

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

RAPHAEL DOS SANTOS GOMES

ESTIMATIVA DE PARÂMETROS DA CINÉTICA DE DIGESTÃO *IN VITRO* DE PLANTAS FORRAGEIRAS

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2016

RAPHAEL DOS SANTOS GOMES

**ESTIMATIVA DE PARÂMETROS DA CINÉTICA DE DIGESTÃO *IN*
VITRO DE PLANTAS FORRAGEIRAS**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de concentração Nutrição e Produção Animal.

ORIENTADOR: PROF. RICARDO AUGUSTO MENDONÇA VIEIRA

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

124/2016

Gomes, Raphael dos Santos

Estimativa de parâmetros da cinética de digestão *in vitro* de plantas forrageiras / Raphael dos Santos Gomes. – Campos dos Goytacazes, 2016. 68 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Zootecnia. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Ricardo Augusto Mendonça Vieira.

Coorientadores: Tadeu Silva de Oliveira e Leonardo Siqueira Glória.

Área de concentração: Nutrição e produção animal.

Bibliografia: f. 58-68.

1. FIBRA 2. INCUBAÇÕES DE LONGO PRAZO 3. MODELOS NÃO LINEARES I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Zootecnia II. Título

CDD

633.2

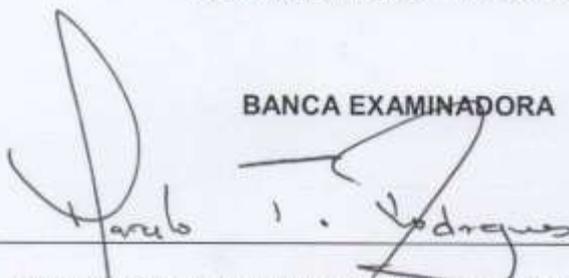
RAPHAEL DOS SANTOS GOMES

ESTIMATIVA DE PARÂMETROS DA CINÉTICA DE DIGESTÃO *IN VITRO* DE
PLANTAS FORRAGEIRAS

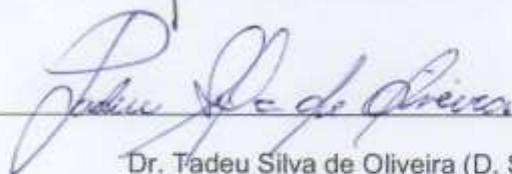
Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como
requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em
Ciência Animal, na área de concentração de Nutrição
e Produção Animal.

Aprovada em 29 de abril de 2016.

BANCA EXAMINADORA

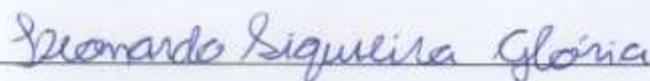


Prof. Marcelo Teixeira Rodrigues (Ph. D., Dairy Science) - UFV



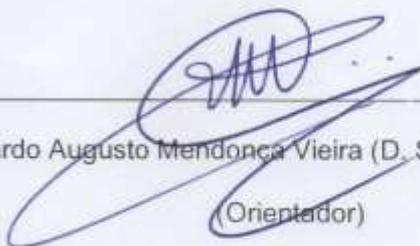
Dr. Tadeu Silva de Oliveira (D. Sc., Zootecnia) - UENF

(Co-orientador)



Dr. Leonardo Siqueira Glória (D. Sc., Genética e Melhoramento)

(Co-orientador)



Prof. Ricardo Augusto Mendonça Vieira (D. Sc., Zootecnia) - UENF

(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido saúde e condições para a realização deste trabalho.

Aos meus pais Amadeu e Sueli, pelo carinho, apoio incondicional e dedicação em todos os momentos da minha vida.

A minha namorada Thayná, pelo apoio, carinho e paciência.

A minha irmã Tássia e ao meu cunhado Glauber, por sempre me incentivarem.

Ao meu orientador Ricardo Augusto Mendonça Vieira, pelo aprendizado, amizade e confiança em mim depositada.

Aos funcionários Robson Alves de Carvalho, Alcir Manhães da Silva e Almir Ribeiro Carvalho Júnior.

Ao Flávio Henrique pelos quinze anos de amizade e sua fundamental ajuda na condução do experimento.

À Laila Ramos pela sua fundamental ajuda na condução do experimento.

Aos meus companheiros de pós-graduação Matheus Abreu, Wagner Tamy, Marcelo Cabral, Nardele Rohem Junior, Renata Soares e Leonardo Glória por esses quatro anos de convivência.

Aos bolsistas Davi Barbosa, Antônio Paulo, Isabela Amorim, Carlos Henrique e Daniel Sant'ana pela ajuda.

Ao Tadeu Silva pela ajuda e amizade.

Às funcionárias do programa de pós-graduação em Ciência Animal, Jovana e Conceição, pelo carinho e atenção.

Ao professor Alberto Magno pela ajuda e amizade.

À Karla Rodrigues, Elisabeth e Natália pela agradável convivência.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela oportunidade de realização do curso, concessão da bolsa de estudo e oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

E a todos que não foram citados, mas contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

RESUMO

GOMES, Raphael dos Santos, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, abril de 2016, Estimativa de parâmetros da cinética de digestão *in vitro* de plantas forrageiras. Orientador: Ricardo Augusto Mendonça Vieira.

O objetivo deste estudo foi estimar os parâmetros cinéticos de relevância biológica e modelar a fração indigestível em função da relação lignina em detergente ácido (LDA) e a matéria orgânica fibrosa (aFDN_{mo}), com base em perfis de produção acumulada de gases e de degradação gravimétrica de longo prazo de diversas plantas forrageiras colhidas no ponto ideal de corte. Foram utilizadas amostras de 18 plantas forrageiras que, após a secagem das amostras procedeu-se à análise de sua composição química, a saber: matéria seca, gordura bruta, cinzas, proteína bruta, aFDN_{mo} e LDA. Incubações *in vitro* foram conduzidas em banho-maria a 39°C em frascos de penicilina de 100 mL na cor âmbar, vedados com tampas de borracha e lacres de alumínio, onde, aproximadamente, 0,5 g de amostra de forragem foram incubados com 40 mL de meio de cultura reduzido e 10 mL de inóculo ruminal. Para a degradação gravimétrica *in vitro* foram avaliados os tempos 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 72, 96, 120, 144, 216, 288, 432, 864, 1440, 1872 e 2352 horas. Foram realizadas renovações da solução de incubação a cada 96 horas, exceto a primeira renovação realizada com 72 horas. Ao final de cada tempo foi analisado o teor de fibra em detergente neutro tratada com amilase termoestável, sem adição de sulfito de sódio e incinerada em mufla. Os perfis de tempo da produção de gás acumulado foram obtidos utilizando um dispositivo não automatizado, o que permitiu tomar medições de pressão e volume dos frascos nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 30, 36, 48, 72 e 96 horas. Os perfis de degradação gravimétrica e de produção acumulada de gases foram interpretados utilizando modelos não-lineares combinados com funções de variância. A fração indigestível (U) foi estimada em função da relação LDA/aFDN_{mo}. Os modelos generalizados de Michaelis-Menten e GNG1 foram os que apresentaram os ajustes mais verossímeis para os perfis de degradação gravimétrica, o modelo bifásico biexponencial foi o que apresentou o ajuste mais verossímil para os perfis de produção acumulada de gases. Na maioria dos perfis foi identificada a heterogeneidade da fração potencialmente digestível da fibra. A fração U foi estimada pela equação $2,03 (0,062 \text{ LDA/aFDN}_{mo}^{3/4})$, no entanto quando o parâmetro U foi substituído pela relação $\text{LDA/aFDN}_{mo}^{2/3}$ no modelo geral, a equação $1,64 (0,055) \text{ LDA/aFDN}_{mo}^{2/3}$ foi a melhor solução para a maioria das espécies forrageiras estudadas. Assim, é possível concluir que a relação entre a fração indigestível da fibra e o teor de lignina na fibra apresenta natureza não linear.

Palavras chave: fibra, incubações de longo prazo, modelos não lineares

ABSTRACT

GOMES, Raphael dos Santos, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, april of 2016, Estimation of kinetic parameters of in vitro digestion of forage plants. Advisor: Ricardo Augusto Mendonça Vieira.

The aim of this study was to estimate kinetic parameters of biological relevance and model the indigestible fraction relationship between acid detergent lignin (ADL) and fibrous organic matter (aNDFom), based on cumulative gas production and gravimetric, long-term degradation profiles of some forage plants at the recommended harvesting point. Samples of 18 forage plants were used after drying and analyzed for chemical composition as follows: dry matter, crude fat, ash, crude protein, aNDFom, and ADL. Anaerobic in vitro incubations were conducted in aluminum crimp-sealed 100 mL penicillin amber vessels in a 39 °C water bath, to which approximately 0.5 g of the forage samples were incubated with 40 mL of reduced culture medium and 10 mL of rumen fluid. The in vitro gravimetric degradation was performed at the following incubation times: 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 72, 96, 120, 144, 216, 288, 432, 864, 1440, 1872, and 2352 hours. The culture medium was first renewed after 72 hours of incubation, and every 96-hour intervals. At the end of each incubation time, we analyzed the neutral detergent fiber treated with heat stable amylase, without addition of sodium sulphite and ignited in a muffle furnace. The cumulative gas production profiles were obtained by using a non-automated device allowing to take pressure and volume records for each vessel at 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 30, 36, 48, 72, and 96 hours. The gravimetric degradation and cumulative gas production profiles were interpreted using nonlinear models combined with variance functions. The indigestible fraction (U) was estimated as a function of ADL / aNDFom relationship. Generalized Michaelis-Menten and GNG1 models were those with the most likely fits to the gravimetric degradation profiles, whereas the biphasic biexponential model presented the most likely fits to the cumulative gas production profiles. A heterogeneous potentially degradable fiber was identified for the majority of the long-term degradation profiles. The fraction U was estimated by $2.03 (0.062) \text{ ADL/aNDFom}^{3/4}$, however when parameter U was replaced by $\text{ADL/aNDFom}^{2/3}$ in the general model, the equation $1.64 (0.055) \text{ ADL/aNDFom}^{2/3}$ was the best solution for most forage species. Therefore, it is possible to conclude that the relationship between indigestible fiber and lignin has a non-linear nature.

Keywords: fiber, long-term incubations, non-linear models

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil ajustado para cada espécie forrageira.	39
Figura 2. Comparação entre os ajustes dos modelos generalizados de Michaelis-Menten e GNG1.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias de mínimos quadrados e intervalos de confiança a 95% (\pm amplitude/2) para a composição química dos alimentos utilizados.	32
Tabela 2. Modelos ajustados para a degradação gravimétrica da fibra, utilizando ajuste conjunto para todas as espécies forrageiras.	33
Tabela 3. Modelos ajustados para a degradação gravimétrica da fibra, utilizando ajuste individual por espécie forrageira.	34
Tabela 4. Estimativa dos parâmetros e seus respectivos erros padrão entre parênteses (SE) do modelo mais verossímil ajustado para cada espécie forrageira.	35
Tabela 5. Taxas de degradação estimadas (e seus respectivos limites inferiores e superiores do intervalo de confiança a 95%) para o modelo generalizado de Michaelis-Menten.	41
Tabela 6. Comparação entre os ajustes geral e individual para a degradação gravimétrica da fibra.	42
Tabela 7. Modelos ajustados para os perfis de produção acumulada de gases, utilizando ajuste ao conjunto formado por todas as espécies forrageiras	43
Tabela 8. Estimativa dos parâmetros da cinética de produção de gases e seus respectivos erros padrão entre parênteses (SE).	44
Tabela 9. Ajustes entre a fração indigestível da fibra e o teor de lignina na fibra.	45
Tabela 10. Estimativa dos parâmetros da relação entre a fração indigestível e o teor de lignina na fibra e seus respectivos erros padrão (SE).	47
Tabela 11. Critérios de informação (AIC _c) e medidas derivadas calculados para os modelos contendo as generalizações alométricas (Eq. 25 e 26) e a forma geral do modelo para cada espécie forrageira (Eq. 4).	48

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1. DEGRADAÇÃO GRAVIMÉTRICA <i>IN VITRO</i>	11
3.2. PRODUÇÃO CUMULATIVA DE GASES	13
3.3. ESTIMATIVA DA FRAÇÃO INDIGESTÍVEL	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA	22
4.2. DEGRADABILIDADE <i>IN VITRO</i>	22
4.2.1. Preparo do meio de cultura	22
4.2.2. Degradação gravimétrica <i>in vitro</i>	23
4.2.3. Produção cumulativa de gases	25
4.3. PERFIS DE DEGRADAÇÃO E FUNÇÕES DE COVARIÂNCIA	26
4.4. ESTIMAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS.....	28
4.5. RELAÇÃO ENTRE A FRAÇÃO INDIGESTÍVEL E A LIGNINA	29
5. RESULTADOS	31
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

Os métodos de análises *in vitro* são comumente utilizados para estimar a degradabilidade da matéria orgânica dos alimentos oferecidos para ruminantes por meio da quantificação do desaparecimento do substrato durante a incubação (TILLEY e TERRY, 1963; GOERING e VAN SOEST, 1970). A técnica de produção cumulativa de gases foi desenvolvida para determinar a fermentação dos alimentos utilizados para ruminantes. Esta técnica é realizada por meio da incubação de amostras dos alimentos em líquido ruminal e tampão; e a produção de gases decorrentes da fermentação é um indicador indireto da cinética de degradação (RYMER et al., 2005).

A descrição matemática dos perfis de produção de gases permite a análise de informações e a comparação entre substratos ou características de fermentação, e pode prover informações úteis referentes à composição dos substratos e a degradabilidade dos componentes de baixa solubilidade (GROOT et al., 1996).

A maior dificuldade para a quantificação da cinética de degradação da fibra consiste na correta definição da fração indigerível dos alimentos estudados (MERTENS, 2005). Existem perfis de degradação que apresentam, claramente, mais de uma inflexão, o que representa heterogeneidade da fração potencialmente degradável (VAN SOEST et al., 2000). Existem modelos capazes de imitar tais perfis e apenas por meio de incubações de longo prazo é possível estimar adequadamente os parâmetros cinéticos (ROBINSON et al., 1986; VIEIRA et al., 2008a; VIEIRA et al., 2012). A estimação da fração indigestível é a tarefa mais importante para que se possa obter estimativas mais acuradas do valor nutricional dos alimentos (VAN SOEST et al., 2005; VIEIRA et al., 2012).

Com isso, a modelagem matemática para o estudo dos perfis de degradação gravimétricos e de produção de gases é uma ferramenta quantitativa importante para o alcance do objetivo de estimação do valor nutricional dos recursos alimentares empregados na alimentação de ruminantes (VIEIRA e FERNANDES, 2006).

2. OBJETIVO

Objetivou-se estimar os parâmetros cinéticos de relevância biológica e modelar a fração indigestível em função da relação lignina em detergente ácido e a matéria orgânica fibrosa, baseado em perfis de produção acumulada de gases *in vitro* e perfis de degradação gravimétrica *in vitro* de longo prazo em diversas plantas forrageiras colhidas no ponto ideal de corte.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. DEGRADAÇÃO GRAVIMÉTRICA *IN VITRO*

Existem vários métodos para a determinação da digestibilidade de alimentos para ruminantes. O método *in vivo*, por ser realizado em ensaios de digestão com animais, é o procedimento de referência e aquele que, preferencialmente, deve ser utilizado para calibração das demais técnicas. No entanto, o método *in vivo* é oneroso, laborioso e demorado, além de não permitir avaliação simultânea de vários alimentos (LOPES et al., 2010). Métodos *in vivo* são considerados os mais confiáveis, porém apresentam desvantagens como: requerimento de grandes quantidades de alimentos, número alto de repetições e elevado custo (BERCHIELLI et al., 2006).

Os métodos *in vitro* que utilizam fermentação microbiana ruminal em substituição aos métodos *in situ* para avaliar a digestibilidade dos alimentos têm sido usados por décadas (TILLEY e TERRY, 1963; GOERING e VAN SOEST, 1970). As técnicas *in vitro* são consideradas mais baratas do que as técnicas *in vivo* e *in situ*, e oferecem a possibilidade de avaliar tanto o resíduo quanto os metabólitos da degradação microbiana. Métodos *in vitro* podem, em última análise, permitir o controle de vários fatores que alteram a degradação do alimento (população microbiana, animais, ambiente) e, por conseguinte, permitir a uniformidade na caracterização da degradação dos alimentos (MOHAMED e CHAUDHRY, 2008).

Resultados de ensaios empíricos podem ser correlacionados com a digestibilidade dos alimentos em animais (TILLEY e TERRY, 1963) e serem utilizados para prever o desempenho animal (OBA e ALLEN, 1999). Os valores de digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (FDN) têm sido utilizados em programas de avaliação, em formulações de dietas ou para descrever o potencial de contribuição de nutrientes digestíveis de um determinado ingrediente na dieta (NRC, 2001; HALL e MERTENS, 2012).

Os diferentes métodos de estimativa da degradação afetam os parâmetros da degradação, principalmente a taxa de degradação e o tempo de latência (GRANT e MERTENS, 1992; BOSSEN et al., 2008). Hall e Mertens (2008) avaliaram diferentes metodologias para estimação da digestibilidade gravimétrica da fibra e concluíram que

os parâmetros da degradação podem ser alterados pela metodologia de fermentação adotada; conseqüentemente, os valores de degradação da fibra observados para os diferentes métodos não são comparáveis. Bossen et al. (2008) observaram que o método *in situ* com vacas alimentadas em níveis de produção podem subestimar a taxa de degradação da FDN e que a perda de partículas é a principal razão para a estimativas de parâmetros viesados de degradabilidade *in situ*. A queda do pH no inóculo é um dos fatores que mais afetam a digestibilidade da fibra, uma vez que os microrganismos celulolíticos são os mais sensíveis a queda de pH (STERN et al., 1997; BERCHIELLI et al., 2006). Bossen et al. (2008) observaram que o método *in vitro* conduzido com o pH neutro obteve os maiores valores de extensão de degradação em todos os alimentos testados e concluíram que este método estima as características de degradação que representam o potencial de degradação dos alimentos (valor intrínseco).

A confiabilidade nas estimativas da cinética de degradação é dependente de diversos fatores, entre eles: a diluição do fluido ruminal, manuseio do fluido ruminal, manutenção das condições do rúmen, tipo de tamponante, tamanho da partícula, dieta do animal doador e tempo de fermentação (PEREZ, 1997; STERN et al., 1997; BERCHIELLI et al., 2006).

No método *in vitro*, as amostras são acondicionadas em tubos ou frascos, com solução tampão, o meio de cultura e o inóculo ruminal, as amostras passam por vários regimes de gaseificação dependendo da marcha utilizada. A cinética de degradação pode ser afetada por diferenças na técnica, especialmente durante a fase inicial da fermentação (HALL e MERTENS, 2008; 2012).

O método de análise de fermentação *in vitro* (TILLEY e TERRY, 1963; GOERING e VAN SOEST, 1970) é amplamente utilizado porém apresenta desvantagens, tais como: 1) a análise da fibra destrói a amostra e são necessárias diferentes amostras para cada ponto de avaliação, de forma que estes estudos de cinética são trabalhosos, caros e com poucas repetições em cada tempo de incubação; 2) os estágios iniciais da digestão são de difícil estudo devido a perda de massa ser baixa; 3) a taxa de degradação dos componentes solúveis da forragem não é determinada.

Waldo et al. (1972) propuseram que a fibra pode ser dividida em duas frações, fibra potencialmente digerível e da fibra não digerível. Smith et al. (1971) e Mertens (1973) concluíram que a taxa de digestão da fração de parede celular potencialmente digerível pode ser quantificada por taxas constantes de primeira ordem. O modelo

simples de primeira ordem foi melhorado pela incorporação do tempo de latência discreto, enquanto a digestão não ocorre (MERTENS e LOFTEN, 1980). Recentemente, Vieira et al. (2008a) desenvolveram um modelo compartimental generalizado de degradação modificado para levar em conta a heterogeneidade na fração potencialmente digestível da fibra e lidar com os perfis de degradação que exibem forma sigmoide e, possivelmente, uma subfração adicional da fibra de degradação lenta.

3.2. PRODUÇÃO CUMULATIVA DE GASES

Os valores de digestibilidade da fibra em detergente neutro são usados para estimar o conteúdo de energia dos alimentos para formulação de dietas (NRC, 2001) e para estimar a digestibilidade de forragens usadas no campo. Diversas metodologias são utilizadas para quantificar a fermentação *in vitro*, por meio de adição de inóculo ruminal com o intuito de quantificar a digestibilidade da FDN, entre essas estão compreendidas técnicas as quais se utilizam pressão contínua de CO₂ (GOERING e VAN SOEST, 1970), tubos de centrífuga com válvulas de liberação de gás (MOORE e MOTT, 1976) e frascos de soro com rolhas (PELL e SCHOFIELD, 1993). Todas as técnicas possuem seu diferencial, porém, apresentam também características indesejáveis, como por exemplo, dificuldade de homogeneização da amostra em tempos médios de fermentação com a utilização de tubos em centrífuga com válvulas de liberação de gás, o que causa inibição da digestão (GRANT e MERTENS, 1992).

Hall e Mertens (2008) citaram que as técnicas as quais quantificam a produção de gás por meio de seringas, podem ser subestimadas, devido ao atrito existente inerente ao êmbolo, entretanto os resultados obtidos com a mesma técnica podem ser utilizados para fins de comparação.

Hall e Mertens (2008) concluíram que tubos com válvulas de liberação de gás apresentam um menor valor de digestibilidade da FDN, em torno de 16%, dependendo do tempo de fermentação e substrato. Com isso, a habilidade em detectar diferenças entre os sistemas de fermentações irá variar dependendo do substrato fermentado, e

que todos os sistemas de fermentação não são igualmente sensíveis a avaliação de todos os substratos.

Vários estudos foram realizados utilizando a produção de gases como forma de medir o metabolismo dos carboidratos e como alternativa para o desaparecimento gravimétrico da fibra (TREI et al., 1970; MENKE et al., 1979; TAYA et al., 1980; MENKE e STEINGASS, 1988), por meio da correlação da produção de gases com o desaparecimento da FDN.

Pell e Schofield (1993) avaliaram a digestibilidade *in vitro* da forragem por meio da produção de gases e citam que o método gravimétrico *in vitro* quantifica o desaparecimento dos componentes do substrato, enquanto que a produção de gases foca no aparecimento dos produtos da fermentação; estes produtos são o resultado da fermentação dos substratos solúveis e insolúveis, o qual é uma vantagem sobre o método tradicional em que não considera o substrato solúvel. Este método pode ser usado para determinar a importância das diferentes frações dos alimentos em prover energia para os microrganismos e identificar compostos que inibam a atividade microbiana em nível de rúmen.

A técnica de produção de gases, no entanto, apresenta dificuldade para quantificar os valores de produção de gás oriundos do meio de cultura e do inóculo, não contabilizando a produção obtida por meio da renovação da biomassa microbiana.

Com o objetivo de diminuir erros atribuídos às técnicas e estimar valores de digestibilidade da FDN mais verossímeis tem-se utilizado a combinação das técnicas de degradação *in vitro* gravimétrica de carboidratos fibrosos e a produção cumulativa de gases para estimar as frações solúveis A e B₁ dos carboidratos (FAVORETO et al., 2008).

Rymer et al. (2005) avaliando a técnica de produção cumulativa de gases *in vitro*, discutiram sobre alguns fatores que podem afetar o perfil de produção de gás de alguns alimentos, como por exemplo, efeito da ventilação do gás durante a incubação, da mudança da pressão atmosférica, da agitação, do tamanho da amostra e preparação, do inóculo, da prova em branco, da composição média e do uso de aparelhos.

Os gases produzidos durante a técnica de fermentação *in vitro* de Pell e Schofield (1993) não são liberados, mas o acúmulo de pressão no frasco é registrada em intervalos regulares. Entretanto, nas técnicas descritas por Theodorou et al. (1994), Cone et al. (1996) e Davies et al. (2000), os gases são liberados em tempos

pré-determinados. A pressão acumulada, intervalo entre leituras e o número de vezes que o gás é liberado, são registrados, e estas informações são utilizadas para calcular o volume cumulativo do gás produzido.

Hall e Mertens (2008) observaram que a liberação do gás em intervalos de 3h durante as doze primeiras horas previne um acúmulo indesejável de pressão que pode comprimir o lacre do tubo.

Pell e Schofield (1993) postularam que a mudança na pressão atmosférica pode ser corrigida por meio da utilização do frasco em branco. Porém, isto só é possível se a fermentação do frasco em branco produzir gás suficiente para causar a abertura da válvula, usualmente durante as seis primeiras horas de fermentação. Schofield (2000) relatou que a maioria das mudanças na pressão atmosféricas não é suficiente para alterar o perfil de produção de gases.

No que se refere aos efeitos da agitação durante o período de incubação, os resultados de Wilkins (1974) não revelaram efeito sobre a latência para a degradação do substrato, porém, observou que a agitação aumenta a taxa de produção de gás. Entretanto, Pell e Schofield (1993) observaram que o coeficiente de variação de produção de gás aumenta se a incubação não for agitada.

Theodorou et al. (1994) observaram que o aumento na quantidade de substrato resulta em um aumento linear no volume de gás total, porém a taxa de produção de gases não é afetada. O tamanho da amostra usado por diferentes pesquisadores varia entre 100 a 1250 mg (GETACHEW et al., 1998). O uso de amostras com menor massa pode acumular erros experimentais, principalmente na pesagem e heterogeneidade da amostra. Já o uso de amostras de maior massa é essencial que o sistema seja capaz de tamponar o ácido e que a pressão acumulada não seja tão alta que possa afetar o perfil de produção de gás (RYMER et al., 2005).

Outro fator a ser considerado durante o processo de preparação da incubação é o inóculo, que é influenciado pelo animal doador, sua dieta e o momento de coleta do conteúdo ruminal, afetando assim os resultados obtidos (RYMER et al., 2005).

O aumento na proporção de fluido ruminal no inóculo aumenta o volume de gases produzido, a taxa de produção de gases e reduz a latência para que ocorra a digestão (PELL e SCHOFIELD, 1993; RYMER et al., 1999).

Trei et al. (1970) observaram que o volume de gases produzido ao incubar amostras de grãos foi maior quando o fluido ruminal foi coletado de novilhos alimentados com grãos ao invés de feno. É possível que quando os animais são

adaptados a um substrato específico, tal como amido ou forrageiras contendo taninos, podem existir diferenças no perfil de produção de gases *in vitro* desses substratos se tais perfis forem comparados ao perfil com inóculo coletados de animais que não foram alimentados com estes ingredientes (RYMER et al., 1999).

Hall e Mertens (2008) observaram que a posição vertical do tubo utilizado para a incubação pode afetar negativamente a digestibilidade da FDN por formar uma camada de 1 a 2 centímetros de sobrenadante, por outro lado, a utilização de tubos selados com contínua movimentação pode contribuir para melhorar a digestibilidade da FDN por não permitir a segregação do substrato e manter a pressão do CO₂ constante.

A mensuração da cinética da produção de gás por meio da utilização de seringas e/ou outros sistemas manométricos é laboriosa, devido à necessidade de leituras periódicas, o que causa frequentemente uma diminuição da acurácia do sistema, resultando em obtenção de perfis com limitados números de pontos que caracterize a curva, de modo que se obtenham perfis de produção de gases descrita por modelos de uma única fase ou exponencial (FRANCE e THORNLEY, 1984; BEUVINK e KOGUT, 1993).

A introdução de equipamentos mais sofisticados pode auxiliar na distinção da produção de gás proveniente das frações rapidamente e lentamente fermentáveis (CONE et al., 1997). O perfil de produção de gás da maioria dos alimentos pode ser ajustado em um modelo trifásico, em que cada fase é caracterizada por uma produção de gás assintótica e o tempo de incubação no qual a metade do máximo é alcançada é um parâmetro que determina o perfil da curva (CONE et al., 1997).

A descrição de um modelo trifásico pode ser caracterizada pela fermentação das frações solúvel, insolúvel e renovação da biomassa microbiana, representadas pela primeira, segunda e terceira fase, respectivamente (CONE et al., 1996).

Cone et al. (1997) incubaram amostras de poáceas e observaram uma produção de gases inicial rápida sem nenhum tipo de latência, com posterior diminuição da produção, porém ainda manteve-se em nível elevado, e após 15 a 20h de incubação a produção diminuiu ainda mais, porém não parou completamente.

Com a utilização da divisão do perfil de produção de gás em fase, representando a fermentação das frações solúvel e insolúvel, torna-se possível fazer comparações com as técnicas de Tilley e Terry (1963) e a técnica do saco de nylon (ORSKOV e MCDONALD, 1979).

A alta taxa de produção de gases observada durante as duas primeiras horas de incubação é causada pela fermentação das frações solúveis, e a produção de gás após uma incubação prolongada pode ser causada pela fermentação de uma fração de difícil fermentação ou por um processo não caracterizado pela fermentação do substrato, ou renovação da biomassa microbiana que ocorre quando a produção de gás continua mesmo após o término da glicose, frequentemente observado após 45h de fermentação (CONE et al., 1997).

A produção de gás proveniente da renovação da biomassa microbiana dificulta a interpretação do perfil de produção de gás, no entanto, poucos estudos têm sido realizados com objetivo de esclarecer tal evento (CONE et al., 1997). Isto pode ser devido ao fato de que esta parte do perfil da produção de gás somente pode ser identificada com equipamentos de alta precisão (CONE et al., 1996). Stefanon et al. (1996) mencionaram que os sistemas prolongados de fermentação que propiciem o esgotamento do substrato devem ser evitados devido a morte microbiana dificultar a interpretação dos resultados observados.

Atualmente, com objetivo de corrigir o perfil de produção de gás tem-se utilizado um controle ou branco com fluído do rúmen, porém, sem adição de amostra. Entretanto, o fluído ruminal pode conter alguma matéria orgânica fermentável, alterando a interpretação da produção de gás. Em adição, a produção de gás no branco pode não ser somente causada pela fermentação da matéria orgânica, mas também pela renovação da população microbiana que iniciará tão logo a matéria orgânica seja consumida, com isso, pode-se concluir que o procedimento de correção da produção de gás com o uso da produção de gás obtida pela renovação da biomassa microbiana no branco não está correta, devido a esse processo não acontecer simultaneamente no branco e na amostra com substrato (CONE et al., 1997).

A não correção para o branco é provavelmente melhor que o uso da correção, uma vez que somente uma mínima parte da produção de gás no branco é causada pela fermentação da matéria orgânica (CONE et al., 1997).

Smith et al. (1971) e Mertens (1973) concluíram que a taxa de digestão da fração da parede celular potencialmente digestível pode ser quantificada por uma taxa cinética constante de primeira ordem. O modelo simples de primeira ordem foi melhorado pela incorporação de uma discreta fase de latência antes do início da digestão (MERTENS, 1973; MERTENS, 1977).

Um adequado modelo que descreva a produção de gás ao longo do tempo é essencial para avaliar os resultados dos estudos de cinética de produção de gases (BEUVINK e KOGUT, 1993). France e Thornley (1984) descreveram vários modelos de crescimento sigmoidal para sistemas biológicos, que podem se ajustar a cinética de produção de gás.

O modelo exponencial é usado frequentemente para avaliar os alimentos pela técnica do saco de nylon (ORSKOV e MCDONALD, 1979), mas este modelo também tem sido utilizado para descrever a cinética da produção de gases (KRISHNAMOORTHY et al., 1991), entretanto, o ajuste no modelo exponencial para a produção de gases é inferior a todos os outros modelos sigmoides (BEUVINK e KOGUT, 1993). Este modelo descreve uma reação cinética de primeira ordem, com ou sem fase de latência. No caso da produção de gás, a taxa de produção de gás é proporcional à soma de gás que ainda será produzida, o qual reflete a concentração de substrato.

O modelo logístico assume que a taxa de produção de gás é proporcional à atividade microbiana, representada pela soma de gás já produzida e pela concentração do substrato (BEUVINK e KOGUT, 1993).

O modelo de Gompertz assume que a taxa de produção de gás é proporcional à atividade microbiana, porém este parâmetro de proporcionalidade diminui com o tempo, de acordo com a cinética de primeira ordem, o qual pode ser atribuído a perda de eficiência na taxa de fermentação com o tempo (BEUVINK e KOGUT, 1993).

3.3. ESTIMATIVA DA FRAÇÃO INDIGESTÍVEL

A estratificação do conteúdo ruminal resulta em um compartimento digestivo que pode ser bastante heterogêneo para modelar como um *pool* simples. Com o objetivo de se obter um *pool* simples homogêneo da matéria digestível é necessário a identificação e subtração da matéria indigestível (MERTENS, 1993).

A estimativa da fração indigestível é crítica para uma descrição acurada da cinética digestiva, no entanto, frequentemente isso não é entendido pelos pesquisadores. A estimativa da fração indigestível não é uma invenção matemática

ou da modelagem, mas sim um princípio biológico crítico nas quais a cinética e as taxas de digestão são baseadas (MERTENS, 1993).

Constantemente as taxas de degradação são calculadas sem a subtração do resíduo indigestível ou com a subtração deste obtido em tempos de fermentação muito curtos. Isto pode ser feito matematicamente, mas viola os princípios biológicos e cinéticos porque a fração digestível e a fração indigestível são combinadas em um *pool* simples (MERTENS, 1993).

Os dois erros mais comuns em modelos são as falhas na inclusão da fração indigestível e da latência. A subtração insuficiente da fração indigestível a partir do *pool* potencialmente digestível é incorreta biologicamente e cineticamente. Biologicamente é incorreto porque a taxa de digestão é determinada em uma fração indigestível. Cineticamente é incorreto porque o *pool* a ser avaliado não apresenta propriedades cinéticas homogêneas (MERTENS, 1993). Esses resultados não apenas causam confundimento na literatura, mas também são fundamentalmente incorretos pois violam os princípios da cinética (MERTENS, 2005).

Geralmente, a digestão é descrita como um processo de primeira ordem considerando o substrato (WALDO et al., 1972; MERTENS e ELY, 1979), entretanto alguns modelos a descrevem como um processo de segunda ordem que depende do substrato e dos microrganismos presentes no sistema (BALDWIN et al., 1977; FRANCE et al., 1982).

Os compartimentos dos modelos são definidos por suas propriedades cinéticas e não precisam necessariamente corresponder a compartimentos anatômicos, fisiológico, químico ou físico no sistema real (MERTENS, 2005).

Parâmetros cinéticos da digestão são importantes pois eles não apenas descrevem a digestão, mas também caracterizam as propriedades intrínsecas dos alimentos que limitam a disponibilidade para os ruminantes (MERTENS, 2005).

A cinética digestiva dos componentes dos alimentos deveria ser descrita pela divisão do alimento em compartimentos rapidamente digestível, lentamente digestível e indigestível (MERTENS, 2005).

O resíduo indigestível pode ser estimado acuradamente por ensaios biológicos com incubações anaeróbicas de longa duração (90-120 dias) (CHANDLER et al., 1980). No entanto, a verdadeira fração indigestível pode ser apenas alcançada após tempo infinito, e qualquer ponto final da fermentação é uma superestimação da assíntota verdadeira (MERTENS, 2005).

Van Milgen et al. (1992) observaram diferenças na fração da fibra em detergente ácido indigestível mensurado após 42 dias *in situ* quando os animais hospedeiros eram alimentados com dietas contendo diferentes proporções de concentrado. Eles concluíram que a fração indigestível não é uma característica intrínseca do alimento porque é afetada pela dieta do animal. Entretanto, pode ser argumentado que a indigestibilidade intrínseca do alimento pode ser mensurada apenas sob condições fermentativas ótimas que vão resultar na máxima digestão (MERTENS, 2005).

O uso do tempo de fermentação de 48 horas para estimar o resíduo indigestível pode subestimar a fração potencialmente digestível. Tempos de fermentação suficientemente longos são necessários para assegurar a estimativa acurada do resíduo indigestível (MERTENS, 1993).

A utilização de períodos curtos de incubação ($t \leq 96h$) poderia resultar em uma estimativa tendenciosa do resíduo indigestível (ELLIS et al., 2005; VAN SOEST et al., 2005). Essa fonte de tendência pode ser explicada pela heterogeneidade ou não uniformidade da fração potencialmente digestível (MERTENS, 1973; ELLIS et al., 2005; VAN SOEST et al., 2005; HUHTANEN et al., 2006), mas modelos compartimentais para considerar acuradamente essa fração heterogênea requer mensurações múltiplas em tempos de incubação longos (ELLIS et al., 2005; VAN SOEST et al., 2005). Ellis et al. (2005) e Van Soest et al. (2005) contornaram esse problema pela modelagem de dois *pools* potencialmente digestíveis, cada um com sua taxa de degradação específica. É importante notar que esses autores incubaram as amostras de forragem até 168 horas (VIEIRA et al., 2008a). Resultados inconsistentes são encontrados na literatura com relação a natureza heterogênea da fração potencialmente digestível da FDNom *in situ* (VIEIRA et al., 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Zootecnia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Amostras das fabáceas: galactia (*Galactia striata* (Jacq.) Urb.), macrotiloma (*Macrotyloma axillare* (E. Mey.) Verdc.), desmódio (*Desmodium heterocarpon* (L.) DC. subsp. *ovalifolium* (Prain) H. Ohashi), amendoim forrageiro cv. Belmonte (*Arachis pintoii* Krapov. & W.C. Greg.), kudzu (*Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth.), cunhã (*Clitoria ternatea* L.), alfafa (*Medicago sativa* L.) e sábia (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) e das poáceas: milho (*Zea mays* L.), capim-elefante cv. Cameroon (*Pennisetum purpureum* Schum.), tifton-85 (*Cynodon nlemfuensis* Vanderyst x *Cynodon dactylon* (L.) Pers.), coast-cross (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.), braquiária brizanta cv. MG-5 (*Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R. Webster), andropogon cv. Bisquamulatus (*Andropogon gayanus* Kunth), capim Massai (*Urochloa maxima* (Jacq.) R. Webster), capim suazi (*Digitaria swazilandensis* Stent.) e azevém (*Lolium perenne* L.) foram obtidas para realização de estudos de cinética de degradação de carboidratos por meio de técnicas de incubação *in vitro*.

As amostras de galactia, macrotiloma, desmódio, amendoim forrageiro, kudzu, coast-cross, andropogon, capim suazi, capim massai e braquiária foram cultivadas durante o verão no município de Seropédica-RJ, clima do tipo AW (KOTTEK et al., 2006). As poáceas foram colhidas aos 28 dias e as fabáceas foram colhidas aos 60 dias, exceto o desmódio que foi colhido aos 90 dias.

As amostras de cunhã, sábia, capim-elefante e milho foram cultivadas durante o verão no município de Campos dos Goytacazes-RJ, clima do tipo AW (KOTTEK et al., 2006). A cunhã foi colhida aos 60 dias, o sábia foi colhido aos 70 dias e apenas as folhas e a parte apical dos ramos foram utilizados. O capim-elefante foi colhido quando atingiu 1,70 m de altura. O milho foi colhido no ponto de silagem e ensilado por pelo menos 60 dias. Desta mesma lavoura de milho, aproveitou-se as espigas não colhidas pela ensiladeira e confeccionou-se uma silagem de espiga de milho, utilizando tambores plásticos de 200 l. As amostras de tifton 85, azevém e alfafa foram obtidas na forma de feno comercial.

As amostras frescas foram secas a 55 °C durante 72 horas em estufa com ventilação forçada. Após, foram moídas em moinho tipo facas (cutter mill) a 1 mm e armazenadas para a realização das análises químicas.

4.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

As amostras de forragem foram analisadas para matéria seca total (MS, Método 967.03) (AOAC, 1990), gordura bruta (GB) (THIEX et al., 2003), e de cinzas (Método 942.05) (AOAC, 1990). O teor de proteína (PB) foi obtido de acordo com as orientações descritas no método AOAC 984.13 e método AOAC 2001.11, incluindo a recuperação de N com utilização de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e lisina-HCl (AOAC, 1990; THIEX et al., 2002). A matéria orgânica fibrosa (aFDNmo) foi analisada de acordo com o método AOAC 2002.04 (MERTENS, 2002) por meio de adição de sulfito de sódio e de solução padronizada de amilase termoestável, e com exclusão das cinzas. O teor de lignina (LDA) foi analisado pelo método de ácido sulfúrico a 72% sobre o resíduo obtido após extração com detergente ácido (MÖLLER, 2009).

Os teores de MS, GB, cinzas, PB, aFDNmo, LDA e a relação LDA:aFDNmo foram analisadas segundo o modelo inteiramente casualizado:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}; \quad \text{Eq. (1)}$$

No qual y_{ij} corresponde à j -ésima determinação ($j = 1, 2, 3$ e/ou 4) do componente químico obtido para a i -ésima espécie forrageira ($i=1, 2, \dots, 18$). O modelo foi ajustado pelo procedimento MIXED do software SAS (v. 9, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e foi utilizada a transformação de Box-Cox (BOX e COX, 1964).

4.2. DEGRADABILIDADE *IN VITRO*

4.2.1. Preparo do meio de cultura

O uso de animais fistulados foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais sob o protocolo n°207, intitulado Manutenção e cuidados de animais com cânulas ruminais permanentes.

As incubações *in vitro* foram realizadas em banho-maria a 39°C. Foram utilizados frascos de penicilina de 100 mL na cor âmbar, os frascos foram vedados com tampas

de borracha e lacres de alumínio. Foram utilizadas, aproximadamente, 0,5 g de amostra incubada com 40 mL de meio de cultura reduzido e 10 mL de inóculo ruminal como descrito por Goering e Van Soest (1970). O meio de cultura e a solução redutora foram preparados de acordo com Hall e Mertens (2008). O inóculo ruminal foi obtido de seis ovinos machos castrados adultos com fístula ruminal, mantidos em duas baias com três animais cada, alimentados uma vez ao dia com silagem de milho e farelo de soja em quantidade suficiente para atender 1,3 vezes as exigências de manutenção (AFRC, 1993). Foram coletadas amostras separadas dos conteúdos líquido e sólido do rúmen, duas horas após o fornecimento do alimento aos animais, armazenadas em garrafas térmicas individuais e encaminhadas para o laboratório. As amostras do conteúdo do rúmen foram batidas em liquidificador por 60 segundos na proporção de 1:2 (conteúdo sólido: líquido ruminal) com o intuito de ocasionar desprendimento das bactérias aderidas a partícula sólida do alimento, obtendo-se assim, uma amostra mais representativa da população microbiana do rúmen. Logo após, a mistura foi filtrada através de oito camadas de gazes. Em seguida, o inóculo ruminal obtido foi adicionado ao meio de cultura, previamente reduzido na proporção 4:1, mantendo a mistura a 39°C sob infusão de CO₂ constante até sua transferência para os frascos, que foram imediatamente vedados e mantidos em banho-maria a 39°C (HALL e MERTENS, 2008). Foram utilizados dois banhos-maria, em cada um destes foram incubadas duas repetições de cada alimento com o inóculo ruminal tendo origem em um grupo de três animais, o conjunto formado pelo banho-maria e os três animais doadores foi considerado uma corrida (UDÉN et al., 2012).

4.2.2. Degradação gravimétrica *in vitro*

Os tempos de incubação avaliados foram 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 72, 96, 120, 144, 216, 288, 432, 864, 1440, 1872 e 2352 horas (98 dias). Para cada tempo de incubação foram realizadas duas corridas, com duplicata dentro de cada corrida, foi adicionado ainda dois frascos apenas com o meio de incubação reduzido e o inóculo ruminal (branco) em cada corrida. Com o objetivo de manter a máxima capacidade fermentativa do inóculo ruminal e evitar o esgotamento da capacidade de tamponamento do meio de cultura foram realizadas renovações da solução de

incubação a cada 96 horas, exceto a primeira renovação realizada com 72 horas. Os frascos foram retirados do banho-maria, imersos em banho de gelo para redução da temperatura o mais rápido possível e centrifugados a 1500 G por 15 minutos a 4°C em centrífuga Hanil modelo Supra 22K (Hanil Science Industrial Co., Ltd, Gyeyang-gu, Incheon, Coréia do Sul), em seguida, o conteúdo do frasco foi filtrado em papel de filtro quantitativo de filtragem rápida com o mínimo de transferência de partícula para o papel. As partículas que ficavam aderidas ao papel de filtro foram transferidas quantitativamente para o frasco com o auxílio do próprio meio de cultura reduzido, os frascos foram selados e mantidos novamente no banho-maria. As centrifugações foram realizadas no próprio frasco de vidro, os quais, foram colocados em moldes de silicone para melhor se acomodar ao rotor para frascos de 250 ml da centrífuga. O peso do frasco somado ao do molde foi equilibrado com água destilada em balança com precisão de 0,1 g. O tempo que cada frasco ficava fora do banho-maria sem a presença do meio de cultura foi descontado do tempo de final de incubação.

Ao final de cada tempo de incubação, os frascos foram imersos em banho de gelo para redução da temperatura o mais rápido possível e mantidos congelados até a realização da análise de fibra. Para a realização da análise de fibra os frascos foram descongelados, centrifugados a 1500 G por 15 minutos. Em seguida, o material foi filtrado em papel de filtro quantitativo de filtragem rápida com o mínimo de transferência de partícula para o papel. As partículas do resíduo da incubação que ficaram no frasco e no papel de filtro foram transferidas quantitativamente para copos de berzelius com auxílio de, aproximadamente, 50 mL de detergente neutro. Assim, para cada tempo foram realizadas análises de fibra em detergente neutro do resíduo de incubação tratada com amilase termoestável, sem adição de Na₂SO₃ (sulfito de sódio) e com incineração do resíduo em detergente neutro para determinar a matéria orgânica fibrosa de acordo com Van Soest et al. (1991) e Mertens (2002). A medida que o tempo de incubação se prolongou a filtragem do resíduo indigestível apresentou dificuldades. Para contornar esse problema nos tempo 216, 288, 432 h foram utilizados 15 g de areia lavada e queimada em mufla como auxiliar de filtragem (MERTENS, 2002) e nos tempos 864, 1440, 1872 e 2352 h o resíduo fibroso foi obtido por centrifugação. Após a fervura por 1 h do resíduo da incubação e o detergente neutro foram transferidos para os vidros de penicilina e centrifugados a 1500 G por 15 minutos a 20°C, o material foi filtrado em papel de filtro quantitativo de filtragem rápida com o mínimo de transferência de partícula para o papel, as partículas que ficaram no

frasco foram transferidas novamente para o frasco com o auxílio de água fervente até completar cerca de 3/4 do frasco, esse processo se repetiu até que água ficasse livre de detergente (cerca de 5 centrifugações). Após as centrifugações, o resíduo foi transferido para o cadinho com o auxílio de acetona e levado para a estufa para a fim de ser seco e após a pesagem foi incinerado em mufla.

4.2.3. Produção cumulativa de gases

Os perfis de tempo da produção de gás acumulado foram obtidos utilizando um dispositivo não automatizado similar àquele utilizado por Abreu et al. (2014). A pressão dos gases foi obtida por leituras manométricas e o volume medido por meio de pipeta graduada (25 mL; incremento 0,1mL). Para a medição do volume foi delineado um sistema, fixado em moldura feita de madeira, com um manômetro (0 a 8 psi; incremento 0,05) acoplado a uma válvula de plástico de três vias. Uma das vias da válvula estava ligada a um tubo de silicone (diâmetro de 5 mm; 1,5 m de comprimento) no qual foi inserida uma agulha descartável de calibre 20 em sua extremidade livre. A segunda via foi anexada ao manômetro por um pequeno pedaço de tubo de silicone (diâmetro de 5 mm; 0,3 m de comprimento) e braçadeiras de plástico. A terceira via foi ligada por outro tubo de silicone (diâmetro de 5mm, 1,3 m de comprimento) ao topo de uma pipeta graduada de 25 mL (incremento 0,1 mL), tendo a sua extremidade cônica ligada à haste de um funil de decantação (1.000 mL) pelo mesmo tipo de tubo silicone (5mm; 0,4 m de comprimento). O funil e a pipeta foram anexados a um suporte de metal em uma posição estática e vertical. O sistema foi preenchido com solução azul de metileno (0,1 g/L) para o marco zero da pipeta. O sistema foi preenchido com cautela para evitar a formação de bolhas de ar.

A pressão do gás foi lida no manômetro introduzindo a agulha, ligada à extremidade livre do tubo, nas tampas de borracha do frasco selado. O gás acumulado no espaço entre a tampa e o meio de cultura flui inicialmente para o manômetro. Feita a leitura de pressão, o volume do gás foi obtido mudando a posição da válvula de três vias para permitir o deslocamento de cima para baixo do gás para dentro da pipeta. O objetivo da extremidade solta foi ler a pressão e o volume sem remover o frasco do banho-maria. No entanto, os frascos foram ligeiramente removidos duas vezes ao dia

(início da manhã e fim da tarde) durante o período de incubação para serem agitados com o objetivo de homogeneizar o conteúdo do frasco.

As medições de pressão e volume foram realizadas nos tempos 0; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10;12; 16; 20; 30; 36; 48; 72 e 96 horas após a adição do inóculo ruminal. A pressão e o volume cumulativo dos gases da fermentação foram obtidos somando-se as leituras corrigidas para o marco nos tempos subsequentes ao tempo zero. Os volumes de gases lidos foram padronizados para mL/0,1 g de matéria seca. Não foram utilizados frascos com branco. Foram realizadas quatro corridas, com duplicata dentro de cada corrida, totalizando oito perfis por alimento, exceto para a silagem de espiga de milho que só foram realizadas duas corridas totalizando quatro perfis.

4.3. PERFIS DE DEGRADAÇÃO E FUNÇÕES DE COVARIÂNCIA

A estrutura geral atribuída aos modelos de degradação e de produção de gases foi a seguinte:

$$R_t = \mu_{R_t} + e_t; \quad \text{Eq. (2)}$$

$$V_t = \mu_{V_t} + e_t; \quad \text{Eq. (3)}$$

nas quais R_t representa o resíduo de incubação gravimétrica no tempo t e V_t representa a produção acumulada de gases no tempo t , sendo pressupostos $R_t \sim Normal(\mu_{R_t}, \sigma_{R_t}^2)$ e $V_t \sim Normal(\mu_{V_t}, \sigma_{V_t}^2)$. Contudo, nos perfis de degradação gravimétrica *in vitro* a forma geral foi atribuída:

$$\mu_{R_t} = A \times \phi_t + U; \quad \text{Eq. (4)}$$

Assim, à função ϕ_t foram atribuídas as seguintes expressões:

$$\phi_t = (\exp(-kt)); \quad \text{Eq. (5)}$$

$$\phi_t = (A_1 \times (\exp(-k_1t)) + (1 - A_1) \times (\exp(-k_2t))); \quad \text{Eq. (6)}$$

$$\phi_t = \left(1 - \left(\frac{t^c}{t^c + K^c}\right)\right); \quad \text{Eq. (7)}$$

$$\phi_t = \left(A_1 \times \left(1 - \left(\frac{t^{c1}}{t^{c1} + K_1^{c1}}\right)\right) + (1 - A_1) \times \left(1 - \left(\frac{t^{c2}}{t^{c2} + K_2^{c2}}\right)\right)\right); \quad \text{Eq. (8)}$$

$$\phi_t = \left(\delta^N \exp(-kt) + \exp(-\lambda t) \sum_{i=1}^{N-1} \frac{(1-\delta^{N-i})(\lambda t)^i}{i!}\right); \quad \text{Eq. (9)}$$

$$\phi_t = \left(A_1 \times \left(\delta_1^N \exp(-k_1 t) + \exp(-\lambda t) \sum_{i=1}^{N-1} \frac{(1 - \delta_1^{N-i})(\lambda t)^i}{i!} \right) + (1 - A_1) \times \left(\delta_2^N \exp(-k_2 t) + \exp(-\lambda t) \sum_{i=1}^{N-1} \frac{(1 - \delta_2^{N-i})(\lambda t)^i}{i!} \right) \right); \quad \text{Eq. (10)}$$

As equações 5 e 6 representam o modelo exponencial, as equações 7 e 8 representam o modelo generalizado de Michaelis-Menten (GMM) (LÓPEZ et al., 1999) e as equações 9 e 10 representam o modelo generalizado GNG1 (VIEIRA et al., 2008a). Onde A é a fração potencialmente degradável, A_1 e $(1 - A_1)$ são respectivamente as frações rapidamente e lentamente degradáveis da fibra potencialmente digestível (A) e U é a fração indigestível. Nas equações de 5, 6, 9 e 10: k , k_1 e k_2 (1/h) são as taxas de degradação das frações potencialmente degradável, rapidamente e lentamente degradáveis da fibra, respectivamente. Nas equações 7 e 8, c , c_1 e c_2 são parâmetros de escala e K , K_1 e K_2 (h) representam o tempo gasto até o consumo de metade do substrato (meia-vida). Nas equações 9 e 10, N é um número inteiro positivo que representa a ordem de dependência do tempo, λ (1/h) é a assíntota da taxa de preparação para a digestão, e $\delta = \lambda / (\lambda - k)$, $\delta_1 = \lambda / (\lambda - k_1)$ e $\delta_2 = \lambda / (\lambda - k_2)$ são constantes.

Para os perfis de produção cumulativa de gases, os modelos foram:

$$\mu_{V_t} = VF \times (1 - \exp(-kt)); \quad \text{Eq. (11)}$$

$$\mu_{V_t} = VF \times (1 - \exp(-ct)) / (1 + K \times \exp(-ct)); \quad \text{Eq. (12)}$$

$$\mu_{V_t} = VF \times (K - K^{\exp(-ct)}) / (K - 1); \quad \text{Eq. (13)}$$

$$\mu_{V_t} = VF \times t^c / (t^c + K^c); \quad \text{Eq. (14)}$$

$$\mu_{V_t} = VF_1 \times (1 - \exp(-k_1 t)) + VF_2 \times (1 - \exp(-k_2 t)); \quad \text{Eq. (15)}$$

$$\mu_{V_t} = VF_1 \times (1 - \exp(-k_1 t)) + VF_2 \times (1 - \exp(-ct)) / (1 + K \times \exp(-ct)); \quad \text{Eq. (16)}$$

$$\mu_{V_t} = VF_1 \times (1 - \exp(-k_1 t)) + VF_2 \times (K - K^{\exp(-ct)}) / (K - 1); \quad \text{Eq. (17)}$$

$$\mu_{V_t} = VF_1 \times (1 - \exp(-k_1 t)) + VF_2 \times t^c / (t^c + K^c); \quad \text{Eq. (18)}$$

As equações 11, 12, 13 e 14 representam os modelos monomolecular (BRODY, 1945), logístico (LÓPEZ et al., 1999), Gompertz (LÓPEZ et al., 1999) e generalizado de Michaelis-Menten (LÓPEZ et al., 1999), respectivamente. Os modelos bicompartimentais foram compostos pela combinação do modelo monomolecular com os modelos monomolecular (equação 15), logístico (equação 16), Gompertz (equação 17) e generalizado de Michaelis-Menten (equação 18). Onde VF (mL) é o volume assintótico de gás produzido, VF_1 e VF_2 (mL) são os volumes de gases produzidos

pelos *pools* rapidamente e lentamente degradáveis, respectivamente. Na equação 11, k é taxa (1/h) de degradação do *pool* simples. Nas equações 15, 16, 17 e 18, k_1 é a taxa (1/h) de degradação da fração rapidamente degradável e k_2 é a taxa (1/h) de degradação da fração lentamente degradável (equação 15). Nas equações 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18, c é um parâmetro de escala e K é o tempo (h) em que metade do substrato é degradado.

A suposição convencional da homocedasticidade foi avaliada usando o pacote NLMIXED do SAS (SAS Systems, Inc., Cary, NC, USA) e a função nlme do pacote nlme do software R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). A variância foi modelada da seguinte forma (PINHEIRO e BATES, 2000):

$$\sigma_{Y_t}^2 = \sigma^2; \quad \text{Eq. (19)}$$

$$\sigma_{Y_t}^2 = \sigma_0^2 \exp(2\theta t); \quad \text{Eq. (20)}$$

$$\sigma_{Y_t}^2 = \sigma^2 (\mu_{Y_t})^{2\psi}; \quad \text{Eq. (21)}$$

onde σ^2 é a variância residual homogênea ($\sigma_t^2 = \sigma^2$) como mostrado pela equação (19). A variância exponencial (equação 20) contém a variância residual inicial ($\sigma_t^2 = \sigma_0^2$) associada com o resíduo no tempo inicial ($t = 0$), que aumenta exponencialmente ao longo do tempo a uma θ (1/hora). A equação 21 representa a variância residual ($\sigma_t^2 = \sigma^2$) escalonada pela potência (ψ) em função da média esperada, μ_{Y_t} . No ajuste dos perfis de pressão acumulada de gases acrescentou-se a correlação geral entre as medidas repetidas no tempo para cada frasco empregando-se a correlação autorregressiva contínua (CAR1) do pacote nlme do R (PINHEIRO e BATES, 2000).

4.4. ESTIMAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Os modelos foram ajustados aos perfis de degradação ou produção cumulativa de gases por meio do procedimento NLMIXED do programa SAS (SAS System Inc., Cary, NC, USA), segundo os procedimentos descritos por Vonesh (2012). O melhor ajuste do modelo ao perfil foi avaliado por meio do cômputo dos critérios de informação derivados do critério de Akaike corrigido (AKAIKE, 1974; SUGIURA, 1978; BURNHAM e ANDERSON, 2004). Além disso, a decisão acerca do melhor modelo a descrever o perfil foi realizada com base nas recomendações descritas por Vieira et al. (2012).

4.5. RELAÇÃO ENTRE A FRAÇÃO INDIGESTÍVEL E A LIGNINA

A fração indigestível foi ajustada em relação ao teor de lignina presente na fibra da seguinte maneira:

$$U = \alpha(LDA/aFDNmo)^\beta; \quad \text{Eq. (22)}$$

na qual U é a proporção da fração indigestível (adimensional) estimada pela combinação mais verossímil dos modelos de degradação e respectivas funções de variâncias para cada alimento, LDA é o teor de lignina na matéria seca (g/kg MS) e $aFDNmo$ é o teor de fibra na MS (g/kg MS).

Foram avaliadas as seguintes possibilidades:

- 22.a) α e β estimados;
- 22.b) $\beta = 2/3$ e α estimado (CONRAD et al., 1984);
- 22.c) $\beta = 3/4$ e α estimado;
- 22.d) $\beta = 1$ e α estimado;
- 22.e) $\alpha = 2,4$ e $\beta = 1$ (CHANDLER et al., 1980);

combinadas com as funções de variância (Eq. 19 a 21). Para os ajustes da fração indigestível em relação a fibra foram adicionados ao conjunto de dados do presente estudo, os dados obtidos por Chandler et al. (1980). Os parâmetros α e β foram ajustados individualmente para cada estudo e para o conjunto dos dois grupos de dados a cada sentença acima, o que totalizou 15 pares (cinco hipóteses \times três conjuntos de dados de possíveis soluções para os parâmetros α e β).

Assim, considerando a forma geral (Eq. 4) dos modelos de degradação gravimétrica da fibra, no qual ϕ_t representa as particularidades de cada modelo, foram feitas as seguintes substituições:

$$U = \alpha(LDA/aFDNmo)^\beta; \quad \text{Eq. (23)}$$

e

$$A = 1 - \alpha(LDA/aFDNmo)^\beta; \quad \text{Eq. (24)}$$

No primeiro caso foi realizada reparametrização da Eq. (4) utilizando apenas a Eq. (23), resultando no seguinte modelo:

$$\mu_{R_t} = A \times (\phi_t) + \alpha(LDA/aFDNmo)^\beta; \quad \text{Eq. (25)}$$

No segundo caso foi realizada reparametrização da Eq. (4) utilizando as Eq. (23) e (24), resultando no seguinte modelo:

$$\mu_{R_t} = (1 - \alpha(LDA/aFDNmo)^\beta) \times (\phi_t) + (\alpha(LDA/aFDNmo)^\beta); \quad \text{Eq. (26)}$$

Foi realizado o ajuste das Eq. (25) e (26) utilizando os 15 pares dos parâmetros α e β obtidos do ajuste da Eq. (22. a-e), no qual as Eq. (25) e (26) representaram a combinação mais verossímil dos modelos de degradação e variância para cada espécie forrageira com o objetivo de verificar a perda de informação.

5. RESULTADOS

Os resultados das determinações da composição química das forrageiras utilizadas na análise cinética *in vitro* foram primeiramente submetidos ao ajuste do modelo descrito pela Eq. (1) para permitir estimar por ponto e por intervalo os nutrientes MS, PB, Cinzas, GB, aFDN_{mo}, LDA e a relação LDA/aFDN_{mo} (Tabela 1). O valor de lambda que maximizou a função de verossimilhança da transformação Box-Cox foi igual a zero para todas as variáveis referentes à composição química, inclusive para a relação LDA/aFDN_{mo}. O modelo que permitiu a melhor interpretação quantitativa dos dados da composição química foi o de variância homogênea, o que resultou em apenas um erro padrão para as médias de todos os nutrientes (Tabela 1). As fabáceas, com base nas médias da composição predita, apresentaram 3,2 vezes mais lignina do que as poáceas para a mesma quantidade de fibra.

Tabela 1. Médias de mínimos quadrados e intervalos de confiança a 95% (\pm amplitude/2) para a composição química dos alimentos utilizados.

Espécie	MS*	PB‡	GB‡	Cinzas‡	aFDNmo‡	LDA‡	LDA/aFDNmo§
Andropogon	201,2 \pm 0,88	109,2 \pm 6,77	22,4 \pm 1,36	77,3 \pm 2,06	686,5 \pm 15,31	39,4 \pm 2,68	57,4 \pm 2,99
Brizanta	191,1 \pm 0,83	134,1 \pm 8,30	26,9 \pm 1,63	84,9 \pm 2,26	592,9 \pm 13,19	27,8 \pm 1,89	46,9 \pm 2,44
Coast cross	311,7 \pm 1,36	89,8 \pm 5,56	18,3 \pm 1,11	70,2 \pm 1,87	753,5 \pm 16,77	60,1 \pm 4,09	79,8 \pm 4,15
Capim-elefante	157,6 \pm 0,69	136,4 \pm 8,45	17,8 \pm 1,08	97,1 \pm 2,59	669,4 \pm 14,90	35,5 \pm 2,41	52,9 \pm 2,75
Capim massai	255,3 \pm 1,11	106,9 \pm 6,62	23,1 \pm 1,40	98,2 \pm 2,62	699,9 \pm 15,61	30,6 \pm 2,08	43,7 \pm 2,28
Capim suazi	203,2 \pm 0,89	133,1 \pm 8,24	29,5 \pm 1,79	84,4 \pm 2,25	660,3 \pm 14,73	38,0 \pm 2,59	57,6 \pm 3,00
Silagem de milho	250,7 \pm 1,09	82,2 \pm 5,10	27,6 \pm 1,68	53,0 \pm 1,41	466,7 \pm 10,38	29,7 \pm 2,02	63,5 \pm 3,30
Feno tifton	808,7 \pm 3,52	166,2 \pm 10,30	10,7 \pm 0,65	61,1 \pm 1,63	741,3 \pm 16,50	49,0 \pm 3,33	66,1 \pm 3,44
Feno alfafa	824,3 \pm 3,59	245,1 \pm 15,18	15,6 \pm 0,95	103,1 \pm 2,75	434,8 \pm 9,68	74,8 \pm 5,08	171,8 \pm 8,94
Amendoim	188,6 \pm 0,82	235,4 \pm 14,58	8,5 \pm 0,52	93,7 \pm 2,50	499,2 \pm 11,11	101,6 \pm 6,91	203,4 \pm 10,58
Desmódio	254,4 \pm 1,12	113,3 \pm 7,02	15,7 \pm 0,95	59,6 \pm 1,59	549,3 \pm 12,25	125,3 \pm 8,52	227,9 \pm 11,87
Galactia	258,1 \pm 1,12	240,5 \pm 14,91	12,5 \pm 0,76	104,0 \pm 2,78	420,8 \pm 9,36	74,9 \pm 5,09	177,9 \pm 9,27
Kudzu	159,5 \pm 0,69	214,2 \pm 13,27	10,6 \pm 0,64	107,0 \pm 2,85	516,2 \pm 11,49	76,0 \pm 5,17	147,2 \pm 7,66
Macrotiloma	152,3 \pm 0,66	166,6 \pm 10,32	21,0 \pm 1,27	82,5 \pm 2,20	492,5 \pm 10,98	68,0 \pm 4,62	137,9 \pm 7,18
Cunhã	207,3 \pm 0,91	220,3 \pm 13,65	31,0 \pm 1,88	68,6 \pm 1,83	465,8 \pm 10,36	77,0 \pm 5,23	165,2 \pm 8,59
Silagem de espiga de milho	380,8 \pm 1,66	76,5 \pm 4,74	33,4 \pm 2,03	22,6 \pm 0,60	260,3 \pm 5,79	12,0 \pm 0,82	46,2 \pm 2,41
Feno de azevém	825,0 \pm 3,59	102,0 \pm 6,32	12,8 \pm 0,78	66,4 \pm 1,77	766,7 \pm 17,06	56,3 \pm 3,83	73,4 \pm 3,82
Sabiá	287,9 \pm 1,27	238,8 \pm 14,79	58,9 \pm 2,92	57,4 \pm 1,53	318,7 \pm 7,11	85,2 \pm 5,02	270,5 \pm 14,08

SE, erro padrão; SE_(MS)=1,00 g/kg de matéria natural; SE_(PB)=1,03 g/kg MS; SE_(GB)=1,03 g/kg MS; SE_(Cinzas)=1,01 g/kg MS; SE_(aFDNmo)=1,01 g/kg MS; SE_(Lig)=1,03 g/kg MS; SE_(Lig/aFDNmo)=1,03 g/kg MS

*MS, matéria seca, g/kg de matéria natural.

‡PB, proteína bruta, GB, gordura bruta, aFDNmo, matéria orgânica fibrosa e LDA, lignina em detergente ácido e ácido sulfúrico a 72%, todos expressos em g/kg de MS.

§LDA/aFDNmo, quantidade de lignina na matéria orgânica fibrosa, g/kg aFDNmo.

Foram feitas tentativas de ajuste utilizando a função nlme do pacote nlme do software R, no entanto os modelos que levavam em consideração a heterogeneidade da fração fibrosa (Eq. 6, 8 e 10) não ajustaram aos perfis de degradação gravimétricos por falta de convergência do algoritmo e, por esse motivo, os ajustes foram feitos utilizando-se alternativamente o procedimento NLMIXED do pacote estatístico SAS. Os modelos descritos pelas Eq. (5) a (10) combinadas com as Eq. (19) a (21) foram comparados com base nos critérios de informação após ajuste ao conjunto de todos os perfis de degradação gravimétrica da fibra, de todas as espécies estudadas empregando-se o procedimento NLMIXED do SAS. O ajuste conjunto possibilitou a comparação dos diferentes modelos (Tabela 2)

Tabela 2. Modelos ajustados para a degradação gravimétrica da fibra, utilizando ajuste conjunto para todas as espécies forrageiras.

Modelo [‡]	AICCr [†]	Δ_r [†]	w_r [†]	ER _r [†]	Θ_r [†]
G6G1 [‡] (Eq. 10 e 21*)	-5478	0	0,999	1	144
G7G1 [‡] (Eq. 10 e 21*)	-5445	33	10 ⁻⁸	10 ⁷	144
G4G1 [‡] (Eq. 10 e 21*)	-5443	35	10 ⁻⁸	10 ⁷	144
G6G1 [‡] (Eq. 10 e 19*)	-5342	136	10 ⁻³⁰	10 ²⁹	126
GMM [‡] (Eq. 7 e 20*)	-5300	178	10 ⁻³⁹	10 ³⁸	108
GMM [‡] (Eq. 8 e 20*)	-5166	312	10 ⁻⁶⁸	10 ⁶⁷	162
G8G1 (Eq. 9 e 21*)	-5162	316	10 ⁻⁶⁹	10 ⁶⁸	108
G3G1 [‡] (Eq. 10 e 19)	-5079	399	10 ⁻⁸⁷	10 ⁸⁶	109
GMM [‡] (Eq. 7 e 19)	-4940	538	10 ⁻¹¹⁷	10 ¹¹⁶	73
G8G1 [‡] (Eq. 9 e 19)	-4851	627	10 ⁻¹³⁷	10 ¹³⁶	73
GMM [‡] (Eq. 8 e 19)	-4814	664	10 ⁻¹⁴⁵	10 ¹⁴⁴	127
Exp (Eq. 5 e 19)	-4527	951	10 ⁻²⁰⁷	10 ²⁰⁶	55
Exp [‡] (Eq. 6 e 19)	-4481	997	10 ⁻²¹⁷	10 ²¹⁶	91

[‡] Detalhes dos modelos estão no texto. [‡] Não estimou o erro padrão dos parâmetros. *por espécie.

[†]AICCr, critério de informação de Akaike corrigido para o r-ésimo modelo; Δ_r , diferença de AICc entre os modelos; w_r , probabilidade de verossimilhança para o r-ésimo modelo; ER_r, razão de evidência do r-ésimo modelo; Θ_r , número de parâmetros do r-ésimo modelo.

Apesar de o modelo G6G1 ter apresentado maior aderência aos dados e matriz Hessiana positiva definida, nem todos os parâmetros foram estimados com os seus respectivos erros padrão, o que limita a inferência a partir deste modelo. Este problema foi observado para os demais modelos que contabilizavam a heterogeneidade da fibra, com exceção do modelo exponencial. Contudo, quando comparado pelo critério de informação, o modelo exponencial apresentou menor verossimilhança de ajuste aos perfis. No entanto, como o modelo G6G1 com frações heterogêneas para a fibra das diferentes espécies forrageiras e com variâncias

heterogêneas descrito pelas Eq. (10) e (21) foi o que melhor aderiu aos dados, assim foi efetuado um ajuste individualizado, isto é, considerando os perfis para cada forrageira empregando-se todos os modelos descritos. Neste caso, foram consideradas repetições as corridas de incubação para cada espécie forrageira, para cada tempo (Tabela 3).

Tabela 3. Modelos ajustados para a degradação gravimétrica da fibra, utilizando ajuste individual por espécie forrageira.

Espécie Forrageira	Modelo [£]	AICc _r [†]	Δ_r [†]	w _r [†]	ER _r [†]	Θ_r [†]
Andropogon	G8G1 (Eq. 10 e 21)	-344,6	0	0,193	1	8
	G5G1* (Eq. 10 e 21)	-343,1	1,5	0,091	2,1	8
Brizanta	G8G1 (Eq. 10 e 21)	-286,4	0	0,177	1	8
	G7G1 (Eq. 10 e 21)	-286,4	0	0,177	1	8
	G4G1* (Eq. 10 e 21)	-285,4	1,0	0,107	1,7	8
Coast cross	G7G1 (Eq. 10 e 21)	-373,4	0	0,215	1	8
	G4G1* (Eq. 10 e 21)	-371,7	1,7	0,092	2,3	8
Capim-elefante	GMM* (Eq. 8 e 20)	-338,1	0	0,437	1	9
Capim massai	GMM* (Eq. 8 e 20)	-362,7	0	0,696	1	9
Capim suazi	G6G1 (Eq. 10 e 19)	-341,9	0	0,122	1	7
	G4G1* (Eq. 10 e 19)	-341,5	0,4	0,100	1,2	7
Silagem de milho	GMM [€] (Eq. 8 e 20)	-315,3	0	0,426	1	9
	G3G1* (Eq. 10 e 21)	-302,5	12,8	0,001	602	8
Feno tifton	G7G1 (Eq. 10 e 19)	-378,9	0	0,295	1	7
	G5G1* (Eq. 10 e 19)	-377	1,9	0,114	2,6	7
Feno alfafa	GMM [§] (Eq. 8 e 20)	-283,7	1	0,995	1	9
	GMM* (Eq. 7 e 20)	-273,1	10,6	0,005	200	6
Amendoim	GMM* (Eq. 8 e 20)	-285,1	0	0,825	1	9
Desmódio	G7G1 (Eq. 9 e 21)	-324,9	0	0,214	1	6
	G5G1* (Eq. 9 e 21)	-324,1	0,8	0,143	1,5	6
Galactia	GMM [€] (Eq. 8 e 20)	-295,5	0	0,877	1	9
	G5G1* (Eq. 9 e 21)	-279,6	15,9	0,001	2834	6
Kudzu	GMM* (Eq. 7 e 20)	-338,6	0	0,380	1	6
Macrotiloma	GMM (Eq. 8 e 20)	-283,8	0	0,620	1	9
	GMM* (Eq. 7 e 20)	-282,8	1,0	0,376	1,7	6
Cunhã	GMM [€] (Eq. 8 e 20)	-321,5	0	0,998	1	9
	G8G1* (Eq. 10 e 21)	-301,4	20,1	10 ⁻⁵	23156	8
Silagem de espiga de milho	G2G1 (Eq. 10 e 21)	-248,1	0	0,388	1	8
	G3G1* (Eq. 10 e 21)	-247,2	0,9	0,247	1,6	8
Feno de azevém	GMM (Eq. 8 e 20)	-352,3	0	0,341	1	9
	G7G1* (Eq. 10 e 21)	-352	0,3	0,293	1,2	8
Sabiá	GMM* (Eq. 7 e 20)	-229,2	0	0,271	1	6

[£] Detalhes dos modelos estão no texto. * Melhor escolha para cada espécie forrageira. [€] Modelo produziu um comportamento supostamente não biológico. [§] Hessiano não positivo definido e a matriz de covariância não foi de posto completo.

[†]AICc_r, critério de informação de Akaike corrigido para o r-ésimo modelo; Δ_r , diferença de AICc entre os modelos; w_r, probabilidade de verossimilhança para o r-ésimo modelo; ER_r, razão de evidência do r-ésimo modelo; Θ_r , número de parâmetros do r-ésimo modelo.

Os ajustes individualizados por espécie produziram estimativas paramétricas por ponto e por intervalo, o que permitiu o estabelecimento de inferências seguras (Tabela

4 e Figura 1). Os modelos que apresentaram os melhores ajustes foram os descritos pelas Eq. (7) a (10) combinadas com as Eq. (19) a (21) como funções de variância (Tabela 3). Os modelos ajustados possibilitaram a identificação da heterogeneidade da fração fibrosa em 67% das espécies forrageiras estudadas.

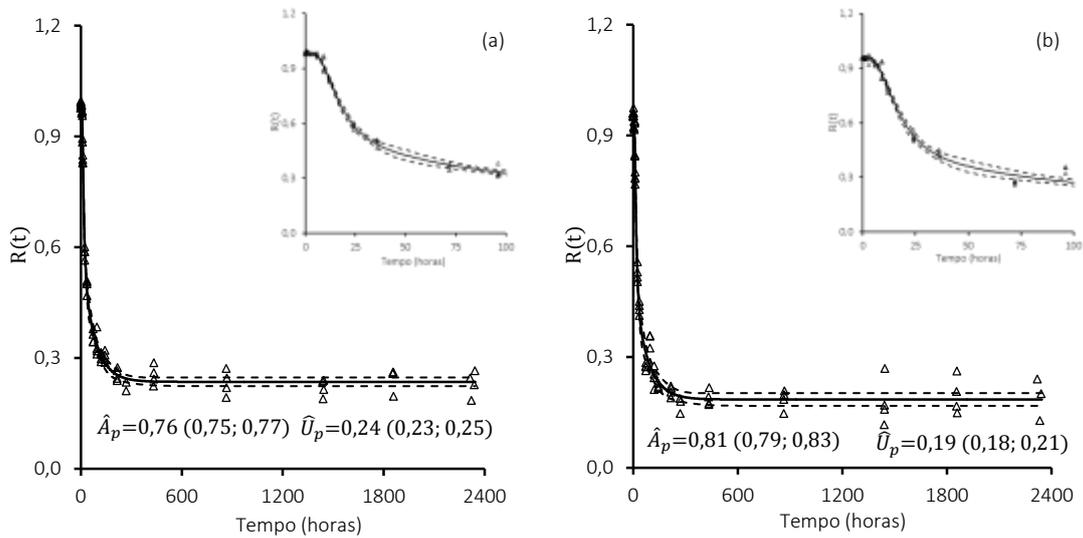
Tabela 4. Estimativa dos parâmetros e seus respectivos erros padrão entre parênteses (SE) do modelo mais verossímil ajustado para cada espécie forrageira.

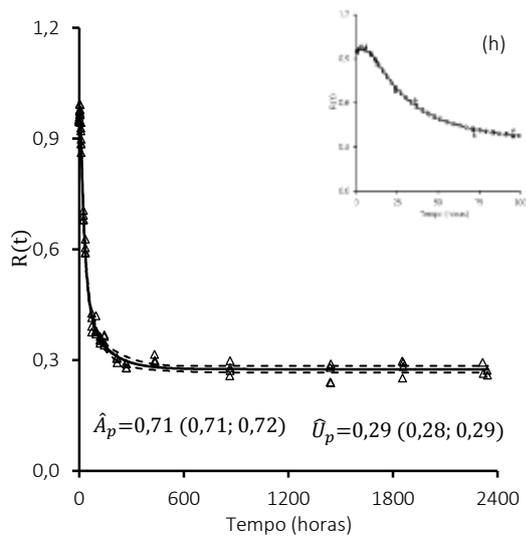
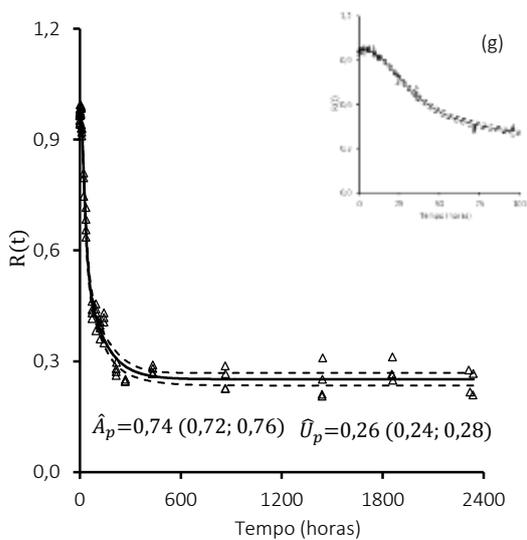
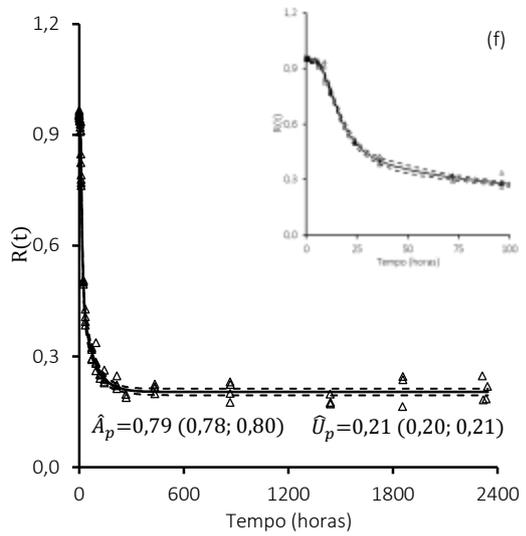
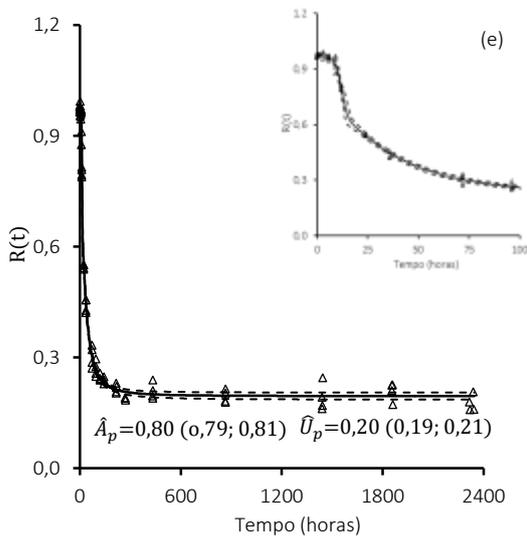
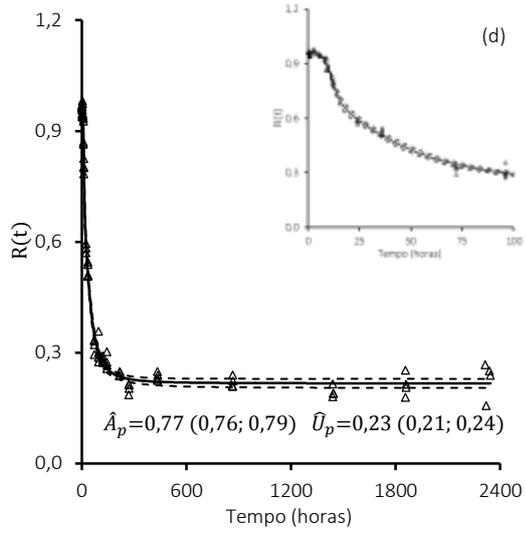
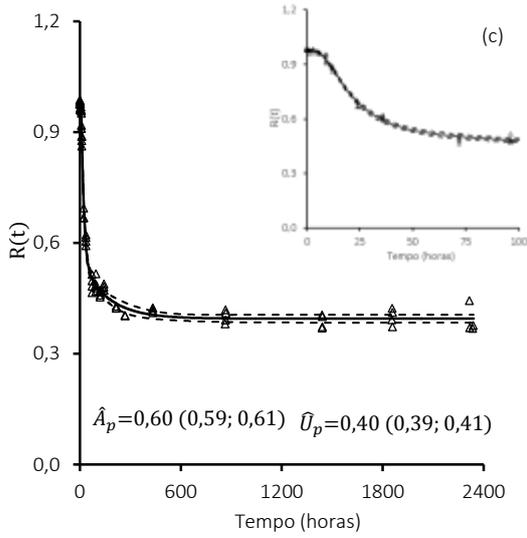
Espécie	Modelo [£]	Parâmetros de $\hat{\mu}_{Y_t}$ (SE)	Parâmetros de $\sigma_{Y_t}^2$ (SE)
Andropogon	G5G1 Eq. (10)	$\hat{A} = 0,750$ (0,0075); $\hat{A}_1 = 0,5615$ (0,0968); $\hat{\lambda} = 0,559$ (0,0752); $\hat{k}_1 = 0,112$ (0,0508); $\hat{k}_2 = 0,014$ (0,0003); $\hat{U} = 0,236$ (0,0059)	$\hat{\sigma} = 0,016$ (0,0023); $\hat{\psi} = -0,333$ (0,1406)
Brizanta	G4G1 Eq. (10)	$\hat{A} = 0,772$ (0,0106); $\hat{A}_1 = 0,615$ (0,1043); $\hat{\lambda} = 0,453$ (0,0742); $\hat{k}_1 = 0,109$ (0,0501); $\hat{k}_2 = 0,013$ (0,0039); $\hat{U} = 0,185$ (0,0086)	$\hat{\sigma} = 0,021$ (0,0032); $\hat{\psi} = -0,352$ (0,1271)
Coast cross	G4G1 Eq. (10)	$\hat{A} = 0,583$ (0,0062); $\hat{A}_1 = 0,740$ (0,0449); $\hat{\lambda} = 0,456$ (0,0353); $\hat{k}_1 = 0,069$ (0,0095); $\hat{k}_2 = 0,006$ (0,0018); $\hat{U} = 0,395$ (0,0053)	$\hat{\sigma} = 0,011$ (0,0017); $\hat{\psi} = -0,682$ (0,2401)
Capim- elefante	GMM Eq. (8)	$\hat{A} = 0,744$ (0,0090); $\hat{A}_1 = 0,360$ (0,0857); $\hat{c}_1 = 5,467$ (1,3687); $\hat{K}_1 = 12,18$ (0,535); $\hat{c}_2 = 2,040$ (0,2762); $\hat{K}_2 = 44,73$ (6,668); $\hat{U} = 0,217$ (0,0063)	$\hat{\sigma} = 0,020$ (0,0019); $\hat{\theta} = 0,0005$ (0,00023)
Capim massai	GMM Eq. (8)	$\hat{A} = 0,782$ (0,0075); $\hat{A}_1 = 0,338$ (0,0546); $\hat{c}_1 = 10,620$ (5,8864); $\hat{K}_1 = 12,34$ (0,256); $\hat{c}_2 = 1,845$ (0,1224); $\hat{K}_2 = 35,06$ (3,576); $\hat{U} = 0,194$ (0,0049)	$\hat{\sigma} = 0,017$ (0,0016); $\hat{\theta} = 0,0005$ (0,00024)
Capim suazi	G4G1 Eq. (10)	$\hat{A} = 0,748$ (0,0074); $\hat{A}_1 = 0,633$ (0,0522); $\hat{\lambda} = 0,396$ (0,0685); $\hat{k}_1 = 0,159$ (0,0774); $\hat{k}_2 = 0,015$ (0,0024); $\hat{U} = 0,204$ (0,0046)	$\hat{\sigma} = 0,021$ (0,0017)
Silagem de milho	G3G1 Eq. (10)	$\hat{A} = 0,721$ (0,0100); $\hat{A}_1 = 0,600$ (0,0562); $\hat{\lambda} = 0,100$ (0,0114); $\hat{k}_1 = 0,681$ (0,8965); $\hat{k}_2 = 0,009$ (0,0015); $\hat{U} = 0,251$ (0,0085)	$\hat{\sigma} = 0,020$ (0,0029); $\hat{\psi} = -0,448$ (0,1623)
Feno tifton	G5G1 Eq. (10)	$\hat{A} = 0,690$ (0,0065); $\hat{A}_1 = 0,724$ (0,0751); $\hat{\lambda} = 0,574$ (0,0531); $\hat{k}_1 = 0,043$ (0,0058); $\hat{k}_2 = 0,008$ (0,0022); $\hat{U} = 0,275$ (0,0045)	$\hat{\sigma} = 0,018$ (0,0015)
Feno alfafa	GMM Eq. (7)	$\hat{A} = 0,501$ (0,0118); $\hat{c} = 2,257$ (0,2087); $\hat{K} = 21,79$ (1,038); $\hat{U} = 0,459$ (0,0068)	$\hat{\sigma} = 0,028$ (0,0028); $\hat{\theta} = 0,0007$ (0,00023)
Amendoim	GMM Eq. (8)	$\hat{A} = 0,590$ (0,0315); $\hat{A}_1 = 0,7533$ (0,0571); $\hat{c}_1 = 2,808$ (0,4109); $\hat{K}_1 = 24,47$ (0,962); $\hat{c}_2 = 0,566$ (0,2268); $\hat{K}_2 = 14,58$ (17,495); $\hat{U} = 0,450$ (0,0293)	$\hat{\sigma} = 0,020$ (0,0019); $\hat{\theta} = 0,0022$ (0,00026)
Desmódio	G5G1 Eq. (9)	$\hat{A} = 0,350$ (0,0073); $\hat{\lambda} = 0,586$ (0,0775); $\hat{k} = 0,032$ (0,0032); $\hat{U} = 0,648$ (0,0065)	$\hat{\sigma} = 0,012$ (0,0017); $\hat{\psi} = -2,549$ (0,4283)
Galactia	G5G1 Eq. (9)	$\hat{A} = 0,559$ (0,0130); $\hat{\lambda} = 40,418$ (254,1800); $\hat{k} = 0,031$ (0,0018); $\hat{U} = 0,519$ (0,0072)	$\hat{\sigma} = 0,023$ (0,0035); $\hat{\psi} = -0,910$ (0,3118)

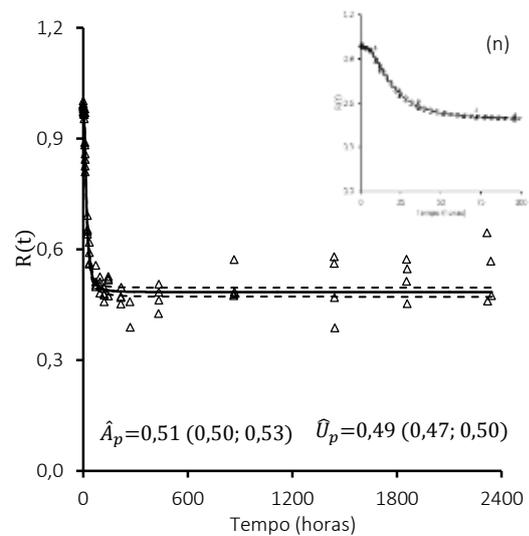
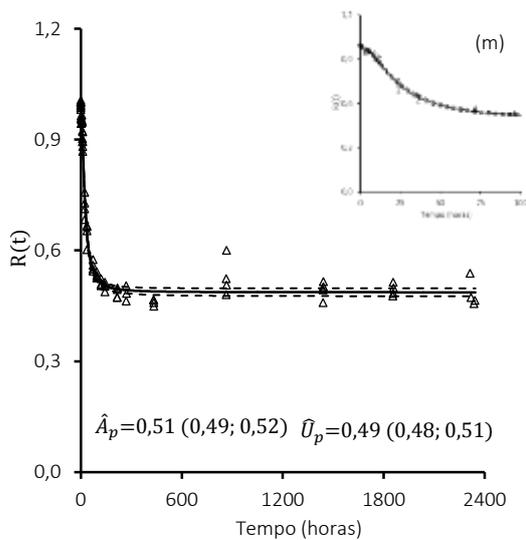
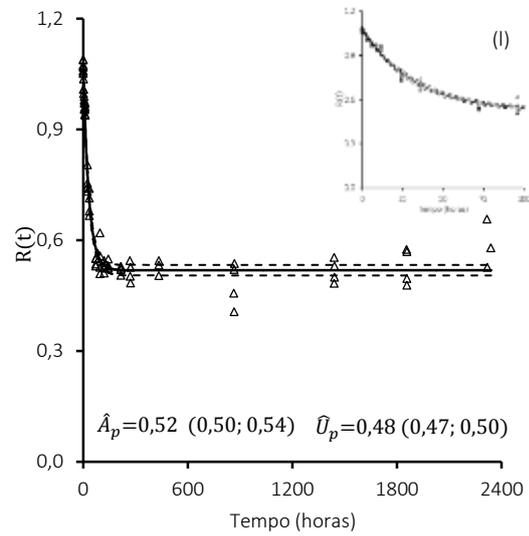
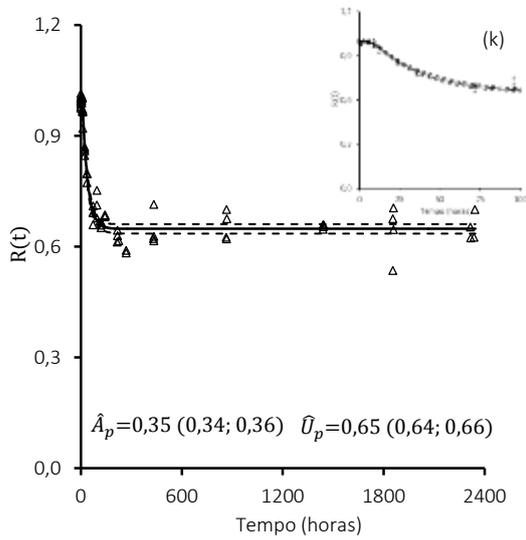
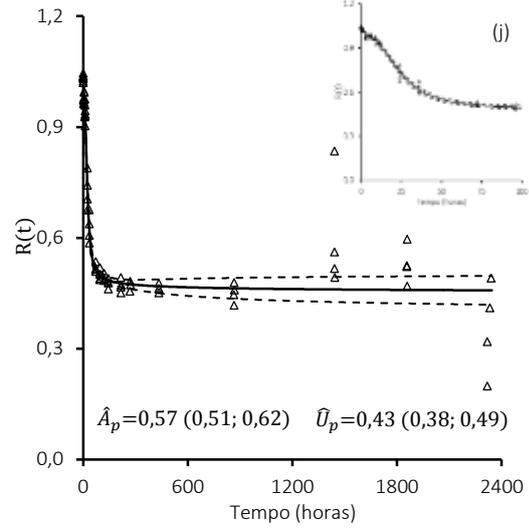
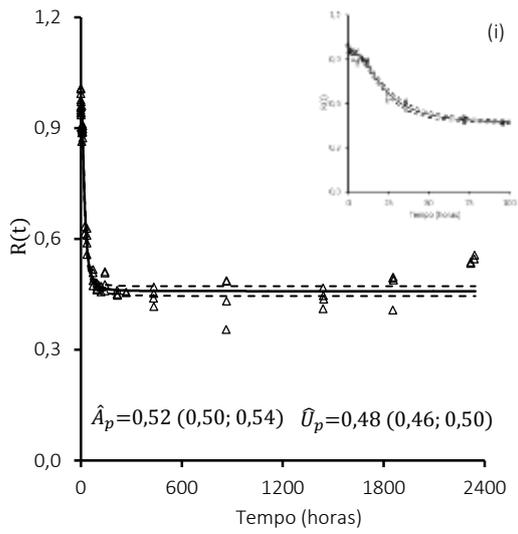
Tabela 4. (Cont.)

Espécie	Modelo [‡]	Parâmetros de $\hat{\mu}_{Y_t}$ (SE)	Parâmetros de $\sigma_{Y_t}^2$ (SE)
Kudzu	GMM Eq. (7)	$\hat{A} = 0,503$ (0,0089); $\hat{c} = 1,823$ (0,1038); $\hat{K} = 23,73$ (0,851); $\hat{U} = 0,487$ (0,0053)	$\hat{\sigma} = 0,020$ (0,0021); $\hat{\theta} = 0,0007$ (0,00031)
Macrotiloma	GMM Eq. (7)	$\hat{A} = 0,507$ (0,0103); $\hat{c} = 2,267$ (0,1583); $\hat{K} = 18,53$ (0,719); $\hat{U} = 0,484$ (0,0062)	$\hat{\sigma} = 0,025$ (0,0025); $\hat{\theta} = 0,0012$ (0,00027)
Cunhã	G8G1 Eq. (10)	$\hat{A} = 0,432$ (0,0118); $\hat{A}_1 = 0,357$ (0,0674); $\hat{\lambda} = 1,320$ (0,2343); $\hat{k}_1 = 0,092$ (0,0340); $\hat{k}_2 = 0,010$ (0,0017); $\hat{U} = 0,559$ (0,0111)	$\hat{\sigma} = 0,0139$ (0,0022); $\hat{\psi} = -2,226$ (0,4076)
Silagem de espiga de milho	G3G1 Eq. (10)	$\hat{A} = 0,760$ (0,0157); $\hat{A}_1 = 0,583$ (0,0904); $\hat{\lambda} = 0,115$ (0,0821); $\hat{k}_1 = 0,090$ (0,1713); $\hat{k}_2 = 0,009$ (0,0023); $\hat{U} = 0,215$ (0,0149)	$\hat{\sigma} = 0,024$ (0,0030); $\hat{\psi} = -0,644$ (0,1258)
Feno de azevém	G7G1 Eq. (10)	$\hat{A} = 0,666$ (0,0072); $\hat{A}_1 = 0,724$ (0,0677); $\hat{\lambda} = 0,687$ (0,0470); $\hat{k}_1 = 0,052$ (0,0072); $\hat{k}_2 = 0,007$ (0,0023); $\hat{U} = 0,285$ (0,0063)	$\hat{\sigma} = 0,014$ (0,0021); $\hat{\psi} = -0,454$ (0,1818)
Sabiá	GMM Eq. (7)	$\hat{A} = 0,208$ (0,0135); $\hat{c} = 3,542$ (0,9228); $\hat{K} = 44,34$ (6,324); $\hat{U} = 0,894$ (0,0105)	$\hat{\sigma} = 0,042$ (0,0041)

[‡] Detalhes dos modelos estão no texto. A média esperada é $\hat{\mu}_{Y_t}$ e a variância estimada é $\sigma_{Y_t}^2$.







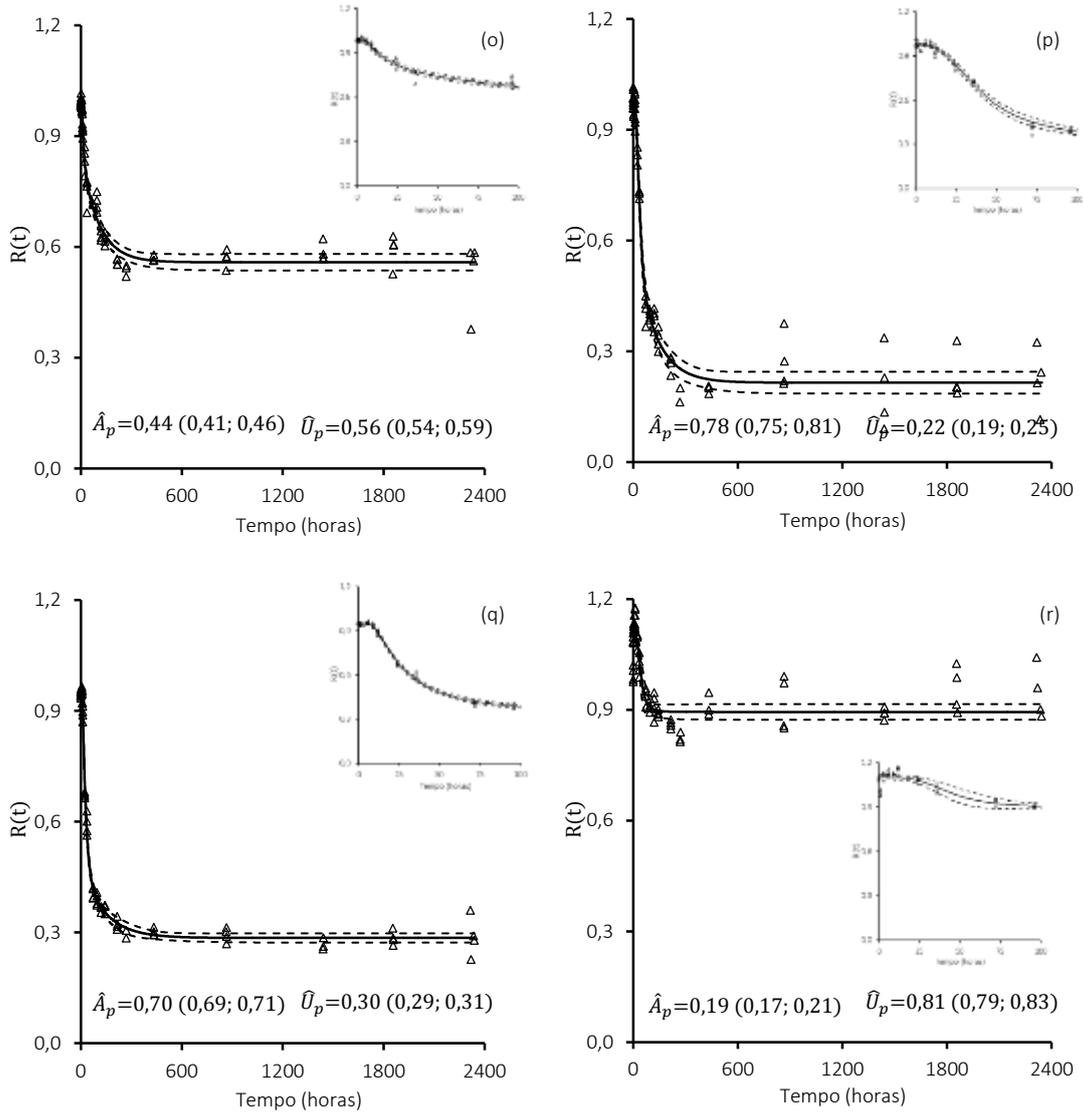


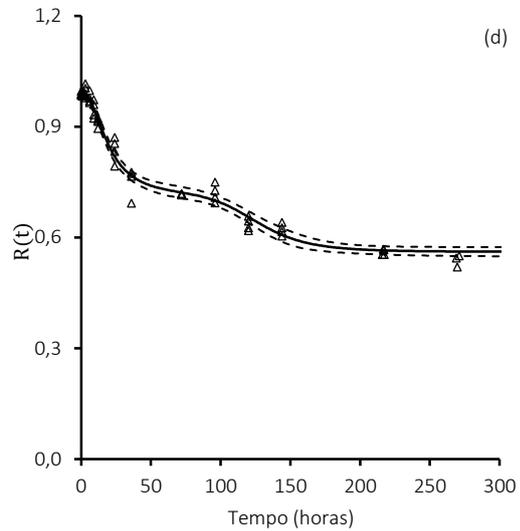
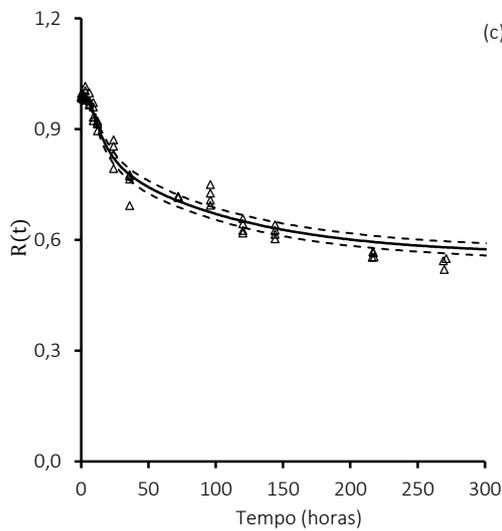
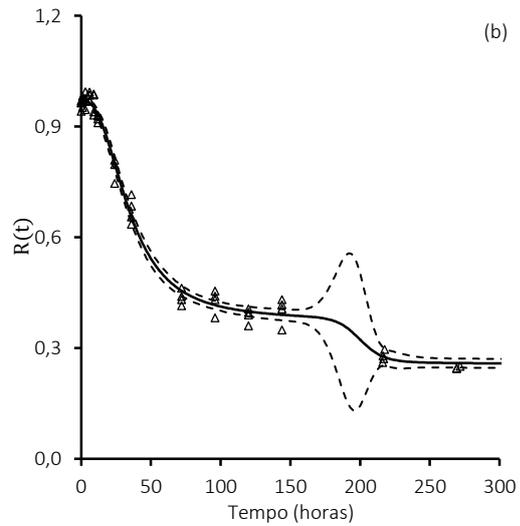
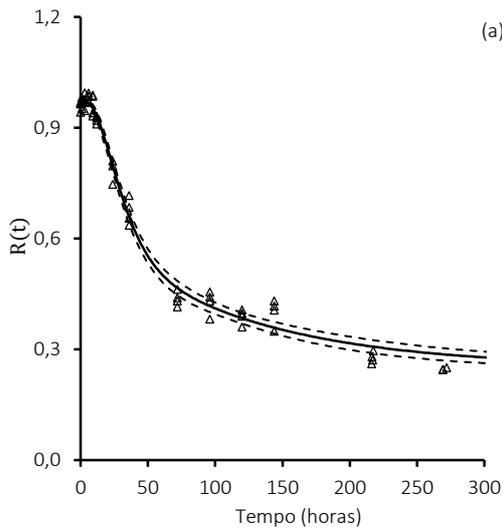
Figura 1. Perfil ajustado para cada espécie forrageira.

No detalhe de cada figura está o período até 100 horas ampliado. a) andropogon, b) brizanta, c) coast cross, d) capim-elefante, e) capim massai, f) capim suazi, g) silagem de milho, h) feno de tifton, i) feno de alfafa, j) amendoim, k) desmódio, l) galactia, m) kudzu, n) macrotiloma, o) cunhã, p) silagem de espiga de milho, q) feno de azevém e r) sabiá.

\hat{A}_p , Fração potencialmente digestível padronizada; \hat{U}_p , fração indigestível padronizada; e seus respectivos limites inferiores e superiores do intervalo de confiança a 95%.

Para a silagem de milho, cunhã e galactia o modelo que melhor se ajustou foi o descrito pelas Eq. (8) e (20), no entanto a escolha para a silagem de milho e a cunhã foi pelo modelo descrito pelas Eq. (10) e (21), já para a galactia a escolha foi pelo modelo descritos pelas Eq. (9) e (21), devido a grande flexibilidade de ajuste do primeiro modelo possivelmente produziu artefatos numéricos, ou seja, aparentemente descreveu um comportamento que talvez não pertença à realidade (Figura 2, painel a contrastado com b, painel c contrastado com d e painel e contrastado com f). Cabe salientar que a ausência de pontos no intervalo entre 144 e 212 horas certamente

contribuiu para esta incerteza. Como no modelo descrito pelas Eq. (7) e (8), a taxa de degradação é função do tempo, optou-se por se apresentar uma constante representada pela taxa de degradação até a meia-vida de consumo do substrato ($k_{1/2}$ e $k_{2/2}$) estimada consoante à detecção de frações heterogêneas ou não da fibra para as espécies em que este modelo apresentou melhor ajuste (Tabela 5).



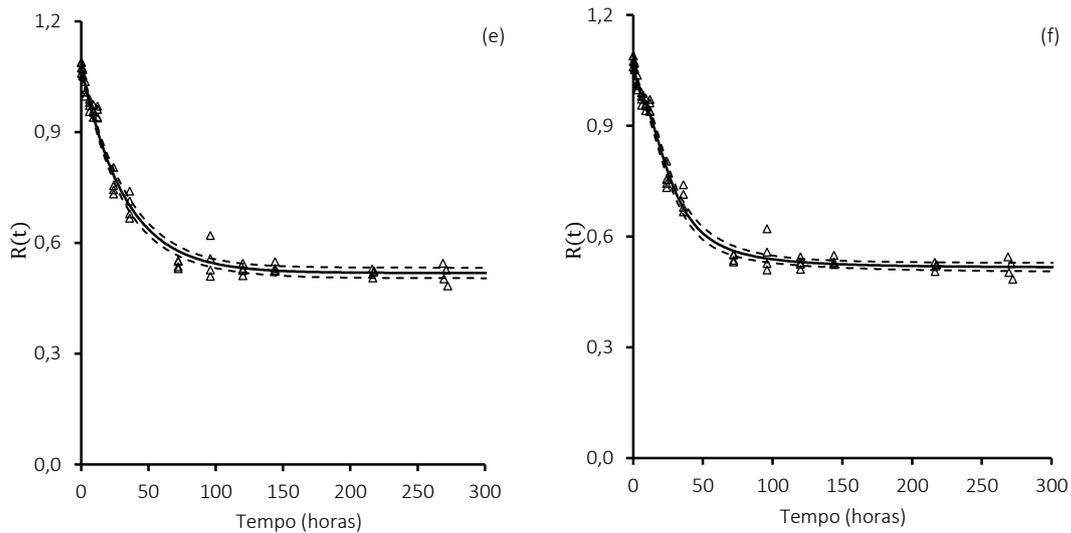


Figura 2. Comparação entre os ajustes dos modelos generalizados de Michaelis-Menten e GNG1.

a) silagem de milho, modelo GNG1 (Eq. 10); b) Silagem de milho, modelo GMM (Eq. 8); c) cunhã, modelo GNG1 (Eq. 10), d) cunhã, modelo GMM (Eq. 8), e) galactia, modelo GNG1 (Eq. 9) e f) galactia, modelo GMM (Eq. 8).

Tabela 5. Taxas de degradação estimadas (e seus respectivos limites inferiores e superiores do intervalo de confiança a 95%) para o modelo generalizado de Michaelis-Menten.

Espécie	$k_{1/2}^*$	$k_{2/2}^*$
Capim-elefante	0,224 (0,099;0,350)	0,023 (0,019;0,026)
Capim massai	0,430 (-0,057;0,918)	0,026 (0,022;0,030)
Feno alfafa	0,052 (0,041;0,063)	-
Amendoim	0,057 (0,040;0,075)	0,019 (-0,029; 0,068)
Kudzu	0,038 (0,033;0,044)	-
Macrotiloma	0,061 (0,051;0,071)	-
Sabiá	0,040 (0,012;0,068)	-

* $k_{1/2}$, (1/h), taxa de degradação até a meia-vida (K) da fração rapidamente degradável da fibra potencialmente degradável; $k_{2/2}$, (1/h), taxa de degradação até a meia-vida (K) da fração lentamente degradável da fibra potencialmente degradável.

A fração indigestível (U) estimada foi alcançada em todas as espécies forrageiras, pois, ao considerar quatro decimais para a fração U , observou-se a estabilização do valor predito, nenhuma alteração numérica do valor de \hat{R}_t para t entre 288 h (12 dias) a 2325 (97 dias) ocorreu em todas as espécies estudadas. O valor da fração U estimada foi, em média, 2,4 vezes maior nas fabáceas do que nas poáceas. Foi verificado que o ajuste individualizado para cada espécie forrageira, além de permitir a estimativa dos parâmetros e seus respectivos erros padrão, conferiu

redução nos valores globais de AICc calculados a partir dos resíduos, o que permitiu demonstrar que o ajuste por espécie forrageira não resultou em perda de informação quando comparado ao ajuste conjunto (Tabela 6). Analisando o resíduo de incubação predito para a fração rapidamente degradável da fibra (A_1) para as espécies em que o modelo mais verossímil identificou a heterogeneidade da fibra, foi possível observar que esta fração alcançou 95% de sua digestão entre 17 e 112 horas. E 95% da digestão da fibra total foi alcançada entre 68 e 271 horas para todas as espécies forrageiras estudadas.

Tabela 6. Comparação entre os ajustes geral e individual para a degradação gravimétrica da fibra.

Modelo ^ε	AICc _r [†]	Δ_r [†]	w_r [†]	ER _r [†]	Θ_r [†]
Individual	-8744,1	0	0,982	1	133
G6G1 [‡] (Eq. 10 e 21')	-8736,1	8,1	0,018	55	144

^ε Detalhes dos modelos estão no texto. [‡] Não estimou o erro padrão dos parâmetros. ^{*} por espécie.

[†]AICc_r, critério de informação de Akaike corrigido para o r-ésimo modelo computado conforme Burnham e Anderson (2004); Δ_r , diferença de AICc entre os modelos; w_r , probabilidade de verossimilhança para o r-ésimo modelo; ER_r, razão de evidência do r-ésimo modelo; Θ_r , número de parâmetros do r-ésimo modelo.

O modelo que apresentou melhor ajuste aos perfis de produção acumulada de gases foi o modelo bifásico descrito pelas Eq. (15) e (21), com efeito aleatório atribuído aos parâmetros VF_1 e VF_2 , com correlação autorregressiva contínua. No entanto, este modelo não apresentou matriz Hessiana positiva definida, o que não permitiu a estimativa dos erros padrão dos parâmetros e optou-se pelo descarte deste resultado (Tabela 7). O modelo escolhido foi o modelo bifásico descrito pelas Eq. (15) e (21), com efeito aleatório no parâmetro VF_1 e correlação autorregressiva contínua por ter apresentado matriz Hessiana positiva definida, o que permitiu a estimativa dos parâmetros e seus respectivos erros padrão (Tabela 8).

Tabela 7. Modelos ajustados para os perfis de produção acumulada de gases, utilizando ajuste ao conjunto formado por todas as espécies forrageiras

Modelo ^ε	Efeito aleatório	AICCr [†]	Δ_r [†]	w_r [†]	ER _r [†]	Θ_r [†]
Eq. (15) e (21) + vr [‡] §	VF_1, VF_2	240,1	0	1,000	1	94
Eq. (15) e (21) ‡*	VF_1	265,2	25,1	10^{-6}	10^5	94
Eq. (16) e (21) ‡	K	364,4	124,3	10^{-27}	10^{27}	112
Eq. (16) e (21)	K	427,6	187,5	10^{-41}	10^{40}	95
Eq. (15) e (21) ‡	k_2	650,2	410,1	10^{-90}	10^{89}	94
Eq. (15) e (21) + vr [‡]	k_2	674,5	434,4	10^{-95}	10^{94}	94
Eq. (15) e (21) ‡	k_2	694,2	454,1	10^{-99}	10^{98}	94
Eq. (15) e (21) ‡ + vr [‡]	-	848	607,9	10^{-133}	10^{132}	109
Eq. (12) e (21) ‡ + vr [‡]	VF_1	1491,2	1251,1	10^{-272}	10^{271}	93
Eq. (12) e (21) + vr [‡]	VF_1	1526,8	1286,7	10^{-280}	10^{279}	76

^ε Detalhes dos modelos estão no texto, em todos os modelos apresentados foi utilizado a correlação autorregressiva contínua. *Modelo escolhido. vr, variância residual; ‡ por espécie. § Hessiano não positivo definido e a matriz de covariância não foi de posto completo.

[†]AICCr, critério de informação de Akaike corrigido para o r-ésimo modelo computado conforme ; Δ_r , diferença de AICc entre os modelos; w_r , probabilidade de verossimilhança para o r-ésimo modelo; ER_r, razão de evidência do r-ésimo modelo; Θ_r , número de parâmetros do r-ésimo modelo.

Tabela 8. Estimativa dos parâmetros da cinética de produção de gases e seus respectivos erros padrão entre parênteses (SE).

Espécie	Parâmetros [£] de $\hat{\mu}_{Y_t}$ (SE)	Parâmetros [£] de $\sigma_{Y_t}^2$ IC a 95%)
Andropogon	$\widehat{VF}_1=0,77$ (0,158) ; $\widehat{k}_1=2,110$ (0,3141) ; $\widehat{VF}_2=22,35$ (0,716) ; $\widehat{k}_2=0,036$ (0,0014)	$\psi=0,735 \pm 0,0499$
Brizanta	$\widehat{VF}_1=0,64$ (0,158) ; $\widehat{k}_1=3,188$ (1,4432) ; $\widehat{VF}_2=25,49$ (0,787) ; $\widehat{k}_2=0,044$ (0,0017)	$\psi=0,728 \pm 0,0617$
Coast cross	$\widehat{VF}_1=0,83$ (0,154) ; $\widehat{k}_1=4,054$ (2,2716) ; $\widehat{VF}_2=21,57$ (0,525) ; $\widehat{k}_2=0,038$ (0,0012)	$\psi=0,635 \pm 0,0662$
Capim-elefante	$\widehat{VF}_1=0,67$ (0,163) ; $\widehat{k}_1=2,212$ (0,6230) ; $\widehat{VF}_2=24,03$ (0,953) ; $\widehat{k}_2=0,036$ (0,0018)	$\psi=0,795 \pm 0,0511$
Capim massai	$\widehat{VF}_1=0,67$ (0,164) ; $\widehat{k}_1=2,195$ (0,5672) ; $\widehat{VF}_2=24,60$ (1,033) ; $\widehat{k}_2=0,038$ (0,0019)	$\psi=0,820 \pm 0,0384$
Capim suazi	$\widehat{VF}_1=0,87$ (0,179) ; $\widehat{k}_1=1,739$ (0,4130) ; $\widehat{VF}_2=24,62$ (0,919) ; $\widehat{k}_2=0,041$ (0,0019)	$\psi=0,784 \pm 0,0449$
Silagem de milho	$\widehat{VF}_1=1,55$ (0,313) ; $\widehat{k}_1=0,776$ (0,1500) ; $\widehat{VF}_2=26,03$ (0,872) ; $\widehat{k}_2=0,050$ (0,0023)	$\psi=0,748 \pm 0,0442$
Feno tifton	$\widehat{VF}_1=1,05$ (0,158) ; $\widehat{k}_1=2,692$ (0,6148) ; $\widehat{VF}_2=21,67$ (0,699) ; $\widehat{k}_2=0,030$ (0,013)	$\psi=0,715 \pm 0,0589$
Feno alfafa	$\widehat{VF}_1=1,40$ (0,169) ; $\widehat{k}_1=2,028$ (0,3117) ; $\widehat{VF}_2=14,79$ (0,592) ; $\widehat{k}_2=0,043$ (0,0022)	$\psi=0,759 \pm 0,0474$
Amendoim	$\widehat{VF}_1=1,06$ (0,160) ; $\widehat{k}_1=2,103$ (0,3440) ; $\widehat{VF}_2=15,09$ (0,636) ; $\widehat{k}_2=0,033$ (0,0018)	$\psi=0,776 \pm 0,0485$
Desmódio	$\widehat{VF}_1=0,95$ (0,174) ; $\widehat{k}_1=1,488$ (0,2543) ; $\widehat{VF}_2=13,42$ (0,544) ; $\widehat{k}_2=0,044$ (0,0024)	$\psi=0,761 \pm 0,0536$
Galactia	$\widehat{VF}_1=0,89$ (0,159) ; $\widehat{k}_1=2,475$ (0,5715) ; $\widehat{VF}_2=14,69$ (0,546) ; $\widehat{k}_2=0,041$ (0,0020)	$\psi=0,738 \pm 0,0622$
Kudzu	$\widehat{VF}_1=1,14$ (0,161) ; $\widehat{k}_1=2,539$ (0,5253) ; $\widehat{VF}_2=17,64$ (0,653) ; $\widehat{k}_2=0,0041$ (0,0019)	$\psi=0,754 \pm 0,0532$
Macrotiloma	$\widehat{VF}_1=0,53$ (0,159) ; $\widehat{k}_1=4,743$ (3,0526) ; $\widehat{VF}_2=17,20$ (0,545) ; $\widehat{k}_2=0,0057$ (0,0024)	$\psi=0,701 \pm 0,0925$
Cunhã	$\widehat{VF}_1=0,77$ (0,172) ; $\widehat{k}_1=2,399$ (0,8174) ; $\widehat{VF}_2=18,56$ (0,694) ; $\widehat{k}_2=0,064$ (0,0033)	$\psi=0,768 \pm 0,0512$
Silagem de espiga de milho	$\widehat{VF}_1=0,32$ (0,270) ; $\widehat{k}_1=2,666$ (2,9766) ; $\widehat{VF}_2=24,51$ (1,145) ; $\widehat{k}_2=0,104$ (0,0069)	$\psi=0,771 \pm 0,0692$
Feno de azevém	$\widehat{VF}_1=1,31$ (0,169) ; $\widehat{k}_1=1,822$ (0,2680) ; $\widehat{VF}_2=21,58$ (0,892) ; $\widehat{k}_2=0,029$ (0,0015)	$\psi=0,787 \pm 0,0425$
Sabiá	$\widehat{VF}_1=0,80$ (0,160) ; $\widehat{k}_1=2,815$ (0,5255) ; $\widehat{VF}_2=12,63$ (0,517) ; $\widehat{k}_2=0,062$ (0,0033)	$\psi=0,787 \pm 0,0543$

[£] Detalhes no texto. $\hat{\sigma}=0,219 \pm 0,0205$; $\hat{\sigma}_{run}=0,103 \pm 0,1276$; $\hat{\sigma}_{frasco}=0,407 \pm 0,0565$; $\hat{\phi}=0,952 \pm 0,0100$.

O ajuste da relação entre a fração indigerível da fibra (U) e o teor de lignina na fibra (Eq. 22) permitiu demonstrar a natureza não linear desta relação em função de da potência mais verossímil para esta relação (Eq. 22) apresentar valor menor do que um (0,75; Tabelas 9 e 10). O valor 2,4 estabelecido por hipótese ao parâmetro α (Eq. 22.e) foi o que apresentou o pior ajuste (Tabela 9). O ajuste da Eq. (22.a-e) nas quais

o efeito de estudo foi incluído no modelo, isto é, o efeito do presente estudo (estudo 1) e do estudo de Chandler et al. (1980), denominado estudo 2, provou-se mais verossímil do que a análise de todo o conjunto de dados formados pelos dois estudos. No entanto, no ajuste realizado sem considerar o efeito de estudo é importante notar que uma única variância comum aos estudos foi mais verossímil (Tabela 9). O intervalo de confiança a 95% para o parâmetro α estimado com os dados do presente estudo (Eq. 22.a) incluiu o valor 2,4, no entanto, o intervalo de confiança para o parâmetro β não incluiu o expoente um (Tabela 10), o que levou ao descarte do modelo 2,4 x LDA/aFDN_{mo} como preditor da fração U. As demais hipóteses levantadas (Eq. 22.b, 22.d, 22.e) não apresentaram suporte com base nos valores de verossimilhança (Tabelas 9).

Tabela 9. Ajustes entre a fração indigestível da fibra e o teor de lignina na fibra.

Modelo ^ε	Variância ^ε	AICc _r [†]	Δ_r [†]	w_r [†]	ER _r [†]	Θ_r [†]
Eq. (22.c) ‡	Eq. (20)	-93,1	0	0,438	1	4
Eq. (22.a) ‡	Eq. (20)	-92,0	1,1	0,253	1,7	6
Eq. (22.a) ‡	Eq. (21)	-89,7	3,4	0,080	6	6
Eq. (22.b) ‡	Eq. (20)	-89,0	4,1	0,056	8	4
Eq. (22.c) ‡	Eq. (21) ‡	-88,9	4,2	0,054	8	6
Eq. (22.c) ‡	Eq. (21)	-88,0	5,1	0,034	13	4
Eq. (22.d) ‡	Eq. (21)	-81,6	11,5	0,001	314	4
Eq. (22.c)	Eq. (21)	-69,4	23,7	10 ⁻⁶	10 ⁵	3
Eq. (22.b)	Eq. (21)	-68,4	24,7	10 ⁻⁶	10 ⁵	3
Eq. (22.a)	Eq. (21)	-66,8	26,3	10 ⁻⁷	10 ⁵	4
Eq. (22.d)	Eq. (21)	-65,2	27,9	10 ⁻⁷	10 ⁶	3
Eq. (22.e) ‡	Eq. (19) ‡	-60,9	32,2	10 ⁻⁸	10 ⁷	2
Eq. (22.e)	Eq. (19)	-54,4	38,7	10 ⁻⁹	10 ⁸	1

^ε Detalhes no texto. ‡ por estudo.

[†]AICc_r, critério de informação de Akaike corrigido para o r-ésimo modelo; Δ_r , diferença de AICc entre os modelos; w_r , probabilidade de verossimilhança para o r-ésimo modelo; ER_r, razão de evidência do r-ésimo modelo; Θ_r , número de parâmetros do r-ésimo modelo.

Foi verificada a perda de informação pelo ajuste do modelo genérico (Eq. 4) com a substituição dos parâmetros U e A pelas Eq. (23) e (24), respectivamente, e constatou-se que a perda de informação foi menor para a maioria das espécies estudadas, com exceção das seguintes espécies: coast-cross, silagem de milho, macrotiloma, cunhã e sabiá (Tabela 11). Ao considerar as substituições na forma geral, isto é, do modelo descrito pela Eq. (4), a substituição apenas do parâmetro U pela Eq. (23) melhorou a verossimilhança de ajuste do modelo aos perfis de degradação da maioria (61%) das espécies consideradas (Tabela 11). A substituição

dos parâmetros A e U pelas Eq. (23) e (24), respectivamente, aumentou a verossimilhança de ajuste do modelo para apenas 11% das espécies (Tabela 11).

Em nenhuma das espécies estudadas, o emprego do estimador $U = 2,4 \times LDA$ (Eq. 25 ou 26 com os parâmetros estimados pela Eq. 22.e) produziu melhoria da verossimilhança de ajuste. Apesar da estimativa de β resultante do ajuste da Eq. (22) com os dados de todas as espécies deste estudo ser igual a $3/4$, quando o ajuste individual foi realizado pela substituição da Eq. (4) pelas Eq. (21) e (22), o valor de β que produziu a maioria de ajustes mais verossímeis foi igual a $2/3$ (Tabelas 9 e 11).

Tabela 10. Estimativa dos parâmetros da relação entre a fração indigestível e o teor de lignina na fibra e seus respectivos erros padrão (SE).

Modelo [£]	Parâmetros de $\hat{\mu}_{Y_t}$ (SE)	Limites do IC (95%)	Parâmetros de $\sigma_{Y_t}^2$ (SE)
Eq. (22.c) ‡, (20)	$\hat{\alpha}_1=2,03$ (0,062); $\hat{\alpha}_2=1,38$ (0,073)	$\hat{\alpha}_1=(1,90; 2,16)$; $\hat{\alpha}_2=(1,23; 1,53)$	$\hat{\sigma} =0,018$ (0,0054); $\hat{c} =15,402$ (4,5500)
Eq. (22.a) ‡, (20)	$\hat{\alpha}_1=1,93$ (0,250); $\hat{\alpha}_2=2,62$ (0,744); $\hat{\beta}_1=0,730$ (0,0522); $\hat{\beta}_2=1,039$ (0,1329)	$\hat{\alpha}_1=(1,42; 2,44)$; $\hat{\alpha}_2=(1,10; 4,13)$; $\hat{\beta}_1=(0,624; 0,837)$; $\hat{\beta}_2=(0,769; 1,310)$	$\hat{\sigma} =0,016$ (0,0049); $\hat{c} =18,457$ (4,6271)
Eq. (22.b) ‡, (20)	$\hat{\alpha}_1=1,64$ (0,055); $\hat{\alpha}_2=1,14$ (0,067)	$\hat{\alpha}_1=(1,53; 1,76)$; $\hat{\alpha}_2=(1,01; 1,28)$	$\hat{\sigma} =0,018$ (0,0053); $\hat{c} =18,100$ (4,5561)
Eq. (22.d) ‡, (21)	$\hat{\alpha}_1=3,82$ (0,204); $\hat{\alpha}_2=2,43$ (0,110)	$\hat{\alpha}_1=(3,40; 4,23)$; $\hat{\alpha}_2=(2,21; 2,66)$	$\hat{\sigma} =0,235$ (0,0716); $\hat{\psi} =1,252$ (0,2722)
Eq. (22.c), (21)	$\hat{\alpha}=1,76$ (0,071)	$\hat{\alpha}=(1,62; 1,90)$	$\hat{\sigma} =0,206$ (0,0838); $\hat{\psi} =0,914$ (0,3417)
Eq. (22.b), (21)	$\hat{\alpha}=1,45$ (0,061)	$\hat{\alpha}=(1,33; 1,57)$	$\hat{\sigma} =0,305$ (0,1438); $\hat{\psi} =1,242$ (0,3878)
Eq. (22.a), (21)	$\hat{\alpha}=1,81$ (0,383); $\hat{\beta}=0,764$ (0,0943)	$\hat{\alpha}=(1,03; 2,59)$; $\hat{\beta}=(0,571; 0,956)$	$\hat{\sigma} =0,195$ (0,1065); $\hat{\psi} =0,865$ (0,4738)
Eq. (22.d), (21)	$\hat{\alpha}=2,87$ (0,114)	$\hat{\alpha}=(2,64; 3,10)$	$\hat{\sigma} =0,095$ (0,0310); $\hat{\psi} =0,156$ (0,2530)
Eq. (22.e) ‡, (19) ‡	-	-	$\hat{\sigma}_1=0,124$ (0,0207); $\hat{\sigma}_2=0,056$ (0,0105)
Eq. (22.e), (19)	-	-	$\hat{\sigma} =0,100$ (0,0125)

[£] Detalhes dos modelos estão no texto, ‡ por estudo, Subscrito 1 se refere a este estudo, e 2 ao estudo de Chandler et al. (1980).

Tabela 11. Critérios de informação (AIC_c) e medidas derivadas calculados para os modelos contendo as generalizações alométricas (Eq. 25 e 26) e a forma geral do modelo para cada espécie forrageira (Eq. 4).

Espécie	Modelo [£]	AIC _c [†]	Δ_r [†]	w_r [†]	ER _r [†]	Θ_r [†]
Andropogon	Eq. (25) e (22.c, e_1)*	-345,5	0	0,382	1	7
	Eq. (25) e (22.a, e_1)	-345,2	0,3	0,329	1,2	7
	Eq. (25) e (22.b, e_1)	-343,4	2,1	0,134	2,9	7
	Eq. (4)	-343,1	2,4	0,115	3,3	8
Brizanta	Eq. (25) e (22.b, e_c)*	-287,8	0	0,271	1	7
	Eq. (25) e (22.d, e_1)	-287,5	0,3	0,234	1,16	7
	Eq. (25) e (22.c, e_c)	-287,3	0,5	0,211	1,28	7
	Eq. (25) e (22.a, e_c)	-286,8	1	0,165	1,65	7
	Eq. (4)	-285,4	2,4	0,082	3,32	8
Coast cross	Eq. (4)*	-371,7	0	1,000	1	8
	Eq. (25) e (22.a, e_1)	-348,2	23,5	10^{-6}	10^5	7
Capim-elefante	Eq. (25) e (22.c, e_1)*	-339,3	0	0,347	1	8
	Eq. (25) e (22.a, e_1)	-338,6	0,7	0,244	1,4	8
	Eq. (4)	-338,1	1,2	0,190	1,8	9
Capim massai	Eq. (25) e (22.a, e_1)*	-365,2	0	0,398	1	8
	Eq. (25) e (22.c, e_1)	-365,2	0	0,398	1	8
	Eq. (4)	-362,7	2,5	0,114	3,5	9
Capim suazi	Eq. (25) e (22.a, e_c)*	-343,9	0	0,465	1	6
	Eq. (25) e (22.c, e_c)	-343,5	0,4	0,381	1,2	6
	Eq. (4)	-341,5	2,4	0,140	3,3	7
Silagem de milho	Eq. (4)*	-302,5	0	1	1	8
	Eq. (25) e (22.b, e_1)	-250,6	51,9	10^{-12}	10^{11}	7
Feno tifton	Eq. (25) e (22.b, e_1)*	-377,7	0	0,442	1	6
	Eq. (4)	-377	0,7	0,312	1,4	7
Feno alfafa	Eq. (4)	-273,1	0	0,302	1	6
	Eq. (25) e (22.b, e_c)*	-273,1	0	0,302	1	5
Amendoim	Eq. (25) e (22.c, e_2)*	-287	0	0,465	1	8
	Eq. (25) e (22.b, e_2)	-286,4	0,6	0,345	1,3	8
	Eq. (4)	-285,1	1,9	0,220	2,6	9
Desmódio	Eq. (26) e (22.d, e_c)*	-328	0	0,396	1	4
	Eq. (26) e (22.a, e_1)	-327,4	0,6	0,294	1,3	4
	Eq. (25) e (22.d, e_c)	-326	2	0,146	2,7	5
	Eq. (25) e (22.a, e_1)	-325,3	2,7	0,103	3,9	5
	Eq. (4)	-324,1	3,9	0,056	7,0	6
Galactia	Eq. (25) e (22.b, e_1)*	-282	0	0,563	1	5
	Eq. (25) e (22.d, e_c)	-280,5	1,5	0,266	2,1	5
	Eq. (4)	-279,6	2,4	0,170	3,3	6
Kudzu	Eq. (25) e (22.c, e_1)	-340,3	0	0,335	1	5
	Eq. (26) e (22.c, e_1)*	-340,2	0,1	0,322	1,1	4
	Eq. (4)	-338,6	1,7	0,143	2,3	6
Macrotiloma	Eq. (4)*	-282,8	0	0,980	1	6
	Eq. (26) e (22.c, e_1)	-274,2	8,6	0,013	74	4
Cunhã	Eq. (4)*	-301,4	0	0,826	1	8
	Eq. (25) e (22.c, e_1)	-297,2	4,2	0,101	8,2	7
Silagem de espiga de milho	Eq. (25) e (22.b, e_1)*	-249,7	0	0,283	1	7
	Eq. (25) e (22.a, e_1)	-249,3	0,4	0,231	1,2	7
	Eq. (25) e (22.c, e_1)	-249,1	0,6	0,209	1,3	7
	Eq. (4)	-247,2	2,5	0,081	3,5	8

Tabela 11. (Cont.)

Espécie	Modelo [‡]	AIC _{C_r} [†]	Δ_r [†]	w_r [†]	ER _r [†]	Θ_r [†]
Feno de azevém	Eq. (25) e (22.a, e_1)*	-354,5	0	0,257	1	7
	Eq. (25) e (22.c, e_1)	-354,5	0	0,257	1	7
	Eq. (25) e (22.b, e_1)	-354,3	0,2	0,232	1,1	7
	Eq. (25) e (22.d, e_1)	-353,8	0,7	0,221	1,4	7
	Eq. (4)	-352	2,5	0,074	3,5	8
Sabiá	Eq. (4)*	-229,2	0	1	1	6
	Eq. (25) e (22.d, e_c)	-225,4	43,8	10^{-10}	10^9	5

[‡]Detalhes dos modelos estão no texto. * Modelo escolhido.

[†]AIC_{C_r}, critério de informação de Akaike corrigido para o r-ésimo modelo; Δ_r , diferença de AICc entre os modelos; w_r , probabilidade de verossimilhança para o r-ésimo modelo; ER_r, razão de evidência do r-ésimo modelo; Θ_r , número de parâmetros do r-ésimo modelo.

e_1 , se refere ao presente estudo; e_2 se refere ao estudo de Chandler et al. (1980) e e_c se refere ao conjunto de dados dos dois estudos.

6. DISCUSSÃO

Yoder et al. (2014) afirmaram que alguns nutrientes, como as cinzas, podem não apresentar distribuição normal, o que é corroborado pelos resultados deste estudo em que todos os nutrientes avaliados, incluindo a relação LDA/aFDN_{mo}, apresentaram distribuição log-normal, dado o valor de lambda da transformação Box-Cox igual a zero (BOX e COX, 1964).

As tentativas de ajuste dos modelos que contabilizavam a heterogeneidade da fração fibrosa ao conjunto formado pelos perfis de todas as espécies forrageiras utilizando a função nlme do pacote nlme do software R não convergiram, principalmente devido as dificuldades encontradas em relação aos valores iniciais dos parâmetros. A ferramenta de otimização não linear é extremamente sensível aos parâmetros iniciais e ao tipo e estrutura dos problemas (NASH, 2014). O ajuste conjunto utilizando o procedimento NLMIXED do SAS permitiu estimar os parâmetros dos modelos, no entanto, os erros padrão de alguns parâmetros não foram estimados, possivelmente devido ao fato de um único modelo não se ajustar perfeitamente a todas as espécies forrageiras, principalmente no caso do modelo GNG1 (Eq. 9 e 10), no qual o termo de ordem de dependência do tempo (N) é definido a priori e muda o comportamento do modelo (VIEIRA et al., 2008a). O ajuste individualizado por espécie forrageira permitiu melhorar a qualidade do ajuste, pois reduziu o número de parâmetros e o critério de informação e suas medidas derivadas, justificando assim essa abordagem.

O ajuste individual por espécie dos perfis de degradação por longo prazo permitiu identificar a natureza heterogênea da fibra em algumas espécies forrageiras (Tabelas 3 e 4). Mertens (1973), Robinson et al. (1986), Nocek e English (1986) e van Milgen et al. (1993) identificaram que a fibra potencialmente degradável é uma fração heterogênea, sendo composta por mais que um *pool* potencialmente degradável; no entanto, Robinson et al. (1986) e van Milgen et al. (1993) consideraram que o segundo *pool* da fração potencialmente degradável da fibra é apenas um artefato matemático. Robinson et al. (1986), utilizaram incubações *in situ* de longo prazo (42 dias) e desprezaram o segundo *pool* (lentamente degradável) como sendo um artefato matemático, sem significado biológico, pois quando o segundo *pool* foi incluído no

modelo, os autores obtiveram a redução dos resíduos mas a predição do tamanho do *pool* apresentou grande variação entre as repetições. Esta grande variação na predição do tamanho do segundo *pool* pode ter ocorrido devido ao tipo de incubação utilizado (*in situ*), pois em incubações de longo prazo ocorre ganho de massa pelo influxo de partículas nos sacos de nylon e por depósitos minerais no tecido de incubação (MARINUCCI et al., 1992), bem como pelo tipo de análise utilizado (ZANTON e HEINRICHS, 2009). Mais recentemente, Van Soest et al. (2005), Ellis et al. (2005) e Vieira et al. (2008a); (2012) também identificaram o segundo *pool* da fração fibrosa.

Estudos anatômicos (AKIN et al., 1974; AKIN e AMOS, 1975) consubstanciam a existência de subfrações da fibra potencialmente degradável. Esses autores verificaram que os tecidos vegetais são degradados a taxas diferentes, por exemplo, células do mesofilo e do floema são degradadas primeiro, aparentemente sem adesão microbiana, seguidas por células da epiderme e da bainha do feixe vascular degradadas mais lentamente. Os feixes vasculares e o esclerênquima não são degradados ou são mais resilientes ao processo de digestão.

Segundo Mertens (2005), a cinética digestiva dos componentes dos alimentos deveria ser descrita pela divisão do alimento nas seguintes frações: rapidamente digestível, lentamente digestível e indigestível.

A grande dificuldade em identificar o segundo *pool* da fração potencialmente degradável da fibra pode ser devido à falta de pontos suficientes por perfil e pelo fato de o tempo final de fermentação ser curto (ROBINSON et al., 1986; ELLIS et al., 2005). Ellis et al. (2005) recomendaram que para o ajuste de modelos não lineares são necessários cinco observações por parâmetro e quando o número e a qualidade das observações são limitantes, modelos com menor número de parâmetros são recomendados. Nesse estudo, cada perfil foi formado por 76 observações e o modelo mais complexo foi composto por 9 parâmetros, o que resultou em, no mínimo, 8 observações por parâmetro. Ellis et al. (2005) utilizou espaçamento de 6 h entre os tempos de incubação até as primeiras 48 horas e 12 h até 168 h; portanto, é possível que alguns pontos entre 36 e 72 horas poderiam melhorar a qualidade dos dados.

Van Soest et al. (2005) e Raffrenato e Van Amburgh (2010) verificaram que o *pool* rapidamente degradável da fibra potencialmente degradável foi totalmente consumido entre 48 e 72 horas, diferente do que foi encontrado nesse estudo, no qual foram necessárias até 112 h para que esta fração alcançasse 95% de sua completa

digestão. Esta diferença pode ser explicada pelo tipo de análise estatística e as espécies forrageiras utilizadas. Neste estudo foi observada uma grande variação entre as espécies para o tempo de digestão da fração rapidamente degradável da fibra. Van Soest et al. (2005) utilizaram transformação logarítmica e o método de “curve peeling” no qual a escolha do tempo final de digestão de cada fração é arbitrária.

Os carboidratos fibrosos das fabáceas são digeridos em menor extensão se comparados às poáceas (DEHORITY e JOHNSON, 1961), o que pode ser corroborado pelos resultados deste estudo (Tabela 4 e Figura 1). Segundo Van Soest (1994), as fabáceas são digeridas à taxas mais elevadas e em menor extensão e as poáceas são degradadas à menores taxas e em maior extensão. Contudo, neste estudo, as taxas de degradação de poáceas e fabáceas não seguiram esse padrão (Tabelas 4 e 5).

O modelo Generalizado de Michaelis-Menten (Eq. 7 e 8) é considerado um modelo muito flexível por se ajustar aos diferentes perfis (LÓPEZ et al., 1999; DHANOA et al., 2000; LÓPEZ et al., 2000). Devido a essa grande flexibilidade este modelo pode ter produzido artefatos matemáticos no ajuste aos perfis de degradação da silagem de milho, galactia e cunhã (Figura 2), sendo preterido nesses três casos, apesar de apresentar maior verossimilhança. Um dos fatores que pode ter contribuído para este problema é a falta de observações no intervalo. Mas caso tais inflexões sejam verossímeis, a identificação da heterogeneidade pode ser feita com sucesso empregando-se tanto o modelo GMM (Eq. 8) como o modelo GNG1 (Eq. 10), exceto para a galactia utilizando o modelo GNG1 (Eq. 9).

O método de produção acumulada de gases é vantajoso se comparado ao método gravimétrico, pois, além de ser mais barato, simples e menos laborioso, permite a mensuração da fermentação dos compostos solúveis (PELL e SCHOFIELD, 1993; MALAFAIA et al., 1999). Enquanto que o modelo bifásico de degradação gravimétrico abrange as frações rapidamente e lentamente degradáveis da fibra (VIEIRA et al., 2008a), os modelos bifásicos de produção acumulada de gases abrangem os carboidratos solúveis e os carboidratos fibrosos (PELL e SCHOFIELD, 1993; CONE et al., 1997), possivelmente a maior parte dos gases produzidos pelos carboidratos fibrosos são referentes à fração rapidamente degradável da fibra. O modelo exponencial frequentemente é ajustado aos perfis de degradação gravimétricos, apresentando bons ajustes principalmente em perfis de baixa qualidade (ELLIS et al., 2005), no entanto, Beuvinck e Kogut (1993) observaram que o modelo

exponencial apresenta ajustes aos perfis de produção de gases inferiores aos modelos sigmóides. Diferente do observado neste estudo, em que o ajuste mais verossímil foi produzido por um modelo bifásico composto de dois modelos exponenciais. Convém ressaltar que os autores não testaram o modelo bifásico biexponencial e aparentemente este modelo tem a capacidade de simular a natureza sigmoide do perfil de produção acumulada de gases.

A estimativa correta da fração indigestível (U) é um ponto crítico para a obtenção de melhor ajuste dos modelos, o que implica precisão e acurácia na estimação dos parâmetros cinéticos (MERTENS, 1993). A verdadeira fração indigestível pode apenas ser alcançada após infinito tempo de fermentação anaeróbica e qualquer ponto final de fermentação possivelmente leva à superestimação da assíntota verdadeira (MERTENS, 2005). Van Milgen et al. (1992) e Krizsan e Huhtanen (2013) observaram que o tamanho da fração indigestível dependia do ambiente ruminal no qual o alimento era incubado e concluíram que a fração indigestível não é uma característica intrínseca do alimento, pois é afetada pela dieta do animal. Entretanto, pode ser argumentado que a indigestibilidade intrínseca do alimento pode ser mensurada apenas sob condições fermentativas ótimas (*in situ*) que vão permitir a máxima extensão da degradação ou se o alimento for incubado *in vitro* (MERTENS, 2005).

O resíduo indigestível pode ser estimado de forma verossímil por ensaios biológicos como as incubações anaeróbicas de longa duração, e.g. 90 a 120 dias (CHANDLER et al., 1980). Atualmente, é aceito que a fração indigestível pode ser estimada pelo fator $2,4 \times LDA/aFDN_{mo}$ (CHANDLER et al., 1980; VAN SOEST et al., 2005). No entanto, alguns autores propuseram diferentes relações entre a fração indigestível e a proporção de LDA na fibra. Conrad et al. (1984) levou em consideração a lei da superfície em sua dedução e propôs o expoente $2/3$ na relação entre a LDA e a fração indigestível. Traxler et al. (1998) propuseram um modelo “log-log” com a relação $6.17 \times (LDA/NDF)^{0.77 \pm 0.026}$, na qual o valor do expoente foi bem próximo pontualmente e englobado pelo intervalo de confiança obtidos neste estudo (Tabelas 9 e 10), o que corrobora a relação não linear (lei da superfície da partícula) entre o teor de LDA e a fração U observada por Conrad et al. (1984). Krämer et al. (2012) encontraram por meio de um tratamento empírico dos dados uma ampla faixa de variação para relação LDA/aFDN_{mo} e a fração U e concluíram que equações de regressão lineares múltiplas contendo mais componentes da composição química

como preditores rendem estimativas para a fração U mais acuradas. Além disso, esses autores asseveram que uma equação universal para a predição não produz resultados satisfatórios. Raffrenato e Van Amburgh (2010) recomendam que um fator diferente para cada tipo de forrageira melhora a predição da fração indigestível. Palmonari et al. (2016), para contornar a grande variabilidade encontrada para a relação $LDA/aFDN_{mo}$ e U sugeriram que estimar diretamente a fração indigestível com fermentações de 240 h *in vitro* é o mais indicado.

A grande variabilidade de resultados encontrados na literatura pode ser explicada pelos tempos de incubação relativamente curtos, ou seja, pela estimativa da fração indigestível ser considerada como o valor do resíduo encontrado no ponto final de fermentação (em geral 240 h) e o tipo de incubação utilizado (*in vitro* vs. *in situ*). A análise do perfil completo por meio do ajuste do modelo não linear introduz o efeito das correlações entre os parâmetros (BARD, 1974; RATKOWSKY, 1990). Além disso, os perfis de degradação *in situ*, ou outros perfis temporais tomados na mesma unidade experimental, normalmente apresentam correlação entre medidas repetidas na mesma unidade experimental, o que implica a necessidade de contabilizá-las contínuo-tempo (MATIS e HARTLEY, 1971; PINHEIRO e BATES, 2000; VONESH, 2012). A interpretação cinética usando como ferramenta os algoritmos cuja base teórica é formada pelos modelos não lineares mistos permitem contabilizar correlações entre as medidas repetidas, empregar diferentes funções de variância para contabilizar a heterogeneidade ao longo do perfil e estimar, também, a heterogeneidade entre grupos de tratamentos (PINHEIRO e BATES, 2000), o que permite a redução da pseudoaleatoriedade do problema em análise e a obtenção de resíduos menos inflacionados (LUCAS, 1964), o que aumenta a verossimilhança do modelo e a precisão das estimativas paramétricas. Em geral, os parâmetros são estimados em modelos não lineares por meio de algoritmo de mínimos quadrados não lineares e as estimativas dos parâmetros do modelo assim obtidas submetidas a uma nova análise empregando-se modelos lineares e pressuposição de normalidade, independência e homocedasticidade (VIEIRA et al., 1997; TRAXLER et al., 1998; KRÄMER et al., 2012; ABREU et al., 2014). O correto tratamento vem com a aplicação da teoria de modelos não lineares mistos, pois sobre o parâmetro são atribuídos os efeitos de tratamentos e possíveis efeitos aleatórios; a distribuição atribuída aos parâmetros é, portanto, consequência da distribuição pressuposta para a variável, no caso a degradação ruminal ou resíduo de incubação. Ao analisar várias corridas

simultaneamente, as informações são analisadas de forma conjunta e as inferências assim obtidas são mais seguras. Por isso é que talvez, à luz dessas novas formas de interpretação cinética, seja possível caminhar para a obtenção de estimativas mais reprodutíveis. O ajuste de modelos não lineares aos perfis de longo prazo do presente estudo parece corroborar estimativas que não lograram aceitação geral, como a estimativa $2/3$ encontrada por Conrad et al. (1984), mas apenas com o tempo, após o acúmulo de informações comparáveis, poderemos asseverar que a relação entre o indigestível verdadeiro e a relação LDA/aFDN_{mo} pode, de fato, render estimativas acuradas para efeito de aplicação. Pelo menos quanto ao ajuste da Eq. (22.b), este expoente parece mostrar a importância da composição química e o arranjo tridimensional da partícula, o que define o tipo de fibra que será exposto à digestão e qual a extensão de superfície de partícula que a contém será susceptível de adesão microbiana.

Diversos autores desconsideram o tipo de forrageira na avaliação da relação entre lignina e a fração indigestível (CONRAD et al., 1984; VAN SOEST, 1993; TRAXLER et al., 1998). Traxler et al. (1998) avaliaram o efeito da tipo de lignina (lignina em permanganato e LDA) e tipos de forrageiras e encontraram coeficientes similares para poáceas C3 e C4 e pequenas diferenças entre poáceas e fabáceas. Os autores concluíram que o resultado obtido com o uso de equações para cada tipo de forrageira na predição da fração U não pode ser, na prática, considerado biologicamente diferente do predito pela equação geral. A vantagem de se utilizar uma equação geral reside no fato de se buscar uma teoria unificadora para explicar a relação entre as variáveis; estas análises têm sido historicamente empregadas no estudo de escalonamento de várias relações biológicas, como a produção de calor em jejum, a frequência cardíaca e outras características com a massa corporal dos animais (WEST et al., 1997; HUI e JACKSON, 2007), os resultados da literatura para o expoente da LDA/aFDN_{mo} e a fração indigestível variam; como exemplo, $\beta = 1$ (CHANDLER et al., 1980; VAN SOEST et al., 2005) e $\beta = 2/3$ (CONRAD et al., 1984; WEISS, 1993; NRC, 2001) foram pressupostos *a priori* para o ajuste; Traxler et al. (1998) fizeram o ajuste dos modelos após linearização por meio de transformação logarítmica e encontraram estimativas para β que variaram de 0.76 a 1.08, mas o valor geral estimado foi o de $0.77 (\pm 0.026)$. Existe alta correlação entre os parâmetros do modelo “alométrico” (VIEIRA et al., 2008b) e as estimativas são dependentes dos dados e é muito difícil a inferência com absoluta segurança dos valores paramétricos

populacionais. Contudo, é desafiando a estimativa em diferentes modelos que esse risco pode ser atenuado, como no caso dos resultados com o ajuste da Eq. (22.b).

Com o ajuste alométrico entre a fração U estimada e o teor de LDA na aFDNmo, os resultados do presente estudo se aproximaram do expoente (β) encontrado por Traxler et al. (1998), no entanto o valor α encontrado por aqueles autores (6,17) foi muito superior ao deste estudo; vale ressaltar que os autores utilizaram incubações *in vitro* em sacos (F57, ANKOM Technology Corp., Fairport, NY) até 144h e transformação logarítmica na análise dos dados. Quando foram feitas substituições na Eq. (4) pelas relações alométricas (Eq. 25 e 26), a maioria dos melhores resultados foram produzidos com $\beta = 2/3$ e o α da relação alométrica estimado no presente trabalho.

7. CONCLUSÃO

A relação entre a fração indigestível da fibra e o teor de lignina na fibra apresenta natureza não linear.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M. L. C.; VIEIRA, R. A. M.; ROCHA, N. S.; ARAÚJO, R. P.; GLÓRIA, L. S.; FERNANDES, A. M.; LACERDA, P. D.; JÚNIOR, A. G. Clitoria ternatea L. as a Potential High Quality Forage Legume. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, p. 169-178, 2014.

AFRC. **Energy and protein requirements of ruminants**. Cambridge, UK: CAB International, 1993.

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. 19, p. 716-723, 1974.

AKIN, D. E.; AMOS, H. E. Rumen bacterial-degradation of forage cell-walls investigated by electron-microscopy. **Applied Microbiology**, v. 29, p. 692-701, 1975.

AKIN, D. E.; BURDICK, D.; MICHAELS, G. E. Rumen bacterial interrelationships with plant-tissue during degradation revealed by transmission electron-microscopy. **Applied Microbiology**, v. 27, p. 1149-1156, 1974.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. Washington: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1990.

BALDWIN, R. L.; KOONG, L. J.; ULYATT, M. J. A dynamic model of ruminant digestion for evaluation of factors affecting nutritive value. **Agricultural Systems**, v. 2, p. 255-288, 1977.

BARD, Y. **Nonlinear parameter estimation**. New York: Academic Press, Inc., 1974.

BERCHIELLI, T. T.; GARCIA, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudos de nutrição. In: BERCHIELLI, T.T., PIREZ, A.V., OLIVEIRA, S.G. (Eds.). **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006, p. 397-422.

BEUVINK, J. M. W.; KOGUT, J. Modeling gas-production kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 1041-1046, 1993.

BOSSEN, D.; MERTENS, D. R.; WEISBJERG, M. R. Influence of fermentation methods on neutral detergent fiber degradation parameters. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1464-1476, 2008.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v. 26, p. 211-252, 1964.

BRODY, S. **Bioenergetics and growth. With special reference to the efficiency complex in domestic animals.** New York: Reinhold Publishing Co., 1945.

BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. Multimodel Inference: Understanding AIC and BIC in Model Selection. **Sociological Methods & Research**, v. 33, p. 261-304, 2004.

CHANDLER, J. A.; JEWELL, W. J.; GOSSETT, J. M.; VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B. Predicting methane fermentation biodegradability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 10, p. 93-107, 1980.

CONE, J. W.; VAN GELDER, A. H.; DRIEHUIS, F. Description of gas production profiles with a three-phasic model. **Animal Feed Science and Technology**, v. 66, p. 31-45, 1997.

CONE, J. W.; VAN GELDER, A. H.; VISSCHER, G. J. W.; OUDSHOORN, L. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. **Animal Feed Science and Technology**, v. 61, p. 113-128, 1996.

CONRAD, H. R.; WEISS, W. P.; ODWONGO, W. O.; SHOCKEY, W. L. Estimating net energy lactation from components of cell solubles and cell walls. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 427-436, 1984.

DAVIES, Z. S.; MASON, D.; BROOKS, A. E.; GRIFFITH, G. W.; MERRY, R. J.; THEODOROU, M. K. An automated system for measuring gas production from forages inoculated with rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes on grass silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 83, p. 205-221, 2000.

DEHORITY, B. A.; JOHNSON, R. R. Effect of particle size upon the in vitro cellulose digestibility of forages by rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 44, p. 2242-2249, 1961.

DHANOA, M. S.; LOPEZ, S.; DIJKSTRA, J.; DAVIES, D. R.; SANDERSON, R.; WILLIAMS, B. A.; SILESHI, Z.; FRANCE, J. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: comparison of models. **British Journal of Nutrition**, v. 83, p. 131-142, 2000.

ELLIS, W. C.; MAHLOOJI, M.; MATIS, J. H. Models for estimating parameters of neutral detergent fiber digestion by ruminal microorganisms. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 1591-1601, 2005.

FAVORETO, M. G.; DERESZ, F.; FERNANDES, A. M.; VIEIRA, R. A. M.; FONTES, C. A. A. Avaliação nutricional da grama-estrela cv. Africana para vacas leiteiras em condições de pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 319-327, 2008.

FRANCE, J.; THORNLEY, J. H. M. Growth functions. In: FRANCE, J., THORNLEY, J.H.M. (Eds.). **Mathematical models in agriculture**. London: Butterworths, 1984, p. 75-94.

FRANCE, J.; THORNLEY, J. H. M.; BEEVER, D. E. A mathematical model of the rumen. **The Journal of Agricultural Science**, v. 99, p. 343-353, 1982.

GETACHEW, G.; BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 72, p. 261-281, 1998.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage fiber analysis. Agricultural handbook No. 379**. Washington, D.C.: U.S.D.A., 1970.

GRANT, R. J.; MERTENS, D. R. Impact of in vitro fermentation techniques upon kinetics of fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1263-1272, 1992.

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, p. 77-89, 1996.

HALL, M. B.; MERTENS, D. R. In vitro fermentation vessel type and method alter fiber digestibility estimates. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 301-307, 2008.

HALL, M. B.; MERTENS, D. R. A ring test of in vitro neutral detergent fiber digestibility: Analytical variability and sample ranking¹. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1992-2003, 2012.

HUHTANEN, P.; NOUSIAINEN, J.; RINNE, M. Recent developments in forage evaluation with special reference to practical applications. **Agricultural and Food Science**, v. 15, p. 293-323, 2006.

HUI, D.; JACKSON, R. B. Uncertainty in allometric exponent estimation: a case study in scaling metabolic rate with body mass. **Journal of Theoretical Biology**, v. 249, p. 168-177, 2007.

KOTTEK, M.; GRIESER, J.; BECK, C.; RUDOLF, B.; RUBEL, F. World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 15, p. 259-263, 2006.

KRÄMER, M.; WEISBJERG, M. R.; LUND, P.; JENSEN, C. S.; PEDERSEN, M. G. Estimation of indigestible NDF in forages and concentrates from cell wall composition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 177, p. 40-51, 2012.

KRISHNAMOORTHY, U.; SOLLER, H.; STEINGASS, H.; MENKE, K. H. A comparative study on rumen fermentation of energy supplements in vitro. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 65, p. 28-35, 1991.

KRIZSAN, S. J.; HUHTANEN, P. Effect of diet composition and incubation time on feed indigestible neutral detergent fiber concentration in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 1715-1726, 2013.

LOPES, F. C. F.; DORNELAS, R. A. C.; PORTUGAL, J. A. B.; CARNEIRO, J. C.; VERNEQUE, R. S.; OLIVEIRA, J. S.; ARCURI, P. B.; DUQUE, A. C. A. Digestibilidade da matéria seca de silagens de milho e de suplementos concentrados determinada por procedimentos in vitro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 1167-1173, 2010.

LÓPEZ, S.; FRANCE, J.; DHANOA, M. S.; MOULD, F.; DIJKSTRA, J. Comparison of mathematical models to describe disappearance curves obtained using the polyester bag technique for incubating feeds in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1875-1888, 1999.

LÓPEZ, S.; FRANCE, J.; GERRITS, W. J. J.; DHANOA, M. S.; HUMPHRIES, D. J.; DIJKSTRA, J. A generalized Michaelis-Menten equation for the analysis of growth. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 1816-1828, 2000.

LUCAS, H. L. Stochastic elements in biological models; their sources and significances. In: GURLAND, J. (Eds.). **Stochastic models in medicine and biology**. Madison: The University of Wisconsin Press, 1964. p. 355-383.

MALAFIAIA, P. A. M.; FILHO, S. C. V.; VIEIRA, R. A. M. Kinetic parameters of ruminal degradation estimated with a non-automated system to measure gas production. **Livestock Production Science**, v. 58, p. 65-73, 1999.

MARINUCCI, M. T.; DEHORITY, B. A.; LOERCH, S. C. In vitro and in vivo studies of factors affecting digestion of feeds in synthetic fiber bags. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 296-307, 1992.

MATIS, J. H.; HARTLEY, H. O. Stochastic compartmental analysis: model and least squares estimation from time series data. **Biometrics**, v. 27, p. 77-102, 1971.

MENKE, K. H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; STEINGASS, H.; FRITZ, D.; SCHNEIDER, W. 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. **The Journal of Agricultural Science**, v. 93, p. 217-222, 1979.

MENKE, K. H.; STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from the chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. **Animal Research and Development**, v. 28, p. 7-55, 1988.

MERTENS, D. R. **Application of theoretical mathematical models to cell wall digestion and forage intake in ruminants**. 1973. 217 f. Thesis (Ph. D.) - Cornell University, Ithaca, NY, 1973.

MERTENS, D. R. Dietary fiber components: relationship to the rate and extent of ruminal digestion. **Federation Proceedings**, v. 36, p. 182-192, 1977.

MERTENS, D. R. Kinetics of Cell Wall Digestion and Passage in Ruminants. In: JUNG, H.G., BUXTON, D.R., HATFIELD, R.D., RALPH, J. (Eds.). **Forage Cell Wall Structure and Digestibility**. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 1993, p. 535-570.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

MERTENS, D. R. Rate and extent of digestion. In: DIJKSTRA, J., FORBES, J.M., FRANCE, J. (Eds.). **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. Wallingford: CAB International, 2005, p. 13-48.

MERTENS, D. R.; ELY, L. O. A dynamic model of fiber digestion and passage in the ruminant for evaluating forage quality. **Journal of Animal Science**, v. 49, p. 1085-1095, 1979.

MERTENS, D. R.; LOFTEN, J. R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 1437-1446, 1980.

MOHAMED, R.; CHAUDHRY, A. S. Methods to study degradation of ruminant feeds. **Nutrition Research Reviews**, v. 21, p. 68-81, 2008.

MÖLLER, J. Gravimetric determination of acid detergent fiber and lignin in feed: interlaboratory study. **Journal of AOAC International**, v. 92, p. 74-90, 2009.

MOORE, J. E.; MOTT, G. O. Fermentation tubes for invitro digestion of forages. **Journal of Dairy Science**, v. 59, p. 167-169, 1976.

NASH, J. C. On best practice optimization methods in R. **Journal of Statistical Software**, v. 60, p. 1-14, 2014.

NOCEK, J. E.; ENGLISH, J. E. In situ degradation kinetics: evaluation of rate determination procedure. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 77-87, 1986.

NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. Washington, DC: National Academy of Sciences, 2001.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 589-596, 1999.

ØRSKOV, E. R.; MCDONALD, I. Estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v. 92, p. 499-503, 1979.

PALMONARI, A.; GALLO, A.; FUSTINI, M.; CANESTRARI, G.; MASOERO, F.; SNIFFEN, C. J.; FORMIGONI, A. Estimation of the indigestible fiber in different forage types. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 248-254 2016.

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

PEREZ, J. R. O. Sistemas para a estimativa de digestibilidade in vitro. In: TEIXEIRA, J.C. (Ed.). **Simpósio internacional de digestibilidade em ruminantes**. Lavras: UFLA-FAEPE, 1997, p. 55-68.

PINHEIRO, J. C.; BATES, D. M. **Mixed-effects models in S and S-PLUS**. New York: Springer-Verlag Inc., 2000.

RAFFRENATO, E.; VAN AMBURGH, M. E. Development of a mathematical model to predict sizes and rates of digestion of a fast and slow degrading pool and an indigestible NDF fraction. In: Cornell Nutrition Conference, 2010, Syracuse, NY. **Proceedings...** Syracuse, NY: Cornell University, 2010. p. 52-65.

RATKOWSKY, D. A. **Handbook of nonlinear regression models**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1990.

ROBINSON, P. H.; FADEL, J. G.; TAMMINGA, S. Evaluation of mathematical models to describe neutral detergent residue in terms of its susceptibility to degradation in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 15, p. 249-271, 1986.

RYMER, C.; HUNTINGTON, J. A.; GIVENS, D. I. Effects of inoculum preparation method and concentration, method of inoculation and pre-soaking the substrate on the gas production profile of high temperature dried grass. **Animal Feed Science and Technology**, v. 78, p. 199-213, 1999.

RYMER, C.; HUNTINGTON, J. A.; WILLIAMS, B. A.; GIVENS, D. I. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123–124, p. 9-30, 2005.

SCHOFIELD, P. Gas production methods. In: D'MELLO, J.P.F. (Ed.). **Farm animal metabolism and nutrition**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2000, p. 209–232.

SMITH, L. W.; GOERING, H. K.; WALDO, D. R.; GORDON, C. H. *In vitro* digestion rate of forage cell wall components. **Journal of Dairy Science**, v. 54, p. 71-76, 1971.

STEFANON, B.; PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Effect of maturity on digestion kinetics of water-soluble and water-insoluble fractions of alfalfa and brome hay. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1104-1115, 1996.

STERN, M. D.; BACH, A.; CALSAMIGLIA, S. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2256-2276, 1997.

SUGIURA, N. Further analysis of the data by Akaike's Information Criterion and the finite corrections. **Communications in Statistics, Theory and Methods**, v. A7, p. 13-26, 1978.

TAYA, M.; OHMIYA, K.; KOBAYASHI, T.; SHIMIZU, S. Monitoring and control of cellulolytic anaerobe culture by using gas evolved as an indicator. **Journal of Fermentation Technology**, v. 58, p. 463-469, 1980.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; MCALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas-production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, p. 185-197, 1994.

THIEX, N. J.; ANDERSON, S.; GILDEMEISTER, B. Crude fat, hexanes extraction, in feed, cereal grain, and forage (Randall/Soxtec/Submersion Method): Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 899-908, 2003.

THIEX, N. J.; MANSON, H.; ANDERSON, S.; PERSSON, J.-Á. Determination of crude protein in animal feed, forage, grain, and oilseeds by using block digestion with a copper catalyst and steam distillation into boric acid: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, p. 309-317, 2002.

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

TRAXLER, M. J.; FOX, D. G.; VAN SOEST, P. J.; PELL, A. N.; LASCANO, C. E.; LANNA, D. P. D.; MOORE, J. E.; LANA, R. P.; VÉLEZ, M.; FLORES, A. Predicting forage indigestible NDF from lignin concentration. **Journal of animal science**, v. 76, p. 1469-1480, 1998.

TREI, J.; HALE, W. H.; THEURER, B. Effect of grain processing on in vitro gas production. **Journal of Animal Science**, v. 30, p. 825-831, 1970.

UDÉN, P.; ROBINSON, P. H.; MATEOS, G. G.; BLANK, R. Use of replicates in statistical analyses in papers submitted for publication in *Animal Feed Science and Technology*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 171, p. 1-5, 2012.

VAN MILGEN, J.; BERGER, L. L.; MURPHY, M. R. Fractionation of substrate as an intrinsic characteristic of feedstuffs fed to ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 124-131, 1992.

VAN MILGEN, J.; BERGER, L. L.; MURPHY, M. R. Digestion kinetics of alfalfa and wheat straw assuming heterogeneity of the potentially digestible fraction. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 1917-1923, 1993.

VAN SOEST, P. J. Cell wall matrix interactions and degradation - Session synopsis. In: JUNG, H.G., BUXTON, D.R., HATFIELD, R.D., RALPH, J. (Eds.). **Forage Cell Wall Structure and Digestibility**. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 1993, p. 377-395.

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

VAN SOEST, P. J.; AMBURGH, M. E.; TEDESCHI, L. O. Rumens balance and rates of fiber digestion. In: Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, 2000, Syracuse, NY. **Proceedings...** Syracuse, NY: Cornell University, 2000. p. 150-166.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VAN SOEST, P. J.; VAN AMBURGH, M. E.; ROBERTSON, J. B.; KNAUS, W. F. Validation of the 2.4 times lignin factor for ultimate extent of NDF digestion, and curve peeling rate of fermentation curves into pools. In: Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, 2005, Syracuse, NY. **Proceedings...** Syracuse, NY: Cornell University, 2005. p. 139-149.

VIEIRA, R. A. M.; CAMPOS, P. R. S. S.; SILVA, J. F. C.; TEDESCHI, L. O.; TAMY, W. P. Heterogeneity of the digestible insoluble fiber of selected forages in situ. **Animal Feed Science and Technology**, v. 171, p. 154-166, 2012.

VIEIRA, R. A. M.; FERNANDES, A. M. A Importância de Estudos Quantitativos Associados à Fibra para a Nutrição e a Alimentação de Ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 258-290, 2006.

VIEIRA, R. A. M.; PEREIRA, J. C.; MALAFAIA, P. A. M.; QUEIROZ, A. C. The influence of elephant-grass (*Pennisetum purpureum* Schum., Mineiro variety) growth on the nutrient kinetics in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 67, p. 151-161, 1997.

VIEIRA, R. A. M.; TEDESCHI, L. O.; CANNAS, A. A generalized compartmental model to estimate the fibre mass in the ruminoreticulum: 1. Estimating parameters of digestion. **Journal of Theoretical Biology**, v. 255, p. 345-356, 2008a.

VIEIRA, R. A. M.; TEDESCHI, L. O.; CANNAS, A. A generalized compartmental model to estimate the fibre mass in the ruminoreticulum: 2. Integrating digestion and passage. **Journal of Theoretical Biology**, v. 255, p. 357-368, 2008b.

VONESH, E. F. **Generalized linear and nonlinear models for correlated data: theory and applications using SAS®**. Cary: SAS Institute Inc., 2012.

WALDO, D. R.; SMITH, L. W.; COX, E. L. Model of cellulose disappearance from the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 55, p. 125-129, 1972.

WEISS, W. P. Predicting Energy Values of Feeds. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1802-1811, 1993.

WEST, G. B.; BROWN, J. H.; ENQUIST, B. J. A general model for the origin of allometric scaling laws in biology. **Science**, v. 276, p. 122-126, 1997.

WILKINS, J. R. Pressure transducer method for measuring gas production by microorganisms. **Applied Microbiology**, v. 27, p. 135-140, 1974.

YODER, P. S.; ST-PIERRE, N. R.; WEISS, W. P. A statistical filtering procedure to improve the accuracy of estimating population parameters in feed composition databases. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 5645-5656, 2014.

ZANTON, G. I.; HEINRICHS, A. J. Evaluation of modeling procedure for fitting in situ feed degradation profiles. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 2080-2088, 2009.