.02	1.02	0.84	1.20	1.31	1.93	2.15	2.15	2.51
14	12:40:03 PM	13.93	0.51	0.44	0.51	0.98	1.09	1.09	1.09	0.87	1.35	1.42	2.07	2.33	2.29	2.66
15	12:55:03 PM	13.97	0.55	0.44	0.47	1.02	1.13	1.13	1.13	0.91	1.42	1.53	2.18	2.44	2.44	2.80
16	1:10:03 PM	13.93	0.58	0.51	0.55	1.09	1.16	1.20	1.20	0.95	1.53	1.60	2.33	2.58	2.58	2.95
17	1:25:03 PM	13.93	0.62	0.55	0.58	1.13	1.24	1.24	1.27	0.98	1.60	1.75	2.47	2.77	2.73	3.09
18	1:40:03 PM	13.93	0.62	0.55	0.58	1.16	1.24	1.27	1.27	1.02	1.67	1.82	2.62	2.87	2.87	3.24
19	1:55:03 PM	13.93	0.69	0.58	0.62	1.24	1.31	1.35	1.35	1.09	1.75	1.89	2.73	3.02	2.98	3.42
20	2:10:03 PM	13.93	0.69	0.62	0.62	1.27	1.35	1.35	1.38	1.09	1.82	2.00	2.87	3.13	3.13	3.53
21	2:25:03 PM	13.93	0.73	0.62	0.66	1.31	1.38	1.42	1.42	1.13	1.89	2.07	2.98	3.24	3.24	3.64
22	2:40:03 PM	13.93	0.76	0.66	0.69	1.38	1.42	1.46	1.46	1.16	2.00	2.15	3.09	3.38	3.35	3.78
23	2:55:03 PM	13.93	0.76	0.66	0.66	1.38	1.46	1.46	1.49	1.20	2.04	2.18	3.24	3.49	3.46	3.89
24	3:10:03 PM	13.93	0.80	0.69	0.73	1.42	1.49	1.49	1.53	1.24	2.11	2.29	3.31	3.60	3.57	4.00
25	3:25:03 PM	13.93	0.84	0.69	0.73	1.49	1.53	1.53	1.56	1.24	2.18	2.37	3.42	3.71	3.71	4.15
26	3:40:03 PM	13.93	0.84	0.73	0.73	1.49	1.53	1.56	1.60	1.27	2.22	2.44	3.53	3.82	3.82	4.26
27	3:55:03 PM	13.93	0.87	0.73	0.73	1.53	1.56	1.56	1.60	1.31	2.29	2.51	3.60	3.93	3.89	4.37
28	4:10:03 PM	13.93	0.87	0.76	0.76	1.56	1.60	1.60	1.67	1.35	2.33	2.58	3.71	4.04	4.04	4.48
29	4:25:03 PM	13.93	0.86	0.80	0.80	1.60	1.64	1.67	1.71	1.38	2.44	2.66	3.82	4.16	4.16	4.60

Figura 10. Dados de pressão acumulada de cada módulo.

19/06/2017 09:40:00															
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
19/06/2017 09:40	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2	9:40:01 AM	14.50	14.15	14.33	14.22	14.33	14.37	14.30	14.30	14.41	14.30	14.66	14.77	14.55	14.62
3	9:55:02 AM	14.00	14.19	14.37	14.26	14.44	14.51	14.44	14.44	14.59	14.44	14.95	15.06	14.88	14.99
4	10:10:02 AM	13.97	14.22	14.41	14.30	14.55	14.62	14.66	14.59	14.55	14.66	14.59	15.13	15.28	15.13
5	10:25:02 AM	13.97	14.30	14.48	14.37	14.66	14.77	14.77	14.70	14.62	14.84	14.70	15.31	15.50	15.31
6	10:40:03 AM	13.97	14.30	14.48	14.41	14.70	14.81	14.84	14.77	14.73	14.91	14.77	15.50	15.72	15.53
7	10:55:03 AM	13.97	14.41	14.51	14.44	14.81	14.95	14.95	14.88	14.81	15.02	14.91	15.68	15.86	15.68
8	11:10:03 AM	13.97	14.41	14.55	14.48	14.88	15.02	15.02	14.99	14.88	15.13	15.02	15.82	16.08	15.86
9	11:25:03 AM	13.97	14.48	14.62	14.55	14.99	15.10	15.13	15.06	14.91	15.24	15.13	15.97	16.22	16.04
10	11:40:03 AM	13.97	14.51	14.62	14.55	15.02	15.17	15.21	15.13	14.99	15.31	15.28	16.15	16.44	16.22
11	11:55:03 AM	13.97	14.55	14.66	14.59	15.10	15.24	15.28	15.21	15.06	15.46	15.39	16.30	16.62	16.41
12	12:10:03 PM	13.97	14.59	14.70	14.62	15.17	15.31	15.31	15.24	15.10	15.53	15.50	16.41	16.77	16.55
13	12:25:03 PM	13.97	14.62	14.73	14.66	15.24	15.35	15.39	15.31	15.13	15.61	15.61	16.59	16.92	16.70
14	12:40:03 PM	13.93	14.66	14.77	14.73	15.31	15.46	15.46	15.39	15.17	15.75	15.72	16.73	17.10	16.84
15	12:55:03 PM	13.97	14.70	14.77	14.70	15.35	15.50	15.50	15.42	15.21	15.82	15.82	16.84	17.21	16.99
16	1:10:03 PM	13.93	14.73	14.84	14.77	15.42	15.53	15.57	15.50	15.24	15.93	15.90	16.99	17.35	17.13
17	1:25:03 PM	13.93	14.77	14.88	14.81	15.46	15.61	15.61	15.57	15.28	16.01	16.04	17.13	17.53	17.28
18	1:40:03 PM	13.93	14.77	14.88	14.81	15.50	15.61	15.64	15.57	15.31	16.08	16.12	17.28	17.64	17.43
19	1:55:03 PM	13.93	14.84	14.91	14.84	15.57	15.68	15.72	15.64	15.39	16.15	16.19	17.39	17.79	17.53
20	2:10:03 PM	13.93	14.84	14.95	14.84	15.61	15.72	15.72	15.68	15.39	16.22	16.30	17.53	17.90	17.68
21	2:25:03 PM	13.93	14.88	14.95	14.88	15.64	15.75	15.79	15.72	15.42	16.30	16.37	17.64	18.01	17.79
22	2:40:03 PM	13.93	14.91	14.99	14.91	15.72	15.79	15.82	15.75	15.46	16.41	16.44	17.75	18.15	17.90
23	2:55:03 PM	13.93	14.91	14.99	14.88	15.72	15.82	15.82	15.79	15.50	16.44	16.48	17.90	18.26	18.01
24	3:10:03 PM	13.93	14.95	15.02	14.95	15.75	15.86	15.86	15.82	15.53	16.52	16.59	17.97	18.37	18.12
25	3:25:03 PM	13.93	14.99	15.02	14.95	15.82	15.90	15.90	15.86	15.53	16.59	16.66	18.08	18.48	18.26
26	3:40:03 PM	13.93	14.99	15.06	14.95	15.82	15.90	15.93	15.90	15.57	16.62	16.73	18.19	18.59	18.37
27	3:55:03 PM	13.93	15.02	15.06	14.95	15.86	15.93	15.93	15.90	15.61	16.70	16.81	18.26	18.70	18.44
28	4:10:03 PM	13.93	15.02	15.10	14.99	15.90	15.97	15.97	15.97	15.64	16.73	16.88	18.37	18.81	18.59
29	4:25:03 PM	13.93	15.10	15.13	15.02	15.93	16.01	16.04	16.01	15.68	16.84	16.95	18.48	18.92	18.70

Figura 11. Dados de pressão absoluta de cada módulo.

19/06/2017 09:40:00															
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
19/06/2017 09:40	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2	9:40:01 AM	20.4	24.8	24.0	23.8	23.0	24.5	23.5	23.5	24.6	23.4	24.0	23.8	24.5	22.9
3	9:55:02 AM	20.4	24.9	24.3	24.0	23.4	24.9	24.1	24.0	24.8	23.8	24.5	24.3	25.1	23.2
4	10:10:02 AM	20.4	25.1	24.3	24.3	23.4	25.2	24.3	24.3	25.1	24.0	24.6	24.5	25.1	23.2
5	10:25:02 AM	20.4	25.1	24.3	24.5	23.4	25.2	24.5	24.3	25.2	24.0	24.8	24.5	25.1	23.2
6	10:40:03 AM	20.4	25.1	24.5	24.6	23.4	25.2	24.5	24.3	25.2	24.1	24.6	24.5	25.1	23.0
7	10:55:03 AM	20.4	25.1	24.5	24.6	23.5	25.4	24.5	24.3	25.2	24.1	24.6	24.3	25.1	23.0
8	11:10:03 AM	20.5	25.1	24.6	24.8	23.7	25.5	24.6	24.5	25.4	24.3	24.6	24.5	25.1	23.2
9	11:25:03 AM	20.5	25.2	24.8	24.9	23.7	25.5	24.8	24.6	25.5	24.5	24.6	24.5	25.2	23.2
10	11:40:03 AM	20.5	25.2	24.8	24.9	23.7	25.7	24.8	24.6	25.5	24.5	24.8	24.6	25.2	23.4
11	11:55:03 AM	20.7	25.2	24.8	24.9	23.7	25.5	24.8	24.6	25.5	24.5	24.8	24.6	25.2	23.4
12	12:10:03 PM	20.7	25.4	24.9	24.9	23.7	25.7	24.8	24.8	25.7	24.6	24.8	24.6	25.2	23.5
13	12:25:03 PM	20.7	25.4	25.1	24.9	23.8	25.7	24.9	24.8	25.7	24.6	24.9	24.6	25.4	23.5
14	12:40:03 PM	20.8	25.5	25.1	24.9	23.8	25.7	24.9	24.8	25.7	24.6	24.9	24.6	25.4	23.5
15	12:55:03 PM	20.8	25.5	25.1	24.9	23.8	25.9	25.1	24.9	25.9	24.6	24.9	24.8	25.4	23.5
16	1:10:03 PM	20.8	25.5	25.2	25.1	24.0	25.9	25.1	24.9	25.9	24.8	25.1	24.8	25.4	23.7
17	1:25:03 PM	21.0	25.7	25.2	25.1	24.0	25.9	25.1	24.9	25.9	24.8	25.1	24.9	25.5	23.7
18	1:40:03 PM	21.2	25.7	25.2	25.1	24.0	25.9	25.1	24.9	25.9	24.8	25.1	24.9	25.5	23.7
19	1:55:03 PM	21.2	25.7	25.2	25.1	24.1	26.0	25.1	25.1	26.0	24.9	25.1	24.9	25.5	23.7
20	2:10:03 PM	21.2	25.9	25.4	25.1	24.1	26.0	25.1	25.1	26.0	24.9	25.2	24.9	25.5	23.8
21	2:25:03 PM	21.3	25.9	25.4	25.2	24.3	26.0	25.2	25.1	26.0	24.9	25.2	24.9	25.7	23.8
22	2:40:03 PM	21.3	25.9	25.4	25.2	24.3	26.0	25.2	25.1	26.0	24.9	25.2	25.1	25.7	23.8
23	2:55:03 PM	21.3	25.9	25.4	25.2	24.3	26.2	25.2	25.1	26.0	24.9	25.2	25.1	25.7	23.8
24	3:10:03 PM	21.3	25.9	25.4	25.2	24.3	26.2	25.2	25.1	26.0	24.9	25.2	25.1	25.7	23.8
25	3:25:03 PM	21.3	25.9	25.4	25.2	24.3	26.2	25.2	25.1	26.0	24.9	25.4	25.1	25.7	23.8
26	3:40:03 PM	21.3	25.9	25.4	25.2	24.3	26.2	25.2	25.1	26.0	24.9	25.2	25.1	25.7	23.8
27	3:55:03 PM	21.3	25.9	25.4	25.1	24.3	26.0	25.2	25.1	26.2	24.9	25.4	25.1	25.7	23.8
28	4:10:03 PM	21.8	25.9	25.1	25.1	24.1	26.0	25.2	24.9	26.2	25.1	25.4	25.1	25.7	23.7
29	4:25:03 PM	21.9	25.9	25.1	24.9	24.0	26.0	25.4	25.1	26.0	25.1	25.5	25.1	25.9	23.7

Figura 12. Dados de temperatura de cada módulo.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	
1	19/06/2017 09:40																+
2	9:40:01 AM		6.93	6.94	7.01	6.95	6.95	6.93	6.93	7.05	6.98	6.91	7.14	6.96	6.93	7.19	
3	9:55:02 AM	6.98	6.92	6.93	6.98	6.94	6.94	6.93	6.91	7.03	6.97	6.90	7.13	6.95	6.93	7.17	
4	10:10:02 AM	6.96	6.91	6.91	6.95	6.93	6.93	6.91	6.90	7.03	6.96	6.90	7.12	6.93	6.91	7.16	
5	10:25:02 AM	6.95	6.90	6.90	6.94	6.92	6.92	6.90	6.89	7.01	6.95	6.89	7.11	6.93	6.90	7.14	
6	10:40:03 AM	6.94	6.89	6.89	6.93	6.91	6.91	6.89	6.88	7.01	6.94	6.88	7.10	6.91	6.90	7.13	
7	10:55:03 AM	6.93	6.87	6.87	6.91	6.90	6.90	6.88	6.87	7.00	6.93	6.87	7.09	6.90	6.89	7.12	
8	11:10:03 AM	6.93	6.87	6.87	6.90	6.89	6.90	6.87	6.86	6.98	6.92	6.87	7.08	6.90	6.88	7.11	
9	11:25:03 AM	6.92	6.86	6.85	6.89	6.88	6.89	6.86	6.85	6.98	6.91	6.86	7.07	6.89	6.87	7.10	
10	11:40:03 AM	6.91	6.85	6.85	6.87	6.87	6.88	6.85	6.85	6.97	6.90	6.86	7.06	6.87	6.86	7.09	
11	11:55:03 AM	6.90	6.85	6.84	6.87	6.87	6.87	6.85	6.84	6.96	6.90	6.85	7.06	6.87	6.86	7.09	
12	12:10:03 PM	6.90	6.84	6.82	6.86	6.86	6.87	6.85	6.83	6.95	6.89	6.85	7.05	6.87	6.85	7.08	
13	12:25:03 PM	6.89	6.83	6.82	6.85	6.85	6.86	6.83	6.82	6.94	6.88	6.85	7.04	6.86	6.85	7.07	
14	12:40:03 PM	6.88	6.83	6.81	6.85	6.85	6.85	6.83	6.82	6.93	6.87	6.84	7.03	6.85	6.84	7.06	
15	12:55:03 PM	6.87	6.82	6.80	6.85	6.83	6.85	6.82	6.82	6.93	6.87	6.83	7.03	6.85	6.84	7.06	
16	1:10:03 PM	6.87	6.82	6.79	6.83	6.83	6.84	6.82	6.81	6.93	6.87	6.83	7.03	6.85	6.83	7.07	
17	1:25:03 PM	6.86	6.81	6.79	6.83	6.83	6.84	6.81	6.80	6.95	6.85	6.82	7.02	6.84	6.82	7.04	
18	1:40:03 PM	6.85	6.81	6.77	6.82	6.82	6.83	6.81	6.79	6.91	6.85	6.82	7.01	6.83	6.82	7.03	
19	1:55:03 PM	6.85	6.80	6.77	6.82	6.81	6.82	6.80	6.79	6.90	6.85	6.82	7.01	6.82	6.82	7.03	
20	2:10:03 PM	6.84	6.79	6.77	6.82	6.80	6.82	6.79	6.79	6.90	6.84	6.81	7.01	6.82	6.82	7.03	
21	2:25:03 PM	6.84	6.79	6.76	6.81	6.81	6.79	6.82	6.79	6.78	6.89	6.83	6.81	7.00	6.82	6.81	
22	2:40:03 PM	6.83	6.79	6.75	6.80	6.79	6.81	6.79	6.78	6.88	6.82	6.80	6.95	6.81	6.80	7.01	
23	2:55:03 PM	6.82	6.78	6.74	6.81	6.79	6.81	6.79	6.77	6.88	6.82	6.80	6.90	6.81	6.80	7.01	
24	3:10:03 PM	6.82	6.78	6.74	6.79	6.78	6.80	6.78	6.77	6.88	6.82	6.80	6.98	6.80	6.79	7.01	
25	3:25:03 PM	6.82	6.77	6.74	6.79	6.77	6.80	6.77	6.77	6.87	6.81	6.79	6.98	6.80	6.79	7.01	
26	3:40:03 PM	6.81	6.77	6.73	6.79	6.77	6.79	6.77	6.77	6.87	6.81	6.79	6.98	6.79	6.79	6.99	
27	3:55:03 PM	6.80	6.77	6.73	6.79	6.77	6.79	6.77	6.76	6.86	6.80	6.79	6.97	6.79	6.79	6.99	
28	4:10:03 PM	6.98	6.96	7.03	7.06	7.17	6.79	6.97	6.98	6.85	6.80	6.97	6.97	6.98	6.98	6.98	
29	4:25:03 PM	6.96	6.95	7.01	7.03	7.15	6.78	6.95	6.95	6.95	6.97	6.95	6.96	6.96	6.97	6.98	
		Cumulative Pressure	Absolute Pressure		Temperature		Battery Voltage		Plant1	Plant2	+		-		x		

Conversão dos dados de pressão (psi) em volume de gás (mL)

Os dados de pressão mensurados em psi durante o processo de fermentação devem ser transformados em volume de gás (mL) e volume de gás em função da matéria seca incubada (mL/g MS incubada).

Os cálculos descritos a seguir foram realizados de acordo com o procedimento 05 do manual ANKOM e uma planilha foi criada para facilitar o trabalho com os dados para posterior estimativa dos parâmetros de degradação e análise estatística.

O primeiro passo consiste em preencher com as informações específicas de cada frasco como volume em mL (peso cheio (g) – peso vazio (g)), solução em mL (inóculo + solução de digestão/tampão) e a quantidade de substrato (forragem) incubada em g (Figura 14).

	L	M	N	O	P	Q	R
					Peso cheio, g	Peso vazio, g	
		Volume real do frasco, ml =	309,3	559,8	250,5		
		Solução do ensaio, ml =	75				
		R (Constante do gás) =	8,314472				
		Quantidade do substrato, g =	0,5005				
roduzido, ml/g MS	0,00						
	2,14						
	4,27						
	5,34						
	6,05						
	7,47						
	8,89						
	9,96						
	10,67						
	11,73						
	12,80						
	13,86						
	14,57						
	15,64						
	15,98						
	15,98						

Figura 14. Planilha para conversão dos dados de pressão em psi em volume de gases em mL – Dados específicos de cada frasco.

Em cada ensaio dois frascos são destinados para o branco (inóculo ruminal mais solução de digestão/tampão). A pressão dos gases do branco deve ser descontada do frasco com substrato (forragem), inóculo e solução tampão (Figura 15). Os dados de pressão do branco e de cada frasco (psi) e temperatura (°C) em cada tempo são copiados da planilha de mensuração do equipamento. Estes dados estão representados na Figura 15 pelas colunas em verde.

De acordo com o manual ANKOM os frascos do sistema têm capacidade média de 310 mL. Para aumentar a precisão dos cálculos, a medida de capacidade foi realizada para cada um dos frascos de forma individual:

$$\text{Peso frasco cheio (g)} - \text{Peso do frasco (g)} = X$$

X = capacidade em mL, já que foi mensurado com água, considerando que 1 mL de água equivale a 1g.

Estes dados permitem o cálculo do:

Headspace, L = volume real do frasco, mL – solução do frasco, mL/1000;

Pressão, kPa = pressão, psi mensurada em cada tempo X 6,894757293;

Temperatura, K = 273 + temperatura mensurada em cada tempo, °C.

Tempo, min	Pressão, psi	Volume, ml	Temp, C	Headspace, L	Pressão, KPa	Temp, K	Lei ideal dos gases
0	0,00	309,30	23,0	0,23430	0,00	296,04	0,000000
15	0,04	309,30	23,4	0,23430	0,50	296,35	0,000048
30	0,07	309,30	23,4	0,23430	1,00	296,35	0,000095
45	0,15	309,30	23,4	0,23430	1,25	296,35	0,000119
60	0,16	309,30	23,4	0,23430	1,42	296,35	0,000135
75	0,22	309,30	23,5	0,23430	1,76	296,51	0,000167
90	0,24	309,30	23,7	0,23430	2,09	296,67	0,000199
105	0,32	309,30	23,7	0,23430	2,34	296,67	0,000222
120	0,33	309,30	23,7	0,23430	2,51	296,67	0,000238
135	0,36	309,30	23,7	0,23430	2,76	296,67	0,000262
150	0,40	309,30	23,7	0,23430	3,01	296,67	0,000286
165	0,44	309,30	23,8	0,23430	3,26	296,82	0,000310
180	0,49	309,30	23,8	0,23430	3,43	296,82	0,000326
195	0,49	309,30	23,8	0,23430	3,68	296,82	0,000349
210	0,55	309,30	24,0	0,23430	3,76	296,98	0,000357

Figura 15. Planilha para conversão dos dados de pressão em psi em volume de gases em mL – Cálculos.

Assim, a pressão do gás mensurado durante o estudo pode ser convertida em moles de gás produzido usando lei do gás "ideal", e, em seguida, convertida em mL de gás produzido usando a lei de Avogadro.

Lei do gás 'Ideal'

$$n = p (V/ RT)$$

Onde: N = gás produzido em moles (mol)

P = pressão em quilopascal (kPa)

V = volume do "headspace" no frasco de vidro em litros (L)

T = temperatura em Kelvin (K)

R = constante de gás (8.314472 L·kPa·K⁻¹·mol⁻¹)

Lei de Avogadro

Usando a lei de Avogadro, à pressão atmosférica, medida em psi (1 psi = 6,894757293 quilopascal), um mole ocupará 22,4 L a 273,15 K e 101,325 kPa (condições padrão). Portanto, o gás medido em moles pode ser convertido para mL como se segue:

Produção de gás, mL = $n \cdot 22,4 \cdot 1000$, onde n é igual a quantidade de moles de gás

Produção de gás, mL/g MS incubada = produção de gás, mL/quantidade de substrato incubado, g.

Temp, C	Headspace, L	Pressão, KPa	Temp, K	Lei ideal dos gases	Gás produzido, ml	Gás produzido, ml/g MS	Volume real do frasco, ml =	Solução do ensaio, ml =	R (Constante do gás) =	Quantidade do substrato, g
23,0	0,23430	0,00	296,04	0,000000	0,00	0,00				
23,4	0,23430	0,50	296,35	0,000048	1,07	2,14				
23,4	0,23430	1,00	296,35	0,000095	2,14	4,27				
23,4	0,23430	1,25	296,35	0,000119	2,67	5,34				
23,4	0,23430	1,42	296,35	0,000135	3,03	6,05				
23,5	0,23430	1,76	296,51	0,000167	3,74	7,47				
23,7	0,23430	2,09	296,67	0,000199	4,45	8,89				
23,7	0,23430	2,34	296,67	0,000222	4,98	9,96				
23,7	0,23430	2,51	296,67	0,000238	5,34	10,67				
23,7	0,23430	2,76	296,67	0,000262	5,87	11,73				
23,7	0,23430	3,01	296,67	0,000286	6,41	12,80				
23,8	0,23430	3,26	296,82	0,000310	6,94	13,86				
23,8	0,23430	3,43	296,82	0,000326	7,29	14,57				
23,8	0,23430	3,68	296,82	0,000349	7,83	15,64				
24,0	0,23430	3,76	296,98	0,000357	8,00	15,98				

Figura 16. Planilha para conversão dos dados de pressão em psi em volume de gases em mL – Cálculos.

E assim, podemos construir os gráficos da produção de gases em relação ao tempo (Figura 17).

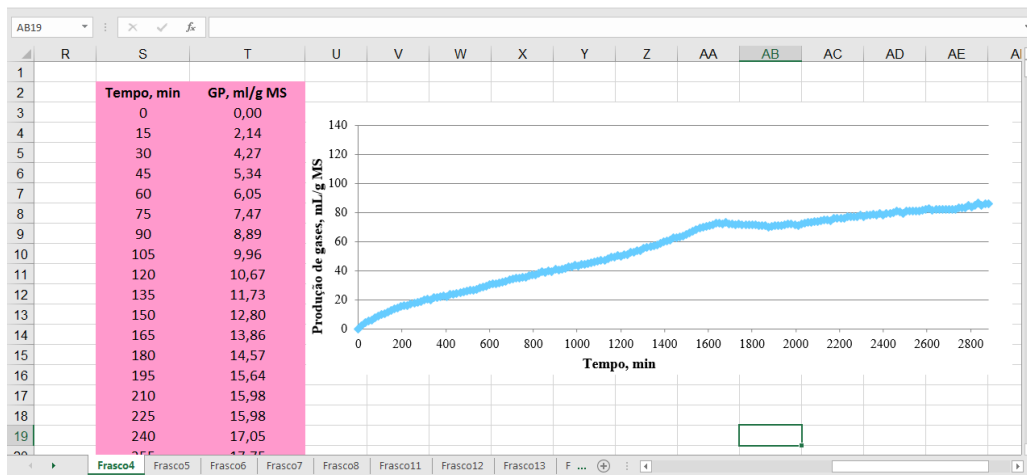


Figura 17. Gráfico da produção de gases em relação ao tempo.

Degradabilidade da matéria seca do substrato

- **Cálculo da quantidade de substrato na amostra original (g)**

Este cálculo é obtido pela diferença de peso das bolsas de filtro de TNT vazias e das bolsas contendo os substratos na matéria original, ou seja, antes do início do ensaio.

- **Cálculo da quantidade de substrato degradada (g)**

Após o término do ensaio a bolsa de TNT é retirada do frasco, lavada em água corrente até a cor ser límpida e levada a estufa à 55°C por 48 h. O peso do substrato degradado é obtido pela diferença entre os pesos das bolsas contendo o substrato e o peso da bolsa vazia.

- **Cálculo da degradabilidade**

Para a determinação da degradabilidade da MS (DMS) dos substratos avaliados, os mesmos são pesados em bolsas de filtro de TNT antes e após o término do ensaio. O cálculo para esta variável consiste na divisão da quantidade de MS do substrato restante após a incubação (g) pela quantidade de MS do substrato original (g) multiplicado por 100. Um exemplo é descrito pela Tabela 1.

A partir destes dados é possível calcular a produção total de gases por matéria seca digestível (MSD):

$$\text{MSD} = \text{quantidade de substrato (g)} * \text{DMS}/100$$

$$\text{Volume total (Vt, ml/g MSD)} = \text{Volume total (Vt, ml)}/\text{MSD}$$

Tabela 1. Valores referentes aos cálculos para obtenção da degradabilidade da matéria seca do substrato

Nº saco	Saco vazio (g)	Saco + amostra original (g)	Amostra original (g)	Saco + amostra pós-rúmen (g)	Amostra pós-rúmen (g)	Amostra degradada (g)	% Degradabilidade da MS
1	0,2234	0,7181	0,4947	0,3539	0,1305	0,3642	73,62

Estimativa dos parâmetros de cinética fermentativa a partir da pressão acumulativa na técnica de produção de gases pelo sistema automático ANKOM^{RF}

Há diversas equações disponíveis para a estimativa dos parâmetros de cinética da fermentação, a partir dos dados de produção acumulativa de gases gerados pela produção de gases *in vitro*.

Em experimentos prévios ao trabalhar com a técnica de produção de gases *in vitro* semiautomática (THIAGO & BARROCAS, 1998), utilizamos o modelo logístico de SCHOFIELD et al. (1994), sendo os parâmetros do modelo estimados pelo algoritmo de

Gauss-Newton modificado inserido no procedimento NLIN do aplicativo SAS Statistical Analysis System versão 9.3 (SAS Institute, Cary - NC, USA), através do modelo:

$$V(t) = V_{cnf}/(1+\exp(2-4*k_{dcnf}*(T-L))) + V_{cf}/(1+\exp(2-4*k_{dcf}*(T-L))),$$

onde:

$V(t)$ = gás produzido, mL;

V_{cnf} = volume máximo de gás da fração de carboidratos não estruturais, mL;

V_{cf} = volume máximo de gás da fração de carboidratos estruturais, mL;

k_{dcnf} e k_{dcf} = taxa de degradação da fração de carboidratos não estruturais e estruturais, %/h;

T = tempos de incubação, h e

L = *lag time*, h.

Outra equação disponível para ser utilizada está descrita nas publicações de CATTANI et al. (2012 e 2013) que também utilizam o sistema automático ANKOM^{RF}. Os volumes de gases foram ajustados ao modelo GROOT et al. (1996) utilizando o PROC NLIN do SAS:

$$PG(t) = A/[1 + (t_{1/2}^c / t^c)]$$

Onde:

A = produção de gases (PG) assintótica, mL;

$t_{1/2}$ = tempo em que metade da produção de gases (PG) assintótica é produzida, h;

c = constante que representa o formato da curva.

O modelo de Gompertz também pode ser utilizada para a estimativa dos parâmetros de cinética ruminal:

$$Y_t = A \exp[-B \exp(-k^t)]$$

Onde:

A = produção de gases assintótica;

B = constante de integração, parâmetro de escala de tempo sem significado biológico específico. Afeta o tempo para atingir a digestão máxima;

k = constante de produção de gases.

Implementação da determinação da concentração de metano na técnica de produção de gases pelo sistema automático ANKOM^{RF}

Foram realizados testes na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – VNP/FMVZ – USP, campus de Pirassununga, em parceria com um dos integrantes do projeto (Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues), para implementar a determinação do gás metano produzido durante os ensaios de fermentação. O grupo de pesquisa parceiro possui vasta experiência em determinar a concentração de metano a partir da

técnica ex-situ (PERNA JÚNIOR et al., 2017), porém não com o equipamento ANKOM^{RF}.

Para os testes utilizou-se 0,5 g de amostra do substrato (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu). As coletas foram realizadas diretamente do “headspace” pelo septo do frasco ou então por uma válvula presente na tampa (Figura 18) em seringas de 5 ou 10 mL, mantidos na própria seringa ou transferidos para vials (20 mL) às 24 e 48 h (Figura 18). Assim que a coleta foi finalizada, as seringas e os vials foram levados para o laboratório para pronta determinação do metano.

Os resultados variaram entre 1 e 63%. A hipótese para esta ampla variação foi a diferença de temperatura do ar no momento da coleta (em torno de 29 °C) em relação a temperatura no momento da injeção a 25°C. Outro aspecto notado foi a dificuldade para injeção nas seringas com apenas 5 mL. Provavelmente, este volume não foi suficiente para purgar os canos no sistema de injeção do cromatógrafo.

Em função destes resultados, decidiu-se realizar as coletas em bags de alumínio que previnem a perda de gases para o ambiente pela abertura das válvulas do equipamento e auxiliam a manutenção da temperatura no momento da injeção no cromatógrafo.



a.



b.



c.



d.



e.



f.

Figura 18. Teste para determinação da concentração de metano. Frasco pronto para o início do ensaio (a.), ensaio em banho-maria (b.), material para coleta de gás (c.), vials para armazenar o gás (d. e f.) e coleta do gás (e.). Fonte: Carolina Tobias Marino.

Após os testes realizados, a equipe se dedicou para a aquisição dos bags de alumínio. A escolha do material adquirido partiu de pesquisa em literatura e consulta com outros grupos de pesquisa que utilizam o mesmo sistema de coleta.

No presente momento, a atividade se concentra em viabilizar e desenvolver a conexão entre o frasco e o bag de alumínio para que todo o gás produzido durante o ensaio de fermentação seja armazenado neste recipiente para posterior coleta e determinação da concentração de metano.



Figura 19. Material para viabilizar a conexão entre o frasco e bag de alumínio para determinação da concentração de metano. Fonte: Carolina Tobias Marino.

Outra atividade em desenvolvimento para viabilizar a determinação da concentração de metano nos ensaios de fermentação foi a aquisição do gás metano para determinar a curva padrão de acordo com CATTANI et al. (2014). Uma curva padrão com seis pontos será gerada pela mistura de volumes conhecidos de CH_4 (99,5% puro, White Martins) com volumes conhecidos de ar com 10, 15, 20, 25, 50 e 100 mL de CH_4/L .

Uma dificuldade encontrada no presente momento para o andamento desta atividade é a necessidade de manutenção do cromatógrafo que está com uma peça danificada. Enquanto a manutenção do cromatógrafo não é concluída, mais testes foram realizados em parceria com a FMVZ-USP com o intuito de padronizar o processo de coleta para determinação da concentração de metano.



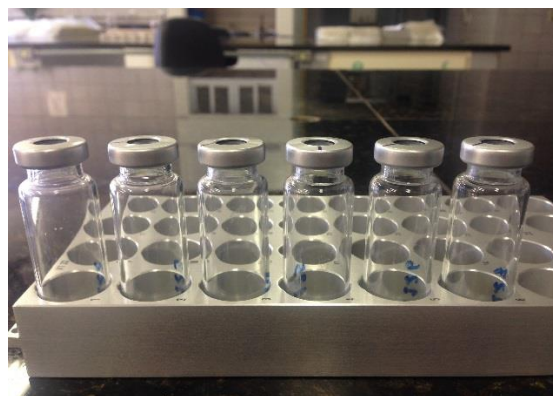
a.



b.

Figura 20. Cilindro de metano para determinação da curva padrão e o cromatógrafo.
Fonte: Carolina Tobias Marino.

Nas figuras 21 e 22 está descrito um passo a passo da coleta para determinação de metano até que se estabeleça a conexão do frasco com o bag de alumínio. A única diferença, então, será que a seringa será usada diretamente no bag.



a.



b.



c.



d.



e.



f.

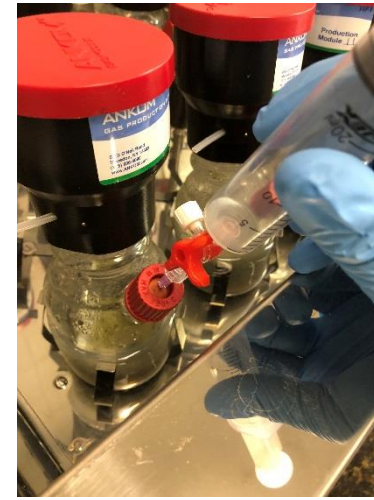
Figura 21. Passo a passo da coleta para determinação da concentração de metano. Processo para vácuo nos frascos (20 mL) para coleta (a.-e.). Módulo ANKOM RF para coleta (f.). Fonte: Carolina Tobias Marino.



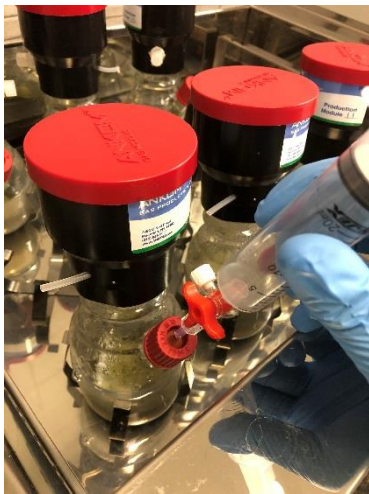
a.



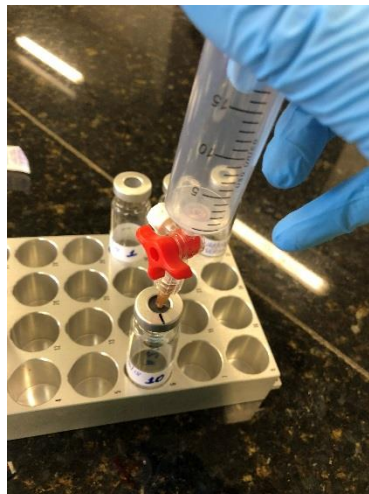
b.



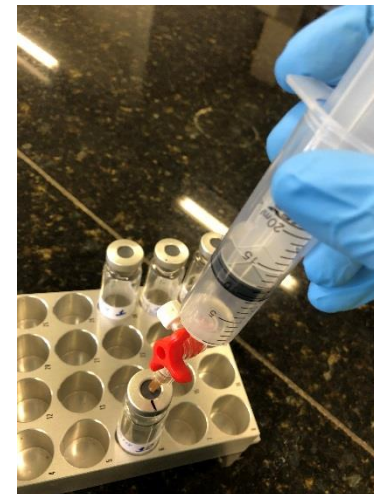
c.



d.



e.



f.

Figura 22. Passo a passo da coleta para determinação da concentração de metano. Coleta do gás e transferência para os frascos (20 mL) (a.-f.). Fonte: Carolina Tobias Marino.

Outro aspecto levantado durante os testes realizados na FMVZ-USP foi a pertinência de maximizar a produção de gases a fim de facilitar a coleta para determinação de metano. Uma quantidade maior de gases produzida pode facilitar a estabilidade para coleta e posterior injeção no cromatógrafo, garantindo a determinação de valores mais confiáveis da concentração deste gás. Para isso, um ensaio com três repetições foi delineado para comparar a relação substrato:solução digestão/tampão com os seguintes tratamentos:

- Tratamento 1 – 0,5 g de substrato no saquinho TNT (SAQ05) com 75 mL de inóculo ruminal + solução digestão/tampão;
- Tratamento 2 – 1,0 g de substrato no saquinho TNT (SAQ10) com 150 mL de inóculo ruminal + solução digestão/tampão;
- Tratamento 3 – 0,5 g de substrato no saquinho TNT e 0,5 g solto no frasco (SAQ0505) com 150 mL de inóculo ruminal + solução digestão/tampão.

O substrato utilizado foi *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com análise descrita no item 3.3.3. O preparo da solução de digestão/tampão, coleta de inóculo ruminal e procedimento da técnica de produção de gases pelo sistema automático RF foi realizado conforme o item 3.3.2.

Os dados foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (SAS, versão 9.3, 2011). Antes das análises propriamente ditas, os dados foram analisados em relação à presença de informações discrepantes (“outliers”) e a normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo procedimento MIXED e o modelo incluiu o efeito de tratamento como fator fixo. Os efeitos de tratamento foram avaliados pelo teste de Tukey ajustado a 5% de probabilidade. O modelo estatístico utilizado está descrito conforme a equação abaixo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ik}$$

Onde:

μ : média geral;

α_i : é o efeito do tratamento i ;

ε_{ijk} : é o erro experimental na parcela que recebe o tratamento i na repetição k .

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2. Não foi observado efeito ($P>0,05$) dos tratamentos para os parâmetros de degradação A, tmeio e c. Já para a produção de gases às 24 e 48 h foi observado um aumento de 34,5% às 24 h ($P=0,0117$)

e 31% às 48 h ($P=0,0127$) com a utilização de 0,5 g dentro do saquinho de TNT e 0,5 g solto no frasco em relação a utilização de 0,5 g dentro do saquinho de TNT.

Estes dados são de extrema valia na continuidade das avaliações para determinação da concentração de metano pela técnica de produção de gases *in vitro* ANKOM^{RF}. Com a determinação da curva padrão, os ensaios serão repetidos para comprovar se o aumento na produção de gases auxilia a coleta e posterior determinação de metano.

Tabela 2. Parâmetros de degradação e produção de gases às 24 e 48 h em função de diferentes relações entre a quantidade de substrato e solução de digestão/tampão mais inoculo.

	Tratamentos			EPM	Prob.
	SAQ 0,5	SAQ 1,0	SAQ 0,5/SOLTO 0,5		
A	140,67	98,68	142,26	16,8	0,5091
t_{meio}	35,63	47,34	81,81	15,39	0,4815
C	1,3846	1,1982	1,3044	0,12	0,7907
Produção gases, 24 h	28,02 ^B	36,53 ^{AB}	42,80 ^A	2,19	0,0117
Produção gases, 48 h	42,40 ^B	52,54 ^{AB}	61,25 ^A	2,81	0,0127

EPM: erro padrão da média.

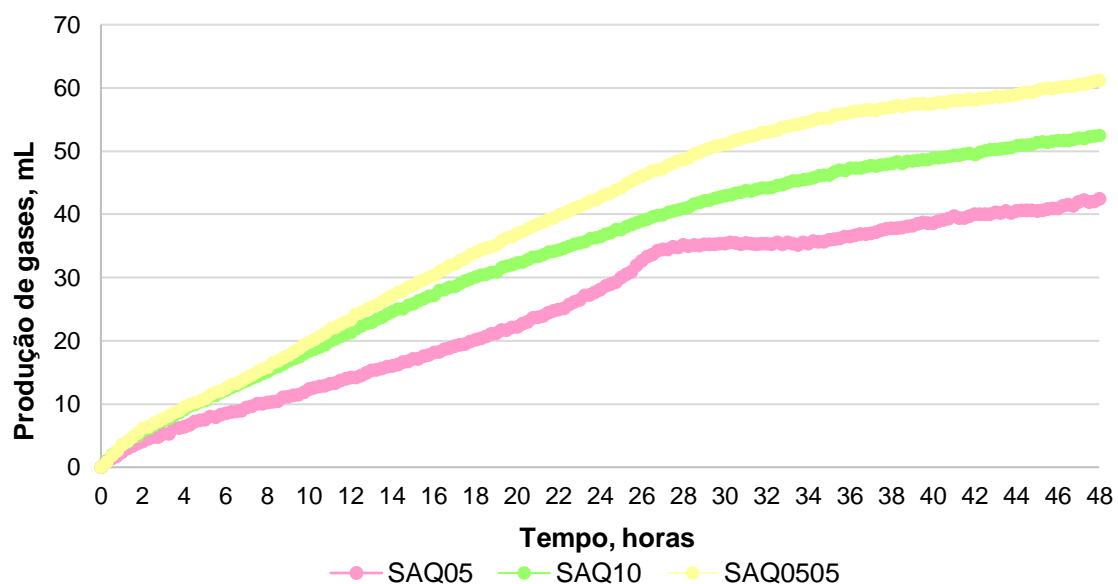


Figura 23. Produção dos gases em mL em função do tempo (horas) para os tratamentos.

Um ensaio com três repetições foi delineado para comparar a relação substrato:solução digestão/tampão com o intuito de maximizar a produção de gases e padronizar o procedimento de coleta para determinação de metano, além de testar os modelos Bicompartimental, Cattani e Gompertz para estimar os parâmetros de cinética de fermentação, com os seguintes tratamentos:

- Tratamento 1 – 0,5 g de substrato no saquinho TNT (SAQ05) com 75 mL de inóculo ruminal + solução digestão/tampão sem a adição de aditivo (a base de *Saccharomyces cerevisiae* e monoestearato de sorbitana);
- Tratamento 2 – 0,5 g de substrato no saquinho TNT (SAQ05) com 75 mL de inóculo ruminal + solução digestão/tampão com a adição de aditivo na dosagem de 0,5 g;
- Tratamento 3 – 0,5 g de substrato no saquinho TNT e 0,5 g solto (SAQ0505) com 150 mL de inóculo ruminal + solução digestão/tampão sem a adição de aditivo;
- Tratamento 4 – 0,5 g de substrato no saquinho TNT e 0,5 g solto (SAQ0505) com 150 mL de inóculo ruminal + solução digestão/tampão com a adição de aditivo.

Tabela 3. Resultados com o modelo Bicompartimental

Variável	Quantidade substrato		Aditivo		Média	EPM	Prob.		
	SAQ05	SAQ0505	SEM ADIT	COM ADIT			SAQ	ADIT	SAQ*ADIT
V _{cnf} , mL/g MS incubada	28,63	34,04	27,98	34,70	31,31	1,81	0,1294	0,0626	0,9712
kd _{cnf} , %/h	0,2114 ^A	0,1358 ^B	0,1896	0,1574	0,1733	0,01	0,0001	0,0711	0,7223
L, horas	1,12	1,15	1,16	1,10	1,14	0,23	0,9467	0,9059	0,7920
V _{cf} , mL/g MS incubada	94,20	89,60	89,77	94,04	91,67	2,27	0,3084	0,3439	0,1383
kd _{cf} , %/h	0,0323	0,0262	0,0286	0,0298	0,0292	0,0007	<0,0001	0,1714	0,0009
PG24 h, mL/g MS incubada	91,64	88,49	84,69	95,44	89,99	3,11	0,6142	0,0912	0,7328
PG48 h, mL/g MS incubada	116,48	119,59	112,01	124,07	117,78	3,80	0,6867	0,1241	0,6840
R ²	0,9997 ^A	0,9996 ^B	0,9996	0,9996	0,9996	0,00002	<0,0001	0,4235	0,7477
QMR	1,5800 ^B	1,8590 ^A	1,6481	1,7909	1,7123	0,07	0,0318	0,2586	0,5077

Tabela 4. Resultados com o modelo Cattani

Variável	Quantidade substrato		Aditivo		Média	EPM	Prob.		
	SAQ05	SAQ0505	SEM ADIT	COM ADIT			SAQ	ADIT	SAQ*ADIT
A, mL/g MS incubada	283,69	312,03	313,87	281,86	294,37	28,17	0,6065	0,5610	0,0321
Tmeio, horas	59,48	110,13	84,63	84,99	81,34	14,89	0,0832	0,9900	0,0591
C	0,8876	0,8514	0,8682	0,8708	0,8739	0,05	0,7380	0,9803	0,2907
PG24 h, mL/g MS incubada	91,64	88,49	84,69	95,44	89,99	3,11	0,6142	0,0912	0,7328
PG48 h, mL/g MS incubada	116,48	119,59	112,01	124,07	117,78	3,80	0,6867	0,1241	0,6840
R ²	0,9993 ^B	0,9999 ^A	0,9996	0,9996	0,9996	0,00006	<0,0001	0,9596	0,5736
QMR	2,2286 ^A	1,0845 ^B	1,6334	1,6798	1,6931	0,13	<0,0001	0,8022	0,4347

Tabela 5. Resultados com o modelo Gompertz

Variável	Quantidade substrato		Aditivo		Média	EPM	Prob.		
	SAQ05	SAQ0505	SEM ADIT	COM ADIT			SAQ	ADIT	SAQ*ADIT
A, mL/g MS incubada	121,14	124,24	116,81	128,57	122,40	3,94	0,6988	0,1482	0,4850
B	2,03	2,04	2,06	2,01	2,03	0,07	0,9209	0,7523	0,7041
k (constante de PG)	0,0855	0,0751	0,0780	0,0826	0,0806	0,001	0,0034	0,1734	0,0134
PG24 h, mL/g MS incubada	91,64	88,49	84,69	95,44	89,99	3,11	0,6142	0,0912	0,7328
PG48 h, mL/g MS incubada	116,48	119,59	112,01	124,07	117,78	3,80	0,6867	0,1241	0,6840
R ²	0,9992 ^A	0,9988 ^B	0,9990	0,9990	0,9990	0,0004	0,0158	0,8208	0,3428
QMR	2,5142	2,9752	2,6006	2,8888	2,7315	0,16	0,1684	0,3846	0,5986

Neste ensaio os modelos Bicompartimental e Cattani obtiveram 94,4% de convergência (resolução das matrizes) e o modelo Gompertz (97,5%).

Pelo modelo Bicompartimental foi observado efeito da quantidade de substrato ($P < 0,001$) para a variável k_{dcnf} , onde está foi mais elevada no tratamento com 0,5 g de substrato no saquinho de TNT (SAQ05 - 0,2114 %/h) quando comparado com o tratamento 0,5 g de substrato no saquinho de TNT e 0,5 g solto (SAQ0505 - 0,1358 %/h). Foi observada interação entre a quantidade de substrato incubada e presença ou não do aditivo ($P = 0,0009$) para a variável k_{dcf} apresentada na Figura 24a. (Tabela 3.). No grupo SAQ05, k_{dcf} foi mais elevada na presença do aditivo e o oposto foi observado no grupo SAQ0505.

Pelo modelo Cattani, foi observada interação entre a quantidade de substrato incubada e presença ou não do aditivo ($P = 0,0321$) para a variável A apresentada na Figura 24b. (Tabela 4). No grupo SAQ05, os valores de A foram mais elevados no grupo sem a presença do aditivo. No grupo SAQ0505 o inverso ocorreu.

Pelo modelo Gompertz, foi observada interação entre a quantidade de substrato incubada e presença ou não do aditivo ($P = 0,0134$) para a variável k demonstrada na Figura 24c (Tabela 5). No grupo SAQ05, k_{dcf} foi mais elevada na presença do aditivo e o oposto foi observado no grupo SAQ0505.

Em relação a comparação dos modelos para determinar qual melhor se ajusta aos dados obtidos com a técnica de produção de gases in vitro pelo sistema automático ANKOM RF, utilizamos dois parâmetros.

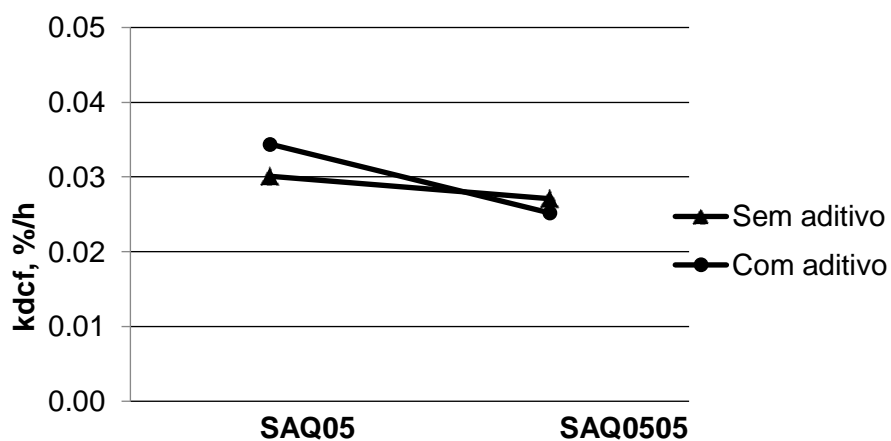
O primeiro foi o coeficiente de determinação (R^2) que é uma medida de ajustamento de um modelo estatístico linear, em relação aos valores observados. Varia entre 0 e 1, indicando, o quanto o modelo consegue explicar os valores observados. É calculado pela divisão da soma de quadrados do modelo pela soma de quadrados totais. Quanto maior o valor de R^2 , melhor. Em relação aos resultados obtidos no presente ensaio, o R^2 foi mais elevado no grupo SAQ05 (0,9997) comparado ao SAQ0505 (0,9996) para o modelo Bicompartimental ($P < 0,0001$). Para os modelos Cattani ($P < 0,0001$) e Gompertz ($P = 0,0158$), o R^2 foi mais elevado no grupo SAQ0505 (0,9999; 0,9998) em relação ao grupo SAQ05 (0,9993; 0,9992), respectivamente.

O segundo parâmetro utilizado na avaliação foi a raiz quadrada do quadrado médio do resíduo (RQQMR) que mensura a divergência entre o modelo de regressão linear e um conjunto de dados. Quanto menor o valor de RQQMR, melhor. Em relação aos resultados obtidos no presente ensaio, a RQQMR foi mais elevada no grupo SAQ0505 (1,8590) comparada ao grupo SAQ05 (1,5800) para o modelo Bicompartimental ($P = 0,0318$). Para o modelo Cattani ($P < 0,0001$), a RQQMR foi mais

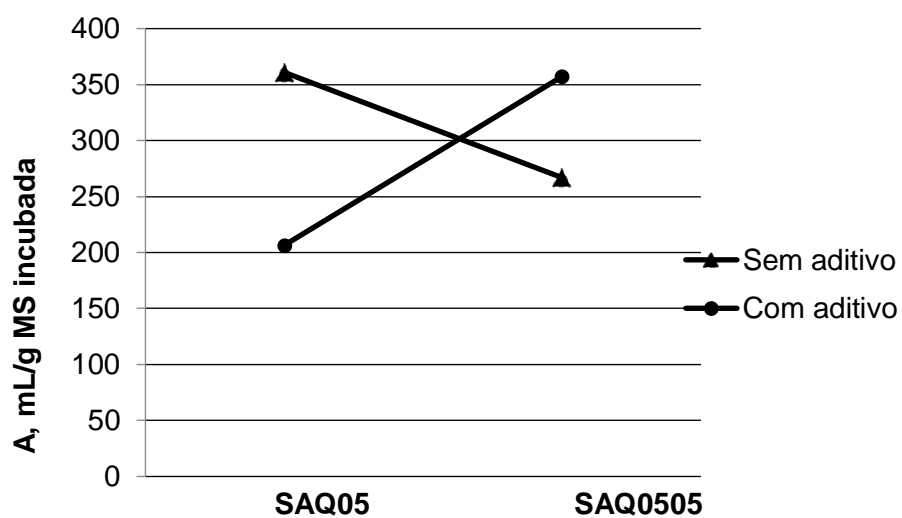
elevada no grupo SAQ05 (2,2286) quando comparada ao grupo SAQ0505 (1,0845). Não foi observado efeito desta variável para o modelo Gompertz ($P > 0,05$).

Dentre a comparação dos modelos entre si, para a variável R^2 ($P < 0,0001$), os modelos Bicompartimental (0,9996) e Cattani (0,9996) obtiveram valores mais elevados comparados ao modelo Gompertz (0,9990). Para a variável RQQMR ($P < 0,0001$), o modelo Gompertz (2,7315) foi mais elevado quando comparado aos modelos Bicompartimental (1,7123) e Cattani (1,6931).

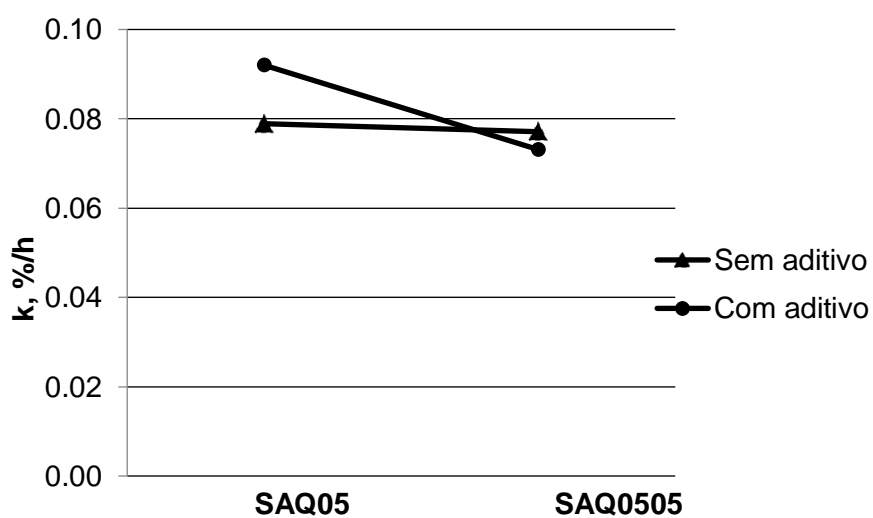
Por estas avaliações os modelos Bicompartimental e Cattani foram o que melhor se ajustaram aos dados obtidos com maior R^2 e menor RQQMR.



a.



b.



c.

Figura 24. Gráficos de interação entre a quantidade de substrato e presença ou não de aditivo para k_{dcnf} no modelo Bicompartimental (a.), A no modelo Cattani (b.) e k no modelo Gompertz (c.).

Referências

- CATTANI, M.; TAGLIAPIETRA, F.; BAILONI, L.; SCHIAVON, S. Synthetic and natural polyphenols with antioxidant properties stimulate rumen microbial growth in vitro. *Animal Production Science*, v. 52, p.44–50, 2012.
- CATTANI, M.; MACCARANA, L.; HANSEN, H.H.; BAILONI, L. Relationships among gas production, end products of rumen fermentation and microbial N produced in vitro at two incubation times. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, v. 78, n.3, p.217-220, 2013.
- CATTANI, M.; TAGLIAPIETRA, F.; MACCARANA, L.; HANSEN, H.H.; BAILONI, L.; SCHIAVON, S. Technical note: In vitro total gas and methane production measurements from closed or vented rumen batch culture systems *Journal of Dairy Science*, v.97, n.3, p.1736 – 1741, 2014.
- CONE, J.W.; BEUVINK, J.A.M.W.; RODRIGUES, M.A.M. Use and applications of an automated time related gas production test for the in vitro study of fermentation kinetics in the rumen. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, n.1, p.25-36, 1995.
- GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. 1970, Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications), *Agricultural Handbook n° 379 ARS-USDA*, Washington, DC.
- GROOT, J.C.J.; CONE, J.W.; WILLIAMS, B.A.; DEBERSAQUES, F. M.A.; LANTINGA, E.A. Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, v.64, n.1, p.77-89, 1996.
- MAKKAR, H.P.S. In vitro gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. *Animal Feed Science and Technology*, v.123-124, n.1, p. 291–302, 2005.
- MENKE, K. H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; SLEINGASS, H.; FRITZ, D.; SCHENEIDER, W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas productions when they are incubated with rumen liquor in vitro. *Journal of Agricultural Science*, v.93, n.1, p.217-222, 1979.
- PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *Journal of Dairy Science*, v.6, n.5, p.1063-1073, 1993.
- PERNA JUNIOR, F.; CASSIANO, E.C.O.; MARTINS, M.F.; ROMERO, L.A.; ZAPATA, D.C.V.; PINEDO, L.A.; MARINO, C.T.; RODRIGUES, P.H.M. Effect of tannins-rich extract from *Acacia mearnsii* or monensin as feed additives on ruminal fermentation efficiency in cattle. *Livestock Science*, v.203, p. 21-29, 2017.
- THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; McALLAN, A. B.; FRANCE, J. A. A new gas production method using a pressure transducer to determine the

fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, v.48, n.3-4, p.185-197, 1993.

THIAGO, L.R.L DE S.; BARROCAS, G. E. G. Técnica de produção de gás: adaptações ao método proposto pelo IGER, UK. Campo Grande, MS: EMBRAPA-CNPGC, 1998. 17 p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 73).