

Acurácia, precisão e robustez de indicadores internos para predição da digestibilidade aparente total de matéria seca em equinos

[Accuracy, precision and robustness of internal markers to predict total apparent digestibility of dry matter in horses]

G.V. Pombo¹, T.D. Valle², R.A. Bradi³, I.C.S. Bueno³

¹Aluna de pós-graduação – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP – Pirassununga, SP

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/USP – São Paulo, SP

³Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP – Pirassununga, SP

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar a acurácia, a precisão e a robustez de diferentes indicadores internos na predição da digestibilidade aparente total da matéria seca (MS) para equinos. Foram utilizadas cinco éguas em manutenção, sem raça definida, com peso médio de 406±76,9kg e idade aproximada de 3,5 anos, alojadas em baias individuais. O experimento foi disposto em quadrado latino 5x5 (cinco dietas e cinco animais). Foram coletadas amostras dos alimentos fornecidos e das fezes para determinação bromatológica dos indicadores, e, para determinação das frações indigestíveis, foi realizada incubação *in vitro*. Os indicadores utilizados foram fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), celulose indigestível (CELi) e lignina em detergente ácido indigestível (LDAi). Os indicadores estudados tiveram médias de taxa de recuperação (TR) muito próximas a 100%. Em razão de uma menor taxa de recuperação, os indicadores FDNi e LDAi apresentaram vieses negativos e diferentes de zero ($P<0,05$). Não houve diferença significativa entre os coeficientes angulares da regressão dos vieses dos indicadores e das variáveis consumo de MS, consumo de indicador e peso vivo ($P>0,05$). A FDAi parece ser o indicador mais indicado para se estabelecerem valores de referências para digestibilidade. Com base nos resultados, é possível sugerir que a CELi é o indicador mais indicado para se compararem fatores entre o mesmo estudo.

Palavras-chave: cavalo, nutrição, método, indireto

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the accuracy, precision and robustness of different internal markers to predict total digestibility of dry matter for horses. Five no breed mares were used in maintenance, with an average weight of 406 ± 76.9kg and approximate age of 3.5 years, staying in individual stalls. The experiment was arranged in a 5x5 latin square design (five diets and five animals). Food samples were collected and the faeces provided for bromatological determining indicators and determining the indigestible fractions was carried out with *in vitro* incubation. The internal markers used were indigestible neutral detergent fiber (NDFi), indigestible acid detergent fiber (ADFi), indigestible cellulose (iCEL) and indigestible acid detergent lignin (LDAi). The indicators studied had mean recovery rate (TR) very close to 100%. Because they have a lower rate of recovery, NDFi and LDAi indicators have negative biases and differ from zero ($P<0.05$). There was no significant difference between the slopes of the regression of the biases of indicators and of variables dry matter intake, consumption indicator and body weight ($P>0.05$). The ADFi seems to be the most appropriate indicator to establish reference values for digestibility. The iCEL seems to be more appropriate to compare factors among the same study.

Keywords: horse, nutrition, method, indirect

Recebido em 14 de maio de 2015

Aceito em 15 de novembro de 2015

E-mail: gpombo@usp.br

INTRODUÇÃO

Muitos são os métodos usados para determinar a digestibilidade de nutrientes. O mais comumente utilizado para obtenção de consumo, digestibilidade e desempenho animal por meio de experimentos é o método *in vivo* com coleta total das fezes (CTF). Porém, é um método muito oneroso e trabalhoso, necessitando da presença contínua de mão de obra, maior número de animais, tempo de adaptação à dieta e controle rigoroso da ingestão e da excreção. Entretanto, estimativas confiáveis podem ser obtidas por técnicas laboratoriais mais simples e de baixo custo, tais como os métodos *in vitro*, *in situ* e químicos (Tilley e Terry, 1963; Orkov e McDonald, 1979; Weiss et al., 1992).

O método *in situ* consiste no desaparecimento da amostra de alimento acondicionada em sacos de náilon ou outro material sintético, incubados em compartimentos do trato digestório onde ocorre algum processo fermentativo microbiano, por diferentes períodos de tempo (Berchielli et al., 2006).

Os métodos *in vitro* devem ser capazes de representar o processo de digestão que ocorre no animal, para estimar quantitativamente a taxa e o grau de digestão similar aos obtidos *in vivo*. A metodologia mais utilizada na predição da digestibilidade é ainda hoje a descrita por Tilley e Terry (1963).

O uso de indicadores internos para predição da digestibilidade das dietas é de grande importância em ensaios onde não é possível realizar a coleta total de fezes dos animais, principalmente em condições de pastejo ou para determinação de digestibilidade parcial. São aqueles que ocorrem naturalmente nos alimentos, enquanto os indicadores externos são aqueles adicionados à dieta ou fornecidos diretamente ao animal (Araújo et al., 2000).

Considerando que os indicadores internos podem ser úteis nos estudos da digestão nos equinos, trabalhos iniciais foram desenvolvidos por Martin-Rosset e Dulphy (1987), que avaliaram o uso da fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), da fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), da celulose indigestível (CELi) e da lignina (LDAi) como indicadores internos em estudos de digestão com dietas com alimentos

volumosos. Algumas evidências demonstram que é possível a utilização desses compostos para obtenção da digestibilidade de nutrientes, já que os resultados apontam altas taxas de recuperação (TR) fecal (Stein et al., 2006).

Os estudos com indicadores internos na produção fecal resumem-se à comparação das estimativas de digestibilidade àquelas observadas pela coleta total de fezes, o que permite a avaliação da acurácia das estimativas, mas não de sua precisão. Nesse caso, os coeficientes de digestibilidade obtidos pela coleta total de fezes representam o valor real para aquela resposta e devem ser utilizados como base para os estudos do erro residual, também chamado viés, e das estimativas obtidas com os indicadores, embora a avaliação de acurácia e de precisão seja fundamental nesse parâmetro (Rodrigues et al. 2010).

Estudos que avaliaram a robustez dos indicadores na estimativa da digestibilidade dos nutrientes da dieta são escassos, principalmente se forem consideradas as variações associadas a outros fatores, como às condições experimentais, sejam eles ligados aos animais (como o peso vivo), à dieta (como a relação volumoso:concentrado), ou a ambos (como a digestibilidade) (Rodrigues et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a acurácia, a precisão e a robustez de diferentes indicadores internos na predição da digestibilidade aparente total da matéria seca (MS) para equinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas cinco éguas em manutenção sem raça definida, com peso médio de $406 \pm 76,9$ kg e idade aproximada de 3,5 anos, alojadas em baias individuais. As dietas experimentais foram formuladas de modo a atender as exigências da categoria animal especificadas pelo Nutrient Requirements of Horses (2007), e as éguas consumiam 2% do peso corporal em matéria seca. O experimento foi disposto em quadrado latino 5x5 (cinco dietas e cinco animais). O período experimental foi dividido em cinco períodos, tendo cada período 10 dias para adaptação à dieta, três dias de coleta total de fezes e dois dias de descanso, quando os animais ficaram soltos em piquetes, totalizando 75 dias.

Foram coletadas amostras dos alimentos fornecidos e das fezes para determinação bromatológica dos indicadores. A composição de nutrientes indigestíveis (indicadores internos) nos alimentos (concentrados e feno) pode ser observada na Tab. 1.

Os indicadores internos avaliados foram: fibra em detergente neutro indigestível, fibra em detergente ácido indigestível, celulose indigestível e lignina em detergente ácido indigestível.

Tabela 1. Concentração dos indicadores internos (em % da MS) nos concentrados e no feno usado para alimentação dos animais no ensaio *in vivo*

Indicadores	Concentrado (% da MS)	Feno (% da MS)
FDNi	9,92	48,41
FDAi	3,83	26,73
CELi	2,36	15,49
LDAi	1,09	9,98

A determinação das frações indigestíveis foi realizada por meio de incubação *in vitro* (Tecnal TE-150, Piracicaba/SP). Para determinação da FDNi e da FDAi, utilizou-se determinador de fibras modelo TE – 149® (Tecnal), de forma sequencial. Após análise de FDAi por imersão em ácido sulfúrico a 72%, os saquinhos eram lavados com água quente até a neutralização, secos em estufas a 105°C, queimados em mufla a 450°C por três horas e pesados, para determinação de lignina em detergente ácido indigestível (LDAi) e estimativa da celulose indigestível (CELi).

O inóculo foi preparado segundo a metodologia descrita para outros estudos *in vitro*, conforme proposto por Theodorou *et al.* (1994) e Maurício *et al.* (1999).

As fórmulas para determinação do coeficiente de digestibilidade, da taxa de recuperação, da acurácia, da precisão e da robustez podem ser observadas na Tab. 2.

Tabela 2. Variáveis avaliadas, fórmulas utilizadas para sua determinação e referências utilizadas

Variáveis	Fórmulas	Referência
¹ CDMS%	$CDMS = 100 - 100 \times \frac{(\% \text{ do indicador na dieta})}{(\% \text{ de indicador nas fezes})}$	Silva e Leão (1979)
² TR%	$TR (\%) = \frac{\text{quantidade de indicador excretado}}{\text{quantidade de indicador ingerido}} \times 100$	Stein <i>et al.</i> (2006)
Acurácia	$\text{Viés médio} = \frac{\sum(\text{predito} - \text{observado})}{n^\circ \text{ de observações}}$	Kohn <i>et al.</i> , (1998)
Precisão	${}^3\text{RQMEP} = \sqrt{\frac{\sum(\text{predito} - \text{observado})^2}{n^\circ \text{ observações}}}$	Kohn <i>et al.</i> , (1998)
Erro residual	$\text{Erro residual} = \sqrt{[RQMEP^2 - (\text{viés médio})^2]}$	Kohn <i>et al.</i> , (1998)

¹CDMS: coeficiente de digestibilidade da matéria seca; ²TR: taxa de recuperação; ³RQMEP: raiz quadrada média do erro de predição.

Para se comparar a taxa de recuperação fecal e a acurácia das estimativas de digestibilidade aparente dos nutrientes entre os indicadores, os dados de recuperação e vieses foram submetidos à análise de variância (PROC GLM do SAS), e as médias comparadas pelo teste de Tukey. O teste T para média igual a zero (PROC TTEST

do SAS) foi utilizado para avaliar a significância dos vieses médios, e as taxas de recuperação foram submetidas ao teste de t para média igual a 100, pelo mesmo procedimento. O nível de significância utilizado foi o de 5%.

Para se comparar a precisão entre os indicadores, os valores do erro residual foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias de Hartley, segundo Ott (1983), comparando-os dois a dois. Foram estimadas regressões entre os vieses e a digestibilidade aparente da matéria seca observada (coleta total de fezes), obtendo-se, dessa forma, o viés linear (coeficiente angular), o coeficiente de determinação do modelo (R^2) e a significância do viés para cada indicador, pelo procedimento REG do SAS (SAS, 2000), segundo Kohn *et al.* (1998).

A avaliação da robustez de cada indicador foi obtida regredindo-se o viés em função das variáveis selecionadas (consumo de matéria seca, consumo do indicador e peso vivo), realizada também pelo procedimento REG do SAS (SAS, 2000). A comparação entre os coeficientes angulares das retas foi realizada pela metodologia de comparação de retas, cujo

princípio é testar a interação entre a variável selecionada e os indicadores, por meio da análise de variância (teste F) pelo PROC GLM (SAS, 2000).

O projeto com número de protocolo nº 2012.1.1326.74.4 está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado *ad referendum*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os indicadores estudados tiveram médias de taxa de recuperação (TR) muito próximas a 100%, porém a CELi apresentou TR maior que 100%, sem diferir da FDNi e FDAi (Tab. 3). A FDNi e a FDAi não diferiram entre si ($P>0,05$) e a LDAi, apresentou menor TR que CELi, sem diferir de FDAi e FDNi.

Tabela 3. Recuperação fecal obtida com os indicadores internos para estimativa da digestibilidade da matéria seca em equinos

Recuperação fecal	Indicadores			
	CELi	FDAi	FDNi	LDAi
Média, %	101,4 ^A	99,4 ^{A,B}	96,0 ^{A,B}	89,6 ^B
Mínimo, %	68,3	74,3	80,6	65,6
Máximo, %	130,3	115,9	109,4	128,3
Desvio-padrão	15,1	9,9	8,1	19,3
CV ²	14,9	10,0	8,4	21,6
Teste T (P) ³	0,678	0,807	0,036	0,036

Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. ²Coefficiente de variação. ³Probabilidade do teste de T para média igual a 100.

Toda vez que há uma recuperação incompleta dos indicadores, o coeficiente de digestibilidade da MS será subestimado. Ao se observarem as recuperações médias, pode-se dizer que a CELi, FDNi e FDAi tiveram melhores TR, uma vez que sua recuperação média não diferiu de 100% ($P>0,05$).

Stein *et al.* (2006) estudaram a recuperação dos indicadores internos em equinos alimentados com concentrado e feno e encontraram valores de 94,49% para CELi e 98,49% para FDAi. Gobesso *et al.* (2011) estudaram a TR para indicadores internos e externos para equinos alimentados à base de feno e concentrado e chegaram a um valor de LDAi de 68,18%, muito abaixo do encontrado neste estudo.

Os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (CDMS) determinada usando-se os indicadores encontram-se na Tab. 4. Toda a avaliação dos indicadores foi realizada por meio do modelo baseado na diferença da estimativa do CDMS pelo indicador e do CDMS obtido pela coleta total, a qual se denominou *vies*.

Ao se analisarem os vieses médios, pode-se notar que a CELi, a FDAi e a FDNi possuem menores vieses. O viés médio obtido com FDNi não difere do viés médio obtido pela LDAi. Por consequência de uma menor taxa de recuperação, os indicadores FDNi e LDAi possuem vieses negativos e diferentes de zero ($P<0,05$), mostrando que estes são menos acurados e subestimam o coeficiente de digestibilidade da MS. Rodrigues *et al.* (2010), ao avaliarem acurácia e precisão das estimativas da

digestibilidade da matéria seca (DAMS) usando os indicadores internos FDAi, FDNi e LDAi em ovinos, encontraram que a recuperação incompleta dos indicadores subestimam as estimativas de DAMS em todos os indicadores utilizados no estudo. Esse fato é comprovado pelos vieses médios negativos e estatisticamente diferentes de zero. Em pesquisa realizada por Stein *et al.* (2006), no qual avaliaram CDMS

obtido pelo método de coleta total de fezes e pelo uso de indicadores internos para equinos alimentados com dietas completas, os indicadores CELi e FDAi, assim como no presente estudo, não apresentaram diferença significativa entre as médias dos vieses, caracterizando, desse modo, os indicadores mais acurados no estudo.

Tabela 4. Acurácia e precisão da estimativa da digestibilidade aparente da matéria seca (DAMS) determinada, utilizando-se diferentes indicadores internos, celulose indigestível (CELi), fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e lignina indigestível (LDAi)

Variável	Indicadores			
	CELi	FDAi	FDNi	LDAi
	Coeficiente de digestibilidade			
Estimado ¹	0,4144 ^A	0,4217 ^A	0,3976 ^A	0,3516 ^B
	Viés do coeficiente de digestibilidade da matéria seca (estimado-observado)			
Média ²	-0,0051 ^A	0,0023 ^A	-0,0247 ^{A,B}	-0,0706 ^B
RQMEP ³	0,0987 ^A	0,0452 ^B	0,0486 ^B	0,1441 ^A
Erro residual ⁴	0,0985 ^A	0,0452 ^B	0,0419 ^B	0,1256 ^A
P (teste de t) ⁵	0,8208	0,8247	0,0303	0,0466
	Regressão linear entre vieses e digestibilidade aparente da MS			
Viés linear ⁶	0,0397 ^B	-0,5497 ^{A,B}	-0,6521 ^{A,B}	-1,6527 ^A
R ² [7]	0,0004	0,4007	0,4957	0,3540
P ⁸	0,9301	0,0027	0,0004	0,0072

Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem entre si; ¹coeficiente de digestibilidade aparente obtido pelos diferentes indicadores; ²diferença média entre o predito e o observado; ³raiz quadrada média do erro de predição; ⁴erro residual obtido pela raiz de diferença entre os quadrados e da média do viés; ⁵probabilidades do teste de t para média igual a zero dos vieses; ⁶slope da função de regressão do viés em função do coeficiente de digestibilidade observado; ⁷R² da função; ⁸probabilidade do teste ser igual a zero.

Quanto à precisão, os indicadores CELi e LDAi foram maiores que a dos demais indicadores avaliados, pelo teste de Barlett. Segundo Kohn *et al.* (1998), ocorre superestimativa da falta de precisão caso se avalie apenas a variância dos vieses (RQMEP). A precisão, corrigida para a falta de acurácia (erro residual), avaliada pelo teste de Hartley, apresentou resultados semelhantes aos encontrados no teste de Barlett. Esses resultados estão relacionados à dificuldade de mensuração da LDAi, que faz com que a variância dos vieses para esse indicador aumente, assim como a do CELi, uma vez que este é obtido por diferença. A recuperação incompleta da lignina foi verificada em ruminantes por vários autores (Kotb e Luckey, 1972; Fahey e Jung, 1983; Carvalho, 1989), o que também foi observado por Machado (1992) e Miraglia *et al.* (1999), em ensaios de digestão com equinos, com 58,3 e 59,0% de recuperação fecal da

lignina, respectivamente. Van Soest (1994) verificou digestibilidade aparente de 20 a 40% em gramíneas imaturas e forragens com baixo conteúdo de lignina. Assim, CELi e LDAi, são menos precisos que FDAi e FDNi.

Ao se regredirem os vieses dos indicadores em função do coeficiente de digestibilidade da MS observado, verificou-se que os indicadores FDAi, FDNi e LDAi superestimam a digestibilidade quando esta é baixa e passam a subestimar quando esta é superior a 0,4236; 0,3844 e 0,3786, respectivamente. Para a CELi, apesar de o coeficiente angular não diferir dos obtidos para FDAi e FDNi, os vieses não são influenciados pelo coeficiente de digestibilidade da matéria seca (Fig. 1), sugerindo que este indicador é mais robusto que os demais quanto a esse fator.

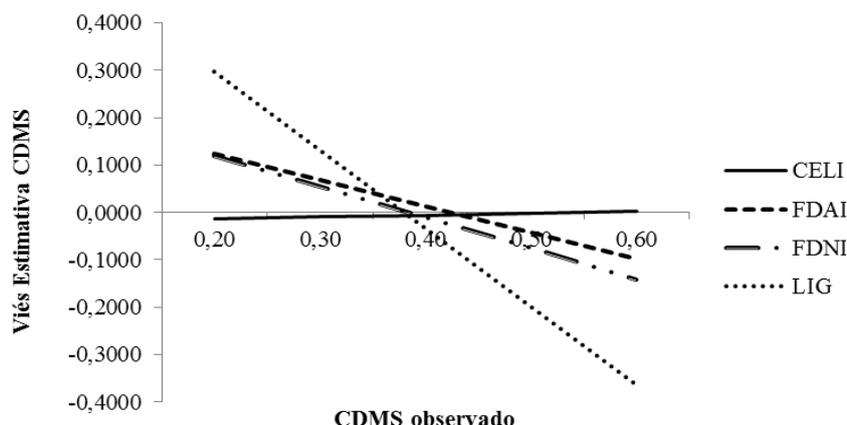


Figura 1. Regressão dos vieses dos indicadores em função do coeficiente de digestibilidade da MS pela coleta total.

Rodrigues *et al.* (2010) observaram um viés crescente em função do aumento da digestibilidade da MS em ovinos para os indicadores FDAi e FDNi. Esses autores associaram esse efeito ao maior desaparecimento do indicador nas dietas com maior teor de fibras, devido à menor taxa de passagem, a qual não se repetiu no ensaio de digestibilidade, levando a estimativas enviesadas das taxas de recuperação fecal. No presente estudo, a digestibilidade observada foi menor que a observada por aqueles autores.

Não houve diferença significativa entre os coeficientes angulares da regressão dos vieses dos indicadores e as variáveis consumo de matéria seca, consumo de indicador e peso vivo ($P > 0,05$). Tal fato mostra que os indicadores foram robustos para as variáveis estudadas, mantendo sua capacidade de predição da digestibilidade aparente da matéria seca.

Estes resultados diferem dos encontrados por Gobesso *et al.* (2011), quando estudaram LDAi na predição da digestibilidade de dietas completas para equinos. O coeficiente de determinação (R^2) alto que encontraram (0,91) demonstra a interferência da FDAi na estimativa da LDAi, pois quanto maior o R^2 , maior a relação entre o viés e a variável. Isso porque a digestão incompleta pode subestimar as quantidades de FDA, afetando a estimativa de digestibilidade por meio desse indicador (Oliveira *et al.*, 1991).

Considerando-se os conceitos de acurácia, precisão e robustez, o modelo possibilita o mais perfeito conhecimento potencial real do indicador. A forma de avaliação ainda é inovadora, mas, nas condições do trabalho, os indícios apontam que a LDAi não deve ser utilizada como indicador interno para prever a digestibilidade aparente da MS.

De acordo com os resultados obtidos, é possível afirmar que a FDAi apresentou-se como o indicador mais apropriado para estabelecer valores de referências para digestibilidade, pois, no presente estudo, foi o único que atingiu os objetivos propostos, ou seja, apresentou melhor acurácia, precisão e robustez.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, K.V.; LIMA, J.A.F.; FIALHO, E.T. *et al.* Comparação entre Indicadores Internos e o Método de Coleta Total na Determinação da Digestibilidade dos Nutrientes de Alimentos Volumosos, em Equinos. *Rev. Bras. Zootec.*, v.29, p.745-751, 2000.
- BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 2006. 583p.
- CARVALHO, F. F. R. *Efeitos de diferentes níveis de proteína bruta para cabras em lactação e uso de indicadores internos para estimar a digestibilidade dos nutrientes*. 1989. 72f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

- FAHEY, G.C.; JUNG, H.G. Lignin as a marker in digestion studies: a review. *J. Anim. Sci.*, v.57, p. 220-225, 1983.
- GOBESSO, A.A.O.; RAMOS, S.C.; CASALECH, F.L. *et al.* Indicadores para estimativa da digestibilidade aparente total em equinos. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, v.12, p.264-274, 2011.
- KOHN, R.A.; KALSCHUR, K.F.; HANIGAN, M. Evaluation of models for balancing the protein requirements of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.3401-3414, 1998.
- KOTB, A.K.; LUCKEY, T.D. Markers in nutrition. *Nutr. Abstr. Rev.* v.42, p.813-845, 1972.
- MACHADO, H.M. *Efeitos de diferentes combinações de capimelefante (Pennisetum purpureum, Schum): cana-de-açúcar (Saccharum officinarum, L.) sobre a digestibilidade em equinos, utilizando diferentes metodologias de determinação.* 1992. 71f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- MARTIN-ROSSET, W.; DULPHY, J.P. Digestibility interactions between forages and concentrates in horses: Influence of feeding level – comparison with sheep. *Livest. Prod. Sci.*, v.17, p.263-276, 1987.
- MAURICIO, R.M., MOULD, F.L., DHANOA, M.S. *et al.* A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.79, p.321-330, 1999.
- MIRAGLIA, N.; BERGERO, D.; BASSANO, B. *et al.* Studies of apparent digestibility in horses and use of internal markers. *Livest. Prod. Sci.*, v.60, p.21-25, 1999.
- NUTRIENT requirements of horses. 6.ed. Washington DC: NRC, 2007. 341p.
- OLIVEIRA, R.F.M.; FONTES, C.A.A.; SILVA, J.F.C. Estudo da recuperação fecal de oxido crômico e dos indicadores internos cinza insolúvel, cinza insolúvel em detergente ácido e lignina em períodos de coleta de dois a sete dias em bovinos. *Rev. Bras. Zootec.*, v.20, p.522-31, 1991.
- ØRSKOV, E. R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubated measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.*, v.92, p.499-503, 1979.
- OTT, R.L. *An introduction to statistical methods and data analysis.* Wadsworth: Duxbury Press, 1983. 354p.
- RODRIGUES, P.H.M.; GOMES, R.C.; SIQUEIRA, R.F. *et al.* Acurácia, precisão e robustez das estimativas da digestibilidade aparente da matéria seca determinada com uso de indicadores em ovinos. *Rev. Bras. Zootec.*, v.39, p.1118-1126, 2010.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM – SAS 2000. SAS user's: guide statistics. Cary: 2000. 211p.
- SILVA, J.F.C.; LEÃO, M.I. *Fundamentos de nutrição de ruminantes.* Piracicaba: Livro Ceres, 1979. 384p.
- STEIN, R.B.S.; TOLEDO, L.R.A.; ALMEIDA, F.Q. *et al.* Estimativa da digestibilidade aparente da matéria seca por meio de indicadores internos em equinos. *Rev. Bras. Zootec.*, v.35, p.504-511, 2006.
- THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S. *et al.* A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of Ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* v.48, p.185-197, 1994.
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A twostage technique for the “in vitro” digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.*, v.18, p.104-111, 1963.
- VAN SOEST, P. J. *Nutritional ecology of the ruminant.* Ithaca: Comstock Publ. Association, 1994. 476p.
- WEISS, W.P.; CONRAD, H.R.; OIERRE, N.R. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.39, p.95-110, 1992.