



Relación entre presión y volumen para la implementación de la técnica *in vitro* de producción de gases en Medellín, Colombia

Revista
Colombiana de
Ciencias
Pecuarias

Sandra L Posada¹, Zoot, Esp; Ricardo Noguera¹, Zoot, PhD; Diana Bolívar², Zoot, MSc

¹Grupo de Investigación en Ciencias Animales-GRICA. Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Producción Agropecuaria, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia.

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

slposada@agronica.udea.edu.co

(Recibido: 28 febrero, 2006; aceptado: 23 octubre, 2006)

Resumen

*La técnica de producción de gases es un método in vitro que permite determinar la extensión y la cinética de degradación del alimento mediante el volumen de gas producido durante el proceso fermentativo. La cuantificación de los gases puede realizarse mediante el empleo de transductores que miden la presión originada por los gases acumulados en la parte superior de los frascos de fermentación. El objetivo de este trabajo fue establecer una ecuación de regresión que relacione presión (P) y volumen de gas (V), para la implementación de la técnica de producción de gases, in vitro, en las condiciones de altura sobre el nivel del mar, del laboratorio de Biotecnología Ruminal (UN, sede Medellín, 1538 msnm). Para este propósito se utilizaron seis forrajes diferentes, que fueron inoculados con líquido ruminal y heces provenientes de vacas Holstein. La presión generada por los gases acumulados en la parte superior de los frascos de incubación fue medida con un transductor de presión conectado a un lector digital. El volumen de gas fue determinado mediante extracción con jeringa hasta el momento en que la presión registrada en el lector fue cero. La ecuación fue obtenida utilizando PROC REG del programa estadístico SAS y correspondió a: $V = -0.1375 + (5.1385 * P) + (0.0777 * P^2)$, $R^2 = 0.99$. El establecimiento de esta ecuación es necesario, puesto que la ley general de gases de Boyle y Gay-Lussac no permite estimar el volumen de gas diluido en la fase líquida. De igual manera el volumen de gas acumulado en la parte superior de los frascos varía en función de la presión atmosférica, lo que hace necesario el ajuste. La ecuación obtenida es representativa de las dos fuentes de inóculo y de una amplia gama de sustratos forrajeros con diferente potencial de fermentación. Así se consolida la utilización de esta ecuación en futuros trabajos de investigación.*

Palabras clave: evaluación de alimentos, fermentación, presión atmosférica

Introducción

Toda vez que la producción de leche y el crecimiento de los rumiantes están limitados por la calidad del alimento disponible, métodos precisos y prácticos que sirvan para la evaluación de su valor nutricional son de reconocida importancia. Adicionalmente, los programas de evaluación

de raciones como el NRC (11) y Cornell Net Carbohydrate and Protein System (2, 17, 18) requieren información detallada de la cinética de digestión de las diferentes fracciones del alimento, lo que hace necesario refinar los métodos para obtener la información requerida. Las expresiones cuantitativas de la cinética de digestión son necesarias para estimar de una forma más precisa la cantidad

de nutrientes digeridos desde los alimentos y las propiedades intrínsecas de los mismos que limitan su disponibilidad para los rumiantes (5).

Las características de fermentación de los alimentos en el rumen pueden ser estudiadas por métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. Debido a que en los estudios *in vivo* los alimentos sólo pueden ser evaluados en raciones totales y requieren considerables recursos, en los últimos años varias técnicas *in situ* e *in vitro* han sido desarrolladas. Dentro de las técnicas *in vitro*, la de uso más frecuente es la descrita por Tilley y Terry (21), la cual fue modificada por Goering y Van Soest (3) para estimar la digestibilidad verdadera de la materia seca (MS). Otra técnica *in vitro* consiste en la utilización de enzimas en lugar de microorganismos, cuya principal ventaja es que no requiere animales como donadores de inóculo. Las dos técnicas anteriores son usadas como procedimientos para estimar la digestibilidad final del sustrato y no proveen información sobre la cinética de digestión. La técnica de la bolsa de nylon (13) supera esta limitante al proporcionar estimativos de la tasa y la dinámica de la degradación de los constituyentes del alimento; sin embargo, es una aproximación laboriosa, costosa e invasiva, en la que solamente un pequeño número de muestras pueden ser evaluadas al mismo tiempo.

La técnica de producción de gases es un método *in vitro* que permite determinar la extensión y la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (20). Una de las ventajas de este procedimiento radica en que el curso de la fermentación y el papel de los componentes solubles del sustrato puede ser cuantificado (14), lo cual es particularmente evidente en los primeros horarios de incubación, una vez que la técnica supera la falta de sensibilidad de los procedimientos gravimétricos (*in situ* e *in vitro*) para medir los pequeños cambios que ocurren en el peso del sustrato (12).

La cuantificación de los gases puede realizarse directamente a través del uso de jeringas graduadas (9, 10), en las que el émbolo se desplaza en la medida en que la presión de gas incrementa, o indirectamente

mediante el empleo de transductores, que miden la presión originada por los gases acumulados en la parte superior de los frascos de fermentación (15, 20). En un principio, para estimar el volumen de gas a partir de valores de presión se empleó la ley de los gases de Boyle y Gay-Lussac, en donde: $P_G = (V_s/P_a) * P_t$, siendo P_G = Producción de gases (ml), V_s = volumen de gases en la parte superior del frasco (ml), P_a = Presión atmosférica (psi) y P_t = Presión obtenida por el transductor (psi); sin embargo, posteriormente se concluyó que su aplicación no contempla el volumen de gas diluido en la fase líquida (8). En consecuencia, el establecimiento de una ecuación de regresión que relacione presión y volumen de acuerdo a las condiciones de altura sobre el nivel del mar, es requisito indispensable para la implementación de la técnica en un determinado centro de experimentación.

El objetivo de este experimento fue establecer una ecuación de regresión que relacione presión y volumen de gas de acuerdo a las condiciones específicas del laboratorio de Biotecnología Ruminal, Universidad Nacional sede Medellín, e ilustrar todos los procedimientos operacionales y matemáticos requeridos para su determinación en diferentes laboratorios.

Materiales y métodos

Sustratos

Se utilizaron seis forrajes: matarratón (*Gliricidia sepium*), guinea (*Panicum maximum*), kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), ryegrass (*Lolium sp.*), morera (*Morus alba*) y estrella (*Cynodon nlemfuensis*), los cuales fueron individualmente inoculados con líquido ruminal y heces.

Inmediatamente después de la colecta, las plantas fueron transportadas al laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad de Antioquia, donde se secaron en estufa de ventilación forzada a una temperatura de 65°C por 72 horas y se molieron a través de una criba de un 1 mm utilizando un molino estacionario Thomas-Wiley modelo 4 (Arthur H. Thomas Company. Philadelphia, PA. USA).

Preparación del medio de cultivo

Un día antes del inicio del experimento se preparó el medio de cultivo de acuerdo con las recomendaciones de Mauricio *et al.* (7). Este medio estuvo compuesto por solución macromineral (9.35 g/l de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 6.2 g/l de KH_2PO_4 y 0.6 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), solución micromineral (132 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 g/l de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 g/l de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 80 g/l de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), solución tampón (4.0 g/l de NH_4HCO_3 y 35 g/l de NaHCO_3), indicador (0.01 g/l de rezasurina) y agente reductor (625 mg HCl cisteína, 95 ml de agua destilada, 4 ml de 1 M NaOH y 625 mg de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$). Estas soluciones se mezclaron en el siguiente orden y proporción: 500 ml de agua destilada, 200 ml de solución tampón, 200 ml de solución micromineral y 1 ml de solución indicadora. El medio fue agitado fuertemente para permitir la mezcla completa de las soluciones y saturado con CO_2 por dos horas hasta que adquirió una leve coloración rosa.

Preparación de los frascos de incubación

La incubación se realizó en frascos de vidrio con capacidad de 100 ml. Antes del inicio del experimento, los frascos de incubación fueron lavados con abundante agua y secados en una estufa a 110°C por 12 horas. Después del secado, los frascos se saturaron con CO_2 y 0.5 g de sustrato fue pesado y adicionado en cada uno.

Un día antes del inicio del experimento, 45 ml de medio de cultivo fue adicionado manualmente a cada frasco mediante la utilización de una jeringa graduada. Los frascos fueron sellados con tapas de caucho (14 mm), mantenidos en refrigeración a 4°C para evitar cualquier tipo de fermentación y llevados a una estufa de ventilación forzada a 39°C cinco horas antes de la inoculación.

Preparación del inóculo e inoculación

El líquido ruminal y las heces fueron obtenidos de tres vacas Holstein fistuladas mantenidas en el

Centro de Producción Paysandú, propiedad de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, ubicado en el municipio de Medellín, corregimiento de Santa Elena, a una altitud de 2538 msnm, con temperatura media de 14°C , precipitación promedio anual de 2200 mm y perteneciente a la zona de vida bh-MB (4). La dieta de los animales donadores consistió de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) de 45 días de edad y sal mineralizada.

La colecta del líquido ruminal se realizó a las 06:30 horas. La digesta fue retirada manualmente del rumen, exprimida para extraer el líquido ruminal y éste almacenado en garrafas térmicas previamente calentadas con agua a 40°C para su transporte al laboratorio de Biotecnología Ruminal (BIORUM) de la Universidad Nacional, que se encuentra ubicado a 1538 msnm. El transporte tuvo una duración aproximada de 45 minutos. En el laboratorio, el líquido ruminal se filtró a través de dos paños de algodón, la parte sólida retirada de los paños fue rápidamente transferida a una licuadora con cierta cantidad de líquido ruminal y licuada por 20 segundos, después de lo cual el material licuado fue nuevamente filtrado, transferido a un erlenmeyer mantenido en baño maría a 39°C y continuamente saturado con CO_2 . Este procedimiento se realizó para garantizar que el inóculo resultante estuviera compuesto por microorganismos ruminales adheridos y no adheridos a la fibra (20).

Las heces fueron colectadas *per rectum*, inmediatamente después del muestreo del líquido ruminal, y almacenadas en garrafas térmicas precalentadas a 40°C . En el laboratorio, las heces frescas se agitaron con un bastón de vidrio y 300 ml de muestra se diluyeron por la adición de 150 ml de tampón anaeróbico. La suspensión resultante fue exprimida a través de dos paños de algodón y los sólidos que permanecieron en el paño se homogenizaron en una licuadora con otros 150 ml de la misma solución tampón.

Los frascos con el medio de cultivo y el sustrato se inocularon según corresponde con 5 ml de líquido ruminal y fecal usando una jeringa graduada. Posteriormente fueron sellados, agitados

manualmente y transferidos a una estufa de ventilación forzada a 39°C (tiempo cero) en cajas de icopor de 1.5 cm de espesor (véase Figura 1). El inóculo ruminal y fecal proveniente de los tres animales fue mezclado en las mismas proporciones antes de la adición a los frascos de incubación.



Figura 1. Frascos de incubación con el sustrato, el medio de cultivo y el inóculo

Conjuntamente con los frascos inoculados con líquido ruminal y heces, se utilizó una serie de frascos denominados blanco, que contenían medio de cultivo e inóculo, pero no sustrato, con el fin de corregir la producción de gas originada por la fermentación del inóculo y el medio.

Para este experimento, por inóculo evaluado se incubaron los seis forrajes al tiempo y seis réplicas por cada forraje, de tal forma que se tuvieron 72 frascos de incubación (6 forrajes x 6 réplicas/forraje x 2 inóculos); además se utilizaron seis blancos por inóculo, resultando en total 84 frascos.

Lecturas de presión y volumen de gas

La presión (psi = libras por pulgada cuadrada) originada por los gases acumulados en la parte superior de los frascos se midió a través de un transductor de presión tipo T443A conectado a un lector digital (Bailey y Mackey, Inglaterra) y a una válvula de tres salidas. La primera salida fue conectada a una aguja (0.6 mm), la segunda conectada al transductor de presión y la tercera a una jeringa plástica que sirvió para la medición del volumen (véanse Figuras 2 y 3).



Figura 2. Transductor de presión tipo T443A (Bailey y Mackey, Inglaterra) conectado a un lector digital

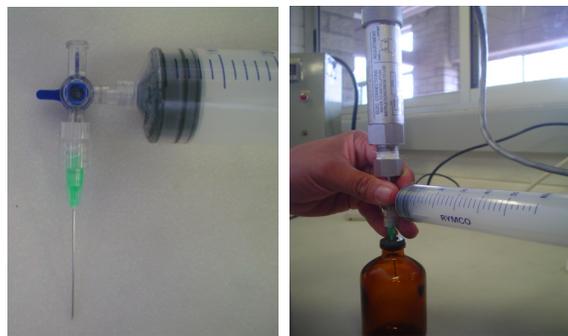


Figura 3. Válvula de tres salidas conectada a jeringa y aguja para la cuantificación del volumen y la presión, respectivamente

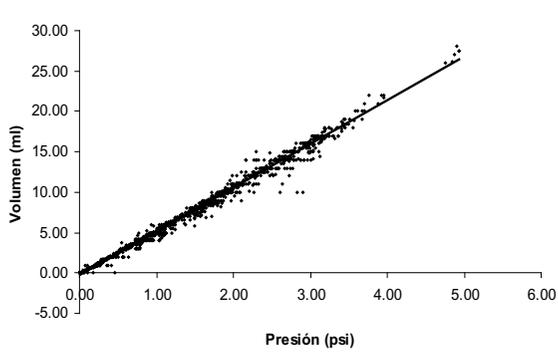
Para la medición de la presión, la aguja acoplada a la válvula fue insertada a través de la tapa de caucho, y para la medición del volumen, los gases acumulados en la parte superior se retiraron con el uso de la jeringa hasta el momento en que la presión registrada en el lector alcanzó a ser cero. Las lecturas se realizaron en los horarios 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 19, 24, 30, 36, 48, 72 y 96 horas y los datos obtenidos fueron transferidos a un computador para su análisis posterior. Este proceso se repitió en todos los frascos de cada caja y después de las lecturas ellos fueron manualmente agitados y reubicados en la estufa.

Análisis estadístico

Los datos de presión y volumen obtenidos durante el proceso fermentativo, con ambas fuentes de inóculo, fueron utilizados para establecer una ecuación de regresión utilizando PROC REG del programa estadístico SAS (19).

Resultados

En el presente estudio los 1176 datos, derivados de la fermentación de los seis sustratos en todos los horarios de incubación, permitieron obtener la relación que se muestra en la tabla 1 y en la figura 4. En la misma tabla se presenta la ecuación correspondiente a cada fuente de inóculo, la cual fue construida con la mitad de la información en cada caso. El elevado valor del coeficiente de determinación (R^2) registrado en todas las ecuaciones denota su capacidad predictiva.



$Y = -0.1375 + 5.1385X + 0.0777X^2$ ($p < 0.0001$; $R^2 = 0.99$)
 Y = Volumen de gas (ml); X = Presión de gas (psi = libras por pulgada cuadrada)

Figura 4. Relación entre los datos de presión y volumen obtenidos por medio de la técnica *in vitro* de producción de gases.

Tabla 1. Ecuaciones de regresión relacionando presión (psi) (X) y volumen de gas (ml) (Y) en el laboratorio de BIORUM.

Ecuación de regresión	R^2	Relación Presión: Volumen
<i>Con las dos fuentes de inóculo</i>		
$Y = -0.1375 + 5.1385X + 0.0777X^2$ $p < 0.0001$	0.99	5.08
<i>Con inóculo ruminal</i>		
$Y = -0.1833 + 5.2098X + 0.0598X^2$ $p < 0.0001$	0.98	5.09
<i>Con inóculo fecal</i>		
$Y = -0.0715 + 5.0440X + 0.0983X^2$ $p < 0.0001$	0.99	5.07

Y = Volumen de gas (ml); X = Presión de gas (psi = libras por pulgada cuadrada)

La ecuación de regresión obtenida con las dos fuentes de inóculo no difiere desde el punto de vista predictivo de aquellas derivadas del análisis individual con cada uno de ellos, lo cual se corrobora por la baja fluctuación en el volumen de gas (entre 5.07 y 5.09) correspondiente a cada unidad de presión (psi).

Discusión

La digestión anaeróbica de la materia orgánica, especialmente de los carbohidratos, produce una mezcla de componentes gaseosos entre los cuales se incluyen ácidos grasos volátiles (AGV), succinato, formiato, lactato, etanol, dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), hidrógeno (H_2) y, en el caso de las proteínas, amoníaco (NH_3) (16). Para una cantidad determinada de gas, la ley de los gases ideales, que comprende las leyes de Boyle y Gay-Lussac, puede expresarse como $PV = nRT$, donde: P= Presión de gas (atm), V= Volumen de gas (lt), n= Número de moles de gas, R= 0.082, constante molar de un gas a 0°C y 760 mm de Hg, y T= Temperatura absoluta (°K). Esta ley, no obstante, sólo puede aplicarse a una mezcla de gases (A, B, C...), como la derivada del proceso fermentativo, siempre que n sea igual al número total de moles presentes $n = nA + nB + nC + \dots n_k$. De esta forma, la contribución individual de cada gas a la presión total en el sistema corresponde a la sumatoria de las presiones parciales $pA + pB + pC + \dots p_k$, acorde al enunciado matemático de la Ley de Dalton (22). Teniendo en cuenta que la proporción de cada gas en la mezcla total obtenida no es especificada por la técnica *in vitro* de producción de gases, la aplicación de la ley general de los gases no es válida.

La difusión de los gases en la fase líquida, un factor directamente relacionado con la presión atmosférica y no considerado por las leyes de Boyle y Gay-Lussac, resulta en la subestimación del volumen de gas que se obtiene a partir de los datos de presión cuando se trabaja con la técnica *in vitro* de producción de gases (6). Una alternativa para superar esta dificultad consiste en la construcción de una ecuación de regresión que relacione presión y volumen de gas a partir de los datos experimentales obtenidos bajo las condiciones específicas de altura sobre el nivel del mar que caracterizan cada laboratorio.

Mauricio *et al* (8) reportan varias ecuaciones obtenidas en Reading (Inglaterra), en el Centro de Energía Nuclear y Agricultura (CENA) (Piracicaba, Brasil) y en la Universidad Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Brasil), las cuales presentaron el mejor ajuste de los datos desde funciones cuadráticas (véase Tabla 2) Las diferencias en las ecuaciones están directamente relacionadas con la altura sobre el nivel del mar de cada laboratorio, una vez que esta variable determina la presión ejercida sobre los gases de la fermentación acumulados en la parte superior de los frascos. En las ecuaciones referenciados por el autor y la derivada de este trabajo (véase Tabla 2), se observa que el valor correspondiente a cada unidad de presión aumenta conforme se incrementa la altura sobre el nivel del mar. La ley enunciada por Boyle (1662) soporta estos resultados al definir que el volumen ocupado por una muestra de gas para una temperatura dada es inversamente proporcional a la presión que se ejerce (1). Mayores alturas sobre el nivel del mar están asociados con menor presión atmosférica y por lo tanto mayores lecturas de producción de gas.

Las disoluciones de gases ideales en un medio líquido obedecen a la ley de Henry, según la cual, a una temperatura dada, la masa de un gas disuelto en una cantidad determinada de líquido es proporcional a la presión que el gas ejerce sobre la superficie del mismo (22). Entendiendo la relación inversa que existe entre la altura y la presión atmosférica, a menor altura se aumentará la presión ejercida sobre los gases acumulados en la parte superior de los frascos, por tanto se espera una mayor difusión de éstos en la fase líquida, conduciendo a un menor valor de presión registrado por el transductor.

También es importante anotar que la fuente de inóculo no alteró la capacidad predictiva del volumen de gas a partir de los datos de presión, lo que indico la existencia de una relación directa entre presión y volumen, independientemente del origen del gas (véase Tabla 1)

La relación entre presión y volumen de este trabajo, comparada con las demás (véase Tabla 2), demuestra que la implementación de la técnica *in vitro* de producción de gases requiere la construcción de una ecuación específica por cada laboratorio de acuerdo a sus condiciones de altitud. Esto es evidente si se observa que el aumento en la presión atmosférica no conservó una relación lineal con el volumen de gas estimado desde las ecuaciones obtenidas.

Cuando la cuantificación de los gases se realiza directamente a través del uso de jeringas graduadas se pierde sensibilidad y poder de resolución, lo que hace más difícil la detección de pequeños diferencias en la digestibilidad (14). En contraste, cuando se emplean transductores que miden la presión originada por los gases acumulados en la parte superior de los frascos de fermentación se disminuyen los errores de operación, se permite mayor rapidez en las lecturas y menor intervalo entre ellas y se aumenta la capacidad del sistema, todo lo cual conduce a una mayor precisión en la descripción del perfil de fermentación (8, 20). No obstante, para el empleo de esta última metodología se precisa la obtención de una ecuación que relacione presión y volumen como paso inicial para la implementación de la técnica en los diferentes laboratorios.

Tabla 2. Ecuaciones de regresión relacionando presión (psi) (X) y volumen de gas (ml) (Y) en diferentes laboratorios.

Lugar	Altura (msnm)	Ecuación	R ²	Relación Presión: Volumen
Reading	66	$Y = 0.18 + 3.69 X + 0.08 X^2$	0.99	1 psi = 3.95 ml
Piracicaba	780	$Y = 0.56 + 3.61 X + 0.18 X^2$	0.98	1 psi = 4.35 ml
Belo Horizonte	836	$Y = -0.004 + 4.43 X + 0.051 X^2$	0.99	1 psi = 4.48 ml
Medellín	1538	$Y = -0.1375 + 5.1385X + 0.0777X^2$	0.99	1 psi = 5.08 ml

Y = Volumen de gas (ml); X = Presión de gas (psi = libras por pulgada cuadrada)

En el establecimiento de una ecuación de regresión que relacione presión y volumen para la implementación de la técnica *in vitro* de producción de gases es importante contar con el mayor número de datos derivados de diversos sustratos que presenten diferente potencial de fermentación, con el fin de que la ecuación obtenida pueda ser utilizada en futuros trabajos de investigación. Construir ecuaciones con sustratos de baja o alta capacidad fermentativa, impediría su utilización para materiales de diferente potencial de degradación, lo que haría imprescindible la obtención de una ecuación en cada condición experimental, restando eficiencia al proceso y aumentando el margen de error por efectos de procedimiento.

Summary

Relationship between pressure and volume for the implementation of the gas production technique, in vitro, in Medellín, Colombia.

*The in vitro gas production technique is a method that allows the determination of the extent and kinetics of degradation of food as a function of the gas volume obtained during fermentation. Gas quantification can be done with the use of transducers measuring the pressure originated by the gas in fermentation flasks. The objective of this work was to establish a regression equation that relates gas pressure (P) and volume (V), for the implementation of in vitro gas production technique, according to the height over the sea level condition of our laboratory, in Medellín, Colombia. For this purpose, six different tipes of forage were inoculated with ruminal liquor and feces from Holstein cows. The pressure generated by the gas accumulated in the upper part of the incubation flasks was measured through a pressure transducer connected to a digital reader. Gas was extracted with a syringe until the pressure registered in the reader was zero. The equation was obtained using PROC REG of the SAS program: $V = -0,1375 + (5,1385 * P) + (0,0777 * P^2)$, $R^2 = 0,99$. Establishing this equation is necessary because the Boyle and Gay-Lussac's law doesn't allow the estimation of the volume of gas diluted in the liquid phase. Similarly, the volume of gas accumulated in the upper part of the flasks varies as a function of the atmospheric pressure, therefore demanding the respective adjustment. The obtained equation is representative for ruminal liquor, feces and a wide range of forages with different fermentation potential. Thus, the equation was standardized for future research.*

Key words: *atmospheric pressure, fermentation, food evaluation.*

Referencias

1. Chang R. Química. 6 ed. México: McGraw-Hill; 1999. 995 p
2. Fox DG, Sniffen CJ, O'Connor JD, Russell JB, Van Soest PJ. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle requirements and diet adequacy. J Anim Sci 1992; 70:3578-3596
3. Goering HK, Van Soest PJ. Forage fiber analysis. Agric. Handbook No. 379. Washington: Agricultural Research Service-USDA; 1970.
4. Holdridge LR. Life zone ecology. San José de Costa Rica: Tropical Science center; 1967; 206 p.
5. López S, Carro MD, González JS, Ovejero FJ. Comparison of different *in vitro* and *in situ* methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. Anim Feed Sci and Technol 1998; 73: 99-113
6. Mauricio RM, Mould FL, Dhanoa MS, Owen E, Channa KS, et al. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminants feedstuff evaluation. Anim Feed Sci Technol 1999; 79: 321-330

7. Mauricio RM, Owen E, Mould FL, Givens I, Theodorou MK, *et al.* Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an *in vitro* gas production technique for evaluating forages. *Anim Feed Sci Technol* 2001; 89:33-48.
8. Mauricio RM, Pereira LGR, Gonçalves LC, Rodríguez NM. Relação entre pressão e volume para implantação da técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases na avaliação de forrageiras tropicais. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2003; 55:216-219.
9. Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, *et al.* The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J Agric Sci* 1979; 93:217-222.
10. Menke KH, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim Res Dev* 1988; 28: 7-55.
11. National Research Council-NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. 7 ed. Washington: National Academy Press; 2001. 381 p.
12. Nogueira JR. Estudo químico, “*in situ*”, “*in vitro*” e microscópico da parede celular de cinco genótipos de sorgo colhidos em três épocas de corte. *Ph. D. Thesis*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. 148p.
13. Orskov ER, DeB Hovell FD, Mould F. Uso de la técnica de la bolsa de nylon para la evaluación de alimentos. *Prod Anim Trop* 1980; 5:213-223.
14. Pell AN, Doane PH, Schofield P. *In vitro* digestibility and gas production. In: *Simpósio sobre Tópicos Especiais em Zootecnia*, Lavras, MG; 1997. 109–132 p.
15. Pell AN, Schofield P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J Dairy Sci* 1993; 76: 1063-1073
16. Posada SL, Nogueira RR. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*. 2005; 17 (36). URL:<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/4/posal7036.htm>
17. Russell JB, O'Connor JD, Fox DG, Van Soest PJ, Sniffen CJ. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. *J Anim Sci* 1992; 70:3551-3561.
18. Sniffen CJ, O'Connor JD, Van Soest PJ, Fox DG, Russell JB. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and Protein Availability. *J Anim Sci* 1992; 70: 3562-3577.
19. Statistical Analysis Systems. SAS®, versión 8.2 para Windows; User's Guide. Statistics. Statistical Analysis Systems Institute. Inc., Cary, North Carolina; 2001.
20. Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci and Technol* 1994; 48:185-197.
21. Tilley JMA, Terry RA. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J Br Grass Soc* 1963; 18: 104-111.
22. Umland J, Bellama J. Química General. 3rd ed. México: Thomson editores; 2001. 1017 p.