Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Modelos não lineares mistos em estudos de degradabilidade
ruminal *in situ*

Simone Daniela Sartorio

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Estatística e Experimentação Agronômica

Piracicaba
2013

Simone Daniela Sartorio
Licenciada em Matemática

Modelos não lineares mistos em estudos de degradabilidade ruminal *in situ*

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. CÉSAR GONÇALVES DE LIMA

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Estatística e
Experimentação Agronômica

Piracicaba
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP

Sartorio, Simone Daniela

Modelos não lineares mistos em estudos de degradabilidade ruminal *in situ* /
Simone Daniela Sartorio. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018
de 2011. - - Piracicaba, 2013.
197: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Capim Tifton 85 2. Digestibilidade 3. Medidas repetidas 4. Modelos não lineares
mistos 5. Novilhos 6. Rúmen 7. Software R 8. Variabilidade I. Título

CDD 636.2085
S251m

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus AMORES:

meus pais, **Romilda** e **Antonio**,

minhas irmãs, **Débora** e **Mariane**,

e a minha avó, **Sebastiana** (*in memoriam*)

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre caminhar comigo e me dar forças nas horas difíceis e por me proporcionar tantas alegrias!

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Pós-Graduação em Estatística e Experimentação Agronômica, pela oportunidade e conhecimentos adquiridos. Em especial, ao professor César Gonçalves de Lima, pelos ensinamentos, pela força, paciência, compreensão, confiança, conselhos, alegrias, caronas e amizade, sendo muito mais que um orientador, um grande amigo, um “pai” como brincamos com ele!

Aos professores e amigos do Departamento de Ciências Exatas: Carlos Tadeu dos Santos Dias, Clarice Garcia Borges Demétrio, Décio Barbin, Édwin Moises Marcos Ortega, Gabriel Adrian Sarries, Roseli Aparecida Leandro e Sílvio Sandoval Zocchi pelos ensinamentos e pela convivência. Em especial à Sônia Maria De Stefano Piedade, pela força de sempre e à Taciana Villela Savian (Tatá), pela troca de experiências, confiança, amizade e pela alegria!!!

Aos professores Euclides Braga Malheiros (FCAV/UNESP), Ives Cláudio da Silva Bueno (FZEA/USP) e Júlio Cesar de Carvalho Balieiro (FZEA/USP) pelas informações sobre o assunto desta tese, pelos dados e pela confiança depositada no nosso trabalho.

Às secretárias Luciane Brajão e Solange de Assis Paes Sabadin por estarem sempre prontas a ajudar sem ver a quem e pelas tantas horas que me escutaram, me aconselhando e ajudando tanto profissionalmente quanto emocionalmente.

Aos funcionários, Eduardo Bonilha e Jorge Alexandre Wiendl pelo suporte computacional, nos ajudando sempre quando os computadores se “revoltavam”. Ao Rosni Honofre Aparecido Pinto, pelo suporte acadêmico, e as meninas: Luciene Maciel e a Cátia por manter nossos ambientes agradáveis e propícios ao estudo.

Ao professor Antônio Bianchi pelo apoio quando soube que passei no concurso em MG e pelos ensinamentos da língua inglesa.

Aos funcionários do departamento de Economia, Administração e Sociologia, Pedro Scardua e Maria Aparecida Zani Ribeiro, pela gentileza com que sempre me atenderam.

Ao coral “Luiz de Queiroz”, à maestrina Cíntia Maria Annichino Pinotti e sua mãe, Adelina Inez (Lica) Annichino Pinotti pelos ensinamentos e por toda diversão proporcionada.

Às fisioterapeutas da ESALQ, Vera e Aline pela atenção e pelo cuidado comigo durante a minha reabilitação, quando operei o joelho. Aos educadores físicos Nátalia e Nino da academia Edinho Company pelo apoio e pelas horas de malhação.

Aos funcionários do Rucas que sempre capricharam na comida. À dentista Jaqueline e seu colaboradores pela atenção quando precisei. A todos os bibliotecários da ESALQ, por sempre estarem prontos a ajudar e pela correção deste trabalho.

Ao grupo de estudos em modelos mistos (GEMMIX) da ESALQ e ao grupo do R-br pela troca de experiências. Em especial ao amigo Walmes Marques Zeviani, mesmo distante, agradeço pela paciência, pelos ensinamentos e pela alegria, sempre quando o encontro.

À amiga Denise Teresinha Gonçalves Bizuti pela amizade e pela ajuda com as referências. À Bianca, a oportunidade de conhecê-la. A todos os amigos da sala de estudos, os momentos de descontração e os cafezinhos.

À Moara Teixeira e a sua família (Sr. Teixeira, Sr.^a Mirian e Tiago) por me receberem tão bem na sua casa, me oferecendo abrigo quando vim para Piracicaba, mesmo não me conhecendo muito bem. À Vila da pós-graduação e as assistentes sociais pela compreensão e por me possibilitarem ficar na vila, no início do doutoramento. Às amigas Alinne da Silva, Andréa Garcia, Cleucione de Oliveira Pessoa (Cleu), Dinara Graziela Alves (Di), Liege Cristina Almeida (Cris) pela grande amizade, alegria e pelo abrigo nesta etapa final.

Ao meus amigos noturnos da net: Ana Júlia Righetto, Cássio Dezotti (Tuba) e Ezequiel Abraham López Bautista; bem como, aos inúmeros vizinhos, companheiros de casa e amigos: Adriana Maria Marques da Silva (Dri), Alexandre (*in memorian*), Antonio Carlos Braga Júnior (Braga), Djair Durand, Edilan de Sant’Ana Quaresma, Elias Medeiros, Elisângela Oliveira (Eli), Elizabeth Mie Hashimoto (Betinha), Epaminondas de Vasconcellos Couto (Epa), Elton Pereira, Everton Batista da Rocha, Fabiane de Lima Silva (Faby), Glaúcia Tatiane Ferrari, Guilherme Biz, Júlio César Pereira, Kuang Hongyu, Luiz Roberto Martins Pinto, Luzia Pedroso de Oliveira, Marcelino Alves Rosa de Pascoa (Popó), Marcelo Lima, Maria Josiane Cruz da Silva, Mariana

Ragassi Urbano, Maurício Santana Lordêlo, Natália Martins, Natalie Verônica Rondineli, Paula Fonte Sanches, Raphael Antonio Prado Dias (Kcond), Renato Nunes Pereira (Renatinho), Ricardo Alves de Olinda, Ricardo Klein, Rodrigo Pescim, Ronaldo Carlos Lucas, Simone Silmara Werner Gurgel do Amaral, Thiago Gentil Ramires, Tiago Flor de Santana, e Vanderson Rabelo, pela convivência, perseverança, apoio e alegria de sempre.

À minha “família” ESALQ que guardo no coração: Vanderly Janeiro (Tio), Lucimary Afonso (Lu), Fernanda Bühner Rizzato, Wilson Alves de Oliveira e sua esposa Irene, Mirian Fernandes Carvalho Araujo, Lúcio Borges Araujo, Priscila Neves Farias, Priscila Robertina dos Santos, Ana Patricia Bastos Peixoto (Patinha), Tiago Almeida de Oliveira (Titi), Cristiane Mariana Rodrigues da Silva (Cris), Denise Viola (Dê), Angela Mello Coelho, Michele Barbosa, Andréia Meyer, Juliana Fachini, Afrânio Márcio Corrêa Vieira, Maria Cristina Martins e Alessandra do Santos (Alê), por tudo o que vivemos e passamos juntos, e pelo apoio incondicional em todos os momentos. Em especial, as minhas “maninhas”: Marina Rodrigues Maestre (Nina) e Renata Alcarde (Rê), pelos abraços, amizade, amor, companheirismo...enfim, por tudo!

Aos amigos distantes e cúmplices: Pâmela Piovesan (Pamelete), Lara de Maschio Carceles (Larinha), Sheila Santana de Brito (Piquena), Marta Colozza Bianchi (Martinha), Fernando Pereira Micena, Cleicimara Regina Módolo Pico (Cleici), que pelas palavras, ajudaram a tornar esta dura caminhada muito mais agradável.

À vizinhas e amigas de Araras: Ana Deguchi Martins, Geralda Moroni Corbanezzi (*in memorian*), Laura Conceição Moraes e Maria de Lourdes dos Santos Bonfante pelo apoio de sempre, tanto nos momentos de alegria como de tristeza, olhando e cuidando sempre da minha família.

Aos meus professores do ensino fundamental, médio e técnico (sempre público), por acreditarem em mim e me incentivarem sempre, mesmo ninguém, nem mesmo eu, tendo idéia de onde eu poderia chegar! Cada um de vocês é responsável de alguma forma por cada novo tijolinho de mais esta conquista. Em especial a minha professora e amiga Erika Squissato Fernandes.

Aos professores Antonio Carlos Simões Pião, José Silvio Govone e Sergio Roberto Nobre pelo apoio de sempre! E a todos os professores e funcionários do departamento de matemática da UNESP, Campus Rio Claro, pela formação e amizade.

À “família” UNIFEI pela colaboração e compreensão para que este trabalho

pudesse ser terminado. À Juliana Cespedes, Ana Paula Malheiros, Denise Ferraz, Érika Oliveira, Rodrigo Silva Lima e sua esposa Luciana pela força e pelo apoio que me deram quando cheguei em Itájubá. Em especial, ao Rafael Rodrigo Ottoboni pela companhia, apoio, amizade e diversão durante esta transição.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Agradecimento especial

À minha família. Meus pais, Antonio Benedito Sartorio e Romilda Alves Galante Sartorio, minhas irmãs Débora Cristina Sartorio e Mariane Gabriela Sartorio, à minha avó Sebastiana Francisco Galante (*in memorian*) e ao meu cunhado Luiz Gustavo Ferreira, o incentivo, por estarem sempre ao meu lado, mesmo à distância, por se alegrarem e chorarem comigo, por sempre me apoiarem e por serem referências em minha vida. Posso dizer que, sem sombra de dúvidas, sou muito abençoada por ter a família que tenho!

A todos que acreditaram em mim e fazem parte da minha vida, o meu

MUITO OBRIGADA!!!

*“Muitos de nossos sonhos parecem impossíveis,
depois improváveis, depois inevitáveis”.*

Christopher Reeve

*“Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo dos céus:
tempo para nascer e o tempo de morrer;
tempo para plantar e de colher;
tempo para matar, e tempo para sarar;
tempo para demolir, e tempo para construir;
tempo para chorar, e tempo para rir;
tempo para gemer, e tempo para dançar;
tempo para atirar pedras, e tempo para juntá-las;
Tempo para dar abraços, e tempo para apartar-se.
tempo para procurar, e tempo para perder;
tempo para guardar, e tempo para jogar fora;
tempo para rasgar, e tempo para costurar;
tempo para calar, e tempo de falar;
há o tempo de guerra e o tempo de paz”,
Mas sempre é tempo de amar.*

Eclesiastes 2.3-3

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 DESENVOLVIMENTO	23
2.1 Componentes nutricionais e digestibilidade nos ruminantes	24
2.2 Metodologias para a avaliação dos alimentos	27
2.2.1 Análise bromatológica	27
2.2.2 Ensaio biológico	29
2.2.2.1 Ensaio <i>in situ</i>	29
2.2.2.2 Características dos ensaios de degradabilidade	31
2.2.2.3 Características dos dados de degradabilidade	32
2.2.3 Modelos matemáticos para estudos de degradabilidade	36
2.3 Modelos não lineares	46
2.3.1 Estimação dos parâmetros	49
2.3.1.1 Método dos mínimos quadrados ordinários	49
2.3.1.2 Método dos mínimos quadrados ponderados	50
2.3.1.3 Método dos mínimos quadrados generalizados	51
2.3.1.4 Método da máxima verossimilhança	52
2.3.2 Métodos iterativos e valores iniciais	53
2.3.3 Qualidade do ajuste	56
2.3.4 Testes de Hipóteses	57
2.3.4.1 Teste t	57
2.3.4.2 Teste da Razão de Verossimilhança	57
2.4 Análise de dados de degradabilidade <i>in situ</i>	59
2.5 Modelo linear misto	60
2.5.1 Estruturas da matriz de variâncias e covariâncias	64
2.6 Modelo não linear misto	66
2.6.1 Estimação de β e $\mathbf{b}$	71
2.6.2 Estimação de θ	73
2.6.2.1 Máxima verossimilhança	73

2.6.2.2	Máxima verossimilhança restrita	75
2.6.2.3	Aproximações numéricas	76
2.6.3	Seleção de modelos e qualidade do ajuste	78
2.6.3.1	Teste da razão de verossimilhança	79
2.6.3.2	Critérios de Informação	79
2.6.3.3	Intervalos de confiança e testes de hipóteses	80
2.6.3.4	Análise de Resíduos	83
2.6.4	A biblioteca nlme	84
3	MATERIAIS E MÉTODOS	89
3.1	Materiais	89
3.1.1	Matéria Seca	90
3.1.2	Fibra em detergente neutro	92
3.2	Métodos	94
3.2.1	Abordagem 1: ANOVAs das estimativas dos parâmetros	95
3.2.2	Abordagem 2: Comparação de modelos não lineares clássicos	96
3.2.3	Abordagem 3: Análise utilizando o modelo não linear misto	99
3.3	O <i>software</i> R	100
3.3.1	O ajuste do MNLM no software R	100
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
4.1	Matéria Seca	105
4.1.1	Abordagem 1: ANOVAs das estimativas dos parâmetros	105
4.1.2	Abordagem 2: Comparação de modelos não lineares clássicos	113
4.1.3	Abordagem 3: Análise utilizando o modelo não linear misto	117
4.2	Fibra em detergente neutro	128
4.2.1	Abordagem 1: ANOVAs das estimativas dos parâmetros	129
4.2.2	Abordagem 2: Comparação de modelos não lineares clássicos	136
4.2.3	Abordagem 3: Análise utilizando o modelo não linear misto	140
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	153
	REFERÊNCIAS	155
	APÊNDICES	169
	ANEXOS	189

RESUMO

Modelos não lineares mistos em estudos de degradabilidade ruminal *in situ*

A principal fonte de proteína na nutrição dos ruminantes é a proteína de origem microbiana, sintetizada no processo fermentativo de degradação ruminal a partir de proteína dietética ou microbiana. Logo o conhecimento deste processo é de grande importância em estudos de avaliação de alimentos para estes animais. Modelos não lineares são amplamente utilizados nestes estudos, buscando estimar os parâmetros da cinética de degradação ruminal através de métodos clássicos de análise univariada. Como estes ensaios envolvem medidas repetidas, propõem-se o uso de modelos não lineares mistos que permitem que a função de regressão não linear dependa de efeitos fixos e aleatórios, o que pode resolver os problemas de correlação entre as medidas repetidas e heterogeneidade de variâncias das respostas. Neste trabalho foram utilizadas duas alternativas comuns de análise de dados de digestibilidade, e seus resultados foram comparados com os da abordagem que utiliza modelos não lineares mistos. Utilizou-se o modelo não linear de Orskov e McDonald (1979) para explicar a cinética de degradação ruminal da matéria seca (MS) e da fibra em detergente neutro (FDN) do feno de capim-Tifton 85, em novilhos alimentados com seis rações experimentais compostas por três diferentes combinações de volumoso(Vo):concentrado(Co) (70:30, 50:50 e 30:70%). Como volumoso foram utilizados fenos de capim-Tifton 85 de diferentes qualidades (4% e 10% de proteína bruta) e como concentrado, casca de soja, milho moído e farelo de girassol. A degradabilidade foi determinada pela técnica *in situ* e os dez tempos de incubação foram de: 3, 6, 12, 24, 48, 60, 72, 84, 96 e 120 horas. Originalmente o experimento foi delineado em quadrado latino (6×6) com seis novilhos mestiços fistulados (linhas), seis períodos (colunas) e seis tratamentos, em que nas parcelas tem-se uma estrutura de parcelas subdivididas, sendo as subparcelas, os tempos de incubação. O uso de modelos não lineares mistos na análise de dados de digestibilidade *in situ* é bastante atraente principalmente quando a pesquisa tem por objetivo entender o comportamento do processo de digestibilidade ao longo dos tempos de incubação. Além disso, quanto maior a variabilidade dos dados, a abordagem mista se torna mais indicada, reduzindo os erros padrão das estimativas dos parâmetros. Mesmo não incluindo a estrutura de delineamento experimental, os modelos não lineares mistos conseguem explicar bem a variabilidade extra, provocada pelos efeitos dos fatores associados ao delineamento, com a inclusão de efeitos aleatórios nos parâmetros do modelo de Orskov e McDonald (1979). O pacote estatístico `nlme` do R mostrou-se ágil e eficiente no ajuste dos modelos não lineares mistos e as suas ferramentas gráficas foram importantes na avaliação da qualidade dos ajustes e na escolha de modelos.

Palavras-chave: Agropecuária; Medidas repetidas; Variabilidade; *Software* R; Capim Tifton 85

ABSTRACT

Nonlinear mixed models in studies of *in situ* ruminal degradability

The main source of protein in ruminant nutrition is the protein of microbial origin, synthesized in the fermentation process of ruminal degradation starting from dietetics or microbial protein. Then, the knowledge of this process is of great importance in evaluation studies of food for these animals. Nonlinear models are widely used in these studies to estimate the parameters of ruminal degradation kinetics through the classical methods of univariate analysis. As these trials involve repeated measurements, we propose the use of nonlinear mixed models which allows that the nonlinear regression function depends on fixed and random effects, which can solve the problems of correlation between the repeated measurements and heterogeneity of variances of the responses. In this work, we used two common alternatives of digestibility data analysis, and their results were compared with the approach which uses nonlinear mixed model. We used the nonlinear model of Orskov and McDonald (1979) to explain the kinetics of ruminal degradation of dry matter (MS) and neutral detergent fiber (FDN) of the hay grass-Tifton 85, in steers fed experimental with six diets composed of three different combinations of forage(Vo):concentrate(Co) (70:30, 50:50 and 30:70%). As forage, we used hay grass-Tifton 85 of different qualities (4% and 10% crude protein) and as concentrate, soybean hulls, corn and sunflower meal. The degradability was determined by the *in situ* technique and the incubation times were 3, 6, 12, 24, 48, 60, 72, 84, 96 and 120 hours. Originally the experiment was designed as a Latin square (6×6) with six fistulated crossbred steers (lines), six periods (columns) and six treatments, in which the plots have a splitplot structure where the subplots were considered the times of incubation. The use of nonlinear mixed models in the analysis of the *in situ* digestibility data is quite attractive especially when the research aims to understand the process behavior digestibility over the incubation times. Moreover, the higher the variability of the data, the mixed approach becomes more suitable, reducing standard errors of the estimated parameters. Even excluding the structure of experimental design, the linear mixed models can explain well the extra variability caused by the effects of the factors associated with the design, with the inclusion of random effects in the model parameters of Orskov and McDonald (1979). The R statistical package `nlme` proved to be agile and efficient for the adjustment of nonlinear mixed models and its graphical tools were important in evaluating the quality of the adjustments and the choice of models.

Keywords: Agriculture; Repeated measures; Variability; R Software; Grass Tifton 85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIC: Critério de Informação de Akaike
 AIC_c: Critério de Informação de Akaike corrigido
 ANOVA: Análise de Variância Univariada
 AR(1): Autoregressiva de primeira ordem
 ARH(1): Autoregressiva de primeira ordem com Heterogeneidade
 BIC: Critério de Informação Bayesiano
 CV: Componentes de Variância
 cv: coeficiente de variância
 DE: Degradabilidade Efetiva
 DP: Degradabilidade Potencial
 d.p.: desvio padrão
 e.p.: erro padrão
 FDA: Fibra em Detergente Ácido
 FDN: Fibra em Detergente Neutro
 F.V.: Fontes de Variação
 g.l.: graus de liberdade
 MANOVA: Análise de Variância Multivariada
 MLM: Modelo Linear Misto
 MNL: Modelo Não Linear
 MNLM: Modelo Não Linear Misto
 MQG: Mínimos Quadrados Generalizados
 MQO: Mínimos Quadrados Ordinários
 MQP: Mínimos Quadrados Ponderados
 MS: Matéria Seca
 MV: Máxima Verossimilhança
 MVR: Máxima Verossimilhança Restrita
 NE: Não Estruturada
 n.p.: número de parâmetros do modelo
p: *p-value*, ou valor-*p*, nível descritivo do teste
 PB: Proteína Bruta
 QM: Quadrado Médio

Rs: Resíduo estudentizado

SC: Simetria Composta

SQ: Soma de Quadrados

SQRes: Soma de Quadrados do Resíduo

TRV: Teste da Razão de Verossimilhanças

1 INTRODUÇÃO

A pecuária desempenha um importante papel no agronegócio nacional e o desenvolvimento deste setor traz grandes vantagens ao país, pois além de ser uma fonte de alimento nobre para a população, fornece matéria prima para a indústria e gera divisas por meio da exportação. Os ruminantes, em particular os bovinos, representam cerca de 68% da pecuária nacional¹ e aproveitam bem muitas fontes de energia e de nitrogênio que não podem ser utilizadas pelos monogástricos.

A alimentação é um dos fatores responsáveis por grande parte (em torno de 60%) dos custos variáveis na produção animal (CABRAL et al., 2005; JOBIM et al., 2011). No Brasil os volumosos compõem a maior parte da ração para os ruminantes, sendo uma das principais fontes de energia para bovinos, caprinos e ovinos. O desempenho desses animais está associado diretamente à ração fornecida, tornando necessário o conhecimento da qualidade nutricional dos alimentos consumidos (SILVA, 1979; PRADO et al., 2004; CABRAL et al., 2005; CARVALHO et al., 2006). A principal fonte de proteína na nutrição destes ruminantes é a proteína de origem microbiana, sintetizada no processo fermentativo de degradação ruminal a partir de proteína dietética ou microbiana reciclada (TEIXEIRA, 1997; CABRAL et al., 2005; CARVALHO et al., 2006; SILVA et al., 2007).

Isso faz com que o conhecimento do processo de degradação dos alimentos pelos microrganismos do rúmen, seja de grande importância em estudos de avaliação de alimentos para ruminantes, porque ele define ou determina a proporção dos nutrientes consumidos que é utilizada pelo animal (JOBIM et al., 2011). O conhecimento de tal processo perpassa, necessariamente, pela caracterização dos alimentos, de acordo com sua composição química e constituição de suas diferentes frações degradáveis (ou não) no rúmen, proporcionando desta forma, melhor entendimento no balanceamento energético-protéico das dietas aos nutricionistas.

Nas últimas décadas foram desenvolvidas várias técnicas de avaliação dos alimentos simulando os processos de digestão *in vivo*, com diferentes níveis de complexidade, como as técnicas gravimétricas² *in situ* e as técnicas *in vitro* com produção de gases. Por meio dessas técnicas a cinética de degradação dos alimentos é determinada

¹<<http://www.svb.org.br/depmeioambiente/PecuariaeMudancasClimaticas.htm>>

²Gravímetro: aparelho para determinar a gravidade específica de um sólido ou líquido.

pela mensuração do desaparecimento da massa de amostra incubada no rúmen ao longo do tempo, ou dos produtos finais da fermentação, e seu comportamento é, em geral, não linear. Para melhor explicar o comportamento desses dados, modelos não lineares como o de Orskov e McDonald (1979) (RUGGIERI et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005; PIRES et al., 2006; SAVIAN, 2008, dentre outros), são amplamente utilizados para estimar parâmetros da cinética ruminal, pois apresentam um número menor de parâmetros, quando comparado aos modelos polinomiais. Além disso, os seus parâmetros são biologicamente interpretáveis.

Como nesse tipo de estudo as medidas são repetidas de modo sistemático nas mesmas unidades experimentais, quando saquinhos de náilon incubados no rúmen do animal são retirados em tempos diferentes, ou em tubos de ensaio (ou ampolas), espera-se que exista uma correlação não nula entre as medidas feitas nas diferentes ocasiões e uma heterocedasticidade das variâncias nas mesmas. É prudente que tais aspectos sejam levados em conta na estimação dos parâmetros do modelo não linear e nas inferências, pois podem alterar os resultados. Neste contexto, a estimação dos parâmetros do modelo não linear é usualmente feita pelos métodos de mínimos quadrados ordinários, ponderados ou generalizados. Entretanto, estes métodos não são adequados a dados desbalanceados, ou incompletos, nem com a falta da normalidade dos erros.

Outro problema em relação a análise desses dados surge com ensaios planejados em delineamento casualizado em blocos, ou quadrado latino. Quando a estrutura do delineamento é incluída no modelo, a análise é realizada em estágios e inúmeros procedimentos podem ser adotados, levando possivelmente a erros de inferência.

Uma melhor alternativa para a análise destes casos envolve o uso de modelos não lineares mistos. Esta metodologia permite trabalhar bem com dados incompletos ou desbalanceados, pois a estimação dos parâmetros é feita pelo método da máxima verossimilhança; permitem explicar com poucos parâmetros algumas estruturas complexas de variâncias e de correlações e; além disso, possibilita a inclusão de covariáveis e da estrutura do delineamento no modelo. De acordo com Halimi (2005), a modelagem de dados experimentais desde o marco teórico dos modelos mistos, possibilita analisar dados com estrutura de dependência, não balanceados e, em algumas ocasiões, com falta de normalidade; além da possibilidade de trabalhar com a falta de cumprimento dos pressupostos tradicionais, modela de maneira flexível, dados com estruturas complexas.

A proposta deste trabalho é utilizar a metodologia de modelos não lineares mistos para descreverem a cinética de degradação ruminal *in situ*, comparando-a com diferentes abordagens de análise propostas na literatura. Com isso tem-se os objetivos de: (i) identificar, por meio de testes da razão de verossimilhanças e critérios de informação, o melhor modelo para a descrição do fenômeno; (ii) definir um roteiro de análise: ajuste, inferências e análise de resíduos; (iii) estudar a substituição da estrutura do delineamento experimental pela inclusão de efeitos aleatórios.

Na seção 2 é feita uma revisão sobre: os ensaios de digestibilidade *in situ*, modelos matemáticos utilizados nesse tipo de estudos, modelos mistos, métodos de estimação e de análise estatística. Na seção 3 são descritos os dois conjuntos de dados utilizados nas alternativas mais comuns de análise e na abordagem utilizando os modelos não lineares mistos. Na seção 4 são apresentados os resultados das análises realizadas para os dois conjuntos de dados, bem como a discussão sobre eles. Finalmente, na seção 5 são feitas as considerações finais sobre o trabalho realizado e são apresentadas algumas idéias para futuros estudos.

2 DESENVOLVIMENTO

Com as mudanças econômicas ocorridas nas últimas décadas, o setor agropecuário tem procurado cada vez mais otimizar a produção. Porém, para se obter uma maior produtividade, em especial nos sistemas de produção de bovinos, há necessidade de se oferecer aos animais alimentos de alta qualidade, o que, de modo geral, implica em altos custos. Para minimizar estes custos é necessário maximizar o aproveitamento dos alimentos pelo animal, o que leva à pesquisa de novas fontes alimentares, ao desenvolvimento de rações e à busca por estratégias de alimentação para otimizar a rentabilidade da produção (CARVALHO et al., 2006; JOBIM et al., 2011). Logo, para um desempenho animal eficiente, há necessidade de conhecimentos básicos da sua nutrição.

Os ruminantes, ou poligástricos como também são conhecidos, constituem o grupo mais numeroso de animais entre os herbívoros. O que difere estes animais dos demais é que o seu estômago apresenta uma modificação do trato gastrointestinal. Na realidade, seu estômago é composto por uma parte aglandular, chamada proventrículo, e uma parte glandular, que corresponde ao estômago dos monogástricos. O proventrículo é dividido em três compartimentos: rúmen, retículo (ou barrete) e omaso (ou folhoso), sendo que nos dois primeiros ocorre a fermentação microbiana, onde bactérias e protozoários produzem enzimas capazes de hidrolisar proteínas, lipídios e carboidratos, inclusive a celulose. A parte glandular corresponde ao abomaso (ou coagulador), em que a digestão é feita por suco gástrico. Uma ilustração destes compartimentos é apresentada na Figura 1 e uma breve descrição da trajetória do alimento nos ruminantes pode ser conferida no Apêndice A.

Figura 1 - Estômago de um ruminante

O rúmen, também conhecido por pança ou bucho, é o primeiro e o maior dos compartimentos do estômago dos ruminantes (Apêndice A), comportando 80% do volume total do estômago de um animal adulto. Dos quatro compartimentos, é aquele que mais chama a atenção dos pesquisadores, pois em conjunto com o retículo forma uma vasta câmara de fermentação (HUNGATE, 1966; RUSSEL, 1992; TEIXEIRA, 1997; NAGARAJA et al., 1997; CAVALCANTE et al., 2004).

Antes da digestão gástrica e intestinal, todos os alimentos são fermentados no rúmen, sendo decompostos pela ação da flora ruminal. Esta flora apresenta um complexo ecossistema microbiano, que é constituído por inúmeros microrganismos de diferentes espécies (HUNGATE, 1966), dentre eles, bactérias e protozoários, que podem se tornar estreitamente adaptados, altamente especializados e exigir poucos alimentos ou largamente adaptados e capazes de usar muitos nutrientes.

A qualidade e quantidade dos produtos da fermentação são dependentes das atividades microbianas do rúmen, mas o equilíbrio da sua população de microrganismos depende da alimentação. A fermentação pré-gástrica permite aos ruminantes o aproveitamento de energia proveniente de componentes fibrosos e conversão de nitrogênio não protéico da ração em proteína verdadeira de alto valor biológico com maior eficiência do que em outros animais (ALLEN, 1996; CABRAL et al., 2005).

Os processos de mastigação e salivagem são algumas características fisiológicas dos ruminantes, que beneficiam o crescimento da população microbiana no rúmen. Logo, a fermentação ruminal nada mais é que o resultado de atividades físicas e microbianas que convertem componentes das rações em produtos finais favoráveis aos microrganismos e ao seu hospedeiro.

2.1 Componentes nutricionais e digestibilidade nos ruminantes

Para formulação de dietas que melhorem a eficiência nutricional dos animais é importante conhecer o metabolismo dos principais componentes dos alimentos, que otimize a manutenção e a produção dos animais, levando em conta as condições em que estão sendo criados. Dentre os principais componentes das dietas os carboidratos merecem grande destaque. Carboidratos são compostos químicos orgânicos, como os açúcares, o amido e a celulose, constituídos por carbono, hidrogênio e oxigênio (FERREIRA, 2001), podendo ser classificados de diversas maneiras. Segundo sua função na célula vegetal,

os carboidratos são classificados como: estruturais (ou parede celular, composta basicamente por celulose, hemicelulose, lignina e pectina - Apêndice B) e não-estruturais (ou conteúdo celular). Os carboidratos encontrados nos vegetais são polissacarídeos, sendo a celulose o componente mais abundante. Particularmente, as forragens contêm aproximadamente 75% de carboidratos, que são a fonte primária de energia para os microrganismos do rúmen e para o animal hospedeiro. Apesar dos ruminantes não conseguirem digerir a celulose e a lignina, os microrganismos apresentam uma capacidade enorme de aproveitamento destes carboidratos possibilitando que os animais utilizem os produtos finais da fermentação ruminal como fonte de energia para seu metabolismo.

A fibra é o componente nutricional que mais ocupa espaço dentro do rúmen, sendo adicionada à dieta de ruminantes para estimular a mastigação e a secreção de tampouantes presentes na saliva. Assim, o objetivo de se balancear dietas para carboidratos é promover um baixo enchimento ruminal, garantir uma alta fermentabilidade da dieta e uma fermentação ruminal com poucas variações ao longo do tempo (REHAGRO, 2003), pois dietas com quantidades inadequadas de fibra ou muito fermentáveis podem diminuir o pH ruminal, a digestibilidade da dieta e a produção de proteína microbiana. As consequências deste desbalanceamento são o comprometimento da saúde animal e a diminuição da produtividade.

Os ácidos do rúmen são geralmente classificados como ácidos graxos voláteis (AGV), que podem ser formados no rúmen por bactérias ou que entram no rúmen como um componente dos alimentos. De um modo geral, carboidratos, proteínas e todos os outros substratos fermentáveis são convertidos simultaneamente em AGV, metano, dióxido de carbono, amônia e célula microbiana. Contudo, segundo Teixeira (1997), estes ácidos são provenientes quase que em sua totalidade, da fermentação dos carboidratos dietéticos. Assim, a concentração total de AGV e a respectiva quantidade de cada um dependem tanto da composição da ração quanto do regime alimentar, sendo reflexo da atividade microbiana e da absorção ou passagem através da parede ruminal (SILVA, 1979). Os ácidos voláteis que são produzidos em maior quantidade nesse processo são: acético (C_2), propiônico (C_3) e butírico (C_4). Os AGV constituem a maior fonte de energia, de 50 a 80% da energia metabolizada ingerida diariamente, para os ruminantes (RESENDE et al., 2006), pois são utilizados na oxidação direta para a produção de energia. Desta maneira, a utilização de energia pelos ruminantes é determinada pelas concentrações rela-

tivas dos principais AGV. Terpenier, em 1883, demonstrou que a fermentação da celulose no rúmen resulta em grande quantidade de AGV, sendo o ácido acético correspondente a pelo menos 50% do total (SILVA, 1979).

As bactérias presentes no rúmen necessitam de fontes de nitrogênio (N), energia, minerais, vitaminas e outros nutrientes para crescer. Contudo, nitrogênio e energia são exigidos em quantidades maiores e exercem maior influência no crescimento bacteriano.

Na formulação comercial de dietas, a determinação do valor nutricional dos ingredientes deve ter a maior acurácia possível, já que este determinará a economicidade da opção alimentar relativa ao requisito nutricional do animal (TEIXEIRA, 1997; ASSIS et al., 1999; CARVALHO et al., 2006; JOBIM et al., 2011). Portanto, torna-se necessário o conhecimento da quantidade de cada nutriente que o animal tem condições de utilizar, o que é feito medindo-se a sua digestibilidade (QUADROS et al., 2004).

A digestibilidade mostra a porcentagem do alimento ou de qualquer nutriente simples deste, que é dissolvido ou que foi ingerido ao passar pelo trato digestivo, podendo ser absorvido e colocado à disposição das células do corpo. Este conceito é expresso pelo coeficiente de digestibilidade do nutriente em apreço, sendo uma característica própria do alimento e não do animal. É obviamente um conceito distinto daquele de rapidez ou facilidade de digestão (COELHO DA SILVA; LEÃO, 1979).

O fracionamento dos alimentos é de fundamental interesse para sua caracterização, sendo possível por meio deste relacionar o conteúdo de nutrientes dos alimentos com seu aproveitamento digestivo e metabólico (CARVALHO et al., 2006). Silva (1979) relatou que alguns destes componentes podem ser determinados por processos químicos diretos, outros são determinados em conjunto, pelo fato de não haver interesse nutricional em separá-los, ou pela inexistência de métodos específicos para sua análise e desta forma, outras análises podem ser necessárias. Assim, as principais metodologias utilizadas para a avaliação da composição bromatológica dos alimentos são os métodos de análise bromatológica e os ensaios biológicos.

2.2 Metodologias para a avaliação dos alimentos

2.2.1 Análise bromatológica

As primeiras tentativas de analisar alimentos foram feitas por Einhof em 1806 (GOERING; VAN SOEST, 1970). Em 1864 surgiram as primeiras propostas de fracionamento dos alimentos, desenvolvidas na Estação Experimental de Weende, na Alemanha. Devido a algumas deficiências, principalmente em relação à caracterização da fibra, na década de 1960, Peter J. Van Soest e sua equipe da Universidade de Cornell (em Beltsville, Maryland/EUA) aperfeiçoaram as técnicas propostas anteriormente.

Por meio da análise bromatológica é possível a identificação da composição química dos alimentos, dividindo-os em frações. Assim, torna-se possível identificar as porcentagens de fibras dos alimentos (VAN SOEST, 1994).

A fibra bruta, ou simplesmente fibra, é um agregado de compostos formado por carboidratos estruturais (celulose e hemicelulose), compreendendo a maior porção da parede celular das células vegetais. Os carboidratos são os constituintes mais importantes na nutrição e alimentação de ruminantes, sendo os mais abundantes na matéria seca e influenciam diretamente na dinâmica digestiva por serem degradados lentamente.

Dentre as frações que são obtidas das técnicas bromatológicas, as que destacam para a descrição da digestibilidade são:

- (i) **Matéria seca (MS):** é o material que resta após a remoção de toda a água. A MS não é um nutriente, mas nela está contida a matéria orgânica (composta por carbono, hidrogênio, oxigênio e, em alguns casos, nitrogênio) e inorgânica (minerais que incluem os macro e microelementos minerais), que são os grupos de nutrientes mais importantes para o desenvolvimento dos animais. A preservação dos alimentos e a determinação dos demais constituintes destes dependem do teor de umidade presente no material. Assim, a determinação da MS é o ponto de partida da análise de alimentos, sendo levado em consideração quando se deseja comparar o valor nutritivo de dois ou mais alimentos, de diferentes épocas, locais ou regiões. Aproximadamente 70-85% da MS digestível da ração é digerida pelos microrganismos do rúmen, com a produção de ácidos graxos voláteis, dióxido de carbono, metano, amônia e células microbianas (SILVA, 1979);

- (ii) **Fibra em detergente neutro (FDN)**: também conhecida como porção fibrosa de rápida degradação, a FDN é constituída basicamente de celulose, hemicelulose e lignina, que representam os principais constituintes da parede celular (VAN SOEST, 1994; LUCCI, 1997; SAVIAN, 2005; GOMES; BORGES; CAMPOS, 2007 e MAGALHÃES, 2007). A FDN mede o teor de fibra total e quantitativamente determina diferenças entre concentrado e volumoso, podendo ainda classificar volumosos como melhor ou pior em relação a qualidade (GOMES; BORGES; CAMPOS, 2007). Por ser um fator dietético bastante representativo do volume ocupado pelo alimento (VAN SOEST, 1994), ela está mais associada ao consumo de alimentos, isto é, ingestão, taxa de enchimento e passagem do alimento no sistema digestivo dos ruminantes (MERTENS, 1977; SAVIAN, 2005);
- (iii) **Fibra em detergente ácido (FDA)**: conhecida também como porção fibrosa de lenta degradação, a FDA compreende principalmente os mesmos componentes da FDN, menos a hemicelulose (VAN SOEST, 1994; LUCCI, 1997; SAVIAN, 2005; GOMES et al., 2007 e MAGALHÃES, 2007). Portanto, a obtenção da hemicelulose não requer métodos químicos, sendo seu teor estimado pela diferença do teor de FDN e FDA, isto é: $FDN - FDA = Hemicelulose$. De forma geral, a FDA está mais relacionada com a digestibilidade dos alimentos (SAVIAN, 2005).

Mertens (1992) citou que o uso de dietas com altas concentrações de volumoso pode levar a uma regulação física do consumo de nutrientes devido ao efeito físico provocado pelo teor de FDN e, desta maneira, influenciar de maneira negativa sobre o desempenho animal. Portanto, estudos que avaliem a eficiência do uso de diferentes relações volumoso:concentrado poderão contribuir para a busca da eficiência produtiva e econômica dos ruminantes (CARVALHO et al., 2007).

Em particular, um volumoso de grande interesse para estes estudos é a espécie híbrida Tifton 85 (*Cynodon* spp.), que surgiu do cruzamento das espécies sul africana (PI 290884) e Tifton 68, sendo caracterizado pela alta produção de matéria seca e alta digestibilidade (BURTON; GATES; IELL, 1993), quando produzida em condições adequadas. Este híbrido apresenta porte alto, rápida taxa de crescimento e boa relação lâmina/colmo, quando comparado aos outros cultivares do gênero *Cynodon* (GONÇALVES et al., 2001).

2.2.2 Ensaios biológicos

Devido ao fato das análises bromatológicas não serem capazes de informar a efetividade de assimilação dos nutrientes determinados laboratorialmente pelo organismo animal, pois não estão envolvidos componentes biológicos dos animais, os ensaios biológicos foram propostos para complementar as análises bromatológicas dos alimentos.

O ensaio biológico inicialmente proposto para determinação do coeficiente de digestibilidade é o ensaio *in vivo*, que consiste em se medir a quantidade de nutriente consumido e a quantidade excretada nas fezes durante um determinado período de tempo. A quantidade de nutrientes que é aparentemente digerida é igual à diferença entre essas duas quantidades, sendo expressa em porcentagem da quantidade do nutriente na ração. Este procedimento apesar de fornecer resultados mais exatos, é muito trabalhoso e oneroso. Neste contexto, muito progresso tem sido feito para estimar a digestibilidade por métodos rápidos e econômicos.

A degradabilidade é uma forma indireta de se avaliar a digestibilidade *in vivo* dos alimentos, sendo uma das mensurações mais condizentes com a realidade, em comparação com as resultantes de outras técnicas. Segundo Schmidek (1999), é por meio dela que se torna possível determinar a velocidade de degradação da proteína de forragens e de suplementos protéicos. Assim, diferentes técnicas foram propostas, e dentre as mais utilizadas, estão os ensaios *in situ*, *in vitro* e, mais recente, a técnica *in vitro* de produção de gases. Vale ressaltar que é extremamente necessário haver uma padronização dos métodos para determinação da degradabilidade dos alimentos, pois só assim será possível a comparação entre os resultados obtidos pelas mesmas técnicas. A seguir, os ensaios *in situ* serão brevemente descritos.

2.2.2.1 Ensaios *in situ*

O ensaio *in situ*, ou *in sacco*, começou a ser desenvolvido na África do Sul, sendo citado pela primeira vez no final da década de 30, por Quinn, Wath e Myburgh (1939). Consiste em determinar a taxa de degradação, ou o desaparecimento de componentes (frações) da amostra dos alimentos (substratos) acondicionados em sacos de náilon e incubados no rúmen por períodos variáveis de tempo (MEHREZ; ORSKOV, 1977; DHANOA et al., 1995; SAVIAN, 2005; CARVALHO et al., 2006; SOARES, 2007). Passado o tempo de incubação, os sacos são retirados do rúmen, lavados e os resíduos

presentes são analisados (HUNTINGTON; GIVENS, 1995). A suspensão de alimentos no rúmen do animal é realizada por meio de uma cânula, ou fístula, implantada nos animais por meio de procedimento cirúrgico. De acordo com Berchieli, Garcia e Oliveira (2006), a cânula pode ser colocada em várias partes do sistema digestivo. Um pouco da história deste procedimento pode ser encontrado no Apêndice C.

Nota-se que a esta técnica proporciona um contato direto do alimento que está sendo avaliado com o ambiente ruminal e seu dinamismo (temperatura, pH, tamponamento e enzimas). Para Van Soest (1994) e Nocek (1997) esta técnica é a melhor forma de simulação da degradação, embora o alimento não esteja sujeito a todos os eventos digestivos, como a mastigação, a ruminação e a passagem para o trato digestivo posterior. Devido as suas vantagens, esta técnica tem sido adaptada e melhorada por vários pesquisadores. Por muitos anos foi utilizada como técnica de referência, sendo base para predição de digestão em vários sistemas.

As amostras em avaliação são secas, geralmente em estufa, com o intuito de reduzir modificações na composição decorrente da respiração e ações de enzimas. Na sequência elas são moídas com o objetivo de facilitar a homogeneização e simular os processos de mastigação. Entretanto, a secagem e a temperatura nas quais são processados os alimentos podem influenciar a natureza e o conteúdo de vários constituintes dessas amostras (SANTOS, 2006). Como alternativa de avaliação da degradabilidade de forragens conservadas, tem-se a determinação *in situ* utilizando-se o *macro-bag*, que medem geralmente 20 × 40cm. Nesta técnica, os alimentos são incubados em sua forma *in natura*, sem secagem ou moagem, de maneira a reduzir perdas dos componentes solúveis e ácidos orgânicos (HUNTINGTON; GIVENS, 1995).

Contudo, vários fatores podem afetar os valores da estimativa da digestibilidade *in situ*, como por exemplo: o tamanho dos poros do saco; o tamanho de partícula da amostra; a relação entre a quantidade de amostra e o tamanho do saco; a sequência de introdução dos sacos e a posição deles no rúmen; o tempo de incubação ruminal dos sacos; o número de sacos e uso (ou não) de repetições; variações relacionadas aos animais utilizados, aos períodos de espera (ou “*wash-out*”) e ao tipo dieta. Por conta destes problemas, existe uma grande dificuldade na comparação dos resultados estimados por esta técnica entre laboratórios, ou mesmo com resultados obtidos *in vivo*, em ensaios convencionais de digestibilidade. Daí a necessidade de padronização da técnica.

Muito cuidado deve se ter na interpretação dos resultados referentes a esta técnica, pois com as bolsas de náilon se mede o desaparecimento e se supõem que este desaparecimento seja sinônimo de degradação.

2.2.2.2 Características dos ensaios de degradabilidade

Os ensaios de degradabilidade em geral apresentam várias fontes de variação que podem interferir nos valores da estimação da degradabilidade, como variações na população microbiana nas amostras; variações devidas ao processamento das amostras, granulometria e peso da amostra; diferenças atribuídas ao meio, como por exemplo, o volume do fluido ruminal em relação à solução tampão; variações nos tempos de fermentação e erros laboratoriais. Com isso, a comparação entre os resultados obtidos nos ensaios de degradabilidade acaba se tornando um processo complicado devido a não padronização das técnicas. Outras dificuldades ainda são encontradas nesses ensaios, como:

- (i) **Delineamento experimental:** diferentes delineamentos experimentais são utilizados nos ensaios de degradabilidade (GONÇALVES et al., 2001; CAVALCANTE et al., 2004; FEITOSA et al., 2004; FERREIRA et al., 2005; CARVALHO et al., 2006; SILVA et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2010; JOBIM et al., 2011), resultando em escolha desuniforme dos fatores considerados (FEITOSA, 1999). Por exemplo: ensaios casualizados em blocos usam os animais como blocos, enquanto ensaios em quadrados latinos usam dois fatores de blocagem: animais e períodos.

Para Sampaio (1997) a escolha de um delineamento estatístico adequado às características e limitações da avaliação da degradabilidade é um dos fatores essenciais para a obtenção de boas estimativas dos parâmetros dos modelos escolhidos e de testes de hipóteses eficientes. O autor recomenda o uso do delineamento em quadrado latino envolvendo animais, períodos e tratamentos nas parcelas e os tempos de incubação ruminal nas subparcelas.

- (ii) **Escolha dos tempos de incubação e número de amostras:** Quanto aos tempos de incubação utilizados experimentalmente para concentrados ou volumosos, encontram-se na literatura grandes variações nos seus limites (menor e maior tempos avaliados) e nos fracionamentos (GONÇALVES et al., 2001; ZAMBOM et al., 2001; ÍTAVO et al., 2002; CABRAL et al., 2005; CARVALHO et al., 2006; GOMES

et al., 2006; BALIEIRO NETO; MELLOTI, 2007; SILVA et al., 2007; JOBIM et al., 2011). Contudo, para identificar o número de pontos no tempo a serem observados para o ajuste da curva, pode-se utilizar a abordagem bayesiana de delineamento ótimo de experimento (SAMPAIO, 1988). De acordo com Orskov (1988) e Romero (1990), não se pode generalizar um tempo máximo de incubação, nem os tempos intermediários, mas é muito importante que a parte da curva mais sensível seja apoiada em um número suficiente de observações e na fase final do processo, obter apenas as observações necessárias que permitam descrever bem a parte assintótica, que representa o potencial de degradação. Santos (2006) confirmou os resultados obtidos por esses autores ao simular situações com menor número de pontos, retirando tempos nas extremidades da faixa e/ou diminuindo o fracionamento dos mesmos e comparando descritivamente as estimativas dos parâmetros.

Neste contexto, torna-se importante verificar como essas variações nos limites e fracionamentos dos tempos de incubação podem interferir no ajuste dos modelos matemáticos, visto que, pontos em excesso oneram o experimento e pontos em falta podem prejudicar o ajuste e a escolha de modelos apropriados.

Dentre as várias recomendações existentes, Mehrez e Orskov (1977) sugeriram que as medidas sejam feitas no intervalo de 12 a 36 horas para concentrados; de 24 a 60 horas para forrageiras de alta qualidade e de 48 a 72 horas para forrageiras de baixa qualidade. Já a AOAC³ recomendou intervalos de zero a 48 horas para concentrados e de 6 a 72 horas para volumosos. Nocek (1988) sugeriu os tempos de incubação 3, 6 e a cada 12 horas para concentrados e volumosos. Sampaio (1994) recomendou 6 a 96 horas para forragens.

2.2.2.3 Características dos dados de degradabilidade

As medidas obtidas para avaliação da degradabilidade ruminal podem ser caracterizadas como de estudos com medidas repetidas. O termo **medidas repetidas** é usado para designar medidas feitas no mesmo indivíduo, ou na mesma unidade experimental, em mais de uma ocasião (DIGGLE, 1988; CROWDER; HAND, 1990) e,

³ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Washington, 1984. 1141 p.

possivelmente, sob diferentes condições experimentais. São muito utilizados em diversas áreas de pesquisa, porque permitem avaliar mudanças na unidade experimental em diferentes situações.

Os ensaios de degradabilidade *in situ* apresentam características de experimentos alternativos do tipo *crossover* e também de experimentos longitudinais. São experimentos do tipo *crossover*, pois o mesmo animal recebe uma sequência de tratamentos, ou seja, em cada diferente período o indivíduo recebe um tratamento diferente. Entre os períodos há um período de adaptação ou espera, chamado de tempo de espera (ou período *wash-out*), entre aplicações dos tratamentos no intuito de prevenir o efeito *carryover*⁴. Contudo, espera-se que este tempo de espera seja eficaz, não existindo confundimento entre os tratamentos. Desta maneira, é comum apenas considerar a estrutura de dados longitudinais na análise.

Quando essas ocasiões envolvem o tempo, ou seja, em cada unidade experimental são realizadas duas ou mais observações da mesma variável resposta, em instantes diferentes e estas recebem sempre o mesmo tratamento durante sua execução, o planejamento é conhecido como **longitudinal**. Em outras áreas os dados longitudinais são também conhecidos como coorte (em Bioestatística), ou painel (em Sociologia, Economia ou Administração). Quando essas ocasiões envolvem o espaço, o planejamento é conhecido como **geoestatístico**.

Para a representação de dados longitudinais é comum o uso de gráficos dos perfis individuais. Este gráfico consiste em um gráfico de dispersão (com o tempo na abscissa e a degradabilidade na ordenada) em que os pontos associados a uma mesma unidade amostral são unidos por segmentos de reta. Em geral, os perfis de repostas médias são sobrepostos a eles. De acordo com Singer, Nobre e Rocha (2012), há situações em que o interesse recai não nos perfis de resposta, mas sim em alguma característica deles, isto é, a resposta de interesse pode ser obtida como uma função dos perfis individuais, por exemplo, o crescimento máximo atingido por uma determinada raça animal.

Particularmente, os dados longitudinais são classificados como **regulares** em relação ao tempo, se o intervalo entre duas medidas consecutivas quaisquer for cons-

⁴O efeito *carryover* ocorre quando o efeito de um tratamento dado no primeiro período de tempo persiste no segundo período e distorce o efeito do segundo tratamento, influenciando ou modificando os efeitos dos tratamentos aplicados subsequentemente.

tante ao longo do estudo. Caso contrário, dizemos que os dados são **irregulares** em relação ao tempo. Quando o esquema de coleta de dados determina que todas as unidades experimentais (sujeitos) sejam observadas nos mesmos instantes (igualmente espaçados ou não), dizemos que o planejamento é **balanceado** com relação ao tempo. Se forem observados em conjuntos de instantes diferentes, ele é dito **desbalanceado** com relação ao tempo. Além disso, a estrutura de dados é dita **completa** se não apresentar observações perdidas; caso contrário a estrutura é dita **incompleta**. Uma estrutura geral de um conjunto de dados longitudinais balanceados e completos com g grupos (tratamentos) e t instantes de observação, é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Estrutura de dados longitudinais completa e balanceada em relação ao tempo, com g grupos e t ocasiões

Grupo ou Tratamento	Unidade Experimental	Tempo				
		1	2	3	...	t
1	1	y_{111}	y_{112}	y_{113}	...	y_{11t}
	2	y_{121}	y_{122}	y_{123}	...	y_{12t}
	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$
	n_1	y_{1n_11}	y_{1n_12}	y_{1n_13}	...	y_{1n_1t}
2	1	y_{211}	y_{212}	y_{213}	...	y_{21t}
	2	y_{221}	y_{222}	y_{223}	...	y_{22t}
	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$
	n_2	y_{2n_21}	y_{2n_22}	y_{2n_23}	...	y_{2n_2t}
$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$
g	1	y_{g11}	y_{g12}	y_{g13}	...	y_{g1t}
	2	y_{g21}	y_{g22}	y_{g23}	...	y_{g2t}
	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$
	n_g	y_{gn_g1}	y_{gn_g2}	y_{gn_g3}	...	$y_{gn_g t}$

As técnicas clássicas de análise de dados com medidas repetidas no tempo (dados longitudinais), geralmente, são dirigidas para o caso de dados completos e balanceados em relação ao tempo e com distribuição normal. Dentre as técnicas disponíveis, destacam-se: a análise uni ou multivariada de perfis (STEEL; TORRIE, 1980; SINGER; ANDRADE, 1986; MORRISON, 1990; CROWDER; HAND, 1990; MILLIKEN; JOHNSON; 1992; JOHNSON; WICHERN, 2007, dentre outros) e a análise de curvas de

crescimento (POTTHOFF; ROY, 1964; SINGER, 1977; JENNRICH; SCHLUCHTER, 1986; dentre outros).

A análise de perfis é realizada com o objetivo de descrever o comportamento dos perfis médios de respostas dos diversos tratamentos por meio de uma curva polinomial, e estudar a influência de outros fatores ou covariáveis no padrão temporal das respostas. Para isso é necessário estimar os parâmetros associados às curvas de cada tratamento e testar hipóteses sobre esses parâmetros (LIMA, 1996). Basicamente, visa responder às perguntas:

- a) Os perfis médios de resposta dos diferentes tratamentos são paralelos? (isto é, a interação entre tratamento e tempo é nula?)
- b) Se os perfis são paralelos, eles são coincidentes? (isto é, o efeito de tratamento é nulo?)
- c) Se os perfis são paralelos, eles são horizontais? (isto é, o efeito do tempo é nulo?)
- d) Se os perfis não são paralelos, o efeito do tempo é nulo em cada um dos tratamentos?
- e) Se os perfis médios de resposta não são paralelos, o efeito de tratamento é nulo em cada ocasião de observação?

Já a análise de curvas de crescimento visa descrever o comportamento dos perfis médios de resposta por meio de funções lineares (polinômios, por exemplo) e não lineares. Possibilita a comparação entre os tratamentos por meio de comparações entre os parâmetros das curvas ajustadas. Na construção de modelos para este tipo de dados duas abordagens distintas podem ser consideradas:

- (i) A primeira é essencialmente orientada pelos dados e considera funções polinômiais para descrever a relação entre a variável resposta e as variáveis explicativas. Talvez seja este o enfoque mais comumente empregado na prática, principalmente em razão da simplicidade das técnicas utilizadas na análise, e a existência de programas computacionais amigáveis (SAS, SPSS, STATA, R, dentre outros), sendo satisfatório dentro de certos limites, pois estes modelos não incorporam o verdadeiro mecanismo gerador dos dados, ou seja, as informações teóricas sobre o fenômeno investigado não são utilizadas, sendo apenas o comportamento visual dos dados levado em consideração.

- (ii) A segunda abordagem é fundamentada em considerações teóricas sobre o fenômeno investigado e geralmente produz modelos baseados em equações diferenciais estocásticas. Modelos gerados por esse tipo de enfoque são conhecidos como modelos mecanísticos (ou empíricos) e são usualmente não lineares. Neste trabalho, esta será a abordagem de interesse.

Como as medidas de degradação ruminal são obtidas ao longo do tempo nos mesmos animais, o que caracteriza os dados como longitudinais, espera-se que exista uma correlação não nula entre elas e uma heterogeneidade de variâncias nas diversas ocasiões. Quando esses aspectos não são levados em consideração pode-se afetar as estimativas obtidas e o erro padrão associado a elas.

Uma maior versatilidade na aplicação das técnicas de análise de dados longitudinais é conseguida com a possibilidade de modelar a estrutura de covariâncias, buscando estruturas intermediárias entre a completamente parametrizada e a componente de variância ($CV = \mathbf{I}\sigma^2$). Isto pode ser alcançado com a especificação de modelos (lineares ou não lineares) mistos, que admitem matrizes de covariâncias diferentes para cada unidade experimental e têm o atrativo adicional de tratar situações em que os dados são incompletos ou não são balanceados em relação ao tempo.

2.2.3 Modelos matemáticos para estudos de degradabilidade

Segundo Mertens (1993), as primeiras avaliações de processos de digestão e conversão eram qualitativas e baseavam-se na interpretação visual de curvas de digestão. A descrição do processo era difícil porque curvas de digestão mostravam comportamentos não lineares e pareciam não se ajustar às cinéticas de reações químicas típicas.

Andrade (1994) afirma que a fase mais crítica dos ensaios de degradabilidade é o ajuste de algum modelo matemático aos dados que explique o fenômeno biológico. Particularmente, as equações de regressão polinomiais podem facilmente e efetivamente alcançar este objetivo, mas sem estabelecer uma relação entre os parâmetros estimados e os componentes do alimento analisado.

Vieira (1995) e Gonçalves et al. (2001) afirmam que a impossibilidade de quantificar diretamente um certo evento biológico tem levado à busca e ao desenvolvimento de modelos matemáticos, com os quais se pretende uma quantificação do fato real. Para a descrição do fenômeno em estudo equações diferenciais são propostas, em que

sua solução geralmente resulta em um modelo não linear, como o modelo de Orskov e McDonald (1979), usualmente utilizado para descrever a degradabilidade ruminal.

O processos de digestão e conversão dependem de tempos de retenção, ou seja, a variável independente dos modelos sugeridos para estudos da degradabilidade é o tempo transcorrido desde a incubação ou ingestão do alimento e, em geral, o tempo deve estender até que o processo fermentativo cesse. Sendo assim, definiu-se: *i*) **degradabilidade inicial** como aquela que corresponde à degradabilidade verificada no tempo zero, ou seja, o intercepto da equação que descreve a evolução da degradação. Outros autores consideram mais adequado denominar esse parâmetro como “solubilidade do alimento em água”, face ao procedimento metodológico pelo qual ele é estimado; *ii*) **degradação potencial** (DP) como o grau de degradação do alimento no ambiente ruminal, caso não houvesse limitação do tempo de permanência da digesta naquele compartimento (SAVASTANO, 1993).

Waldo em 1970 foi o primeiro a sugerir uma inovação conceitual (MERTENS, 1993 apud FEITOSA, 1999), que serviu como base para uma nova visão dos modelos matemáticos relacionados com a cinética da digestão, com os quais se pretendia uma quantificação real do fato. Desta forma, na década de 1970 vários pesquisadores como Waldo, Smith e Cox (1972), Smith, Goering e Gordon (1972), Mertens (1977), Orskov e McDonald (1979) e Mertens e Loften (1980), propuseram um modelo exponencial de primeira ordem para a avaliação da cinética ruminal, assumindo que o rúmen constitui um compartimento homogêneo. Estes modelos estão fundamentados em um esquema comum, em que é estabelecida uma divisão do substrato em diversas frações, cada uma delas digerida no rúmen a uma determinada amplitude e ritmo (SAVIAN, 2005).

Dentre os modelos não lineares utilizados na descrição dos perfis médios de degradação ruminal, destacam-se os de crescimento exponencial para a técnica *in situ*, apresentando comportamento exponencial crescente ou decrescente se foi avaliada a fração degradável acumulada ou o resíduo potencialmente degradável, respectivamente. Para as técnicas *in vitro* com produção de gases destacam-se os modelos de crescimento exponencial e sigmoidal (SCHOFIELD; PITT; PELL, 1994; MELLO et al., 2008, dentre outros). Neste trabalho apenas serão abordados os modelos para a degradação *in situ*.

Adicionalmente, os modelos podem assumir um, dois ou mais compartimentos e/ou fases de fermentação. Dessa forma, quando os dados forem analisados por

modelos diferentes, os resultados também podem ser diferentes, exigindo cautela e bom senso em sua interpretação e julgamento.

Na literatura diversos modelos são propostos para a caracterização da degradação dos componentes nutricionais de alimento no rúmen. Por sua simplicidade e significado biológico dos seus parâmetros, grande parte dos pesquisadores prefere usar o modelo exponencial, proposto por Orskov e McDonald (1979). Para estimar a degradabilidade de suplementos de proteína no rúmen, a obtenção deste modelo é feita supondo-se uma certa quantidade de um componente de um determinado alimento, que entra no rúmen seja composta de três frações:

- (i) a , que é a fração solúvel em água (ou valor de lavagem), que é assumida ser degradada instantâneamente;
- (ii) S , que é a fração insolúvel mas potencial degradável; e
- (iii) U , que é a fração insolúvel não degradável.

Tem-se que $a + S + U = 1$ (MILGEN; MURPHY; BERGER, 1991; THORNLEY; FRANCE, 2007). Como a é assumida ser degradada instantaneamente, apenas S e U são de interesse dinâmico. O esquema para a cinética das frações S e U é mostrada na Figura 2, em que μ e k (em h^{-1}) denotam as taxas de fração de degradação e de passagem, respectivamente. Excluindo das setas duplas tem-se o esquema de desaparecimento durante a incubação em um saco de poliéster.

Figura 2 - Modelo de dois estágios para degradação ruminal.

A taxa da fração de degradação é postulada como:

$$\mu = c, \quad (1)$$

em que, c (h^{-1}) é uma constante, tal que $c \geq 0$ e portanto, $\mu \geq 0$. Aqui, a taxa de fração de passagem k é assumida também constante, podendo assumir os valores 2, 5, 8 % por hora para níveis de ingestão alimentar baixo, médio e alto, respectivamente.

Se o componente alimentar é incubado em um saco de poliéster no rúmen, a taxa de passagem é nula e as frações dinâmicas são descritas pelas equações diferenciais lineares:

$$\frac{dU}{dt} = 0 \quad \text{e} \quad \frac{dS}{dt} = -\mu S. \quad (2)$$

Considerando $t \geq 0$, substituindo μ da equação (1) e integrando as equações dadas em (2) obtém-se:

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= -cS \iff \frac{1}{S} dS = -c dt \iff \int \frac{1}{S} dS = \int_0^t -c dt \iff \\ &\iff \ln(S) + b_1 = - \int_0^t c dt \iff \ln(S) + b_1 = -c(t) \iff \\ &\iff e^{\ln(S)} = e^{-b_1} e^{-ct} \iff S = b e^{-ct} \end{aligned} \quad (3)$$

e

$$U = U_0, \quad (4)$$

em que $b = e^{-b_1}$ e U_0 são as quantidades iniciais (constantes) da degradabilidade potencial e da fração não degradável do componente alimentar, respectivamente; e b_1 é uma constante de integração. A degradação acumulada (desaparecimento) no tempo t é dado por:

$$D = a + \int_0^t \mu S dt. \quad (5)$$

Substituindo μS da equação (2) na equação (5), em seguida integra-se o produzido e substituindo (3), obtém-se:

$$\begin{aligned} D &= a + \int_0^t \mu S dt = a + \int_0^t -dS = a + \left(-[S] \Big|_0^t \right) \\ &= a + (-[b e^{-ct} - b e^{-c \cdot 0}]) = a + (-b e^{-ct} + b) = a + b(1 - e^{-ct}). \end{aligned}$$

Logo, o modelo proposto por Orskov e McDonald (1979) é dado pela seguinte expressão não linear:

$$D(t) = a + b(1 - e^{-ct}) , \quad (6)$$

em que,

$D(t)$ é a degradabilidade potencial ou desaparecimento dos componentes bromatológicos do alimento, em porcentagem, no tempo t ;

a é a fração do alimento solúvel em água, ou rapidamente degradável;

b é a fração insolúvel em água, mas potencialmente degradável em um determinado tempo, sob ação de microrganismos;

c é a taxa de degradação da fração b ; e

t é o tempo de incubação (h).

Fazendo variar os valores de a , b e c do modelo (6), pode-se estudar o comportamento desta função, que é ilustrado na Figura 3. O valor $100 - [a + b(1 - e^{-kt})]$ corresponde à fração efetivamente não degradada (em porcentagem), no tempo t .

Contudo, determinadas frações de alguns alimentos apresentam um período pré-fermentativo, em que não se verifica a degradação do substrato. Tal período, compreendido entre o início da incubação e o início da degradação do alimento por ação enzimática microbiana ruminal, é chamado de tempo de latência, *lag time*, *lag phase*, ou tempo de colonização (L). Durante esse período, pode ocorrer hidratação das partículas do alimento, remoção de substâncias inibidoras e eventos ligados à adesão e efetiva colonização das partículas do alimento pelos microrganismos ruminais, de modo que, antes do término desta fase, o alimento permanece inalterado no rúmen, a não ser por ação mecânica (SAVASTANO, 1993; SAVIAN, 2008).

Stensig, Weisbjerg, e Hvelplund (1994) alertaram que, se o tempo de colonização não for considerado no modelo, a assíntota tende a ser superestimada e a taxa de degradação, subestimada. Segundo Gonzales et al. (1992), embora existam modelos que permitam a estimação do *lag time*, este parâmetro é altamente variável e dificilmente reproduzido. Na ausência de modelos e técnicas analíticas melhores, recomenda-se que a avaliação da cinética de digestão seja baseada nos parâmetros de taxa de degradabilidade

Figura 3 - Modelo de Orskov e McDonald (1979) variando os parâmetros a , b e c

potencial. Na realidade, se forem considerados apenas os resultados após o *lag time*, é justificável a introdução de novos modelos que determinem a contribuição deste sobre a cinética de degradação ruminal (MERTENS, 1977; MCDONALD, 1981; PEREIRA, 1992; SAMPAIO, 1994). Na literatura, estudos envolvendo ajuste desses modelos e seus componentes são amplamente discutidos.

Revisando o modelo (6), McDonald (1981) acrescentou a ele o parâmetro L , referente ao tempo de colonização para o início da degradação microbiana. Este novo modelo é descrito por:

$$D(t) = \begin{cases} a & \text{se } 0 \leq t \leq L; \\ a' + b' (1 - e^{-ct}) & \text{se } t > L. \end{cases}, \quad (7)$$

sendo, $D(t)$ a degradabilidade ou desaparecimento dos componentes bromatológicos do alimento, em porcentagem no tempo de incubação t ; L é o *lag time*; os parâmetros a , b e c têm a mesma interpretação do modelo (6); e a' e b' são constantes. Segundo Vieira (1995), o parâmetro a corresponde a solubilização inicial do substrato, obtida diretamente por inclusão do tempo zero; a' e b' são parâmetros de escala do modelo, que não possuem significado biológico; e c é a taxa de degradação da fração insolúvel potencialmente degradável (b), que é estimada por: $b = a' + b' - a$.

Para o cálculo do *lag time* foi proposta a equação:

$$L = \frac{1}{c} \ln \left[\frac{a' + b' - a}{b'} \right], \quad (8)$$

obtida substituindo-se na equação (7) $D(t)$ pela fração solúvel a e isolando o valor de t . A explicação biológica para esta equação é que ao substituir o que poderia ser degradável pela fração solúvel e determinar o valor do tempo na expressão, obtém-se exatamente o período de colonização, em que não haveria degradabilidade e sim partículas do alimento solúvel ou tão pequenas a ponto de escaparem pelos poros do saco de náilon. A Figura 4 traz uma representação gráfica dos parâmetros da equação de McDonald (1981), indicando o valor do *lag time*, com $a' > 0$.

Figura 4 - Representação gráfica dos parâmetros da equação de McDonald (1981), indicando o valor do *lag time* (quando $a' > 0$)

Segundo Thiago (1994), o valor da expressão $100 - (a + b)$ representa a

fração indigestível no rúmen e que valores positivos de a caracterizam perda rápida, devido à degradação no tempo zero ou simples solubilidade, que pode ser estimada pela prévia submersão de um grupo de sacos de náilon com amostra do alimento em água e seguindo o procedimento normal para os outros sacos retirados do rúmen. Quando a for negativo significa que há necessidade de um tempo prévio para ocorrer o início da degradação (*lag time*). Esta medida é bastante interessante na avaliação de forragens, em especial para as tropicais, onde o processo de lignificação é mais acentuado. O fato de trabalhar com amostras picadas em vez de moídas, pode contribuir para diminuir o valor desta medida.

Mertens (1993) alerta que algumas vezes o *lag time* é negativo, isto representa problemas para sua interpretação biológica. Considerando-se a interpretação de que um *lag time* positivo indica o tempo após o qual a digestão começa, um *lag time* negativo indica que a digestão no rúmen se inicia antes de $t = 0$, um resultado que é difícil, senão impossível, de ser aceito biologicamente.

A explicação biológica apresentada por Mertens e Ely (1982) para os valores negativos de *lag time* foi que, tempos inferiores ao *lag time* são aqueles estimados quando a solubilização ocorre instantaneamente e o conjunto de tempos iniciais de incubação impede que este se torne menor que zero, devido a isto, eliminam a possibilidade de detecção da solubilização, e assim, erros de estimativas das taxas fracionais de digestão e componentes potencialmente digestíveis e indigestíveis podem ocorrer.

A partir dessas considerações, várias reparametrizações foram propostas. Por exemplo, Dhanoa (1988) sugeriu a seguinte reparametrização do modelo de McDonald (1981):

$$D(t) = \begin{cases} a & \text{se } 0 \leq t \leq L; \\ a + b (1 - e^{-c(t-L)}) & \text{se } t > L. \end{cases}, \quad (9)$$

em que os parâmetros têm a mesma interpretação da equação (6).

Já Sampaio (1997), sugeriu a seguinte forma para a equação (7):

$$D(t) = \begin{cases} a' & \text{se } 0 \leq t \leq L; \\ a + b (1 - e^{-ct}) & \text{se } t > L. \end{cases}, \quad (10)$$

onde a é a intersecção do modelo exponencial com o eixo das ordenadas, e corresponde à fração imediatamente solúvel se não houvesse *lag time*; b é a fração potencialmente degradável sob ação da microbiota, se não houvesse *lag time*; a' é o verdadeiro valor

da fração imediatamente solúvel, na presença de um *lag time* (este parâmetro pode ser estimado pela lavagem do material contido nos sacos de náilon no tempo zero, ou seja, sem ter passado por qualquer tempo de incubação); e b' é a fração potencialmente degradável por ação de microbiota. Observa-se que $b' = a + b - a'$, já que $a + b = a' + b'$.

O modelo (7) foi ainda simplificado por Pike, Owen e Said (1996), com algumas redefinições para os parâmetros. Os autores consideraram $A = a + b$ e $B = b$, e o modelo reparametrizado é descrito pela equação

$$D(t) = A - Be^{-ct}, \quad (11)$$

sendo, A o potencial máximo de degradação do material no saco (a assíntota da curva); e B , o valor onde o potencial de degradação foi efetivamente devido à ação químico-microbiológica. Os parâmetros c e t são como definidos na equação (6). Este modelo considera apenas os resultados observados após o término do tempo de colonização (SAMPAIO, 1988).

Os valores de a , b ou B descritos no modelo de Orskov e McDonald (1979) e Sampaio (1988) podem não corresponder às suas definições biológicas devido à existência do *lag time* (BARBOSA, 1996).

Sampaio (1997) sugeriu que o valor do *lag time* seja estimado substituindo-se $D(t)$ por S (fração solúvel), que no modelo de Orskov e McDonald (1979) e McDonald (1981) é descrito por a , para obter o valor de t na equação (11), resultando em:

$$L = -\frac{\ln(A - S) - \ln(B)}{c}.$$

Relata ainda que o *lag time* de várias forrageiras tropicais tratadas ou não quimicamente, de boa ou de baixa digestibilidade, não excede a 5,5 horas.

A equação não sigmoideal de Orskov e McDonald (1979) também é utilizada com frequência na avaliação da degradação dos alimentos pela técnica *in vitro* com produção de gás. Para esta supõe-se que a taxa de produção de gás depende unicamente do substrato disponível para fermentação, uma vez alcançado o tempo de colonização. Esta equação apresenta três parâmetros, descrevendo um comportamento exponencial:

$$G(t) = g (1 - e^{-c(t-L)})$$

em que, $G(t)$ é a produção acumulada de gás no instante t ; g é o potencial máximo de produção de gás ou assíntota da curva; c é uma taxa específica de degradação (%/hora); e L possui o mesmo significado dos modelos anteriores.

O modelo de Orskov e McDonald (1979) ainda pode ser visto como um caso especial do modelo de dois compartimentos de France et al. (1993) que é dado por:

$$G(t) = A[1 - e^{-c(t-L)-d(\sqrt{t}-\sqrt{L})}] \quad (12)$$

em que, $G(t)$ é a produção acumulada de gás (ml) no tempo t ; $A = a + b$ (assíntota); c é a taxa fracional de produção de gás (h^{-1}). O parâmetro L tem a mesma interpretação definida anteriormente, enquanto d , que não é biologicamente definido, representa pequenas variações de degradação nas primeiras horas de incubação. Fazendo $d = L = 0$ em (12) obtém-se o modelo de Orskov e McDonald. O modelo (12) apresenta maior flexibilidade em relação ao modelo de Orskov e McDonald (1979), pois é composto por quatro parâmetros.

Na estimação da degradabilidade, além das duas frações citadas anteriormente (solúvel e insolúvel), torna-se necessário levar em conta também o percurso normal do alimento pelo trato gastrointestinal (taxa de passagem), com isso determina-se a degradabilidade efetiva (DE) do alimento, que é o objetivo final dos ensaios de degradabilidade. A mensuração da degradabilidade no rúmen, sem considerar a taxa de passagem, pode superestimar a extensão da degradação, já que as partículas dos alimentos estão sujeitas à passagem para o compartimento seguinte, antes de serem completamente degradadas (CARVALHO et al., 2006). Para se realizar a formulação de uma ração mais adequada são essenciais o conhecimento da DE e da taxa de degradação, aliadas a dados de composição química dos alimentos utilizados (ORSKOV, 1988).

Desta forma, seja f a fração (em peso) da proteína que permanece no rúmen após t horas de incubação, então o valor de $f = e^{-kt}$ pode ser usado como um fator de correção aplicado a um ritmo de degradação instantânea para um tempo t . A taxa de desaparecimento ajustada é dada por:

$$f \frac{dD(t)}{dt} = (e^{-kt}) \frac{dD(t)}{dt}, \quad (13)$$

em que, $D(t)$ é a porcentagem de desaparecimento do material contido na bolsa incubada no rúmen no tempo t . Como $D(t) = a + b(1 - e^{-ct}) = a + b - b e^{-ct}$, então:

$$\frac{dD(t)}{dt} = -b e^{-ct}(-c) = b c e^{-ct}. \quad (14)$$

Substituindo (14) em (13), tem-se:

$$f \frac{dD(t)}{dt} = (e^{-kt}) b c e^{-ct} = b c e^{-t(k+c)}.$$

Assim, Orskov e McDonald (1979) propuseram o cálculo da porcentagem acumulada de degradação efetiva (DE) protéica por meio da integral:

$$\begin{aligned}
 DE &= a + \int_0^t f \frac{dD(x)}{dx} dx &= a + \int_0^t b c e^{-x(k+c)} dx &= \\
 &= a + b c \int_0^t e^{-x(k+c)} dx &= a + b c \left(\frac{-e^{-x(k+c)}}{(k+c)} \Big|_0^t \right) &= \\
 &= a + \frac{b c}{(k+c)} (1 - e^{-t(k+c)}) && (15)
 \end{aligned}$$

Note que, a medida que t aumenta, o termo $e^{-t(k+c)}$ da equação (15) tende a zero e a porcentagem de proteína realmente degradada estará representada por:

$$DE = a + \frac{b c}{(k+c)} \quad (16)$$

onde a , b e c são as mesmas constantes da equação (6) e k é a taxa de passagem assumida também constante, como descrita na Figura 2.

Para o modelo (7) a degradabilidade efetiva é dada pela seguinte equação:

$$DE = a + \frac{b'c}{c+k} e^{-(c+k)L},$$

em que a , b' , c , L e k são os mesmos parâmetros definidos em (7).

Como citado anteriormente, o cálculo da degradabilidade potencial (DP) também é de interesse, pois informa o grau de degradação do alimento no ambiente ruminal, caso não houvesse limitação do tempo de permanência da digesta naquele compartimento. Considerando o modelo (6), a DP é calculada como:

$$DP = a + b. \quad (17)$$

2.3 Modelos não lineares

O primeiro a formular um modelo em termos de erros aleatórios foi Moivre (1756), em seu trabalho *Doctrine of Chances*, onde a primeira edição foi publicada em 1738. Sua contribuição é conhecida como “Princípio da Média Aritmética”⁵. Já as técnicas de regressão surgiram da necessidade de se representar dados provenientes de tabelas, sob a forma de uma expressão matemática. O termo regressão foi utilizado pela

⁵Citado em “A Course of Regression” Class notes of Iowa University. Biblioteca do IMECC/UNICAMP.

primeira vez por Galton, por volta de 1885, quando investigava relações entre características antropométricas de sucessivas gerações de pessoas. Ele observou dentre outros fatos, que os filhos apresentavam as mesmas características dos seu pais, porém em uma intensidade menor. Por exemplo, pais com estatura baixa tem filhos de estatura baixa, mas em média, a estatura destes é maior. O mesmo ocorre, mas em direção contrária, para pais com estatura maior. Este fenômeno, da altura dos filhos mover-se em direção à altura média de todos os homens (regredirem para a média), ele denominou de **regressão** (MIRSHAWKA, 1993 apud CHIACCHIO, 1993).

Nos estudos de regressão linear simples busca-se explicar o relacionamento entre as variáveis X e Y por meio de uma função $f(.)$. Quando Y depende apenas de uma variável X , ou seja,

$$Y = f(X, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_p) + \varepsilon$$

tem-se que:

- a) $f(.)$ é linear nos parâmetros $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_p$ se a derivada parcial de $f(.)$ em relação a cada um dos parâmetros for apenas uma função dos dados, $h(X)$, ou seja,

$$\frac{\partial(f)}{\partial(\beta_k)} = h(X) \text{ , com } k = 1, 2, \dots, p;$$

- b) Se pelo menos uma das derivadas parciais, $\frac{\partial(f)}{\partial(\beta_k)}$, depender de pelo um dos parâmetros do modelo, então dizemos que $f(.)$ é uma função não linear dos parâmetros (DRAPER; SMITH, 1998). Ao contrário dos modelos polinomiais, os parâmetros dos modelos não lineares possuem interpretação biológica e descrevem características importantes do objeto de estudo, como taxas de crescimento ou assíntotas. Na área zootécnica, diversos são os fenômenos descritos por modelos de regressão não linear, como as curvas de crescimento em peso, as curvas de produção de ovos e de produção de leite.

- c) $f(.)$ não é linear, mas pode ser linearizada por meio de alguma transformação de variáveis. Um modelo de regressão não linear é considerado “intrinsecamente linear” se este pode ser reduzido a um modelo linear por meio de uma reparametrização apropriada, ou pelo uso de alguma transformação. Em geral, na prática, um modelo não linear é linearizado para facilitar a obtenção das estimativas dos parâmetros. O inconveniente de uma transformação é que, além dos parâmetros

perderem suas interpretações intrínsecas, pode alterar a estrutura e distribuição do erro. Por exemplo: se os erros do modelo original satisfazem as suposições usuais de normalidade, independência e homogeneidade da variância, os erros do novo modelo, em geral, não satisfarão tais suposições (KHURI; CORNELL, 1987). Caso não seja possível obter uma reparametrização ou uma transformação apropriada, que reduza o modelo à forma linear, diz-se que os modelos são “intrinsecamente não lineares”.

As funções mais utilizadas para descrever curvas de degradação em função dos tempos de incubação, podem ser lineares ou não lineares. Contudo, de acordo com Draper e Smith (1998) as curvas não lineares proporcionam um melhor ajuste das curvas por apresentarem quadrados médios residuais menores.

Considere o i -ésimo indivíduo ($i = 1, \dots, n$) e a medida no tempo t_{ij} , com $j = 1, \dots, n_i$. Seja $\mathbf{y}_i = [y_{i1}, \dots, y_{in_i}]'$ o vetor de variáveis respostas, que resume a informação avaliada em um indivíduo i em diferentes níveis de uma variável independente que podem ser agrupados no vetor $\mathbf{x}_i = [x_{i1}, \dots, x_{in_i}]'$. O modelo não linear para o i -ésimo indivíduo pode ser escrito assumindo que a relação variável resposta/variável independente é representada por uma equação da forma:

$$\mathbf{y}_i = \mathbf{f}(\mathbf{x}_i, \boldsymbol{\beta}) + \boldsymbol{\varepsilon}_i, \quad (18)$$

em que

$\boldsymbol{\beta} = [\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_p]'$ é o vetor de parâmetros desconhecidos;

$\mathbf{f}(\mathbf{x}_i; \boldsymbol{\beta}) = [f(x_{i1}; \boldsymbol{\beta}), \dots, f(x_{in_i}; \boldsymbol{\beta})]'$ é um vetor ($n_i \times 1$) de funções não lineares contínuas, com forma conhecida, e que admitem derivadas de primeira e segunda ordem com relação aos seus parâmetros (BATES; WATTS, 1988; SEBER; WILD, 2003).

$\boldsymbol{\varepsilon}_i = [\varepsilon_{i1}, \dots, \varepsilon_{in_i}]'$ é o vetor ($n_i \times 1$) de erros associado ao i -ésimo indivíduo, sendo ε_{ij} o erro da j -ésima observação feita no i -ésimo indivíduo, em que $cov(\boldsymbol{\varepsilon}_i) = \boldsymbol{\Sigma}$, sendo $\boldsymbol{\Sigma}$ uma matriz positiva definida de variâncias e covariâncias.

A função esperança ou função de regressão é dada por $E(\mathbf{y}_i) = \mathbf{f}(\mathbf{x}_i; \boldsymbol{\beta})$. Vale ressaltar que $\mathbf{x}_i$ pode ser escrito como uma matriz ($x_{ij} \times w$) de variáveis regressoras, em que w é o

número de variáveis regressoras. Geralmente $w = 1$, pois nos experimentos longitudinais se trabalha com uma única variável regressora (tempo), o que implica em substituir a matriz por um vetor.

2.3.1 Estimação dos parâmetros

Dependendo do método de estimação utilizado, não é necessário supor o tipo distribuição para as observações, bastando que algumas condições de regularidade (Anexo A) sejam satisfeitas para que os estimadores sejam consistentes e assintoticamente normais (BRANDÃO, 1996). Os métodos mais utilizados na estimação dos parâmetros de modelos não lineares são os de mínimos quadrados e o da máxima verossimilhança. Genericamente, o método dos mínimos quadrados apresenta algumas variações por conta da suposição sobre a estrutura da matriz de variâncias e covariâncias do problema em estudo. A seguir estes métodos são apresentados com maiores detalhes.

2.3.1.1 Método dos mínimos quadrados ordinários

A base do método foi desenvolvida por Carls Friedrich Gauss em 1794, com apenas 18 anos, contudo Adrien-Marie Legendre foi o primeiro a publicá-lo em 1806, em seu tratado “Nouvelles méthodes pour la détermination des orbites des comètes”, publicado em Paris em 1806. Gauss somente viria a publicar seus resultados em 1809, em Hamburgo. Ambos utilizaram o princípio em conexão com problemas de astronomia e física (CHIACCHIO, 1993; BUSSAB; MORETTIN, 2004).

Este é o método de estimação mais simples (BRANDÃO, 1996) e talvez por este fato, seja o mais utilizado. Em geral, assume-se que os erros são variáveis aleatórias independentes e identicamente distribuídas (i.i.d.) com:

$$E(\varepsilon_{ij}) = 0, \quad Var(\varepsilon_{ij}) = \sigma^2 \quad \text{e} \quad Cov(\varepsilon_{ij}, \varepsilon_{ij^*}) = 0, \text{ para } j \neq j^*.$$

Em geral, essas suposições não são satisfeitas nos estudos de degradabilidade, em que as medidas são feitas repetidamente ao longo do tempo nas mesmas unidades experimentais.

Denota-se por $\hat{\beta}_{MQO}$ a estimativa de mínimos quadrados ordinários de $\beta = [\beta_1, \dots, \beta_p]$, ou seja, $\hat{\beta}_{MQO}$ contém os valores de β que minimizam a soma de quadrados dos erros, $S(\beta)$ (HARTLEY; BROOKER, 1965; DRAPER; SMITH, 1998;

MAZUCHELI; ACHCAR, 2002) que é dada por:

$$S(\boldsymbol{\beta}) = \sum_{i=1}^n [\mathbf{y}_i - \mathbf{f}(\mathbf{x}_i; \boldsymbol{\beta})]' [\mathbf{y}_i - \mathbf{f}(\mathbf{x}_i; \boldsymbol{\beta})]. \quad (19)$$

Logo, para a determinação dos estimadores de mínimos quadrados $\hat{\boldsymbol{\beta}}_{MQO}$ deve-se derivar (19) com relação a cada β_k ($k = 1, \dots, p$) e igualar as equações a zero. Procedendo desta forma, determina-se um sistema de p equações não lineares.

Os estimadores de mínimos quadrados são aproximadamente não viciados, normalmente distribuídos e com variância mínima, mesmo em pequenas amostras. Têm propriedades similares às propriedades ótimas de modelos lineares (BRANDÃO, 1996) e os valores de previsões que utilizam tais estimadores são mais precisos. Contudo, Draper e Smith (1998) ressaltaram que no caso da regressão não linear, as propriedades dos estimadores dos parâmetros são válidas apenas assintoticamente, isto é, para grandes amostras. Afirmam ainda que as inferências sobre o vetor de parâmetros apresentam resultados apenas aproximados, cuja validade depende se o “grau de não linearidade do modelo” é pequeno.

Medidas de não linearidade indicam se o grau de não linearidade em um modelo de regressão não linear, é pequeno o suficiente para justificar a utilização dos resultados usuais da teoria dos modelos lineares como aproximação para os não lineares (GUTTMAN; MEETER, 1965). Beale (1960 apud CHIACCHIO, 1993) foi o pioneiro a questionar essa validade, propondo uma “medida de não linearidade intrínseca do modelo”, que indica se a curvatura da superfície de estimação é acentuada ou não nas proximidades do mínimo. Diversos autores se preocuparam em estudar a não linearidade e propuseram medidas para a sua quantificação. As abordagens de Beale (1960) e Bates e Watts (1980) quantificam a não linearidade do modelo, baseando-se no local da solução, enquanto as abordagens de Box (1971) e Ratkowsky (1983) fizeram uso de medidas associadas aos parâmetros estimados. Maiores detalhes sobre essas medidas de curvatura podem ser encontrados em Zeviani (2009), dentre outros.

2.3.1.2 Método dos mínimos quadrados ponderados

Quando constatada a heterogeneidade de variâncias, a estimação pelo método clássico dos MQO passa a não atender as especificações do ajuste de um modelo de regressão, distorcendo dessa forma as estimativas obtidas do modelo ajustado

(DAVIDIAN; GILTINAN, 1995). Diante deste fato, ou se procede a uma transformação na variável resposta com a finalidade de estabilização da variância, ou se emprega o método MQP para a estimação dos parâmetros (RIAZOSHAMS; MIDI, 2009), uma vez que, para cada valor da variável independente supõe-se que a precisão é diferente. Logo, tem-se que:

$$E(y_{ij}) = f(\mathbf{x}_i, \boldsymbol{\beta}), \quad \text{Var}(y_{ij}) = \frac{\sigma^2}{w_j} \quad \text{e} \quad \text{Cov}(\varepsilon_{ij}, \varepsilon_{ij^*}) = 0, \quad \text{para } j \neq j^*.$$

em que, $w_j > 0$ é conhecido ($j = 1, 2, \dots, t$). Note que a função da variância continua caracterizada por apenas um parâmetro positivo desconhecido, σ^2 , mas as variâncias nas diversas ocasiões podem ser diferentes. O estimador de mínimos quadrados ponderados de $\boldsymbol{\beta}$ é o vetor $\hat{\boldsymbol{\beta}}_{MQP}$ que minimiza a soma de quadrados dos erros dada por:

$$S(\boldsymbol{\beta}) = \sum_{i=1}^n [\mathbf{y}_i - \mathbf{f}(\mathbf{x}_i, \boldsymbol{\beta})]' \mathbf{W}^{-1} [\mathbf{y}_i - \mathbf{f}(\mathbf{x}_i, \boldsymbol{\beta})], \quad (20)$$

em que $\mathbf{W} = \text{diag}(w_1, w_2, \dots, w_t)$ é uma matriz diagonal ($t \times t$), cujos elementos, w_j , são conhecidos. O uso do método dos MQP admite que alguns dos erros apresentam maior variabilidade do que outros. Os casos com maiores valores de w_j terão menores variâncias e por esse motivo terá um maior peso na soma de quadrados dos resíduos ponderados (SOARES, 2007). Procedendo como no método dos MQO, obtém-se um sistema de p equações não lineares a ser resolvido, para obtenção do estimador $\hat{\boldsymbol{\beta}}_{MQP}$.

2.3.1.3 Método dos mínimos quadrados generalizados

Este método é utilizado quando os erros não são independentes e existe heterogeneidade das variâncias (GALLANT, 1987). O estimador de MQG de $\boldsymbol{\beta}$, denotado por $\hat{\boldsymbol{\beta}}_{MQG}$, é obtido minimizando a soma de quadrados dos resíduos dada por:

$$S(\boldsymbol{\beta}) = \sum_{i=1}^n [\mathbf{y}_i - \mathbf{f}(\mathbf{x}_i, \boldsymbol{\beta})]' \boldsymbol{\Sigma}^{-1} [\mathbf{y}_i - \mathbf{f}(\mathbf{x}_i, \boldsymbol{\beta})] \quad (21)$$

Observe que o uso deste estimador supõe que a matriz de covariância $\boldsymbol{\Sigma}$ seja conhecida, o que dificilmente ocorre, ou que dispomos de uma estimativa obtida de forma independente da amostra com que estamos trabalhando. Na prática, em geral, substitui-se a matriz $\boldsymbol{\Sigma}$ por uma estimativa calculada a partir dos próprios dados (BRANDÃO, 1996). Um estimador consistente para $\boldsymbol{\Sigma}$ é dado por:

$$\mathbf{S} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left[\mathbf{y}_i - \mathbf{f}(\mathbf{x}_i, \hat{\boldsymbol{\beta}}_{MQO}) \right]' \left[\mathbf{y}_i - \mathbf{f}(\mathbf{x}_i, \hat{\boldsymbol{\beta}}_{MQO}) \right],$$

em que $\hat{\beta}_{MQO}$ é o estimador MQO de β , que é obtido minimizando a soma de quadrados residual (19) (MALINVAUD, 1970 apud BRANDÃO, 1996).

Sugestões de estimadores quando Σ tem estrutura autoregressiva podem ser encontradas em Gallant (1987) e Seber e Wild (2003), dentre outros. De acordo com Savian (2005), no caso do estudo de modelos não lineares que descrevem a degradação ruminal é bastante razoável incorporar a autocorrelação, pois as medidas de degradação de um determinado componente nutricional de interesse são tomadas em um mesmo animal, e devem ser correlacionadas.

Sendo Σ conhecida, a obtenção do estimador de MQG ainda não é trivial. Para facilitar sua obtenção, calcula-se a matriz $\mathbf{L}$ ($t \times t$) triangular superior, obtida pela decomposição de Cholesky, em que $\Sigma^{-1} = \mathbf{L}'\mathbf{L}$. Logo, a soma de quadrados descrita por (21) pode ser reescrita como:

$$S(\beta) = \sum_{i=1}^n [\mathbf{L}\mathbf{y}_i - \mathbf{L}\mathbf{f}(\mathbf{x}_i, \beta)]' [\mathbf{L}\mathbf{y}_i - \mathbf{L}\mathbf{f}(\mathbf{x}_i, \beta)] \quad (22)$$

A partir deste momento, o vetor de estimativas $\hat{\beta}_{MQG}$ passa a ser um vetor de estimativas de MQO para os dados transformados, pois esta transformação utilizando a decomposição de Cholesky, permite tratar os dados como de um caso de variâncias homogêneas com observações independentes ($\Sigma = \mathbf{I}\sigma^2$). Maiores detalhes sobre esse procedimento podem ser encontrados, por exemplo, em Brandão (1996) ou Ogliari (1998).

Note que os métodos dos MQO e MQP são casos particulares do método de MQG, bastando admitir no primeiro caso $\Sigma = \mathbf{I}\sigma^2$, sendo $\mathbf{I}$ uma matriz identidade e no segundo caso, $\Sigma = \text{diag}(w_1, w_2, \dots, w_t)$, uma matriz diagonal.

Vale salientar que na presença de heterogeneidade de variâncias e algum tipo de dependência nos erros o método dos MQG é mais eficiente do que os métodos dos MQP e MQO (HOFFMANN; VIEIRA, 1998).

2.3.1.4 Método da máxima verossimilhança

Este método foi introduzido por Fisher em 1922 e seu objetivo é buscar valores dos parâmetros que maximizem a função de verossimilhança. É um método numericamente intensivo, seus estimadores possuem propriedades assintóticas ótimas, contudo para sua utilização, é necessário conhecer a distribuição conjunta de ε_i no modelo (18).

Suponha que ε_i sejam independentes e identicamente distribuídos (i.i.d.) com distribuição $N_p(\mathbf{f}(\mathbf{x}_i, \boldsymbol{\beta}), \mathbf{I}\sigma^2)$, então a função de verossimilhança L é dada por:

$$L(\boldsymbol{\beta}) = \frac{1}{(2\pi\sigma^2)^{n/2}} \exp \left\{ -\frac{1}{2\sigma^2} \sum_{i=1}^n (\mathbf{y}_i - \mathbf{f}(\mathbf{x}_i, \boldsymbol{\beta}))^2 \right\} \quad (23)$$

Logo, o estimador de máxima verossimilhança, $\hat{\boldsymbol{\beta}}_{EMV}$, de $\boldsymbol{\beta}$ é por definição, o valor de $\boldsymbol{\beta}$ que maximiza a função de verossimilhança $L(\boldsymbol{\beta})$. Sob a suposição de normalidade dos erros, tem-se que os estimadores de máxima verossimilhança (MV) são idênticos aos de MQO, pois maximizar a função de verossimilhança corresponde a minimizar a soma de quadrados de resíduos (CHIACCHIO, 1993).

De acordo com Brandão (1996) e Ogliari (1998), no caso de se utilizar outras estruturas de covariâncias, os métodos de estimação mais utilizados são os de MQG e o de MV. Devido à necessidade de se estimar também a matriz de covariâncias, estes métodos tornam-se mais complicados computacionalmente que o de MQO.

Na prática, o processo de estimação de um parâmetro em um modelo não linear é obtido de forma semelhante aos modelos lineares. Contudo, muitas vezes, a determinação numérica das estimativas dos parâmetros no modelo não linear pode ser problemática (SOUZA, 1998; RITZ, C.; STREIBIG, 2008), pois como em modelos multiparamétricos, as soluções das equações normais podem ser extremamente difíceis, não apresentando solução explícita, sendo necessário o uso de algum método iterativo de resolução para equações não lineares (BATES; WATTS, 1988; RATKOWSKY, 1983; PEDDADA; HASEMAN, 2005).

2.3.2 Métodos iterativos e valores iniciais

Como apresentado na seção anterior, tanto para minimizar a $S(\boldsymbol{\beta})$ em (19), (20) ou (21), quanto para maximizar $L(\boldsymbol{\beta})$ é necessário o uso de algum método iterativo. Logo, o problema de estimação depende da utilização de métodos clássicos de otimização não linear, como aqueles introduzidos por Newton, Cauchy e Gauss. Contudo, a dificuldade para a análise estatística de modelos de regressão não linear surge, pois os algoritmos existentes podem não convergir e os resultados inferenciais baseados numa aproximação linear podem ser pouco confiáveis.

Vários métodos iterativos foram propostos e dentre os mais usados estão: o método de Gauss-Newton, o método gradiente (ou *Steepest-Descent*) e o método de

Marquardt, os quais fazem uso das derivadas parciais da função esperança $\mathbf{f}(\mathbf{x}_i, \boldsymbol{\beta})$ com relação a cada parâmetro. Chiacchio (1993) apresenta um estudo teórico de cada um destes métodos, além de outros, e suas principais características e limitações.

Um outro método iterativo bastante utilizado é o de Gauss-Newton modificado (ou método de linearização), que consiste em utilizar a expansão em série de Taylor de primeira ordem em torno de um determinado $\boldsymbol{\beta}^{(0)}$, em que $\boldsymbol{\beta}^{(0)} = [\beta_1^{(0)}, \dots, \beta_p^{(0)}]$ é um vetor de valores iniciais dos parâmetros, ou seja,

$$f(\mathbf{X}, \boldsymbol{\beta}) \approx f(\mathbf{X}, \boldsymbol{\beta}^{(0)}) + \boldsymbol{\Delta}^{(0)}(\boldsymbol{\beta} - \boldsymbol{\beta}^{(0)})$$

em que, $\mathbf{X}$ é a matriz de delineamento do experimento; $\boldsymbol{\beta} = (\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_p)$ é vetor dos verdadeiros parâmetros de regressão; e $\boldsymbol{\Delta}^{(0)}$ é o vetor de derivadas de primeira ordem da $S(\boldsymbol{\beta})$ em relação aos parâmetros do modelo não linear, calculado em $\boldsymbol{\beta}^{(0)}$. Assim,

$$\begin{aligned} \mathbf{y} &= f(\mathbf{X}, \boldsymbol{\beta}) \\ \mathbf{y} &\approx f(\mathbf{X}, \boldsymbol{\beta}^{(0)}) + \boldsymbol{\Delta}^{(0)}(\boldsymbol{\beta} - \boldsymbol{\beta}^{(0)}) \\ \mathbf{y} - f(\mathbf{X}, \boldsymbol{\beta}^{(0)}) &\approx \boldsymbol{\Delta}^{(0)}(\boldsymbol{\beta} - \boldsymbol{\beta}^{(0)}) . \end{aligned} \tag{24}$$

Fazendo $\mathbf{y} - f(\mathbf{X}, \boldsymbol{\beta}^{(0)}) = \mathbf{y}^{(0)}$ e $\boldsymbol{\beta} - \boldsymbol{\beta}^{(0)} = \boldsymbol{\varphi}^{(0)}$, chega-se a uma aproximação para um modelo de regressão linear:

$$\mathbf{y}^{(0)} = \boldsymbol{\varphi}^{(0)} \boldsymbol{\Delta}^{(0)} + \boldsymbol{\varepsilon} \tag{25}$$

O vetor de coeficientes de regressão $\boldsymbol{\varphi}^{(0)}$ representa a diferença entre o vetor dos verdadeiros parâmetros de regressão e o vetor dos valores iniciais atribuídos a eles, e pode ser entendido como uma correção que deve ser feita nos coeficientes de regressão iniciais. O propósito de ajustar o modelo de regressão linear, como apresentado em (25), é estimar o vetor dos coeficientes de regressão $\boldsymbol{\varphi}^{(0)}$, obtido pelo método de MQO, $\boldsymbol{\varphi}^{(0)} = (\boldsymbol{\Delta}'^{(0)} \boldsymbol{\Delta}^{(0)})^{-1} \boldsymbol{\Delta}'^{(0)} \mathbf{y}^{(0)}$, e usar essas estimativas para corrigir as estimativas iniciais dos parâmetros de regressão. Logo, o modelo de regressão não linear é aproximado à termos lineares.

Ao final da primeira iteração, a atualização do vetor de estimativas dos parâmetros é dada por: $\boldsymbol{\beta}^{(1)} = \boldsymbol{\beta}^{(0)} + \boldsymbol{\varphi}^{(0)}$. Se a soma de quadrados $S(\boldsymbol{\beta}^{(1)}) < S(\boldsymbol{\beta}^{(0)})$, então repete-se o processo utilizando $\boldsymbol{\beta}^{(1)}$ no lugar de $\boldsymbol{\beta}^{(0)}$ obtendo-se $\boldsymbol{\beta}^{(2)} = \boldsymbol{\beta}^{(1)} + \boldsymbol{\varphi}^{(1)}$ e $S(\boldsymbol{\beta}^{(2)})$, e assim sucessivamente. O processo pára de acordo com algum critério pré-estabelecido. Por exemplo: pare o processo na iteração m se:

$$|S(\boldsymbol{\beta}^{(m+1)}) - S(\boldsymbol{\beta}^{(m)})| < 0,000001.$$

Vale notar que mesmo estabelecendo critérios para o término do processo iterativo, a convergência não é garantida.

Quando o vetor de valores iniciais estiver demasiadamente distante do vetor de solução final, o método de Gauss-Newton pode necessitar de um número muito grande de iterações para convergir. Pode também ocorrer convergência para um mínimo local, ou mesmo, a não convergência. Entretanto, bons valores iniciais podem levar a um mínimo global, mesmo quando existir vários mínimos locais. Assim, um problema importante e recorrente no ajuste desses modelos relaciona-se com a especificação de valores iniciais dos parâmetros do modelo escolhido.

O vetor de valores iniciais pode por estar ligado ao desenvolvimento teórico do processo ou pode ser obtido em experiências semelhantes. Chiacchio (1993) em seu trabalho apresenta algumas técnicas para a obtenção de valores iniciais, sendo as mais utilizadas:

- a) **Método do modelo aproximado:** Consiste em transformar o modelo não linear em um modelo linear aproximado, do qual se obtém estimativas, que serão usadas como valor inicial para o modelo não linear.
- b) **Método da “Malha”:** Consiste em considerar uma rede (malha) de pontos no espaço dos parâmetros, tomando para valor inicial β^0 o ponto da rede para o qual o valor da função utilizada é mínimo, no caso a SQ, ou máximo, no caso da verossimilhança.

Ratkowsky (1983) discute outros procedimentos para a obtenção de bons valores iniciais para algumas classes de modelos (modelos de crescimento, modelos de regressão assintótica, dentre outros) para que viabilizem uma convergência rápida do processo de estimação. Algumas alternativas para a determinação desses valores também são apresentadas em Gallant (1987) e Draper e Smith (1998).

Embora existam algumas orientações gerais para a determinação de valores iniciais, o processo de escolha é um procedimento decidido pelo pesquisador. Chiacchio (1993) recomenda que, se um determinado método falhar, o pesquisador deve tentar outros até conseguir um que seja satisfatório. Se todos os métodos falharem, pode-se concluir que o modelo escolhido não é adequado para explicar o fenômeno.

Vale lembrar que para avaliar a adequação de um vetor de valores iniciais

deve-se observar a convergência do processo iterativo e o número de iterações necessárias até que a convergência do processo ocorra.

2.3.3 Qualidade do ajuste

Vonesh et al. (1996) definiram a bondade de ajuste de um modelo como sendo o grau no qual um valor predito $\hat{y}_{ij}$ concorda com um valor observado y_{ij} . Para avaliar a qualidade do ajuste de um modelo não linear, vários aspectos podem ser levados em conta, como:

- a) A convergência do processo iterativo e o número de iterações necessárias para a sua convergência.
- b) O coeficiente de determinação ajustado, $\bar{R}^2$, que é definido por:

$$\begin{aligned}\bar{R}^2 &= R^2 - \frac{1}{n-p} (1 - R^2) \\ &= \frac{SQReg}{SQTotal} - \frac{1}{n-p} \left(\frac{SQRes}{SQTotal} \right)\end{aligned}\quad (26)$$

em que p é o número de parâmetros do modelo não linear; n é o número de observações; $SQReg$ é a soma de quadrados de regressão; $SQTotal$ é a soma de quadrados total; e $SQRes$ é a soma de quadrados do resíduo. Este coeficiente é obtido apenas quando se usam os métodos de estimação de mínimos quadrados, sendo adequado para um grande número de aplicações, particularmente aqueles envolvendo dados contínuos. Esta medida deve ser utilizada com cautela na avaliação da qualidade do ajuste, pois no caso de modelos não lineares a soma dos erros não necessariamente é igual a zero e a $SQRes$ mais a $SQReg$ não é necessariamente igual a $SQTotal$, o que pode afetar o valor do coeficiente de determinação.

- c) O valor do quadrado médio do resíduo (QMRes), que é a estimativa da variância (σ^2), quando se usam os métodos de estimação de mínimos quadrados.
- d) O erro de predição médio (EPM) que corresponde à média de todos os erros de predição (BRACCINI-NETO et al., 1996), isto é:

$$EPM = 100 * \left(\frac{y_{ij} - \hat{y}_{ij}}{y_{ij}} \right)$$

O sinal de cada valor do EPM indica se a função subestimou (+) ou superestimou (−) o valor observado (SOARES, 2007);

e) O erro padrão das estimativas.

2.3.4 Testes de Hipóteses

2.3.4.1 Teste t

O teste t de *Student* é frequentemente utilizado para testar a significância dos parâmetros de um modelo (RATKOWSKY, 1983). Com ele testam-se hipóteses do tipo:

$$H_0: \beta_k = \beta_{k0} \quad \text{versus} \quad H_1: \beta_k \neq \beta_{k0}$$

em que β_k ($k = 1, 2, \dots, p$) é qualquer parâmetro do modelo em estudo. Sua estatística de teste é dada por:

$$t^* = \frac{\hat{\beta}_k - \beta_k}{\sqrt{\widehat{Var}(\hat{\beta}_k)}}, \quad (27)$$

que segue uma distribuição t de *Student* exata, com $n - p$ graus de liberdade. Logo, se $|t^*| \leq t_{(1-\frac{\alpha}{2}; n-p)}$ não se rejeita H_0 .

Um intervalo de $1 - \alpha$ de confiança para os parâmetros é dado por:

$$\hat{\beta}_k \pm t_{(1-\frac{\alpha}{2}; n-p)} \sqrt{\widehat{Var}(\hat{\beta}_k)}. \quad (28)$$

2.3.4.2 Teste da Razão de Verossimilhança

Quando os tratamentos (ou grupos) correspondem a níveis crescentes de um fator quantitativo (como o tempo, ou a porcentagem de um determinado componente, nos ensaios de digestibilidade), os procedimentos de comparações de médias não são indicados. Uma forma de comparar esses tratamentos envolve a realização de testes sobre a igualdade de cada um dos parâmetros das equações que descrevem o comportamento das respostas médias dos diversos tratamentos. A identidade de modelos de regressão não linear e a igualdade de qualquer subconjunto de parâmetros podem ser verificadas por meio do teste da razão de verossimilhanças (GALLANT, 1975; REGAZZI, 2003; SOARES, 2007).

O TRV é um teste baseado na comparação dos valores das funções de MV para dois modelos aninhados.

Definição 2.1 *Um modelo mais simples é dito aninhado em um modelo mais geral (modelo de referência), quando o espaço paramétrico do primeiro modelo é um subespaço do*

segundo ou quando os parâmetros do modelo aninhado (modelo com restrição) podem ser obtidos impondo-se certas restrições nos parâmetros do modelo de referência.

A hipótese a ser testada pelo TRV é:

H_0 : O modelo com restrição (menos parâmetros) é melhor;

H_1 : O modelo de referência (mais parâmetros) é melhor.

A estatística do teste é dada por:

$$L = 2 \log \left(\frac{L_1}{L_2} \right) = -2[\log(L_2) - \log(L_1)] \quad (29)$$

em que L_1 e L_2 representam a verossimilhança do modelo aninhado e do modelo de referência, respectivamente. Sob certas condições de regularidade (Anexo A), L segue assintoticamente a distribuição χ_r^2 , sendo r o número de graus de liberdade obtido subtraindo o número de parâmetros do modelo aninhado do número de parâmetros do modelo de referência. Logo, rejeita-se H_0 quando $L \geq \chi_{(r;\alpha)}^2$, sendo α o nível de significância considerado.

Regazzi e Silva (2010) utilizam o TRV com aproximações F e *quiquadrado*, para testar a identidade de modelos de regressão não linear. Por meio de simulações foi possível concluir que para um número total de observações suficientemente grande, as duas aproximações são praticamente equivalentes; contudo, para amostras pequenas, a aproximação dada pela estatística F deve ser preferida, uma vez que a taxa de erro tipo I é sempre menor do que da estatística *quiquadrado*, independentemente do número total de observações.

No geral, os testes de hipóteses em regressão não linear mais utilizados são o de Wald, o Razão de Verossimilhanças, ou o Teste de Rao (ou dos Multiplicadores de Lagrange). Seber e Wild (2003) ressaltam que os três são equivalentes assintoticamente, entretanto, cada um apresenta vantagens e desvantagens. O teste de Wald possui o atrativo da facilidade de cálculo da estatística do teste, porém não é invariante com relação a reparametrizações do modelo ou da hipótese testada, isto é, diferentes formas de expressar o mesmo modelo podem levar a diferentes valores da estatística do teste. Os outros dois testes exigem a estimação do vetor de parâmetros sob as restrições estabelecidas pela hipótese testada, o que os torna mais trabalhosos.

2.4 Análise de dados de degradabilidade *in situ*

Devido ao grande número de detalhes e fatores envolvidos nos ensaios de degradabilidade, a análise estatística dos dados pode ser feita utilizando vários procedimentos distintos.

A análise estatística dos dados resultantes desses ensaios encontra dois problemas importantes: (i) como incluir no modelo os fatores relacionados ao delineamento; (ii) como descrever com parcimônia e fidelidade a estrutura de variação e de correlação entre as medidas repetidas. Acredita-se que uma análise que não leve em conta tais aspectos possa levar a erros de inferência relevantes.

Geralmente, o ajuste dos modelos de degradação é feito utilizando-se somente as médias da variável-resposta para tratamentos e tempos de incubação (SANTOS, 2006), sendo que as outras causas de variação do ensaio não são consideradas na análise. Quando a estrutura do delineamento é incluída, geralmente a análise é realizada em estágios.

Para a comparação dos parâmetros do modelo, devido as várias abordagens de análise que podem ser adotadas, vários procedimentos podem ser considerados, como por exemplo o teste de Tukey, no caso univariado (GOMES et al., 2006; MARTINS et al., 2007; JOBIM et al., 2011). Contudo, o que é indicado por vários autores (OGLIARI; ANDRADE, 2001; REGAZZI, 2003; FEITOSA et al., 2004; SOARES, 2007; SARTORIO et al., 2010) é o uso do teste da razão de verossimilhança.

Vale salientar que, quando realizada análises de variâncias (univariadas ou multivariada) não se ajustam curvas, só se comparam as médias de cada parâmetro referente a cada tratamento (ou grupo) nas diversas ocasiões.

2.5 Modelo linear misto

Como as medidas de degradação ruminal são obtidas ao longo do tempo nos mesmos animais, o que caracteriza os dados como longitudinais, espera-se que exista uma correlação não nula entre elas e uma heterogeneidade de variâncias nas diversas ocasiões. Quando esses aspectos não são levados em consideração pode-se afetar as estimativas obtidas e o erro padrão associado a elas.

Na **análise univariada de perfis** utilizando um **modelo univariado**, de acordo com um delineamento em parcelas subdivididas (*split-plot design*), impõe-se forte restrição à estrutura da matriz de variâncias-covariâncias entre os instantes, dada por:

$$\Sigma = cov(\mathbf{y}_i) = \begin{bmatrix} \sigma_\varepsilon^2 + \sigma_\gamma^2 & \sigma_\gamma^2 & \sigma_\gamma^2 & \dots & \sigma_\gamma^2 \\ \sigma_\gamma^2 & \sigma_\varepsilon^2 + \sigma_\gamma^2 & \sigma_\gamma^2 & \dots & \sigma_\gamma^2 \\ \sigma_\gamma^2 & \sigma_\gamma^2 & \sigma_\varepsilon^2 + \sigma_\gamma^2 & \dots & \sigma_\gamma^2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \sigma_\gamma^2 & \sigma_\gamma^2 & \sigma_\gamma^2 & \dots & \sigma_\varepsilon^2 + \sigma_\gamma^2 \end{bmatrix}. \quad (30)$$

A estrutura (30) com apenas dois parâmetros impõe que a variância das respostas em qualquer tempo seja igual a $\sigma_\varepsilon^2 + \sigma_\gamma^2$ e que a covariância entre dois tempos quaisquer seja constante e igual a σ_γ^2 .

Alternativamente, a **análise multivariada de perfis** (MANOVA) utiliza uma matriz de variâncias-covariâncias sem restrições, chamada não-estruturada que pode ser apresentada como:

$$\Sigma = \begin{bmatrix} \sigma_1^2 & \sigma_{12} & \sigma_{13} & \dots & \sigma_{1t} \\ \sigma_{21} & \sigma_2^2 & \sigma_{23} & \dots & \sigma_{2t} \\ \sigma_{31} & \sigma_{32} & \sigma_3^2 & \dots & \sigma_{3t} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \sigma_{t1} & \sigma_{t2} & \sigma_{t3} & \dots & \sigma_t^2 \end{bmatrix}. \quad (31)$$

A estrutura (31) apresenta $m = \frac{t(t+1)}{2}$ parâmetros, em que t é o número de ocasiões em que as unidades experimentais foram avaliadas repetidamente.

As estatísticas de testes envolvendo somente comparações entre grupos (tratamentos, por exemplo) têm distribuição F exata para qualquer estrutura de Σ . Uma condição necessária e suficiente para que os testes F envolvendo comparações intra-indivíduos (envolvendo o fator tempo) sejam exatos, é que a matriz Σ satisfaça a condição de esfericidade (HUYNH; FELDT, 1970) - Anexo B. Se a hipótese nula de esfericidade é

rejeitada, a análise univariada (tipo *split-plot*) não deve ser usada.

Uma alternativa para a análise desses dados quando o teste de esfericidade é rejeitado é o uso da metodologia multivariada. Contudo, Andrade e Singer (1986) afirmaram que apesar dessa estrutura não ser tão restritiva quanto à estrutura uniforme, ela também não é totalmente adequada para representar a estrutura de covariâncias de dados longitudinais. Além disso, a MANOVA não incorpora com facilidade covariáveis que variam ao longo do tempo, desconsidera dados não-regulares e, assim como no método univariado, não trata bem a estrutura desbalanceada de dados.

Quando a condição de esfericidade da matriz de covariâncias Σ não está satisfeita, Box (1954a,b) e Geisser e Greenhouse (1958) propuseram o uso de soluções univariadas aproximadas, que envolvem a correção do número de graus de liberdade das estatísticas dos testes que envolvem as comparações de médias intra-indivíduos por um fator multiplicativo de correção γ (LIMA, 1996; MALHEIROS, 2001, para maiores detalhes).

Aos modelos uni e multivariado uma melhor alternativa para a análise é o uso da metodologia de modelos mistos (FREITAS, 2007; GÓMEZ; MUÑOZ; BETANCUR, 2008; BARBOSA, 2009; SARTORIO et al., 2010; ALCARDE, 2012, dentre outros), a qual será o foco de estudo neste trabalho.

Os **modelos lineares**, ou **não lineares**, **mistos** são também conhecidos como modelos hierárquicos ou modelos multiníveis, terminologias especialmente comuns nas áreas de educação, ciências sociais, medicina e epidemiologia, dentre outras.

O modelo linear misto foi proposto por Henderson (1949, 1975) e seu uso em estudos longitudinais tornou-se mais frequente com o trabalho de Laird e Ware (1982). Com o modelo misto, tem-se uma maior versatilidade na aplicação da técnica de análise de dados com medidas repetidas (análise de perfis e de curvas de crescimento), pois:

- (i) Permitem a modelagem da matriz de covariâncias com um número menor de parâmetros que a dos modelos multivariados gerais;
- (ii) Podem ser usados quando os dados não são balanceados em relação ao tempo;
- (iii) Possibilitam o ajuste de curvas polinomiais de graus diferentes para cada grupo de unidades experimentais.

A sua maior flexibilidade, de acordo com Riboldi (2007), é a possibilidade de contem-

plar a estrutura de interdependência das observações e a estrutura de correlação (intra-indivíduo) presente em medidas repetidas tomadas na mesma unidade experimental.

O modelo misto essencialmente considera a existência de efeitos fixos e de efeitos aleatórios além do erro experimental. De acordo com Hauser et al. (2009), os efeitos são considerados:

- a) **Fixos:** quando se deseja inferir somente para as categorias das variáveis independentes (fatores) que são incluídas no ajuste do modelo;
- b) **Aleatórios:** quando as categorias das variáveis utilizadas no ajuste do modelo constituem uma amostra aleatória de uma população, ou seja, formam um conjunto de categorias com uma distribuição de probabilidade, e se deseja inferir para a população inteira.

Harville (1977), Laird e Ware (1982) e Ware (1985) propuseram a formulação do modelo linear misto (MLM) em dois estágios que será descrito a seguir.

Primeiro estágio: Considere o indivíduo i ($i = 1, \dots, n$) e a medida no tempo t_{ij} , com $j = 1, \dots, n_i$. Neste primeiro estágio é ajustado um modelo de regressão para cada indivíduo, que é sugerido baseado no comportamento dos perfis individuais. Seja $\mathbf{y}_i = (y_{i1}, y_{i2}, \dots, y_{in_i})'$, tal que:

$$\mathbf{y}_i = \mathbf{Z}_i \boldsymbol{\beta}_i + \boldsymbol{\epsilon}_i, \quad (32)$$

em que, $\mathbf{Z}_i$ é uma matriz ($n_i \times q$), conhecida de covariáveis; $\boldsymbol{\beta}_i$ é um vetor ($q \times 1$) de coeficientes de regressão do indivíduo i ; e $\boldsymbol{\epsilon}_i$ é o vetor de erros associado ao i -ésimo indivíduo, em que $\boldsymbol{\epsilon}_i \sim N_{n_i}(\mathbf{0}, \mathbf{R}_i)$, sendo $\mathbf{R}_i$ é a matriz de covariâncias associadas às t ocasiões de avaliação, refletindo os aspectos de variabilidade e correlação das observações *intra-indivíduos* ou dentro de indivíduo;

Segundo estágio: o objetivo nesta fase é captar a variabilidade entre indivíduos por meio de um modelo representado por:

$$\boldsymbol{\beta}_i = \mathbf{K}_i \boldsymbol{\beta} + \mathbf{b}_i \quad (33)$$

tal que, $\mathbf{K}_i$ é uma matriz ($q \times p$) de covariáveis conhecidas; $\boldsymbol{\beta}$ é um vetor de parâmetros de regressão desconhecido de ordem p e $\mathbf{b}_i \sim N_q(\mathbf{0}, \mathbf{D})$, sendo $\mathbf{D}$ a matriz de variâncias

e covariâncias associadas aos q efeitos aleatórios, refletindo os aspectos de variabilidade e correlação das observações *entre-indivíduos*. Supõem-se que ϵ_i e $\mathbf{b}_i$ são independentes. De (32) e (33) tem-se:

$$\mathbf{y}_i = \mathbf{X}_i \boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}_i \mathbf{b}_i + \epsilon_i \quad (34)$$

em que, $\mathbf{X}_i = \mathbf{Z}_i \mathbf{K}_i$ é a matriz $(n_i \times p)$ de delineamento associada aos efeitos fixos; $\mathbf{Z}_i$ é a matriz associada aos efeitos aleatórios; $\boldsymbol{\beta}$ é o vetor de parâmetros de efeito fixo; e $\mathbf{b}_i$ é o vetor de parâmetros de efeito aleatório. Considerando todos os indivíduos, matricialmente tem-se:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X} \boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z} \mathbf{b} + \boldsymbol{\epsilon} ,$$

sendo:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{y}_1 \\ \mathbf{y}_2 \\ \vdots \\ \mathbf{y}_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}_1 & \mathbf{Z}_1 & \mathbf{0} & \dots & \mathbf{0} \\ \mathbf{X}_2 & \mathbf{0} & \mathbf{Z}_2 & \dots & \mathbf{0} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \mathbf{X}_n & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \dots & \mathbf{Z}_n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \boldsymbol{\beta} \\ \mathbf{b}_1 \\ \mathbf{b}_2 \\ \dots \\ \mathbf{b}_n \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \boldsymbol{\epsilon}_1 \\ \boldsymbol{\epsilon}_2 \\ \dots \\ \boldsymbol{\epsilon}_n \end{bmatrix} .$$

Em termos de modelos hierárquicos, o modelo linear misto geral pode ser reescrito de tal modo que:

$$\mathbf{y}|\mathbf{b} \sim N(\mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{b}, \mathbf{R}) ,$$

$$\mathbf{b} \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{D}). \quad (35)$$

Assim, marginalmente, tem-se que $\mathbf{y} \sim N(\mathbf{X}\boldsymbol{\beta}, \boldsymbol{\Sigma})$, em que $\boldsymbol{\Sigma} = \mathbf{Z}\mathbf{D}\mathbf{Z}' + \mathbf{R}$. A estimação e inferências desse modelo podem ser encontradas em Pinheiro e Bates (2000), Thompson (2008) e Alcarde (2012), dentre outros.

Note que a estrutura de covariâncias de simetria composta, que é comum em modelos lineares mistos, pode ser obtida em (34), tomando-se $\mathbf{Z}_i = \mathbf{1}_{t_i}$, onde $\mathbf{1}_{t_i}$ é o vetor $(t_i \times 1)$ de uns e $cov(\epsilon_i) = \mathbf{I}\sigma^2$.

Molenberghs e Verbeke (2005) ressaltaram que diferentes modelos hierárquicos podem produzir o mesmo modelo marginal, ilustrando que um bom ajuste do modelo marginal pode não ser uma evidência, igualmente forte, de um bom ajuste de um determinado modelo hierárquico. Um tratamento satisfatório do modelo hierárquico somente é possível no contexto bayesiano.

2.5.1 Estruturas da matriz de variâncias e covariâncias

Em geral, a estrutura para a matriz de covariâncias Σ_i deve depender da maneira pela qual as observações foram obtidas e do conhecimento sobre o mecanismo gerador das observações (SINGER; NOBRE; ROCHA, 2012). Ela é definida pela combinação das matrizes $\mathbf{R}_i$ e $\mathbf{D}$, o que permite a construção de outras estruturas mais complexas a partir da especificação destas, ampliando significativamente o arsenal de estruturas disponíveis para explicar a variabilidade dos dados. Contudo, Davidian e Giltinan (1995) frisaram que é muito importante reconhecer explicitamente as duas fontes de variação, a variação aleatória entre medidas dentro de cada unidade experimental (variabilidade intra-indivíduo) e a variação aleatória entre diferentes unidades experimentais. Algumas das possíveis estruturas que podem ser adotadas para estas matrizes podem ser encontradas em Wolfinger (1996), no manual do `proc mixed` do SAS 9.2 (2009), no Anexo C, e em outras referências.

Em modelos mistos, a estrutura da matriz de variância e covariância intra-indivíduo usada no modelo linear tradicional, que pressupõe homocedasticidade das variâncias é frequentemente usada para a matriz $\mathbf{R}_i$. Neste caso, o número de parâmetros de Σ_i a estimar é igual ao número de parâmetros distintos de $\mathbf{D}$ mais um, que é um número em geral bem menor do que $\frac{t(t+1)}{2}$, que é o número de parâmetros da matriz de variâncias e covariâncias não estruturada, utilizada na abordagem multivariada.

Segundo Brandão (1996) e Ogliari (1998), a preferência por estruturas especiais de covariâncias em substituição à estrutura geral (ou não estruturada) é aconselhável por diversas razões como:

- (i) Tornam o modelo mais realista em relação aos dados;
- (ii) Melhoram a eficiência das estimativas;
- (iii) Traz ganhos significativos no aspecto computacional, pois em alguns casos o número de parâmetros da matriz de covariâncias a serem estimados diminui quando se utiliza alguma estrutura especial, isso ocorre principalmente quando o número de ocasiões observadas t é grande. Contudo, vale ressaltar que nem sempre essa troca é indicada.

Para a escolha da estrutura de variâncias e covariâncias intra-indivíduos, em estudos longitudinais, é razoável utilizar informações sobre o comportamento da resposta

ao longo das condições de avaliação. Singer, Nobre e Rocha (2012) apresentaram uma estratégia para auxiliar na identificação da estrutura de variâncias e covariâncias $\mathbf{R}_i$ em estudos longitudinais, que resumidamente consiste na:

- (i) Análise das matrizes de covariâncias e correlações intra-unidades amostrais, quando for possível calculá-las, para identificar padrões de variação das correlações e das variâncias.
- (ii) Análise dos gráficos de dispersão múltiplos das observações padronizadas quando for possível construí-los.
- (iii) Análise dos gráfico das linhas das matrizes de covariâncias e correlações amostrais *versus* defasagens.
- (iv) Utilização dos critérios de informação para selecionar dentre as estruturas de covariâncias intra-unidades amostrais identificadas a que melhor representará a variabilidade dos dados.
- (v) Análise de resíduos, gráfico de resíduos padronizados *versus* os valores preditos para a verificação do ajuste do modelo, bem como a presença de observações discrepantes e/ou influentes.

Para a matriz $\mathbf{D}$, Pinheiro e Bates (2000) propõem algumas alternativas para identificar a necessidade de inclusão de efeito aleatório; e a estrutura dessa matriz, como por exemplo:

- (i) Análise do gráfico de perfis médios para propor um modelo para os efeitos fixos; e gráficos de perfis individuais para identificar padrões que indiquem possíveis efeitos aleatórios e heterocedasticidade ao longo das condições de avaliação.
- (ii) Construção dos intervalos de confiança para os parâmetros do modelo de regressão por indivíduo. O gráfico formado por estes intervalos, para cada parâmetro, indica a possível necessidade de inclusão de um efeito aleatório neste parâmetro, quando existirem intervalos que não sobrepõem-se.
- (iii) Para a escolha da estrutura para a matriz $\mathbf{D}$, ajusta-se os possíveis modelos com tais estruturas e em seguida testes e/ou critérios de informação devem ser utilizados para se tomar decisão.

2.6 Modelo não linear misto

Os primeiros desenvolvimentos associados aos modelos não lineares mistos (MNLM) aparecem com Sheiner e Beal (1980) em estudos de farmacocinética⁶. Tem sido frequentemente utilizados em análises de dados de medidas repetidas de crescimento, farmacodinâmica, dinâmicas de HIV e outras doenças, aplicações biométricas e em outros estudos (HARTFORD; MEZA; JAFFRÉZIC; FOULLEY, 2007; WANG, 2007; DAVIDIAN, 2009).

De acordo com Pinheiro e Bates (2000), os modelos não lineares mistos são uma extensão dos modelos lineares mistos combinada com os modelos não lineares, permitindo que a função de regressão não linear dependa de efeitos fixos e aleatórios. Para Hartford e Davidian (2000) e Wang (2007), o MNLM descreve os dados com medidas repetidas por uma função caracterizando a dependência sistemática das observações sobre as covariáveis e os parâmetros.

Um MNLM mais geral possível é apresentado por Ogliari (1998), Pinheiro e Bates (2000) e Davidian (2009), dentre outros, que em sua formulação além de inserirem covariáveis dentro de cada indivíduo i (no caso deste estudo, o tempo), incluem covariáveis de nível individual (como por exemplo, o sexo). No presente trabalho serão considerados como covariáveis o tempo e os fatores do delineamento em quadrado latino (período, animal e tratamento).

De acordo com Marshall e Barón (2000) são encontradas várias extensões de um MNLM e dentre as mais utilizadas tem-se três extensões que serão descritas a seguir.

Extensão 1 - Modelo de Lindstrom e Bates

No modelo proposto por Lindstrom e Bates (1990) os efeitos aleatórios fazem parte dos componentes não lineares do modelo, que pode ser representado como:

$$\mathbf{y}_i = \mathbf{f}(\mathbf{X}_i, \boldsymbol{\beta}, \mathbf{Z}_i, \mathbf{b}_i) + \boldsymbol{\varepsilon}_i, \quad (36)$$

em que

$\mathbf{y}_i = [y_{i1}, \dots, y_{in_i}]'$ é o vetor $(n_i \times 1)$ de respostas do i -ésimo indivíduo. Vale lembrar

⁶Farmacocinética é o estudo quantitativo dos processos de absorção, distribuição, biotransformação e eliminação dos fármacos ou dos seus metabólitos.

que n_i se refere ao número de tempos observados no i -ésimo indivíduo, que podem ser diferentes entre si, quando se têm dados desbalanceados em relação ao tempo ou quando se tem uma estrutura incompleta dos dados;

$\mathbf{X}_i = [\mathbf{x}_{i1}, \dots, \mathbf{x}_{iw}]$ é uma matriz conhecida ($n_i \times w$) de valores intra-indivíduos, podendo incluir somente os instantes de avaliação. Neste caso, $\mathbf{X}_i$ tem uma única coluna ($w = 1$) e pode-se trocar $\mathbf{X}_i$ pelo vetor $\mathbf{x}_{ij}$, com $j = 1, \dots, n_i$;

$\boldsymbol{\beta}$ é um vetor ($p \times 1$) de parâmetros populacionais desconhecidos;

$\mathbf{Z}_i$ é uma matriz ($n_i \times q$), de posto completo, de constantes conhecidas que associa $\mathbf{y}_i$ a $\mathbf{b}_i$;

$\mathbf{b}_i$ é um vetor ($q \times 1$) de coeficientes aleatórios de regressão, não observados;

$\mathbf{f}(\mathbf{X}_i, \boldsymbol{\beta}, \mathbf{Z}_i, \mathbf{b}_i)$ é um vetor conhecido ($n_i \times 1$) de funções de resposta não linear;

$\boldsymbol{\varepsilon}_i$ é um vetor ($n_i \times 1$) de erros aleatórios intra-indivíduo.

Assume-se que as observações feitas em diferentes indivíduos são independentes entre si, ou seja, que os $\boldsymbol{\varepsilon}_i$ são independentes e distribuídos com média $\mathbf{0}$ e matriz de variâncias e covariâncias $\sigma^2 \mathbf{R}_i$ ($n_i \times n_i$), que depende de i somente pela sua dimensão. Em algumas situações admite-se que $\sigma^2 \mathbf{R}_i = \sigma^2 \mathbf{I}_{n_i}$, em que $\mathbf{I}_{n_i}$ é uma matriz identidade de ordem n_i , mas $\mathbf{R}_i$ pode assumir qualquer estrutura de covariâncias marginal especial, como a estrutura auto regressiva de primeira ordem, por exemplo. Usualmente o número de parâmetros de $\mathbf{R}_i$ é bem pequeno.

Em geral, os $\mathbf{b}_i$ são considerados independentes e identicamente distribuídos com média $\mathbf{0}$ e matriz de covariâncias $\sigma^2 \mathbf{D}$, e que os $\mathbf{b}_i$ são independentes dos $\boldsymbol{\varepsilon}_i$.

De acordo com Marshall e Barón (2000), a distribuição marginal de $\mathbf{y}_i$ em (36) pode ser difícil de ser encontrada, mesmo quando se admite que a distribuição condicional de $\mathbf{y}_i | \mathbf{b}_i$ é normal e a distribuição marginal de $\mathbf{b}_i$ também é normal.

Note que as matrizes de especificação $\mathbf{X}_i$ e $\mathbf{Z}_i$ podem ser diferentes e variar entre unidades experimentais, estendendo o modelo para o caso de dados não balanceados em relação ao tempo. As matrizes $\mathbf{Z}_i$ podem conter quaisquer covariáveis que afetem diferentemente as unidades experimentais e a forma de especificação das matrizes $\mathbf{X}_i$ é bastante similar àquela utilizada nos modelos de regressão. Para dados balanceados e

completos, admite-se $\mathbf{X}_i = \mathbf{X}$. Vale salientar também que, o fato de os efeitos aleatórios entrarem no modelo de uma forma não linear complica o processo de estimação.

O modelo (36) pode também ser formulado em dois estágios, generalizando o modelo (34), como descrito a seguir.

Primeiro estágio: o vetor de observações y_{ij} , correspondendo às t_{ij} medidas repetidas no i -ésimo indivíduo, é modelado como:

$$y_{ij} = f(\phi_i, \mathbf{x}_{ij}) + \varepsilon_{ij}, \quad i = 1, 2, \dots, n; j = 1, \dots, n_i, \quad (37)$$

em que f é uma função não linear real e diferenciável de um vetor de parâmetros ϕ_i e do componente $\mathbf{x}_{ij}$ da matriz de delineamento, $\mathbf{X}_i$, referente ao indivíduo i ; ε_{ij} é o erro associado a j -ésima observação feita no i -ésimo indivíduo. Matricialmente tem-se:

$$\mathbf{y}_i = \begin{bmatrix} y_{i1} \\ \vdots \\ y_{in_i} \end{bmatrix}, \quad \boldsymbol{\varepsilon}_i = \begin{bmatrix} \varepsilon_{i1} \\ \vdots \\ \varepsilon_{in_i} \end{bmatrix} \quad \text{e} \quad \boldsymbol{\eta}(\phi_i) = \begin{bmatrix} f(\phi_i, \mathbf{x}_{i1}) \\ \vdots \\ f(\phi_i, \mathbf{x}_{in_i}) \end{bmatrix},$$

então

$$\mathbf{y}_i = \boldsymbol{\eta}(\phi_i) + \boldsymbol{\varepsilon}_i, \quad \text{com} \quad \boldsymbol{\varepsilon}_i \sim N(\mathbf{0}, \sigma^2 \mathbf{R}_i),$$

sendo $\mathbf{R}_i$ uma matriz que depende de i só através da sua dimensão. Por conveniência nós iremos suprimir a dependência de $\boldsymbol{\eta}_i$ sobre o vetor preditor $\mathbf{x}_{ij}$ ($j = 1, \dots, n_i$). Em muitas situações admite-se $\mathbf{R}_i = \mathbf{I}$, mas permite a especificação de uma estrutura de covariância marginal não independente, por exemplo, uma estrutura de correlação serial associada a um processo autoregressivo de 1.^a ordem, AR(1).

Segundo estágio: o vetor de parâmetros específico dos indivíduos é modelado como:

$$\phi_i = \mathbf{A}_i \boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}_i \mathbf{b}_i, \quad \text{com} \quad \mathbf{b}_i \sim N(\mathbf{0}, \sigma^2 \mathbf{D}), \quad (38)$$

em que $\boldsymbol{\beta}$ é um vetor ($p \times 1$) de efeitos fixos populacionais; $\mathbf{b}_i$ é um vetor ($q \times 1$) de efeitos aleatórios associados com o i -ésimo indivíduo, com matriz de variâncias-covariâncias $\sigma^2 \mathbf{D}$; as matrizes $\mathbf{A}_i$ ($n_i \times p$) e $\mathbf{B}_i$ ($n_i \times q$) são as matrizes de delineamento para os efeitos fixos e aleatórios, respectivamente. Assim, a função f pode ser descrita como $f(\mathbf{A}_i \boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}_i \mathbf{b}_i, \mathbf{x}_{ij})$.

As matrizes $\mathbf{A}_i$ e $\mathbf{B}_i$ são usadas para simplificar a especificação do modelo e para facilitar a sua implementação computacional. Assim, o modelo (38) pode ser

ampliado (PINHEIRO; BATES, 2000) para o caso de as unidades experimentais estarem classificadas em diferentes grupos, segundo um ou mais fatores, como é comum nos ensaios de degradabilidade, quando são comparados diversos alimentos simultaneamente. Essa extensão será estudada no presente trabalho de forma detalhada, com foco na estimação dos parâmetros do modelo não linear e de comparações entre os modelos associados aos diferentes grupos ou tratamentos. Por exemplo, se experimento envolve dois grupos (ou tratamentos), então $\mathbf{A}_i$ pode ser escolhido para permitir diferentes efeitos fixos para os diferentes grupos (para exemplificar, $\mathbf{A}_i = [\mathbf{I} : \mathbf{0}]$ para os indivíduos do grupo 1 e $\mathbf{A}_i = [\mathbf{0} : \mathbf{I}]$ para os indivíduos do grupo 2). Se as matrizes $\mathbf{B}_i$ são iguais para todos os indivíduos i , ambos os grupos ainda teriam efeitos aleatórios a partir da mesma distribuição. Outra situação comum é quando alguns, mas não todos os parâmetros têm um componente aleatório. Neste caso, $\mathbf{A}_i = \mathbf{I}$, mas $\mathbf{B}_i$ conteria apenas algumas das colunas de $\mathbf{A}_i$. Muitas outras combinações são possíveis.

Logo, o MNLM (36) formulado em dois estágios pode ser reescrito como:

$$\mathbf{y}_i | \mathbf{b}_i = \mathbf{f}(\boldsymbol{\phi}_i, \mathbf{x}_{ij}) + \boldsymbol{\varepsilon}_i, \quad \text{com } i = 1, \dots, n, \quad j = 1, \dots, n_i$$

$$\boldsymbol{\phi}_i = \mathbf{A}_i \boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}_i \mathbf{b}_i \quad (39)$$

$$\mathbf{b}_i \stackrel{i.i.d.}{\sim} N(\mathbf{0}, \sigma^2 \mathbf{D}); \quad \boldsymbol{\varepsilon}_i \stackrel{i.i.d.}{\sim} N(0, \sigma^2 \mathbf{R}_i).$$

Note que este modelo (39) é uma generalização do modelo (36) e permite a incorporação de covariáveis que variam com o tempo nos efeitos fixos ou nos efeitos aleatórios do modelo. Juntando-se de maneira conveniente as informações dos n indivíduos tem-se:

$$\mathbf{y} = \begin{bmatrix} \mathbf{y}_1 \\ \mathbf{y}_2 \\ \vdots \\ \mathbf{y}_n \end{bmatrix}, \quad \boldsymbol{\phi} = \begin{bmatrix} \phi_1 \\ \phi_2 \\ \vdots \\ \phi_n \end{bmatrix}, \quad \boldsymbol{\eta}(\boldsymbol{\phi}) = \begin{bmatrix} \boldsymbol{\eta}_1(\phi_1) \\ \boldsymbol{\eta}_2(\phi_2) \\ \vdots \\ \boldsymbol{\eta}_n(\phi_n) \end{bmatrix},$$

$$\tilde{\mathbf{D}} = \text{diag}(\mathbf{D}, \mathbf{D}, \dots, \mathbf{D}) \quad \text{e} \quad \mathbf{R} = \text{diag}(\mathbf{R}_1, \mathbf{R}_2, \dots, \mathbf{R}_n).$$

Agora, o modelo geral é

$$\mathbf{y}|\mathbf{b} \sim N(\boldsymbol{\eta}(\boldsymbol{\phi}), \sigma^2 \mathbf{R}), \quad \boldsymbol{\phi} = \mathbf{A}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}\mathbf{b}, \quad (40)$$

$$\mathbf{b} \sim N(\mathbf{0}, \sigma^2 \tilde{\mathbf{D}}),$$

em que

$$\mathbf{B} = \text{diag}(\mathbf{B}_1, \mathbf{B}_2, \dots, \mathbf{B}_n), \quad \mathbf{b} = \begin{bmatrix} \mathbf{b}_1 \\ \mathbf{b}_2 \\ \vdots \\ \mathbf{b}_n \end{bmatrix} \quad \text{e} \quad \mathbf{A} = \begin{bmatrix} \mathbf{A}_1 \\ \mathbf{A}_2 \\ \vdots \\ \mathbf{A}_n \end{bmatrix}.$$

Extensão 2 - Modelo de Vonesh e Carter

O modelo proposto por Hirst et al. (1991) e Vonesh e Carter (1992) é um caso especial do modelo de Lindstrom e Bates (1990), em que o componente não linear é reduzido à curva populacional e o efeito aleatório é linear na escala da resposta, isto é, considera-se n unidades experimentais ($i = 1, 2, \dots, n$) cujas respostas no tempo podem ser expressas em termos do seguinte modelo:

$$\mathbf{y}_i = \mathbf{f}(\mathbf{X}_i, \boldsymbol{\beta}) + \mathbf{Z}_i \mathbf{b}_i + \boldsymbol{\varepsilon}_i \quad (41)$$

em que $\mathbf{X}_i$, $\boldsymbol{\beta}$, $\mathbf{Z}_i$, $\mathbf{b}_i$ e $\boldsymbol{\varepsilon}_i$ são definidos como em (36). Considerando que os $\boldsymbol{\varepsilon}_i$ são independentes e distribuídos com média $\mathbf{0}$ e matriz de variâncias e covariâncias $\mathbf{R}_i$, que os $\mathbf{b}_i$ são independentes e identicamente distribuídos com média $\mathbf{0}$ e matriz de covariâncias $\mathbf{D}$, e que $\mathbf{b}_i$ e $\boldsymbol{\varepsilon}_i$ são mutuamente independentes, tem-se que:

$$\text{cov}(\mathbf{y}_i) = \boldsymbol{\Sigma}_i = \mathbf{Z}_i \mathbf{D} \mathbf{Z}_i^T + \mathbf{R}_i. \quad (42)$$

O modelo (41) generaliza alguns modelos utilizados em análises envolvendo dados longitudinais e apresenta alguns aspectos marcantes. Por exemplo, se a função $\mathbf{f}$ for linear nos parâmetros, isto é, se $\mathbf{f}(\mathbf{X}_i, \boldsymbol{\beta}) = \mathbf{X}_i \boldsymbol{\beta}$, então (41) é o MLM descrito por Laird e Ware (1982).

De certo modo, o trabalho de Vonesh se concentra mais em inferências sobre os efeitos fixos, e menos sobre os componentes de variância e covariâncias.

Extensão 3 - Modelo linear generalizado misto

Defini-se o modelo linear generalizado misto (MLGM) como:

$$\mathbf{y}_i = \mathbf{f}(\mathbf{X}_i\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}_i\mathbf{b}_i) + \boldsymbol{\varepsilon}_i \quad (43)$$

em que $\mathbf{X}_i$, $\boldsymbol{\beta}$, $\mathbf{Z}_i$, $\mathbf{b}_i$ e $\boldsymbol{\varepsilon}_i$ são definidos como em (36). Supõe-se que $\mathbf{y}_i|\mathbf{b}_i$ tem distribuição pertencente à família exponencial e que existe uma função de ligação que relaciona o componente sistemático (preditor linear) com o componente aleatório do modelo. Esses modelos estão fora do escopo deste trabalho. Maiores detalhes podem ser encontrados em Diggle et al. (2002), Molenberghs e Verbeke (2005), ou Vazquez et al. (2010), dentre outros.

2.6.1 Estimação de $\boldsymbol{\beta}$ e $\mathbf{b}$

Diferentes métodos podem ser utilizados para estimar os parâmetros do MNLM como o método dos mínimos quadrados, máxima verossimilhança e procedimentos de estimação bayesiana. Vonesh e Carter (1992) utilizaram no processo de estimação um procedimento de quatro estágios, similar ao procedimento de regressão linear multivariado descrito por Malinvaud (1966) e Gallant (1987), em que os parâmetros da estrutura de variâncias e covariâncias são estimados pelo método MQO e em seguida, usam-se estas estimativas em um procedimento de estimação de MQG. Contudo, no presente trabalho abordaremos apenas os métodos de estimação de máxima verossimilhança e máxima verossimilhança restrita. Para maiores detalhes sobre os outros métodos de estimação, Gallant (1987), Davidian e Giltinan (1995) e Vonesh e Chinchilli (1997) são boas referências.

Quando os componentes de variâncias das matrizes $\mathbf{D}$ e $\mathbf{R}$ são conhecidos e $\boldsymbol{\eta}$ é uma função linear de $\boldsymbol{\beta}$ e $\mathbf{b}$:

$$\boldsymbol{\eta}(\mathbf{A}_i\boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}_i\mathbf{b}_i) = \mathbf{X}_i\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}_i\mathbf{b}_i,$$

então, defini-se

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}_1^T \\ \mathbf{X}_2^T \\ \vdots \\ \mathbf{X}_n^T \end{bmatrix} \quad \text{e} \quad \mathbf{Z} = \text{diag}(\mathbf{Z}_1, \mathbf{Z}_2, \dots, \mathbf{Z}_n).$$

O estimador linear de MQG de $\boldsymbol{\beta}$ é dado por:

$$\hat{\boldsymbol{\beta}}_{lin} = \hat{\boldsymbol{\beta}}_{lin}(\boldsymbol{\theta}) = (\mathbf{X}^T \mathbf{V}^{-1} \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{V}^{-1} \mathbf{y}$$

e o preditor linear de $\mathbf{b}$ é dado por:

$$\hat{\mathbf{b}}_{lin} = \hat{\mathbf{b}}_{lin}(\boldsymbol{\theta}) = \tilde{\mathbf{D}} \mathbf{Z}^T \boldsymbol{\Sigma}^{-1} [\mathbf{y} - \mathbf{X} \hat{\boldsymbol{\beta}}_{lin}(\boldsymbol{\theta})],$$

em que $\boldsymbol{\Sigma} = \mathbf{R} + \mathbf{Z} \tilde{\mathbf{D}} \mathbf{Z}^T$ e $\boldsymbol{\theta}$ contém os elementos das matrizes de covariâncias $\mathbf{D}$ e $\mathbf{R}$. O vetor paramétrico $\boldsymbol{\theta}$ é uma conveniência que permite escrever todos os parâmetros de covariância (exceto σ^2) em um vetor sem especificar exatamente como $\mathbf{R}$ é parametrizada. Note que $\boldsymbol{\theta}$ é definido em função de $\mathbf{D}$ e $\mathbf{R}$.

As estimativas $\hat{\boldsymbol{\beta}}_{lin}$ e $\hat{\mathbf{b}}_{lin}$ maximizam conjuntamente a função:

$$g_{lin}(\boldsymbol{\beta}, \mathbf{b} | \mathbf{y}) = -\frac{1}{2\sigma^2} [\mathbf{y} - (\mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{b})]^T \mathbf{R}^{-1} [\mathbf{y} - (\mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{b})] - \frac{1}{2\sigma^2} \mathbf{b}^T \tilde{\mathbf{D}}^{-1} \mathbf{b}, \quad (44)$$

que para $\boldsymbol{\beta}$ fixo é o algoritmo de densidade a posteriori de $\mathbf{b}$ e para $\mathbf{b}$ fixo é o logaritmo da verossimilhança para $\boldsymbol{\beta}$. Note que (44) é formado por uma soma de quadrados e um termo quadrático em $\mathbf{b}$. Transformando o termo quadrático em $\mathbf{b}$ em um termo de soma de quadrados equivalente, pode-se tratar a otimização puramente como um problema de mínimos quadrados. O problema de mínimos quadrados é criado aumentando o vetor de dados com “pseudo-dados”, como:

$$\tilde{\mathbf{y}} = \tilde{\mathbf{X}}\boldsymbol{\beta} + \tilde{\mathbf{Z}}\mathbf{b} + \tilde{\boldsymbol{\varepsilon}}$$

em que

$$\tilde{\mathbf{y}} = \begin{bmatrix} \mathbf{R}^{1/2} \mathbf{y} \\ \mathbf{0} \end{bmatrix}, \quad \tilde{\mathbf{X}} = \begin{bmatrix} \mathbf{R}^{1/2} \mathbf{X} \\ \mathbf{0} \end{bmatrix}, \quad \tilde{\mathbf{Z}} = \begin{bmatrix} \mathbf{R}^{1/2} \mathbf{Z} \\ \tilde{\mathbf{D}}^{-1/2} \end{bmatrix}, \quad \text{e} \quad \tilde{\boldsymbol{\varepsilon}} \sim N(\mathbf{0}, \sigma^2 \mathbf{I}),$$

sendo $\tilde{\mathbf{D}}^{-1/2} = \text{diag}(\mathbf{L}^{-T}, \mathbf{L}^{-T}, \dots, \mathbf{L}^{-T})$ e $\mathbf{L}$ é o fator de Cholesky de $\mathbf{D}$ ($\mathbf{D} = \mathbf{L}^T \mathbf{L}$), em que $\mathbf{L}$ é uma matriz triangular superior. A notação $\mathbf{L}^{-T}$ indica a transposta da inversa da matriz $\mathbf{L}$. Similarmente, $\mathbf{R}^{-1/2}$ contém o fator de Cholesky de $\mathbf{R}_i$.

Para a situação em que $\boldsymbol{\eta}$ é uma função não linear, esta idéia é facilmente reproduzida. Em um modelo não linear de efeitos mistos o estimador de máxima verossimilhança $\hat{\boldsymbol{\beta}}(\boldsymbol{\theta})$ e a moda a posteriori $\hat{\mathbf{b}}(\boldsymbol{\theta})$ maximizam a função:

$$g(\boldsymbol{\beta}, \mathbf{b} | \mathbf{y}) = -\frac{1}{2\sigma^2} [\mathbf{y} - \boldsymbol{\eta}(\mathbf{A}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}\mathbf{b})]^T \mathbf{R}^{-1} [\mathbf{y} - \boldsymbol{\eta}(\mathbf{A}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}\mathbf{b})] - \frac{1}{2\sigma^2} \mathbf{b}^T \tilde{\mathbf{D}}^{-1} \mathbf{b}.$$

Para β fixo, g é uma constante mais o logaritmo da função de densidade a posteriori de $\mathbf{b}$. Assim, é evidente que $\mathbf{b}$ que maximiza g para um dado valor de β é a moda a posteriori. Logo, $\hat{\beta}$ é um estimador de máxima verossimilhança relativo para uma distribuição marginal aproximada de $\mathbf{y}$. Como no caso linear, estas estimativas podem ser calculadas como a solução para um problema de mínimos quadrados não linear que é obtido aumentando-se o vetor de dados com “pseudo-dados”, como:

$$\tilde{\mathbf{y}} = \tilde{\boldsymbol{\eta}}(\mathbf{A}\beta + \mathbf{B}\mathbf{b}) + \tilde{\boldsymbol{\varepsilon}},$$

em que

$$\tilde{\mathbf{y}} = \begin{bmatrix} \mathbf{R}^{1/2}\mathbf{y} \\ \mathbf{0} \end{bmatrix}, \quad \tilde{\boldsymbol{\eta}}(\mathbf{A}\beta + \mathbf{B}\mathbf{b}) = \begin{bmatrix} \mathbf{R}^{1/2}\boldsymbol{\eta}(\mathbf{A}\beta + \mathbf{B}\mathbf{b}) \\ \tilde{\mathbf{D}}^{-1/2}\mathbf{b} \end{bmatrix}, \quad \text{e} \quad \tilde{\boldsymbol{\varepsilon}} \sim N(\mathbf{0}, \sigma^2\mathbf{I}).$$

2.6.2 Estimação de θ

2.6.2.1 Máxima verossimilhança

Inferências sobre β e θ são baseadas no tratamento da densidade condicional de $\mathbf{y}_i|\mathbf{x}_i$. Na prática, assume-se que os efeitos aleatórios $\mathbf{b}_i$ são contínuos e usando a independência entre as observações e entre $\boldsymbol{\varepsilon}_i$ e $\mathbf{b}_i$, a densidade conjunta de $\mathbf{y}$ é dada por:

$$p(\mathbf{y}|\mathbf{x}; \beta, \theta) = \prod_{i=1}^n p(\mathbf{y}_i|\mathbf{x}_i; \beta, \theta) \quad (45)$$

em que $p(\mathbf{y}_i|\mathbf{x}_i; \beta, \theta)$ é a densidade marginal de $\mathbf{y}_i|\mathbf{x}_i$. Então defini-se os estimadores de máxima verossimilhança para θ com respeito a densidade marginal de $\mathbf{y}$ que é escrita como:

$$p(\mathbf{y}) = \int p(\mathbf{y}, \mathbf{b})d\mathbf{b} = \int p(\mathbf{y}|\mathbf{b})p(\mathbf{b})d\mathbf{b} \quad (46)$$

em que a última igualdade segue da suposição usual de que os efeitos aleatórios são variáveis aleatórias i.i.d. e independentes de todas as covariáveis. A integral em (46) representa a contribuição do indivíduo i para (45), que depende de duas distribuições: $p(\mathbf{y}|\mathbf{b})$, que caracteriza a distribuição intra-indivíduo que é dependente de covariáveis; e $p(\mathbf{b})$, que caracteriza a população, a variabilidade entre os indivíduos. Pelo fato da função

$\boldsymbol{\eta}$ ser não linear em $\mathbf{b}$, não existe forma fechada para a densidade (46) e o cálculo das estimativas será muito difícil. Como alternativa, aproxima-se a distribuição condicional de $\mathbf{y}$ (equação (40)) para $\mathbf{b}$ próximo de $\widehat{\mathbf{b}}(\boldsymbol{\theta})$ por uma normal multivariada com média que é linear em $\mathbf{b}$. Para isso, aproxima-se o erro $\mathbf{y} - \boldsymbol{\eta}(\mathbf{A}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}\mathbf{b})$ expandido em Série de Taylor ao redor de $\widehat{\mathbf{b}}$ como:

$$\mathbf{y} - \boldsymbol{\eta}(\mathbf{A}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}\mathbf{b}) \approx \mathbf{y} - \boldsymbol{\eta}(\mathbf{A}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}\widehat{\mathbf{b}}) + \widehat{\mathbf{Q}}\mathbf{b} - \widehat{\mathbf{Q}}\widehat{\mathbf{b}},$$

em que

$$\widehat{\mathbf{Q}}_i = \widehat{\mathbf{Q}}_i(\boldsymbol{\theta}) = \left. \frac{\partial \boldsymbol{\eta}_i}{\partial \mathbf{b}_i^T} \right|_{\widehat{\boldsymbol{\beta}}, \widehat{\mathbf{b}}} = \left(\left. \frac{\partial \boldsymbol{\eta}_i}{\partial \boldsymbol{\phi}^T} \right|_{\widehat{\boldsymbol{\beta}}, \widehat{\mathbf{b}}} \right) \mathbf{B}_i,$$

e

$$\widehat{\mathbf{Q}} = \widehat{\mathbf{Q}}(\boldsymbol{\theta}) = \text{diag}\{\widehat{\mathbf{Q}}_1, \widehat{\mathbf{Q}}_2, \dots, \widehat{\mathbf{Q}}_n\} = \left. \frac{\partial \boldsymbol{\eta}}{\partial \mathbf{b}^T} \right|_{\widehat{\boldsymbol{\beta}}, \widehat{\mathbf{b}}}.$$

Note que $\widehat{\mathbf{Q}}_i$ é uma função de $\boldsymbol{\theta}$. Então,

$$\mathbf{y} - \boldsymbol{\eta}(\mathbf{A}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}\widehat{\mathbf{b}}) + \widehat{\mathbf{Q}}\widehat{\mathbf{b}} - \widehat{\mathbf{Q}}\mathbf{b} | \mathbf{b} \sim N(\mathbf{0}, \sigma^2 \mathbf{R})$$

e a distribuição condicional aproximada de $\mathbf{y}$ é:

$$\mathbf{y} | \mathbf{b} \sim N \left(\boldsymbol{\eta}(\mathbf{A}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}\widehat{\mathbf{b}}) + \widehat{\mathbf{Q}}\widehat{\mathbf{b}} - \widehat{\mathbf{Q}}\mathbf{b}, \sigma^2 \mathbf{R} \right).$$

Esta expressão, junto com a distribuição de $\mathbf{b}$, permitem aproximar a distribuição marginal de $\mathbf{y}$ como:

$$\mathbf{y} \sim N \left(\boldsymbol{\eta}(\mathbf{A}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}\widehat{\mathbf{b}}) - \widehat{\mathbf{Q}}\widehat{\mathbf{b}}, \sigma^2 \widehat{\boldsymbol{\Sigma}} \right) \quad (47)$$

sendo:

$$\widehat{\boldsymbol{\Sigma}} = \widehat{\boldsymbol{\Sigma}}(\boldsymbol{\theta}) = \mathbf{R} + \widehat{\mathbf{Q}}\widetilde{\mathbf{D}}\widehat{\mathbf{Q}}^T.$$

Supondo que a variável resposta tem distribuição normal multivariada, o logaritmo da função de verossimilhança é obtido utilizando a distribuição marginal (47) e pode ser escrito como:

$$\begin{aligned} l(\boldsymbol{\beta}, \sigma^2, \boldsymbol{\theta} | \mathbf{y}) &= -\frac{1}{2} \log |\sigma^2 \widehat{\boldsymbol{\Sigma}}| \\ &- \frac{1}{2\sigma^2} \left[\mathbf{y} - \boldsymbol{\eta}(\mathbf{A}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}\widehat{\mathbf{b}}) + \widehat{\mathbf{Q}}\widehat{\mathbf{b}} \right]^T \widehat{\boldsymbol{\Sigma}}^{-1} \left[\mathbf{y} - \boldsymbol{\eta}(\mathbf{A}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}\widehat{\mathbf{b}}) + \widehat{\mathbf{Q}}\widehat{\mathbf{b}} \right], \end{aligned} \quad (48)$$

em que $\log$ é a função logarítmica; e $\hat{\mathbf{b}}$ e $\hat{\mathbf{Q}}$ dependem de $\boldsymbol{\theta}$. Logo, $\hat{\boldsymbol{\beta}}_{EMV}$, $\hat{\sigma}_{EMV}$ e $\hat{\boldsymbol{\theta}}_{EMV}$ serão os estimadores de máxima verossimilhança de $\boldsymbol{\beta}$, σ e $\boldsymbol{\theta}$ se maximizarem (48). Segundo Linstrom e Bates (1990), o inverso da matriz de derivadas segundas de (48) fornece uma estimativa para aproximação da matriz de variâncias e covariâncias para $\hat{\boldsymbol{\beta}}_{EMV}$, $\hat{\sigma}_{EMV}$ e $\hat{\boldsymbol{\theta}}_{EMV}$.

2.6.2.2 Máxima verossimilhança restrita

O método da máxima verossimilhança restrita (MVR) foi desenvolvido na década de 50. O uso do método em MLM considerando-se a distribuição normal foi desenvolvido em 1971 por Patterson e Thompson (HARVILLE, 1977). Os estimadores dos componentes de variância obtidos pelo método MVR têm sido amplamente adotados, pois levam em consideração a perda dos graus de liberdade envolvidos na estimação dos parâmetros fixos do modelo. De um modo geral as estimativas de MVR tendem a ser menos viesadas que as estimativas de MV (HARVILLE, 1977; GILMOUR; THOMPSON; CULLIS, 1995). Segundo Barbosa (2009) o método foi desenvolvido para diminuir o viés de estimadores de MV em pequenas amostras. Uma discussão sobre algumas das vantagens e desvantagens destes dois métodos de estimação podem ser encontradas em Harville (1977).

O método da máxima verossimilhança restrita (MVR) é útil para inferências sobre componentes de variância em MLM e a sua extensão para MNLM é muitas vezes dificultada pela existência de integrais analiticamente intratáveis (NOH; LEE, 2008).

Considerando a distribuição normal, o método para definir os estimadores de MVR é o mesmo utilizado para os estimadores de MV exceto que o logaritmo da função de verossimilhança é dado por:

$$l_R(\boldsymbol{\beta}, \sigma, \boldsymbol{\theta} | \mathbf{y}) = -\frac{1}{2} \log |\sigma^{-2} \hat{\mathbf{P}}' \hat{\boldsymbol{\Sigma}}^{-1} \hat{\mathbf{P}}| + l(\boldsymbol{\beta}, \sigma, \boldsymbol{\theta} | \mathbf{y}) \quad (49)$$

em que

$$\hat{\mathbf{P}}_i = \hat{\mathbf{P}}_i(\boldsymbol{\theta}) = \left. \frac{\partial \boldsymbol{\eta}_i}{\partial \boldsymbol{\beta}^T} \right|_{\hat{\boldsymbol{\beta}}, \hat{\mathbf{b}}} = \left(\left. \frac{\partial \boldsymbol{\eta}_i}{\partial \boldsymbol{\phi}^T} \right|_{\hat{\boldsymbol{\beta}}, \hat{\mathbf{b}}} \right) \mathbf{A}_i,$$

e

$$\hat{\mathbf{P}} = \hat{\mathbf{P}}(\boldsymbol{\theta}) = \begin{bmatrix} \hat{\mathbf{P}}_1 \\ \hat{\mathbf{P}}_2 \\ \vdots \\ \hat{\mathbf{P}}_n \end{bmatrix} = \frac{\partial \boldsymbol{\eta}}{\partial \boldsymbol{\beta}^T} \Big|_{\hat{\boldsymbol{\beta}}, \hat{\mathbf{b}}}.$$

Ou seja, ao invés de otimizar diretamente a verossimilhança das observações, o método da MVR maximiza a parte da função de verossimilhança que é invariante aos efeitos fixos (ALCARDE, 2012). Para maximizar (49) é necessário o uso de algum método iterativo. Os estimadores $\hat{\boldsymbol{\beta}}_{EMVR}$, $\hat{\sigma}_{EMVR}$ e $\hat{\boldsymbol{\theta}}_{EMVR}$ serão aqueles que maximizarem l_R .

A função de verossimilhança restrita é baseada em $n - p$ contrastes de erros linearmente independentes. No modelo não linear a matriz de derivadas parciais $\hat{\mathbf{P}}$, que define estes contrastes de erros, depende de $\hat{\boldsymbol{\beta}}$ e $\hat{\mathbf{b}}$. Contudo, desde que o subespaço medido pelas colunas de $\hat{\mathbf{P}}$ depende apenas da não linearidade intrínseca e não da não linearidade dos efeitos dos parâmetros (BATES; WATTS, 1980), os resultados serão aproximadamente constantes numa vizinhança das estimativas.

2.6.2.3 Aproximações numéricas

O problema prático de se obter os estimadores para os parâmetros do MNLM se concentra na maximização da função de verossimilhança $l(\cdot)$, pois sua resolução geralmente é intratável analiticamente, mesmo quando a distribuição de efeitos aleatórios é normal. A avaliação das integrais deve ser feita por meio de alguma aproximação numérica, ou seja, para maximizar o logaritmo da função de MV, ou o da MVR, é necessário o uso de algum método iterativo (como o método de Newton-Raphson, o método Fisher score, ou o método EM proposto por Laird e Ware (1982), dentre outros).

Diferentes aproximações têm sido propostas para obter-se a estimativa dos parâmetros do modelo proposto. Basicamente, alguns destes métodos consistem em tomar uma expansão de Taylor de primeira ordem para a função não linear (f) do modelo em torno do valor esperado dos efeitos aleatórios (SHEINER; BEAL, 1980; VONESH; CARTER, 1992; LINDSTROM; BATES, 1990), como descrito anteriormente. Alguns dos métodos para a aproximação da função de verossimilhança utilizados em MNLM são:

a) **O Método da Quadratura Gaussiana:** a aproximação requer que o integrando

seja avaliado em cada abscissa e, em seguida, os resultados sejam ponderados e somados. A precisão da regra para aproximação do valor verdadeiro da integral se baseia no número de abscissas que pode ser escolhido pelo usuário. Quanto maior o número de abscissas, melhor será a aproximação, porém maior será o tempo computacional. Uma descrição completa do método é dada em Davidian e Gallant (1992).

- b) **O Método de aproximação Laplaciana modificada:** consiste em um método de aproximação alternado que usa uma regra de Quadratura Gaussiana adaptada para melhorar a aproximação de Laplace. É frequentemente usada em inferência bayesiana para estimar a densidade *a posteriori* e distribuições preditivas. Uma boa descrição deste método pode ser encontrada em Tierney e Kadane (1986).
- c) **Algoritmos MCEM (Monte Carlo EM) e GQEM:** ambos propostos por Wang (2007), o primeiro é o algoritmo de Monte Carlo aplicado ao algoritmo EM. O autor encontrou inúmeras dificuldades na obtenção de amostras a serem utilizadas para estimar o passo E, devido à intratabilidade da distribuição utilizada. Contudo, afirma que o algoritmo MCEM com base em amostras independentes permitiu uma avaliação direta do erro de Monte Carlo e pode ser muito mais eficiente que os algoritmos baseados em cadeias de Markov. O segundo método utiliza aproximações da quadratura de Gaussiana (GQEM) para o passo E. Para casos de dimensão pequena, o algoritmo GQEM é mais eficiente do que o algoritmo MCEM e, portanto, deve ser escolhido.
- d) **O Método EML (*Estimativa mista linear*):** desenvolvido por Lindstrom e Bates (1990), consiste em aproximar a função de verossimilhança pela verossimilhança de um MLM utilizando um algoritmo híbrido de maximização. O processo inicia-se com o cálculo das estimativas iniciais dos parâmetros θ , então usa várias iterações EM para chegar perto do máximo, e em seguida, muda para iterações Newton-Raphson para completar a convergência para o valor ótimo. O algoritmo proposto dessa forma se justifica pelo fato das iterações do algoritmo EM geralmente trazerem as estimativas dos parâmetros para a região do ótimo muito rapidamente, mas o progresso para o ótimo tende a ser lento nas proximidades do mesmo. Por outro lado as iterações do método Newton-Raphson são individualmente mais intensivas

computacionalmente do que as iterações EM e podem ser bastante instáveis quando distantes do ideal. No entanto, perto do ótimo o método Newton-Raphson converge muito rapidamente (PINHEIRO; BATES, 2000). Assim, o algoritmo híbrido foi desenvolvido, no intuito de otimizar o processo de maximização.

Métodos de aproximação para tratar a verossimilhança restrita também são propostos na literatura, por exemplo, Noh e Lee (2008), baseados na verossimilhança hierárquica, propuseram um procedimento para a obtenção das estimativas de MVR em MNLM. Segundo estes autores o procedimento é eficiente computacionalmente e estatisticamente. Outro procedimento para estimar os componentes de variâncias em MNLM foi sugerido por Meza, Jaffrézic e Foulley (2007), foi chamado de algoritmo SAEM e baseia-se na integração dos efeitos fixos e em um procedimento de estimação estocástica, implementado via algoritmo EM estocástico.

2.6.3 Seleção de modelos e qualidade do ajuste

Sabe-se que a seleção de um modelo deve basear-se em um bom ajuste aos dados amostrais e também na sua coerência com o evento biológico estudado. Selecionar o melhor modelo significa selecionar a melhor estrutura para as médias (parte fixa) e a melhor estrutura de covariâncias. A construção do MNLM consta de três etapas: **a)** seleção dos efeitos fixos; **b)** identificação dos efeitos aleatórios e estimação; e **c)** comparação de modelos. Os procedimentos descritos por Barbosa (2009) para MLM também servem para MNLM.

Diggle (1988) e Wolfinger (1993) propuseram uma estratégia para seleção de MLM, dividido em três etapas:

- (i) Usar análise gráfica e selecionar um modelo de médias inicial. Modelos de médias superparametrizados são preferidos aos subparametrizados, pois evitam a introdução de correlações falsas.
- (ii) Selecionar uma estrutura de variâncias e covariâncias inicial, usando alguma teoria científica relevante e gráficos, como os gráficos de resíduos e os de perfis individuais.
- (iii) Usar técnicas estatísticas formais para comparar estruturas de variâncias e covariâncias e selecionar a(s) mais parcimoniosa(s). Assumindo uma das estruturas

de covariância selecionadas, usar técnicas formais para reduzir o modelo inicial, se necessário.

A seleção e a avaliação de um modelo são tarefas simples, mas de extrema importância, pois determinarão o modelo que melhor prediz a variável dependente de forma parcimoniosa, isto é, com um menor número de parâmetros. Para isso são utilizadas ferramentas analíticas como testes de hipóteses e critérios de informação, como descritos a seguir.

2.6.3.1 Teste da razão de verossimilhança

O teste da razão de verossimilhanças (TRV) aplicado aos MNL (REGAZZI, 2003; REGAZZI; SILVA, 2010) pode também ser usado para comparar MNLM aninhados.

Quando for utilizado o método da MVR para estimação dos parâmetros, o TRV pode ser aplicado desde que os modelos a serem comparados tenham os mesmos parâmetros de efeito fixo e ambos os modelos tenham sido ajustados pelo mesmo método, no caso o método da MVR (PINHEIRO; BATES, 2000 - p.83). Portanto, o TRV pode ser empregado para testar hipóteses sobre os parâmetros de covariâncias ou parâmetros de efeito fixo.

West, Welch e Galecki (2007) recomendam a utilização do TRV para os parâmetros de covariância, incluindo os MNLM com estruturas de efeitos aleatórios aninhados. Já as hipóteses sobre os efeitos fixos devem ser testadas usando os testes t e F , porque o TRV tende a ser não conservativo.

O TRV foi utilizado por Pinheiro e Bates (2000) para avaliar a importância dos efeitos aleatórios, ajustando diferentes modelos aninhados em que as estruturas de covariâncias dos efeitos aleatórios mudaram da mais complexa para a mais simples.

Para realizar o TRV em MNLM, o mesmo procedimento descrito na seção 2.3.4.2. deve ser adotado.

2.6.3.2 Critérios de Informação

Outras ferramentas que servem como medida de comparação da qualidade de ajuste de modelos são os critérios de informação. Como nos MLM, o Critério de Informação de Akaike (AIC) e o Critério de Informação Bayesiano (BIC) são usados para comparar MNLM (PINHEIRO; BATES, 2000). Tais medidas permitem determi-

nar qual o modelo é mais provável que esteja correto e quantificar quão mais provável é cada modelo, sendo o seu o cálculo e interpretação, bem fáceis de serem realizados (MOTULSKY; CHRISTOPOULOS, 2003). Os critérios são baseados no logaritmo da função de verossimilhança (MV ou MVR), sendo dependentes do número de observações e de parâmetros do modelo em estudo. Não dependem de p -valores ou do conceito de significância estatística, podendo ser aplicados a modelos aninhados ou não aninhados.

O AIC (*Akaike Information Criterion*) foi proposto por Akaike (1974) e é calculado por:

$$AIC = -2l(\hat{\beta}, \hat{\theta}, \hat{\sigma}) + 2d \quad (50)$$

em que, θ é o vetor de parâmetros de componentes de variância; $l(\hat{\beta}, \hat{\theta}, \hat{\sigma})$ é o valor do logaritmo da função de verossimilhança do modelo, calculado com as estimativas obtidas no processo de maximização; e d representa o número total de parâmetros de efeitos fixos e aleatórios. O valor do AIC pode ser positivo ou negativo (SAKAMOTO; ISHIGURO; KITAGAWA, 1986).

Bozdogan (1987), propôs a seguinte correção para o AIC:

$$AIC_c = -2l(\hat{\beta}, \hat{\theta}, \hat{\sigma}) + 2d + 2\frac{d(d+1)}{n-d-1} \quad (51)$$

sendo n o número de observações usadas na estimação do modelo em estudo. Seu uso é recomendado quando têm-se amostras grandes.

O BIC (*Bayesian Information Criterion*) foi proposto por Schwarz (1978), penaliza os modelos com mais parâmetros e o seu uso é recomendado quando se trabalha com pequenas amostras. É calculado por:

$$BIC = -2l(\hat{\beta}, \hat{\theta}, \hat{\sigma}) + d \log(n), \quad (52)$$

onde n é definido como anteriormente. O modelo que apresentar o menor valor de AIC, AIC_c e/ou de BIC será escolhido e considerado representativo de um melhor ajuste. Observe que todos os critérios penalizam a verossimilhança pelo número de parâmetros, mas para grandes amostras, o BIC penaliza mais severamente a verossimilhança do que o AIC_c .

2.6.3.3 Intervalos de confiança e testes de hipóteses

A estimação por intervalo é definida para qualquer função paramétrica dos parâmetros de locação, mas a situação mais comum envolve a construção de intervalos

de confiança para um componente β_k ($k = 1, 2, \dots, p$) do vetor de parâmetros $\boldsymbol{\beta}$. Neste caso, o intervalo de confiança (BRANDÃO, 1996) é dado por:

$$\hat{\beta}_k - t_{(1-\alpha/2)}[\hat{\boldsymbol{\Omega}}_{ii}]^{1/2} \leq \beta_k \leq \hat{\beta}_k + t_{(1-\alpha/2)}[\hat{\boldsymbol{\Omega}}_{ii}]^{1/2} \quad (53)$$

onde $t_{(1-\alpha/2)}$ é o valor crítico da distribuição t -Student com $(np - r)$ graus de liberdade e um nível de significância α ; sendo $r = \text{posto}(\hat{\boldsymbol{\Omega}})$, em que $\hat{\boldsymbol{\Omega}} = \widehat{\text{cov}}(\hat{\boldsymbol{\beta}})$ é a estimativa da matriz de covariâncias dos estimadores $\hat{\boldsymbol{\beta}}$, que é dada por:

$$\hat{\boldsymbol{\Omega}} = \left[\sum_{i=1}^n \mathbf{J}_i^T(\hat{\boldsymbol{\beta}}) \hat{\boldsymbol{\Sigma}}_i^{-1} \mathbf{J}_i(\hat{\boldsymbol{\beta}}) \right]^{-1} \quad (54)$$

em que $\mathbf{J}(\hat{\boldsymbol{\beta}})$ é o jacobiano da função e $\hat{\boldsymbol{\Sigma}}_i = \widehat{\text{cov}}(\mathbf{y}_i)$; e $\hat{\boldsymbol{\Omega}}_{ii}$ é o i -ésimo elemento da diagonal da matriz calculada em (54).

Comparações usuais entre os parâmetros de efeito fixo do modelo (41) podem ser expressas na forma de uma hipótese linear geral:

$$H_0 : h(\boldsymbol{\beta}) = 0 \quad \text{versus} \quad H_1 : h(\boldsymbol{\beta}) \neq 0 \quad (55)$$

onde $h(\boldsymbol{\beta})$ é um vetor $(q \times 1)$ de funções com derivada primeira contínua. Por exemplo: $H_0 : \boldsymbol{\beta} = \boldsymbol{\beta}^0$, em que $\boldsymbol{\beta}^0$ é algum valor específico de $\boldsymbol{\beta}$, pode ser escrita na forma (55) fazendo-se $h(\boldsymbol{\beta}) = \boldsymbol{\beta} - \boldsymbol{\beta}^0$. Da normalidade assintótica de $\sqrt{n}(\hat{\boldsymbol{\beta}} - \boldsymbol{\beta}^0)$ pode-se testar a hipótese não linear geral usando-se a estatística de Wald, dada por:

$$W = h^T(\hat{\boldsymbol{\beta}}) [\hat{\mathbf{H}} \hat{\boldsymbol{\Omega}} \hat{\mathbf{H}}^T]^{-1} h(\hat{\boldsymbol{\beta}})$$

onde $h(\hat{\boldsymbol{\beta}})$ é o valor da função $h(\boldsymbol{\beta})$ avaliada em $\boldsymbol{\beta} = \hat{\boldsymbol{\beta}}$, $\hat{\mathbf{H}}$ é a matriz de derivadas (jacobiano) de $h(\boldsymbol{\beta})$ avaliada em $\boldsymbol{\beta} = \hat{\boldsymbol{\beta}}$, e $q = \text{posto}(\mathbf{H}(\boldsymbol{\beta}))$.

A estatística de Wald tem distribuição aproximada de qui-quadrado com q graus de liberdade, $W \sim \chi_q^2$, e é um teste válido para tamanhos grandes de amostra. Gallant (1987) sugeriu o uso de testes alternativos para situações de tamanhos pequenos de amostras, como o teste baseado na estatística:

$$W_1 = \frac{W}{q}, \quad (56)$$

que tem distribuição $F_{(q, n-p)}$. A justificativa para este procedimento é que, dada a estimação dos parâmetros de locação, restam $(n - p)$ graus de liberdade para estimar $\boldsymbol{\Sigma}$. Como W_1 tem distribuição aproximada $F_{(q, \infty)}$, a utilização da distribuição $F_{(q, n-p)}$ deve

fornecer uma boa aproximação para amostras pequenas, que é um problema comum em ensaios de degradabilidade.

Segundo Verbeke e Molenberghs (2000) o teste de Wald não é adequado para uso com modelos lineares mistos que são especificados condicionalmente aos efeitos aleatórios $\mathbf{b}_i$, isto é, $\mathbf{y}_{ij}|\mathbf{b}_i \sim N(\mathbf{X}_i\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}_i\mathbf{b}_i, \boldsymbol{\Sigma}_i)$, porque a estatística do teste não leva em conta a estimativa dos parâmetros de efeito aleatório e pode subestimar a variação dos efeitos fixos. O mesmo problema pode ser encontrado ao considerar um MNLM, mas esta afirmação necessita de mais investigações.

Para modelos de regressão não linear, os testes de Wald e da razão de verossimilhança são assintoticamente equivalentes, desde que certas condições de regularidade (Anexo A) sejam atendidas. Mas em pequenas amostras, os resultados assintóticos aproximam de modo distinto cada procedimento (SOUZA, 1998).

Como orientações e não regras rígidas e rápidas para a seleção do modelo, duas estratégias para construção de MLM, e que podem ser adaptadas para MNLM, foram propostas por West, Welsh e Galecki (2007, p. 51):

a) Estratégia descendente (top-down strategy): sugere iniciar o processo com um modelo que inclui o número máximo de efeitos fixos possíveis e de interesse (modelo maximal), que deverá extrair toda variação sistemática dos dados. A estratégia é a seguinte:

- (i) Comece com o ajuste do modelo maximal.
- (ii) Selecione uma estrutura de efeitos aleatórios para o modelo. A necessidade de incluir os efeitos aleatórios selecionados pode ser avaliada por meio do TRV e pelos critérios de informação. Observe que nesta fase, busca-se a melhor estrutura para a matriz de variâncias e covariâncias $\mathbf{D}$.
- (iii) Selecione uma estrutura de covariância para explicar a variação intra-indivíduos. Uma vez que os efeitos fixos e efeitos aleatórios já estão adicionados ao modelo, a variação restante observada é devido ao erro residual. Desta forma, uma estrutura de covariâncias adequada para os resíduos deve ser investigada. Nesta fase, busca-se modelar a matriz de variâncias e covariâncias $\mathbf{R}$.
- (iv) Esta etapa envolve o uso de testes estatísticos apropriados para determinar quais

parâmetros de efeito fixo são necessários no modelo.

b) **Estratégia ascendente** (*step-up strategy*): esta estratégia trabalha no sentido contrário da anterior. Sugere iniciar o processo com o ajuste de um modelo, contendo somente o efeito da média geral. Em seguida, são incluídos efeitos de covariáveis como de efeitos fixos e possivelmente efeitos aleatórios associados aos mesmos. A necessidade de inclusão de novos termos no modelo pode ser verificada pelo TRV ou critérios de informação.

2.6.3.4 Análise de Resíduos

A análise de resíduos é um passo muito importante para verificar as pressuposições de qualquer modelo proposto e também para encontrar possíveis pontos influentes e/ou *outliers*. Uma ou mais observações são ditas discrepantes (*outliers*) se seus resíduos são muito grandes (em valor absoluto) em relação aos demais (DRAPER; SMITH, 1998; PRUDENTE, 2009; PANOSSO; MALHEIROS, 2011). Já os pontos influentes são observações que, embora não apresentem resíduos grandes, podem alterar significativamente as estimativas dos parâmetros do modelo escolhido. Para detectar a presença de pontos influentes ou de *outliers*, técnicas gráficas, como diagramas paralelos de dispersão e semivariogramas empíricos (*empirical semivariograms*) podem ser usados para avaliar a média marginal e a estrutura de covariâncias. Q-Q plots e envelopes simulados (ATKINSON, 1985) são importantes ferramentas gráficas para avaliar o afastamento da normalidade dos dados, que é uma das suposições feitas sobre a distribuição dos dados.

Outras técnicas de diagnóstico podem ser aplicadas com base nos resíduos ordinários e resíduos padronizados. Contudo, Prudente (2009) afirmou que os resíduos projetados são melhores que os resíduos ordinários para tais verificações. Maiores detalhes sobre este resíduo podem ser encontrados em Martins (2012)⁷.

Pinheiro e Bates (2000), Nobre e Singer (2007) dentre outros, definiram três tipos de resíduos em modelos lineares mistos e cada um deles é útil para avaliar

⁷MARTINS, M.C. **Análise de resíduos projetados em modelos não-lineares de regressão:** uma aplicação em crescimento de frutos. Dissertação (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. Dissertação ainda em elaboração, mas com resultados positivos.

algum tipo de suposição feita no modelo:

- (i) **o resíduo marginal** ($\hat{\xi}$): é indicado para avaliar a suposição de linearidade do valor esperado da variável resposta e as covariáveis, além de avaliar o ajuste da estrutura de covariâncias utilizada no modelo. É definido por:

$$\hat{\xi} = \mathbf{y} - \mathbf{X}\hat{\boldsymbol{\beta}} \quad (57)$$

que prediz os erros marginais: $\xi = \mathbf{y} - E[\mathbf{y}] = \mathbf{y} - \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} = \mathbf{Z}\mathbf{b} + \boldsymbol{\varepsilon}$.

- (ii) **o resíduo condicional** ($\hat{\varepsilon}$): é indicado para avaliar a hipótese de normalidade e de homocedasticidade do erro condicional, além da existência de observações discrepantes, sendo definido como:

$$\hat{\varepsilon} = \mathbf{y} - \mathbf{X}\hat{\boldsymbol{\beta}} - \mathbf{Z}\hat{\mathbf{b}} \quad (58)$$

que prediz os erros condicionais: $\varepsilon = \mathbf{y} - E[\mathbf{y}|\mathbf{b}] = \mathbf{y} - \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} - \mathbf{Z}\mathbf{b}$.

- (iii) **os valores preditos dos efeitos aleatórios - EBLUP** ($\hat{\mathbf{Zb}}$): podem ser usados para detectar a presença de indivíduos discrepantes, avaliar a normalidade dos efeitos aleatórios e a sua correspondente estrutura de covariâncias. São definidos por: $\hat{\mathbf{Zb}}$, que prediz os efeitos aleatórios: $\mathbf{Zb} = E[\mathbf{y}|\mathbf{b}] - E[\mathbf{y}]$.

Contudo, na literatura existem poucos estudos de análise de resíduos para MNLM, sendo esta uma área a ser explorada. Partindo das similaridades com o MLM deve ser possível estabelecer diferentes resíduos para o MNLM. Este assunto não será abordado aqui, mas ficará como idéia para futuros estudos.

2.6.4 A biblioteca nlme

A biblioteca `nlme` do R foi desenvolvida por José Pinheiro e Douglas Bates em 2007. Nesta biblioteca, várias funções são disponibilizadas, dentre as quais, a função `nlme` que ajusta um MNLM geral usando a formulação apresentada por Lindstrom e Bates (1990), mas permitindo efeitos aleatórios aninhados. Os erros intra-grupo podem ser correlacionados e/ou ter variâncias desiguais. Algumas considerações importantes desta biblioteca são elencadas a seguir:

a) Facilidades de programação:

- (a.1) **Valores iniciais:** É obrigatória a declaração de valores iniciais apenas para os efeitos fixos. O valor padrão para os efeitos aleatórios é zero e as estimativas iniciais para os parâmetros de covariância incluídos no vetor $\boldsymbol{\theta}$ e σ^2 são geradas automaticamente usando a fórmula dada em Laird, Lange e Stram (1987), se elas não são fornecidas (PINHEIRO et al., 1993).

Para obter os valores iniciais dos efeitos fixos é comum também utilizar a função `nlsList`, que ajusta o modelo não linear para todos os subgrupos de indivíduos definidos pelos níveis do fator de agrupamento, que aparece no modelo. As médias das estimativas dos parâmetros, que são obtidas pelo comando `fixed(nlslist)`, servem como valores iniciais para cada tratamento. É evidente que, dependendo do comportamento dos tratamentos esse procedimento pode não gerar um bom conjunto de valores iniciais para o procedimento iterativo, mas no geral funciona.

- (a.2) Flexibilidade na especificação de diversas estruturas de matrizes de variância e covariância (**D** e **R**).

- (a.3) Inclusão de mais de um efeito aleatório no modelo.

- (a.4) Facilidades na especificação e no cálculo de testes de razão de verossimilhanças.

- b) Métodos de estimação:** Estão disponíveis os métodos MVR e MV, sendo que este último é o método de estimação padrão da função `nlme` e não precisa ser especificado. O método MVR é escolhido com o argumento `method=REML`.

- (b.1) **Técnicas de maximização:** Como os efeitos aleatórios são quantidades não observáveis, a estimação de MV em modelos de efeitos mistos é baseada na densidade marginal da resposta $\mathbf{y}$, como dado em (46).

Em geral, esta integral não tem a expressão em forma fechada quando a função f do modelo é não linear em $\mathbf{b}_i$, sendo necessário o uso de algum método numérico. A aproximação implementada na função `nlme` é chamada EML (PINHEIRO et al., 2009). Este método de maximização alterna em dois passos: um passo que considera o uso do método dos mínimos quadrados não linear ponderados (MQNLP), e o outro passo que considera o efeito linear misto (EML):

(i) No passo MQNLP, a estimativa corrente de $\mathbf{D}$ é considerada como fixa e a estimativa condicional dos efeitos fixos $\boldsymbol{\beta}$ é obtida pela minimização da função objetivo de MQNLP que é dada por:

$$\sum_{i=1}^n (\|\mathbf{y}_i - \mathbf{f}_i(\boldsymbol{\beta}, \mathbf{b}_i)\|^2 + \mathbf{b}_i^T \mathbf{D}^{-1} \mathbf{b}_i) \quad (59)$$

em que, $[\mathbf{f}_i(\boldsymbol{\beta}, \mathbf{b}_i)]_j = \mathbf{f}(\phi_{ij}, \mathbf{x}_{ij})$, com $i = 1, \dots, n$, $j = 1, \dots, t_i$; e a notação $\|\cdot\|$ é referente a norma vetorial.

(ii) O passo EML atualiza a estimativa de $\mathbf{D}$ baseado em uma expansão de Taylor de primeira-ordem da função f do modelo, aproximando a estimativa corrente de $\boldsymbol{\beta}$ e o modo condicional dos efeitos aleatórios $\mathbf{b}_i$, que serão designados por $\hat{\boldsymbol{\beta}}^{(w)}$ e $\hat{\mathbf{b}}_i^{(w)}$, respectivamente. Escrevendo:

$$\hat{\mathbf{X}}_i = \left. \frac{\partial \mathbf{f}_i}{\partial \boldsymbol{\beta}^T} \right|_{\hat{\boldsymbol{\beta}}, \hat{\mathbf{b}}}, \quad \hat{\mathbf{Z}}_i = \left. \frac{\partial \mathbf{f}_i}{\partial \mathbf{b}_i^T} \right|_{\hat{\boldsymbol{\beta}}, \hat{\mathbf{b}}}, \text{ e}$$

$$\hat{\mathbf{w}}_i^{(w)} = \mathbf{y}_i - \mathbf{f}_i(\hat{\boldsymbol{\beta}}^{(w)}, \hat{\mathbf{b}}_i^{(w)}) + \hat{\mathbf{X}}_i^{(w)} \hat{\boldsymbol{\beta}}^{(w)} + \hat{\mathbf{Z}}_i^{(w)} \hat{\mathbf{b}}_i^{(w)}, \quad (60)$$

em que a função de logaritmo de verossimilhança aproximada usada para estimar $\mathbf{D}$ é

$$\begin{aligned} l(\boldsymbol{\beta}, \sigma^2, \mathbf{D}|\mathbf{y}) &= -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \left\{ \log \left| \sigma^2 \left(\mathbf{I} + \hat{\mathbf{Z}}_i^{(w)} \mathbf{D} \hat{\mathbf{Z}}_i^{(w)T} \right) \right| \right. \\ &\quad + \sigma^{-2} \left[\hat{\mathbf{w}}_i^{(w)} - \hat{\mathbf{X}}_i^{(w)} \boldsymbol{\beta} \right]^T \left(\mathbf{I} + \hat{\mathbf{Z}}_i^{(w)} \mathbf{D} \hat{\mathbf{Z}}_i^{(w)T} \right)^{-1} \\ &\quad \times \left. \left[\hat{\mathbf{w}}_i^{(w)} - \hat{\mathbf{X}}_i^{(w)} \boldsymbol{\beta} \right], \right\} \end{aligned} \quad (61)$$

que é idêntica à função para o MLM (LAIRD; WARE, 1982) em que o vetor resposta é dado por $\mathbf{w}^{(w)}$ e as matrizes de delineamento dos efeitos fixo e aleatório são dadas por $\hat{\mathbf{X}}^{(w)}$ e $\hat{\mathbf{Z}}^{(w)}$. Usando os resultados de Lindstrom e Bates (1990) pode-se expressar um valor ótimo de $\boldsymbol{\beta}$ e σ^2 como funções de $\mathbf{D}$ e trabalhando-se com o perfil da função de logaritmo de verossimilhança de $\mathbf{D}$, simplifica grandemente a otimização do processo. Uma aproximação para a função de logaritmo de verossimilhança restrita para a estimação de $\mathbf{D}$ também pode ser obtida pela função nlme que é dada por:

$$\begin{aligned} l_R(\boldsymbol{\beta}, \sigma^2, \mathbf{D}|\mathbf{y}) &= -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \log \left| \sigma^2 \hat{\mathbf{X}}_i^{(w)T} \left(\mathbf{I} + \hat{\mathbf{Z}}_i^{(w)} \mathbf{D} \hat{\mathbf{Z}}_i^{(w)T} \right)^{-1} \hat{\mathbf{X}}_i^{(w)} \right| \\ &\quad + l(\boldsymbol{\beta}, \sigma^2, \mathbf{D}|\mathbf{y}). \end{aligned} \quad (62)$$

O algoritmo alterna entre os passos MQNLP e EML até que algum critério de convergência seja alcançado. Este algoritmo alternativo tende a ser mais eficiente quando as estimativas dos componentes de variância e covariância ($\mathbf{D}$ e σ^2) não são altamente correlacionados com as estimativas dos efeitos fixos (β). O método da MVR implementado na função `nlme` apresenta problemas ainda não solucionados relacionados à estimação dos parâmetros e convergência do processo. Por esse motivo, o método padrão (*default*) da função `nlme` é o método da MV⁸.

Pinheiro (1994, apud PINHEIRO; BATES, 1995) demonstrou que, no modelo de efeito misto linear, a estimativa da máxima verossimilhança de $\mathbf{D}$ e σ^2 são assintoticamente independentes das estimativas de máxima verossimilhança de β , mas estes resultados ainda não foram estendidos para o MNLM (69).

Lindstrom e Bates (1990) apenas usam o passo EML para atualizar a estimativa dos parâmetros da matriz $\mathbf{D}$. Contudo, o passo EML também atualiza os valores de β e o modo condicional de $\mathbf{b}_i$. Assim, podemos reavaliar os passos iterativos EML por (60) e (61) (ou (62) para a função de logaritmo de verossimilhança restrita) na estimação atualizada de β e $\mathbf{b}_i$ como apontado por Wolfinger (1993). Como a atualização da estimativa corresponde ao valores obtidos na primeira iteração de um algoritmo Gauss-Newton no passo MQNLP, iterações do passo EML irão convergir para o mesmos valores obtidos no algoritmo alternado, possivelmente não tão rapidamente. Wolfinger (1993) também mostrou que a aproximação EML para (62) é equivalente à aproximação Laplaciana (TIERNEY; KADANE, 1986) na integral (46) quando uma priori é assumida para β .

⁸José Carlos Pinheiro, durante seu mini-curso titulado “Modelos não lineares de efeitos mistos em R”. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 57., Piracicaba, 06 de maio de 2012.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente é feita uma pequena descrição do ensaio que gerou os dados e em seguida, são apresentados tabelas com estatísticas descritivas (média e erro padrão) e gráficos de perfis individuais para as variáveis respostas consideradas. Para o ensaio considerado, assumiu-se que as observações realizadas numa mesma unidade de investigação seguem uma distribuição normal multivariada. Três metodologias para a análise de ensaios de degradabilidade são apresentadas nas subseções 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3, das quais na prática, a primeira (abordagem 1) é muito utilizada.

3.1 Materiais

Os dados utilizados no presente trabalho são de um estudo desenvolvido por Feitosa (2003) na Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos, do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Campus de Jaboticabal, realizado no período de maio de 2001 a dezembro de 2002.

Um dos objetivos do trabalho foi avaliar a degradação ruminal do capim-Tifton 85 com 10% de proteína bruta, em novilhos alimentados com rações experimentais compostas por diferentes combinações de volumoso(Vo):concentrado(Co) (70:30, 50:50 e 30:70%). Como volumoso foram utilizados fenos de capim-Tifton 85 de diferentes qualidades (4% e 10% de proteína bruta), que serão denotados por TIF4 e TIF10, e como concentrado, casca de soja, milho moído e farelo de girassol. Os tratamentos resultantes de um esquema fatorial 3×2 foram identificados como: 70:30-TIF4 (T1), 70:30-TIF10 (T2), 50:50-TIF4 (T3), 50:50-TIF10 (T4), 30:70-TIF4 (T5) e 30:70-TIF10 (T6).

Para este trabalho os dados relativos à degradabilidade da matéria seca (MS) e a degradabilidade da fibra em detergente neutro (FDN) do feno de capim-Tifton 85 com 10% de proteína bruta foram considerados como variáveis respostas. A degradabilidade foi determinada pela técnica *in situ* e os dez tempos de incubação foram de: 3, 6, 12, 24, 48, 60, 72, 84, 96 e 120 horas, com duas repetições para cada tempo de incubação, em cada animal. Originalmente o experimento foi delineado em quadrado latino (6×6) com seis novilhos mestiços fistulados (linhas), seis períodos (colunas) e seis tratamentos, em que nas parcelas tem-se uma estrutura de parcelas subdivididas, sendo as subparcelas, os tempos de incubação. O croqui do ensaio é apresentado na Tabela 2.

Adotou-se o sistema de colocação dos sacos de náilon nos diferentes tempos de incubação e a retirada simultânea de todos os sacos ao final do período de incubação.

Tabela 2 - Croqui do delineamento experimental

Animal	Período					
	I	II	III	IV	V	VI
1	T2	T1	T3	T4	T6	T5
2	T1	T2	T4	T3	T5	T6
3	T4	T3	T6	T5	T1	T2
4	T3	T4	T5	T6	T2	T1
5	T6	T5	T2	T1	T3	T4
6	T5	T6	T1	T2	T4	T3

3.1.1 Matéria Seca

Um estudo descritivo inicial permitiu detectar a presença de três valores discrepantes da variável MS, que foram retirados da análise. Os perfis individuais de resposta e os perfis individuais separados por tratamento referentes a variável resposta MS em função dos tempos de incubação são apresentados na Figura 5. Note que os perfis possuem comportamentos semelhantes, apresentam heterogeneidade de variâncias ao longo do tempo e indicam que um modelo não linear pode explicar bem a relação entre a degradação da MS e o tempo de incubação.

Figura 5 - (a) Perfis individuais; e (b) perfis individuais por tratamento da degradabilidade de MS ao longo dos tempos de incubação

Observe também que é evidente um aumento da variabilidade das respostas até as 24 ou 48 horas de incubação e uma posterior diminuição até as 120 horas, para

todos os tratamentos (Tabela 3), mas esse aspecto não é tão evidente nos gráficos de perfis individuais (Figura 5).

Tabela 3 - Degradabilidade média da MS (%) do capim-Tifton 85 com 10% de PB, por tratamento e por tempo de incubação (h)

Tratamento	Estatística	Tempo (h)									
		3	6	12	24	48	60	72	84	96	120
70:30-TIF4	Média	23,16	28,35	33,36	48,80	61,39	66,53	68,67	70,46	71,35	73,59
	e.p.	1,24	1,75	2,79	5,32	4,17	1,66	1,14	1,08	0,67	0,77
70:30-TIF10	Média	23,30	28,79	35,36	50,66	61,91	65,51	68,59	70,16	71,44	72,74
	e.p.	1,52	0,80	3,25	4,78	3,49	3,00	1,67	0,91	0,86	0,62
50:50-TIF4	Média	23,11	27,46	34,87	49,31	58,89	64,12	67,31	68,34	69,81	72,05
	e.p.	1,53	2,87	1,52	2,87	4,71	2,03	2,36	2,87	3,02	2,80
50:50-TIF10	Média	23,34	28,52	33,87	49,84	61,05	64,92	67,25	68,56	70,49	72,85
	e.p.	1,91	2,19	3,36	3,85	5,41	2,79	2,06	2,69	2,03	1,52
30:70-TIF4	Média	23,52	28,12	31,60	44,98	56,54	62,11	63,29	66,20	68,48	71,09
	e.p.	1,88	1,52	1,91	3,17	2,35	2,74	1,66	1,73	1,41	1,32
30:70-TIF10	Média	23,32	27,63	31,96	47,75	56,17	61,51	65,26	66,05	68,85	71,31
	e.p.	1,62	1,56	2,21	3,15	3,10	3,03	2,58	2,83	1,64	1,56

3.1.2 Fibra em detergente neutro

Para a variável FDN nenhum valor discrepante foi detectado durante a análise descritiva inicial. Os perfis individuais e os perfis individuais separados por tratamento em função dos tempos de incubação são apresentados na Figura 6. As mesmas características da variável MS são reveladas pelos perfis de FDN: heterogeneidade de variâncias ao longo dos tempos de incubação e a sugestão de que um modelo não linear represente bem os perfis de resposta.

Figura 6 - (a) Perfis individuais; e (b) perfis individuais por tratamento da degradabilidade de FDN ao longo dos tempos de incubação

Observe que o aumento da variabilidade das repostas até as 24 ou 48 horas de incubação, que é evidente na Tabela 4, torna-se mais evidente nos gráficos de perfis

individuais de FDN da Figura 6.

Tabela 4 - Degradabilidade média da FDN (%) do capim-Tifton 85 com 10% de PB, por tratamento e por tempo de incubação (h)

Tratamento	Estatística	Tempo (h)									
		3	6	12	24	48	60	72	84	96	120
70:30-TIF4	Média	8,25	13,68	23,32	39,94	58,37	61,66	64,68	66,69	68,19	70,16
	e.p.	3,15	6,03	6,22	8,78	4,53	2,96	2,44	1,96	1,89	1,34
70:30-TIF10	Média	7,80	16,84	26,88	42,81	56,79	60,60	64,62	65,95	67,53	68,89
	e.p.	3,07	6,08	8,09	6,91	4,60	3,34	1,85	2,33	1,80	1,92
50:50-TIF4	Média	8,52	16,57	22,23	39,80	52,00	57,77	61,76	64,27	66,17	67,58
	e.p.	4,06	4,97	4,26	7,29	7,36	4,42	4,81	2,71	2,67	3,37
50:50-TIF10	Média	8,93	17,16	22,24	39,38	55,57	59,15	61,64	64,07	66,41	68,75
	e.p.	3,78	5,89	5,88	6,64	8,58	4,79	5,17	3,83	2,83	2,43
30:70-TIF4	Média	8,23	12,71	17,79	30,00	48,95	54,44	57,53	59,69	63,90	66,65
	e.p.	3,66	3,02	3,81	3,66	4,47	2,53	2,37	2,99	1,38	1,61
30:70-TIF10	Média	7,59	14,21	20,14	33,75	49,99	54,55	58,51	61,17	63,49	67,34
	e.p.	1,57	3,33	5,49	9,25	4,82	3,34	3,14	3,05	2,14	1,90

3.2 Métodos

Para todos os testes de hipóteses foi adotado um nível de significância de 5%. Para as variáveis respostas consideradas, os testes de Shapiro-Wilk (RITZ; STREIBIG, 2008) e Hartley (BARBIN, 2003) serão utilizados para testar a normalidade e homocedasticidade, respectivamente.

Como o modelo proposto por Orskov e McDonald (1979) é em geral utilizado para explicar as análises desses ensaios, por apresentar interpretação biológica e pelo seu comportamento ser visualmente semelhante ao comportamento de ambas as variáveis respostas utilizadas nesse trabalho, MS e FDN, tal modelo foi utilizado para os ajustes. A $DE_{5\%}$ foi calculada pela fórmula (16) e a DP por: $DP = \hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_2$, em que $\hat{\beta}_1$ e $\hat{\beta}_2$ são as estimativas dos parâmetros β_1 e β_2 do modelo de Orskov e McDonald (1979).

Os primeiros passos para o ajuste de um MNL clássico no *software* R são descritos no Apêndice D e um programa resumido para seu ajuste é encontrado no Apêndice E. Para a análise de resíduos será utilizado os resíduos padronizados e es-

tudentizados. O coeficiente de variação de cada análise foi calculado como:

$$c.v. = \frac{s_Y}{\bar{y}} * 100\%$$

em que s_Y e $\bar{y}$ são, respectivamente, o desvio padrão e a média amostral da variável resposta considerada na análise.

3.2.1 Abordagem 1: ANOVAs das estimativas dos parâmetros

A idéia do ajuste aqui empregada é a mesma utilizada no trabalho de Santoro et al. (2005) e Jobim et al. (2011), dentre outros, sendo esta dividida em duas fases. Na primeira fase utiliza-se o modelo não linear escolhido, no caso o modelo de Orskov e McDonald (1979) e ajusta-se uma curva para cada indivíduo. Admitindo que os intervalos de tempo entre dois períodos é suficientemente grande para eliminar qualquer possível efeito residual de tratamento, considera-se como um indivíduo cada combinação entre animal e período, totalizando $g \times g = g^2$ unidades experimentais (independentes). No R esses ajustes são obtidos facilmente pela função `nlsList` da biblioteca `nlme`.

Na segunda fase utilizam-se as estimativas dos parâmetros obtidas da primeira fase ($\hat{\beta}_{1i}$, $\hat{\beta}_{2i}$ e $\hat{\beta}_{3i}$), como variáveis respostas e realizam-se três análises de variância univariadas independentes, tendo como covariáveis os fatores associados ao delineamento experimental (animal, período e o fator de tratamento), que até o momento não foi incorporado na análise. Logo, tem-se os seguintes modelos:

$$\hat{\beta}_{1lc(u)} = \mu + A_{1l} + P_{1c} + T_{1u} + \varepsilon_{1lc(u)} \quad (63)$$

$$\hat{\beta}_{2lc(u)} = \mu + A_{2l} + P_{2c} + T_{2u} + \varepsilon_{2lc(u)} \quad (64)$$

$$\hat{\beta}_{3lc(u)} = \mu + A_{3l} + P_{3c} + T_{3u} + \varepsilon_{3lc(u)} \quad (65)$$

sendo μ uma constante comum a todas as observações; T_{ku} é o efeito do u -ésimo tratamento na k -ésima variável resposta, para $k = 1, 2, 3$; A_{kl} é o efeito do l -ésimo animal na k -ésima variável resposta; e P_{kc} é o efeito do c -ésimo período na k -ésima variável resposta; em que $u, l, c = 1, 2, \dots, g$, e g é o número de tratamentos envolvidos no ensaio.

Após a realização das ANOVAs as médias podem ser comparadas usando algum teste de comparações múltiplas (se a covariável é qualitativa), como o teste de Tukey (maiores detalhes sobre o teste podem ser encontrados em BARBIN, 2003), ou a análise de regressão (se a covariável é quantitativa). Contudo, será feito as duas aborda-

gens, pois o teste de comparações múltiplas mesmo não sendo recomendado para fatores quantitativos (REGAZZI, 2003), que o caso deste trabalho, é ainda utilizado.

Note que esta abordagem apesar de ser muito utilizada, ela é ainda ineficiente, pois neste tipo de ajuste, a matriz de variâncias e covariâncias não é modelada de maneira satisfatória, pelo fato de ser dados longitudinais.

O cálculo das degradabilidades efetiva (DE) e potencial (DP), dados em (16) e (17), respectivamente, podem ser feitos simplesmente utilizando as estimativas médias dos parâmetros dos modelos e os resultados dos testes de hipóteses. Contudo, na prática, os cálculos da DP e da DE são realizados para cada indivíduo, utilizando os resultados dos ajustes individuais. As médias dos tratamentos são comparadas em análises de variâncias univariadas tendo as estimativas de DP e DE como variáveis respostas (ASSIS et al., 1999; JOBIM et al., 1999; FERREIRA et al., 2005; JOBIM et al., 2011).

3.2.2 Abordagem 2: Comparação de modelos não lineares clássicos

Este procedimento consiste em ajustar o modelo não linear clássico para cada tratamento e comparar os tratamentos por meio de testes de hipóteses do tipo modelo completo versus modelo restrito (ou reduzido), sobre os parâmetros do modelo.

Regazzi (2003) alerta que os procedimentos de comparações de médias não são indicados quando os tratamentos correspondem a níveis crescentes de um fator quantitativo. O autor afirma ainda que uma melhor forma de comparar esses tratamentos (ou grupos), consiste em testar a igualdade dos parâmetros das equações que descrevem o comportamento das respostas médias dos diversos tratamentos. A identidade de modelos de regressão não linear e a igualdade de qualquer subconjunto de parâmetros pode ser verificadas por meio do teste da razão de verossimilhanças (TRV).

O modelo em que se consideram parâmetros distintos para cada tratamento é chamado modelo completo. Contudo, note que o modelo completo pode mudar em cada comparação. As médias das estimativas dos ajustes individuais do MNL de cada tratamento serão usadas como estimativas iniciais para o ajuste dos modelos propostos. Os ajustes destes modelos serão feitos de maneira clássica, utilizando o método de mínimos quadrados. Alguns dos modelos interessantes para o problema serão descritos a seguir. Seja D_u a variável *dummy* que indica o u -ésimo tratamento ($u = 1, \dots, g$), têm-se:

- Modelo de efeitos fixos completo (MF0), em que todos os parâmetros são considerados diferentes;

$$\sum_{u=1}^g D_u \{ \beta_{1u} + \beta_{2u} [1 - \exp(-\beta_{3u} \mathbf{x}_{ij})] \}$$

- Modelo de efeitos fixos (MF1) considerando $\beta_{11} = \dots = \beta_{1g} = \beta_1$:

$$\sum_{u=1}^g D_u \{ \beta_1 + \beta_{2u} [1 - \exp(-\beta_{3u} \mathbf{x}_{ij})] \}$$

- Modelo de efeitos fixos (MF2) considerando $\beta_{21} = \dots = \beta_{2g} = \beta_2$:

$$\sum_{u=1}^g D_u \{ \beta_{1u} + \beta_2 [1 - \exp(-\beta_{3u} \mathbf{x}_{ij})] \}$$

- Modelo de efeitos fixos (MF3) considerando $\beta_{31} = \dots = \beta_{3g} = \beta_3$:

$$\sum_{u=1}^g D_u \{ \beta_{1u} + \beta_{2u} [1 - \exp(-\beta_3 \mathbf{x}_{ij})] \}$$

- Modelo de efeitos fixos (MF4) considerando $\beta_{11} = \dots = \beta_{1g} = \beta_1$ e $\beta_{21} = \dots = \beta_{2g} = \beta_2$:

$$\sum_{u=1}^g D_u \{ \beta_1 + \beta_2 [1 - \exp(-\beta_{3u} \mathbf{x}_{ij})] \}$$

- Modelo de efeitos fixos (MF5) considerando $\beta_{11} = \dots = \beta_{1g} = \beta_1$, $\beta_{21} = \dots = \beta_{2g} = \beta_2$ e $\beta_{31} = \dots = \beta_{3g} = \beta_3$:

$$\sum_{u=1}^g D_u \{ \beta_1 + \beta_2 [1 - \exp(-\beta_3 \mathbf{x}_{ij})] \}$$

em que $i = 1, 2, \dots, n$; $j = 1, 2, \dots, t_i$ e x_{ij} é o tempo avaliado na j -ésima ocasião do i -ésimo indivíduo.

Algumas hipóteses que podem ser testadas comparando esses modelos são descritas a seguir.

Hipótese 1: testa se as frações rapidamente solúveis dos alimentos analisados são iguais, ou seja, se todos os tratamentos apresentam uma curva com o mesmo ponto de intersecção no eixo das ordenadas.

$$H_0^{(1)}: \beta_{11} = \beta_{12} = \dots = \beta_{1g} = \beta_1$$

$$H_1^{(1)}: \text{nem todos os } \beta_{1u} \text{'s são iguais.}$$

Hipótese 2: testa se os tratamentos apresentam a mesma degradação potencial dos alimentos.

$$H_0^{(2)}: \beta_{21} = \beta_{22} = \dots = \beta_{2g} = \beta_2$$

$$H_1^{(2)}: \text{nem todos os } \beta_{2u} \text{'s são iguais.}$$

Hipótese 3: testa se as taxas de degradação da fração potencialmente degradável dos alimentos são iguais para todos os tratamentos.

$$H_0^{(3)}: \beta_{31} = \beta_{32} = \dots = \beta_{3g} = \beta_3$$

$$H_1^{(3)}: \text{nem todos os } \beta_{3u} \text{'s são iguais.}$$

Hipótese 4: testa se todos os tratamentos podem ser representados por uma única curva de degradação ruminal.

$$H_0^{(4)}: \beta_{11} = \dots = \beta_{1g} = \beta_1; \beta_{21} = \dots = \beta_{2g} = \beta_2; \beta_{31} = \dots = \beta_{3g} = \beta_3$$

$$H_1^{(4)}: \text{pelo menos uma igualdade é uma desigualdade.}$$

Embora outras hipóteses de interesse possam ser formuladas a partir de contrastes entre os parâmetros do MNL, isso não será feito no presente trabalho. Baseando-se na observação das curvas médias, outros modelos serão propostos no intuito de identificar quais tratamentos diferem entre si, considerando cada um dos conjuntos de parâmetro que apresentar diferença, ou seja, utilizando as informações obtidas dos testes anteriores. Vale notar que nesta abordagem o delineamento experimental não é considerado na análise.

A estimação dos parâmetros dos modelos será feita pelo método dos MQO, como descrito na seção 2.3.1.1.

Por meio do TRV são feitas as comparações entre modelos encaixados (ou aninhados), envolvendo comparações do tipo modelo completo *versus* modelo reduzido (REGAZZI, 2003). A estatística do TRV é dada por:

$$L = \left(\frac{\hat{\sigma}_C^2}{\hat{\sigma}_R^2} \right)^{n/2}. \quad (66)$$

em que $\hat{\sigma}_C^2$ é o quadrado médio do resíduo associado ao modelo completo; e $\hat{\sigma}_R^2$ ao modelo reduzido. No caso de grandes amostras, tem-se que:

$$-2\ln(L) = -n \ln \left(\frac{\hat{\sigma}_C^2}{\hat{\sigma}_R^2} \right) \xrightarrow[n \rightarrow \infty]{d} \chi_{(v)}^2$$

em que $v = p_C - p_R$ graus de liberdade, sendo p_C e p_R o número de parâmetros dos modelos completo e reduzido, respectivamente.

3.2.3 Abordagem 3: Análise utilizando o modelo não linear misto

A proposta nesta abordagem é utilizar o modelo não linear misto como descrito por Lindstrom e Bates (1990) e utilizado por Gómez, Muñoz e Betancur (2008), para explicar o comportamento médio das respostas dos diferentes tratamentos e a presença de heterogeneidade de variâncias e de correlação entre as medidas repetidas no mesmo animal ao longo do tempo. Considerando uma forma geral, a degradabilidade do i -ésimo indivíduo ($i = 1, 2, \dots, n$), na j -ésima ocasião do u -ésimo tratamento pode ser representado como:

$$y_{iuj} = \beta_{1u} + \beta_{2u} (1 - e^{-\beta_{3u}x_{ij}}) + \varepsilon_{iuj}, \quad u = 1, 2, \dots, g, \quad j = 1, 2, \dots, t_i. \quad (67)$$

em que x_{ij} é o tempo avaliado no i -ésimo indivíduo, na j -ésima ocasião. Como ilustração, o MNLM com um efeito aleatório associado à fração rapidamente solúvel, pode ser escrito como:

$$y_{iuj} = (\beta_{1u} + b_{1i}) + \beta_{2u} [1 - e^{-\beta_{3u}x_{ij}}] + \varepsilon_{iuj} \quad (68)$$

onde β_{1u} representa a fração rapidamente solúvel das parcelas que receberam o tratamento u , β_{2u} é a fração que pode ser degradada se houver tempo das parcelas que receberam o tratamento u , β_{3u} é a taxa de degradação da fração β_{2u} das parcelas que receberam o tratamento u , b_{1i} é o efeito aleatório associado a β_{1u} , independente e identicamente distribuído como $N(0, \sigma_b^2)$ e ε_{iuj} é o erro aleatório associado a y_{iuj} independentes e identicamente distribuídos como $N(0, \sigma_e^2)$, e independentes de b_{1i} . Nesta ilustração em que o parâmetro de efeito aleatório está associado ao parâmetro de efeito fixo β_{1u} entrou no modelo (68) na forma linear, como descrito por Hirst et al. (1991) e Vonesh e Carter (1992). O mesmo ocorre quando se inclui efeito aleatório no parâmetro β_{2u} . Porém, quando um efeito aleatório estiver associado ao parâmetro β_{3u} , diz-se que o efeito aleatório entra na forma não linear, como proposto por Lindstrom e Bates (1990).

Considerando um efeito aleatório associado a cada um dos parâmetros do modelo (67), este ainda pode ser reescrito em dois estágios, como apresentado em (37) e (38). Por exemplo, para simplificar a notação, considere que se tem apenas um único tratamento no ensaio, ou seja, os dados são simplesmente observacionais. A degradabilidade

da MS no i -ésimo indivíduo, na j -ésima ocasião de avaliação é dada por:

$$\begin{aligned} y_{ij} &= f(\phi_{ij}, x_{ij}) + \varepsilon_{ij} \\ &= \phi_{i1} + \phi_{i2}(1 - e^{-\phi_{i3}x_{ij}}) + \varepsilon_{ij} \end{aligned} \quad (69)$$

em que

$$\phi_{ij} = \mathbf{A}_{ij}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}_{ij}\mathbf{b}_i$$

com $\mathbf{b}_i \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{D})$

$$\begin{bmatrix} \phi_{i1} \\ \phi_{i2} \\ \phi_{i3} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \\ \beta_3 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b_{i1} \\ b_{i2} \\ b_{i3} \end{bmatrix}$$

Com o uso da metodologia envolvendo MNLM é possível modelar as matrizes de covariâncias intra ($\mathbf{R}$) e entre indivíduos ($\mathbf{D}$). Essa combinação de estruturas permite a criação de outras estruturas mais complexas.

3.3 O *software* R

Para realização das análises estatísticas utilizou-se o *software* gratuito e aberto, R versão 2.11.1. O *software* pode ser obtido no site⁹ do CRAN (R, 2012), onde é possível baixar também os pacotes ou bibliotecas opcionais chamados de contribuídos (em inglês: *Contributed Packages*) e uma série de manuais e livros (SARTORIO, 2008). Existe ainda um grupo de discussão na internet (R-br)¹⁰, que possibilita a troca de experiências entre os seus participantes.

No ajuste de modelos não lineares clássicos utilizou-se a função `nls` (*Non-linear Least Squares*) do pacote básico do R, e no ajuste de modelos não lineares mistos, o pacote `nlme` (*Nonlinear Mixed-Effects Models*), que precisa ser instalado.

3.3.1 O ajuste do MNLM no *software* R

A definição de um MNLM envolve a escolha da função não linear adequada e estruturas para os efeitos fixos e aleatórios e para as matrizes $\mathbf{R}$ e $\mathbf{D}$, que descrevem

⁹<<http://www.R-project.org>>

¹⁰<<https://listas.inf.ufpr.br/cgi-bin/mailman/listinfo/r-br>>

as covariâncias intra e entre indivíduos, respectivamente. A inclusão de efeitos aleatórios aos parâmetros da função não linear pode ser sugerida de algumas maneiras, como:

- (i) Analisar os gráficos de perfis individuais de respostas, com o intuito de perceber se as curvas de degradabilidade apresentam maior variabilidade nos pontos iniciais ou finais do processo, ou na curvatura dos perfis. Uma grande variabilidade em alguma dessas características sugere a inclusão de efeitos aleatórios nos parâmetros β_1 , β_2 e β_3 (ou a , b ou c) do modelo de Orskov e McDonald (1979), respectivamente.
- (ii) Avaliar a sobreposição dos intervalos de 95% de confiança para os parâmetros do modelo, para cada indivíduo. As informações necessárias para a construção dos intervalos podem ser obtidas como descrito na primeira fase da abordagem 1. Segundo Pinheiro e Bates (2000), o gráfico desses intervalos é uma boa ferramenta para verificar a variabilidade entre os indivíduos, podendo sugerir para quais parâmetros é conveniente associar um efeito aleatório. Segundo os autores, a não sobreposição dos intervalos calculados para um parâmetro sugere a inclusão de um efeito aleatório ao respectivo parâmetro. No *software* R os intervalos de confiança são obtidos com o comando `intervals` juntamente com o comando `plot`.

Se essas técnicas informais de escolha de efeitos aleatórios não forem conclusivas, pode-se comparar os modelos apresentados na Tabela 5, que correspondem a todas as possibilidades de MNLM.

Tabela 5 - Modelos de Orskov e McDonald sem e com efeitos aleatórios, propostos para explicar a cinética da degradação ruminal

Modelo	Efeito aleatório em	Expressão
MF0*	—	$\beta_{1u} + \beta_{2u}\{1 - \exp(-\beta_{3u}\mathbf{x}_{ij})\}$
MR1**	β_1	$(\beta_{1u} + b_{1i}) + \beta_{2u}\{1 - \exp(-\beta_{3u}\mathbf{x}_{ij})\}$
MR2	β_2	$\beta_{1u} + (\beta_{2u} + b_{2i})\{1 - \exp(-\beta_{3u}\mathbf{x}_{ij})\}$
MR3	β_3	$\beta_{1u} + \beta_{2u}\{1 - \exp[-(\beta_{3u} + b_{3i})\mathbf{x}_{ij}]\}$
MR4	β_1 e β_2	$(\beta_{1u} + b_{1i}) + (\beta_{2u} + b_{2i})\{1 - \exp(-\beta_{3u}\mathbf{x}_{ij})\}$
MR5	β_1 e β_3	$(\beta_{1u} + b_{1i}) + \beta_{2u}\{1 - \exp[-(\beta_{3u} + b_{3i})\mathbf{x}_{ij}]\}$
MR6	β_2 e β_3	$\beta_{1u} + (\beta_{2u} + b_{2i})\{1 - \exp[-(\beta_{3u} + b_{3i})\mathbf{x}_{ij}]\}$
MR7	β_1 , β_2 e β_3	$(\beta_{1u} + b_{1i}) + (\beta_{2u} + b_{2i})\{1 - \exp[-(\beta_{3u} + b_{3i})\mathbf{x}_{ij}]\}$

*MF: modelo de efeitos fixos; **MR: modelo de efeitos aleatórios

Após decidir a que parâmetros vão estar associados os efeitos aleatórios, quer pelo uso das técnicas gráficas, quer pela comparação dos modelos da Tabela 5, deve-se escolher uma estrutura adequada para a matriz $\mathbf{D}$. Por exemplo, se os efeitos aleatórios são independentes a matriz $\mathbf{D}$ pode ser uma diagonal; se os efeitos aleatórios são independentes e possuem a mesma variância, a matriz $\mathbf{D}$ pode ser um múltiplo da matriz identidade. As estruturas disponíveis (`pdMat`) no pacote `nlme` para essa matriz podem ser encontradas em Pinheiro e Bates (2000). A escolha da melhor estrutura de covariâncias pode ser feita utilizando os critérios de informação ou comparando-se os modelos pelo TRV. Neste trabalho serão consideradas as estruturas: (i) identidade (*Ident*); (ii) diagonal (*Diag*); e (iii) não estruturada simétrica (*Symm*). Note que ao considerar apenas um efeito aleatório no modelo, a matriz $\mathbf{D}$ independe da estrutura.

Verbeke e Molenberghs (2008) alertaram que quando é obtida uma estimativa negativa para o componente de variância associado a um efeito aleatório deve-se reformular modelo, removendo o efeito aleatório. No entanto, nem todos os pacotes estatísticos produzem estimativa negativa para um componente de variância, ao contrário, a não convergência ou uma mensagem informando que a matriz $\mathbf{D}$ não é positiva semi-definida podem indicar a presença desses valores negativos. Nestes casos os autores recomendam remover os efeitos aleatórios, um por um, em ordem decrescente de complexidade até que todos os componentes de variância tornem-se positivos.

A estrutura da matriz $\mathbf{R}$, que descreve a variação intra indivíduos (estas são geralmente estruturas associadas as dependências temporais e geográficas), pode ser modelada de forma flexível combinando as estruturas de correlação (`corStruct`) e as funções de variâncias (`varFunc`). Uma boa descrição destas funções pode ser encontrada em Pinheiro e Bates (2000). Para inserir a estrutura da matriz $\mathbf{R}$ na função `nlme`, o comando `corr` é utilizado. Algumas composições utilizando diferentes estruturas são apresentadas por Pinheiro e Bates (2000), Barbosa (2009), dentre outros. No presente estudo foram testadas as seguintes estruturas para a matriz $\mathbf{R}$: (i) autoregressiva de ordem 1 (AR); (ii) simetria composta (SC); e (iii) autoregressiva de ordem 1 com heterogeneidade (ARH).

Sugestões de estruturas para a matriz $\mathbf{R}$ podem ser obtidas por meio da análise das matrizes de covariâncias e de correlações amostrais verificando, por exemplo, se as variâncias são constantes ou não, se as correlações diminuem quando o intervalo

entre os tempos aumenta. Essa inspeção visual das matrizes fica prejudicada e pouco informativa quando o número de ocasiões é muito grande.

Para dados balanceados em relação ao tempo e completos, uma estimativa da matriz de variâncias e covariâncias amostral é obtida calculando:

$$\hat{\Sigma} = \frac{1}{n} [\mathbf{y}_i - f(\mathbf{X}, \hat{\boldsymbol{\beta}}_{MQO})][\mathbf{y}_i - f(\mathbf{X}, \hat{\boldsymbol{\beta}}_{MQO})]^T$$

em que $\hat{\boldsymbol{\beta}}_{MQO}$ são as estimativas dos parâmetro do modelo não linear obtidas pelo método de MQO.

A busca pelo melhor modelo não linear misto que reproduza bem as características da média da variável resposta e a estrutura de covariâncias e de correlações entre as medidas repetidas vai seguir os seguintes passos:

- a) Considerando o modelo não linear escolhido, ajustar várias estruturas para as matrizes $\mathbf{D}$ e $\mathbf{R}$.
- b) Testar os modelos sugeridos. Se estes são encaixados, a significância da inclusão de termos de efeitos aleatórios no modelo (67) deverá testada usando o TRV (PINHEIRO; BATES, 2000) que é realizado pelo comando `anova(modelo1, modelo2)`. Se os modelos não forem encaixados, algum critério de informação deverá ser utilizado, sendo estes obtidos, no *software* R, pelos comandos `AIC(modelo)` e `BIC(modelo)`.
- c) Estimar os efeitos fixos com o método da MV e testar a sua significância utilizando o TRV. Aqui não será utilizado o teste de Wald, contudo, no *software* R, o teste de Wald para MNLM é obtido pedindo um resumo do modelo com o comando `summary` juntamente com o argumento `test='Wald'`.
- d) Avaliar o gráfico de resíduos padronizados *versus* valores preditos para caracterizar a qualidade do ajuste do modelo.
- e) Esboçar gráficos considerando efeitos fixos e aleatórios, afim de avaliar o ajuste do MNLM aos dados observados em relação ao MNL clássico;
- f) Comparar os tratamentos. Para isso, sugere-se proceder como em Regazzi e Silva (2010) e Sartorio et al. (2010): *i*) Observar o gráfico das curvas ajustadas com o intuito de juntar tratamentos com curvas semelhantes; *ii*) Estimar um novo modelo

com a mesma estrutura de variância e covariância que foi selecionada; *iii*) Testar os modelos pelo TRV, ou AIC (e/ou BIC); e *iv*) Verificar a significância dos efeito fixos novamente e se necessário, verificar a estrutura aleatória outra vez, considerando o novo modelo proposto.

Um programa resumido para a realização de um ajuste de um MNLM no *software* R é encontrado no Apêndice F.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Matéria Seca

Nota-se uma heterogeneidade de variâncias nas porcentagens de degradação de MS nos diferentes tempos de incubação (Tabela 6), com maior variabilidade de respostas no tempo 6h. As correlações entre as medidas de MS feitas no início do processo de incubação são baixas, passando a valores positivos e mais altos a partir das 12h de incubação. A heterogeneidade das variâncias e os valores das correlações sugerem que uma estrutura muito simples, que admita homogeneidade de variâncias e a não correlação entre observações repetidas, seja inadequada ao estudo.

Tabela 6 - Matriz de variâncias (diagonal principal), covariâncias (abaixo da diagonal) e correlações amostrais (acima da diagonal) nos diversos tempos de incubação (em hora) - Variável MS (%)

Tempo (h)	Tempo (h)									
	3	6	12	24	48	60	72	84	96	120
3	2,3625	0,0297	0,1497	0,1885	0,0027	-0,0223	-0,1622	0,0382	0,0021	-0,0235
6	0,3049	44,5855	0,0919	0,0148	-0,0505	0,2824	0,3095	0,3216	0,3653	0,3261
12	0,6283	1,6758	7,4591	0,5909	0,3543	0,0489	0,2164	0,2112	0,1106	0,0228
24	1,1990	0,4077	6,6765	17,1170	0,4002	0,2783	0,3307	0,4223	0,2997	0,2053
48	0,0181	-1,4669	4,2100	7,2043	18,9321	0,5503	0,6116	0,6090	0,5661	0,4652
60	-0,1018	5,6123	0,3977	3,4264	7,1257	8,8558	0,5329	0,6407	0,6510	0,6487
72	-0,6294	5,2160	1,4915	3,4532	6,7161	4,0026	6,3699	0,8179	0,8026	0,6990
84	0,1544	5,6450	1,5165	4,5929	6,9656	5,0120	5,4260	6,9095	0,9003	0,8087
96	0,0064	4,8509	0,6009	2,4661	4,8985	3,8530	4,0283	4,7064	3,9550	0,9155
120	-0,0624	3,7646	0,1077	1,4687	3,5003	3,3380	3,0506	3,6757	3,1480	2,9898

4.1.1 Abordagem 1: ANOVAs das estimativas dos parâmetros

Ajustou-se o modelo de Orskov e McDonald (1979) para os dados de degradabilidade de cada um dos trinta e seis indivíduos, resultantes da combinação dos seis animais avaliados em seis diferentes períodos. Vale reforçar que quando admitimos 36 animais, estamos admitindo que o tempo de espera (ou “*wash-out*”) foi suficiente para eliminar o efeito residual dos tratamentos.

Na Tabela 7 encontram-se as estimativas médias dos parâmetros do modelo de Orskov e McDonald, por nível dos fatores Vo:Co e TIF. As maiores porcentagens

de volumosos na ração proporcionaram os menores valores para as frações rapidamente solúveis ($\hat{\beta}_1$) e os maiores valores de taxas de degradabilidade da fração potencialmente degradável ($\hat{\beta}_3$).

Tabela 7 - Média e erro padrão (e.p.) das estimativas dos parâmetros do modelo de Orskov e McDonald, referente as combinações dos níveis dos fatores Vo:Co e TIF - Degradação da MS (%)

Variável resposta	Estatística	TIF	Vo:Co		
			30:70	50:50	70:30
$\hat{\beta}_1$ (%)	Média	4%	19,68	17,96	17,36
	e.p.	4%	0,3308	0,3812	0,2967
	Média	10%	19,13	18,09	17,76
	e.p.	10%	0,2822	0,2447	0,4422
$\hat{\beta}_2$ (%)	Média	4%	54,17	54,84	57,72
	e.p.	4%	0,3987	0,7147	0,5866
	Média	10%	53,80	55,33	55,71
	e.p.	10%	0,2828	0,5515	0,6345
$\hat{\beta}_3$ (%/h)	Média	4%	0,0248	0,0325	0,0317
	e.p.	4%	0,000748	0,001080	0,001043
	Média	10%	0,0272	0,0327	0,0350
	e.p.	10%	0,000931	0,001052	0,001072

Cabral et al. (2005) encontraram valores de 10,84%, 51,06%, e 3,01%/h respectivamente, os parâmetros $\hat{\beta}_1$, $\hat{\beta}_2$ e $\hat{\beta}_3$ da MS para o feno capim Tifton 85, os quais estão próximos dos valores médios 18,33%, 55,26% e 3,07%/h apresentados neste trabalho. Balieiro e Melloti (2007) obtiveram 11,83%, 53,12% e 4,10%/h para os parâmetros, sendo estes muito próximos aos valores encontrados por Cabral et al. (2005), com exceção da taxa $\hat{\beta}_3$ que foi superior. Valadares Filho, Rocha e Cappelle (2002) também obtiveram valores bem aproximados destes, 17,67% e 53,36%, para os parâmetros $\hat{\beta}_1$ e $\hat{\beta}_2$.

Jobim et al. (2011) obtiveram uma estimativa da taxa de degradação ($\hat{\beta}_3$) de 1,83%, que é bem menor que a encontrada neste trabalho. Isso pode ser explicado pelo fato de os autores terem considerado um tempo de incubação final menor ao utilizado neste trabalho. Uma outra possível explicação é que o principal fator que reduz a digestibilidade da forragem, à medida que aumenta a sua maturidade, é a alta quantidade de fibra e a baixa concentração de carboidratos solúveis, diminuindo significativamente

a extensão da digestão *in situ* da matéria seca e da FDN para o Tifton 85 das rações (BUXTON; REDFEARN, 1997; MANDEBVU et al., 1998).

Para as três variáveis respostas que serão analisadas (estimativas de $\hat{\beta}_1$, $\hat{\beta}_2$ e $\hat{\beta}_3$), a normalidade dos erros e a homogeneidade de variâncias entre os seis tratamentos foram aceitas ($p > 0,05$). Os coeficientes de variação das análises para a abordagem 1 foram: 11,15%, 5,98% e 21,34% para as variáveis respostas $\hat{\beta}_1$, $\hat{\beta}_2$ e $\hat{\beta}_3$, respectivamente. Os quadros de ANOVA construídos para as estimativas de cada um dos parâmetros do modelo de Orskov e McDonald (Tabela 8) indicam que não houve interação ($p > 0,05$) entre os níveis dos fatores Vo:Co e TIF. Também não se observou efeito do fator TIF (porcentagem de proteína bruta) do feno Tifton 85 fornecido aos animais na degradabilidade da MS, ocorrendo diferenças significativas ($p < 0,05$) somente entre as médias dos níveis do fator Vo:Co. Estes resultados foram os mesmos daqueles obtidos por Feitosa et al. (2004).

Pelo teste de Tukey percebeu-se que os animais que receberam 70% de volumoso na ração apresentaram menor valor de $\hat{\beta}_1$ e maior valor de $\hat{\beta}_2$ do que os animais que receberam somente 30% de volumoso. Os tratamentos com 70 e 50% de volumoso também apresentaram um maior valor de $\hat{\beta}_3$ do que os tratamentos com 30% de volumoso (Tabela 9).

Os gráficos dos resíduos estudentizados *versus* valores ajustados para cada parâmetro (Figura 7) indicaram que os ajustes dos modelos foram razoáveis, contudo, para as variáveis $\hat{\beta}_2$ e $\hat{\beta}_3$ possíveis pontos discrepantes foram identificados, mas não foram retirados da análise.

Vale lembrar que, quando esta abordagem é utilizada, apenas se comparam as médias dos grupos (ou tratamentos), não sendo comum ajustar curvas (CARVALHO et al., 2006; MARTINS et al., 2007; SILVA et al., 2007; JOBIM et al., 2011).

Tabela 8 - Quadros das ANOVA's considerando as estimativas dos parâmetros do modelo de Orskov e McDonald como variáveis respostas e os coeficientes de variação (cv) de cada análise - Degradação da MS (%)

Variável resposta	F.V.	g.l.	SQ	QM	F	p -value
$\hat{\beta}_1$	Animal	5	15,29	3,06	-	-
	Período	5	65,24	13,05	-	-
	Vo:Co	2	21,98	10,99	5,20	0,02
	TIF	1	0,00	0,00	$1,68E^{-5}$	0,99
	Vo:Co $\times$ TIF	2	1,45	0,73	0,34	0,71
	Resíduo	20	42,25	2,11	-	-
$\hat{\beta}_2$	Animal	5	46,39	9,28	-	-
	Período	5	157,14	31,43	-	-
	Vo:Co	2	45,42	22,71	3,78	0,04
	TIF	1	3,60	3,60	0,60	0,45
	Vo:Co $\times$ TIF	2	9,69	4,85	0,81	0,46
	Resíduo	20	120,28	6,01	-	-
$\hat{\beta}_3$	Animal	5	$6,20E^{-4}$	$1,24E^{-4}$	-	-
	Período	5	$1,80E^{-4}$	$3,67E^{-5}$	-	-
	Vo:Co	2	$3,90E^{-4}$	$1,96E^{-4}$	15,43	$8,85E^{-5}$
	TIF	1	$4,00E^{-5}$	$3,53E^{-5}$	2,77	0,11
	Vo:Co $\times$ TIF	2	$1,00E^{-5}$	$7,06E^{-6}$	0,56	0,58
	Resíduo	20	$2,50E^{-4}$	$1,27E^{-5}$	-	-
$cv_{\hat{\beta}_1} = 11,15\%$; $cv_{\hat{\beta}_2} = 5,98\%$; $cv_{\hat{\beta}_3} = 21,34\%$						

Tabela 9 - Médias dos parâmetros do modelo de Orskov e McDonald por níveis de Vo:Co, referente a degradação da MS

Vo:Co	$\hat{\beta}_1$		$\hat{\beta}_2$		$\hat{\beta}_3$	
	Média		Média		Média	
70:30	17,56	a	56,72	a	0,0334	a
50:50	18,03	ab	55,09	ab	0,0326	a
30:70	19,40	b	53,98	b	0,0260	b

Médias de um mesmo parâmetro seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%)

Testes de tendência de regressão para os níveis do fator Vo:Co indicaram efeito linear significativo, permitindo concluir que a fração rapidamente solúvel diminui linearmente ($\hat{\beta}_1 = 20,71 - 0,04725Vo:Co$) com o aumento da porcentagem de volumoso na ração. Já a fração que pode ser degradada, se houver tempo, aumenta linearmente com o aumento da porcentagem de volumoso na ração ($\hat{\beta}_2 = 51,95 + 0,0667Vo:Co$) e a taxa de degradação da fração potencialmente degradável aumenta de forma quadrática com o aumento da porcentagem de volumoso na ração ($\hat{\beta}_3 = 0,0044 + 0,0009Vo:Co - 0,000008(Vo:Co)^2$).

Figura 7 - Resíduos estudantizados *versus* valores ajustados referente às variáveis $\hat{\beta}_1$ (a); $\hat{\beta}_2$ (b); e $\hat{\beta}_3$ (c)

A média e o erro padrão da $DE_{5\%}$ e DP estão apresentados na Tabela 10, sendo que para a $DE_{5\%}$ considerou-se a taxa de passagem de 5%/h ($DE_{5\%}$). Obteve-se para a $DE_{5\%}$ da fração MS variações de 37,68% a 40,51%, sendo que a DP variou de

72,80% a 75,08%. O feno de capim Tifton 85 no trabalho realizado por Jobim et al. (2011) apresentou valores inferiores tanto da DP da MS (70,34%) quanto da DE_{5%} (de 36,57%). Assis et al. (1999) avaliaram o capim Tifton 85 em diversos cortes e recebendo diferentes doses de nitrogênio, obtiveram para a DE_{5%} da fração MS variações de 39,12% a 40,67%, valores superiores aos encontrados por Jobim et al. (2011), mas dentro dos limites dos resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 10 - Média e erro padrão (e.p.) da degradabilidade efetiva à taxa de 5% (DE_{5%}) e da degradabilidade potencial (DP), referente as combinações dos níveis dos fatores Vo:Co e TIF - Degradação da MS (%)

Variável resposta	Estatística	TIF	Vo:Co		
			30:70	50:50	70:30
DE _{5%} (%)	Média	4%	37,47	39,30	39,51
	e.p.	4%	0,1525	0,2626	0,3050
	Média	10%	37,90	39,74	40,51
	e.p.	10%	0,2591	0,4092	0,2215
DP (%)	Média	4%	73,85	72,80	75,08
	e.p.	4%	0,5305	0,6592	0,4755
	Média	10%	72,92	73,43	73,48
	e.p.	10%	0,5125	0,4443	0,4142

A normalidade dos erros e homogeneidade de variâncias entre os tratamentos foram aceitas ($p > 0,05$) tanto para a DE_{5%}, quanto para a DP. A interação entre os fatores Vo:Co e TIF não foi significativa para a DE_{5%}, indicando que estes fatores não interagem (Tabela 11). Já o efeito do fator Vo:Co foi significativo, mas as médias de qualidade do capim Tifton (TIF) foram consideradas iguais. Os efeitos dos dois fatores e da interação entre eles não foram significativos para DP.

Observou-se que, em média, o aumento da porcentagem de volumoso na ração provoca um aumento da DE_{5%}. Segundo Aroeira, Lopez e Dayrell (1996), devido às semelhanças entre as digestibilidades da matéria seca e da matéria orgânica como energia disponível, a degradabilidade efetiva da matéria seca pode ser considerada como a energia digerida no rúmen. Portanto a ingestão de uma maior porcentagem de volumoso deve proporcionar maior energia disponível aos microrganismos do rúmen.

Tabela 11 - Quadros das ANOVA's considerando a degradabilidade efetiva à taxa de 5% ($DE_{5\%}$) e a degradação potencial (DP) como variáveis respostas, e os coeficientes de variação (cv) de cada análise - Degradação da MS (%)

Variável resposta	F.V.	g.l.	SQ	QM	F	p -value
$DE_{5\%}$	Animal	5	43,68	8,74	-	-
	Período	5	12,76	2,55	-	-
	Vo:Co	2	36,03	18,02	13,19	$2,22E^{-4}$
	TIF	1	3,52	3,52	2,58	0,12
	Vo:Co $\times$ TIF	2	0,65	0,33	0,24	0,79
	Resíduo	20	27,31	1,37	-	-
DP	Animal	5	81,52	16,30	-	-
	Período	5	103,86	20,77	-	-
	Vo:Co	2	8,90	4,45	0,90	0,42
	TIF	1	3,62	3,62	0,73	0,40
	Vo:Co $\times$ TIF	2	7,83	3,91	0,79	0,47
	Resíduo	20	99,04	4,95	-	-

$cv_{DE_{5\%}} = 4,82\%$; $cv_{DP} = 4,01\%$

Note que as médias dos níveis 70:30 e 50:50 não apresentaram diferença entre si com relação a $DE_{5\%}$ (Tabela 12), mas foram superiores às médias do nível 30:70.

Os testes de tendência indicaram que a $DE_{5\%}$ aumenta linearmente com o aumento da porcentagem de volumoso ($\widehat{DE}_{5\%} = 36,1 + 0,06Vo : Co$).

Tabela 12 - Teste de Tukey para a comparação das médias de $DE_{5\%}$, referente à degradabilidade da MS

	Vo:Co		
	70:30	50:50	30:70
Média	40,01 a	39,52 a	37,68 b

Médias de um mesmo parâmetro seguidas de mesma

letra, não diferem entre si ao nível de 5%

Os gráficos dos resíduos estudentizados *versus* valores preditos para $DE_{5\%}$ e DP (Figura 8) indicaram um bom ajuste dos modelos, contudo, para a variável DP um possível ponto discrepante foi identificado (observação 18), mas não foi retirado da análise.

Figura 8 - (a) Resíduos estudentizados *versus* valores preditos referente a variável: (a) DE₅%; e (b) DP

Uma característica interessante é que as estimativas dos parâmetros do MNL de Orskov e McDonald são fortemente correlacionadas entre si (Tabela 13), mas este aspecto não é levado em conta nesta abordagem de análise. Note, por exemplo, que ao aumentar a taxa de degradação da fração potencialmente degradável, diminui-se o tempo de degradação da fração potencialmente degradável. E ao diminuir a taxa de degradação da fração potencialmente degradável, aumenta-se a fração potencialmente degradável, necessitando de um maior tempo para a degradação do alimento.

Tabela 13 - Matriz de variâncias (diagonal principal) e correlações (acima da diagonal) amostrais referente às estimativas dos parâmetros do modelo de Orskov e McDonald (1979) - Variável MS (%)

Parâmetro	Parâmetro		
	$\hat{\beta}_1$	$\hat{\beta}_2$	$\hat{\beta}_3$
$\hat{\beta}_1$	1,37	-0,50	-0,61
		(0,0018) ⁽¹⁾	(0,0001)
$\hat{\beta}_2$		10,29	-0,51
			(0,5149)
$\hat{\beta}_3$			4,00E ⁻⁵

⁽¹⁾ *p-value* do teste $H_0: \rho_{\hat{\beta}_k, \hat{\beta}_{k^*}} = 0$ ($k, k^* = 1, 2, 3$)

Uma alternativa para incorporar na análise essa correlação entre as estimativas dos três parâmetros é realizar na segunda etapa desta abordagem uma análise de variância multivariada (MANOVA), tendo as estimativas dos três parâmetros como

variáveis respostas em função das estruturas de delineamento e de tratamento. Contudo, essa abordagem multivariada aplicada aos dados de degradabilidade necessita de mais estudos, pois os resultados da MANOVA são garantidos assintoticamente, o que não ocorre nestes ensaios de degradabilidade *in situ*, que apresentam, em geral, um número reduzido de observações. Esta proposta não será objeto de estudo neste trabalho.

4.1.2 Abordagem 2: Comparação de modelos não lineares clássicos

Nesta abordagem, observando o comportamento das curvas referentes aos tratamentos (Figura 9), os modelos da Tabela 14 foram propostos e ajustados visando à comparação dos mesmos. Os testes de homogeneidade de variâncias e normalidade dos erros foram aceitos para a variável MS ($p > 0,05$). Note que os modelos MF5, MF6 e MF7 não são encaixados e possuem a mesma quantidade de parâmetros. A escolha pelo modelo MF5 baseou-se no menor valor de AIC.

Figura 9 - Curvas médias ajustadas para cada tratamento utilizando o modelo não linear de Orskov e McDonald (1979)

Considerando os outros modelos propostos e os resultados dos TRV's apresentados na Tabela 15, há evidências da existência de três curvas para representar os tratamentos (modelo MF4), ou seja: as frações rapidamente solúveis dos alimentos analisados são iguais, os tratamentos apresentam a mesma fração potencialmente degradável e não existe diferença na qualidade do capim Tifton em cada Vo:Co, mas existem diferenças entre os níveis do fator Vo:Co.

Tabela 14 - Modelos propostos para a explicação da cinética de degradação da MS, número de parâmetros (n.p.), AIC, BIC, estimativa da variância residual e coeficiente de variação (cv) do experimento

Modelo	$\beta_{1u}^{(1)}$	β_{2u}	β_{3u}	n.p.	AIC	BIC	$\hat{\sigma}^2$
MF0*	diferentes	diferentes	diferentes	19	1700,33	1773,79	6,85
MF1	$\beta_{1u} = \beta_1$	diferentes	diferentes	14	1693,52	1747,65	6,81
MF2	diferentes	$\beta_{2u} = \beta_2$	diferentes	9	1689,73	1724,53	6,83
MF3	diferentes	diferentes	$\beta_{3u} = \beta_3$	4	1765,50	1780,97	8,58
MF4	$\beta_{1u} = \beta_1$	$\beta_{2u} = \beta_2$	$\beta_{31} = \beta_{32},$ $\beta_{33} = \beta_{34},$ $\beta_{35} = \beta_{36}$	6	1687,63	1710,82	6,84
MF5	$\beta_{1u} = \beta_1$	$\beta_{2u} = \beta_2$	$\beta_{31} = \beta_{32} = \beta_{33} = \beta_{34},$ $\beta_{35} = \beta_{36}$	5	1692,32	1711,65	6,95
MF6	$\beta_{1u} = \beta_1$	$\beta_{2u} = \beta_2$	$\beta_{31} = \beta_{32},$ $\beta_{33} = \beta_{34} = \beta_{35} = \beta_{36}$	5	1728,07	1747,40	7,70
MF7	$\beta_{1u} = \beta_1$	$\beta_{2u} = \beta_2$	$\beta_{31} = \beta_{32} = \beta_{35} = \beta_{36},$ $\beta_{33} = \beta_{34}$	5	1763,52	1782,86	8,51
$cv_{MS} = 33,56\%$; $^{(1)}u = 1, \dots, 6$; *MF: modelo de efeitos fixos							

Tabela 15 - Testes da razão de verossimilhanças para os efeitos fixos - Degradabilidade da MS(%)

Teste	H ₀	H ₁	p-valor	Modelo escolhido
1	MF1	MF0	0,69	MF1
2	MF2	MF1	0,30	MF2
3	MF3	MF2	$2,20E^{-16}$	MF2
4	MF4	MF2	0,28	MF4
5	MF5	MF4	0,01	MF4

Os gráficos dos resíduos estudentizados *versus* valores preditos e dos quantis teóricos *versus* os quantis amostrais do modelo MF4 (Figura 10) indicam que o ajuste desse modelo não foi muito bom.

Figura 10- (a) Resíduos estudentizados *versus* valores preditos; e (b) quantis teóricos *versus* os quantis amostrais do modelo MF4

As estimativas dos parâmetros do modelo final (Tabela 16) estão dentro do intervalo de variação dos valores encontrados na abordagem 1 (17,56 a 19,40%, 53,98 a

56,72% e 0,0260 a 0,0326%/h, respectivamente para $\hat{\beta}_1$, $\hat{\beta}_2$ e $\hat{\beta}_3$). Observe que aumentando a proporção de volumoso na dieta, aumentou-se a taxa de degradação da fração potencialmente degradável (β_3). O mesmo comportamento foi observado para a $DE_{5\%}$, que apresentou valores próximos daqueles encontrados na abordagem 1 (37,68 a 40,01%) e aos resultados da literatura (ASSIS et al., 1999; JOBIM et al., 2011). O valor estimado para DP (73,47%) está dentro do intervalo de valores obtidos na abordagem 1 (73,38 a 74,28%). Vale lembrar que os cálculos da $DE_{5\%}$ e DP foram feitos utilizando as estimativas dos parâmetros das três curvas do modelo MF4, sendo estas curvas apresentadas na Figura 11.

Tabela 16 - Estimativas dos parâmetros do modelo MF4, os erros padrões (e.p.), a degradabilidade efetiva à taxa de 5% ($DE_{5\%}$) e a degradabilidade potencial (DP) - Variável MS

Vo:Co	$\hat{\beta}_1$	e.p.	$\hat{\beta}_2$	e.p.	$\hat{\beta}_3$	e.p.	$DE_{5\%}$	DP
70:30 (4 e 10%)	18,73	0,42	54,74	0,44	0,0327	0,0011	40,38	73,47
50:50 (4 e 10%)	18,73	0,42	54,74	0,44	0,0305	0,0010	39,48	73,47
30:70 (4 e 10%)	18,73	0,42	54,74	0,44	0,0257	0,0008	37,31	73,47

Figura 11 - Curvas referentes ao modelo MF4, abordagem 2, para explicar a degradabilidade da MS

Além do ajuste de cada modelo ser realizado em uma única etapa, esta abordagem apresenta a vantagem de realizar os testes sobre os parâmetros das curvas, que

representam os tratamentos utilizando todos os dados originais. Apesar dos resultados serem semelhantes aos da abordagem 1, a estrutura de delineamento não foi incluída nesta abordagem, o que pode inflacionar o valor dos resíduos e, conseqüentemente, alterar os resultados de testes de hipóteses.

4.1.3 Abordagem 3: Análise utilizando o modelo não linear misto

Os intervalos de 95% de confiança construídos para os três parâmetros dos 36 modelos ajustados para a variável MS são ilustrados na Figura 12. Observando essa figura percebe-se que para todos os parâmetros existem intervalos que não se sobrepõem, mas o número de intervalos não sobrepostos para o parâmetro β_1 (ou parâmetro a) é bem menor do que nos outros parâmetros. A análise indica a inclusão de efeito aleatório em β_2 (ou parâmetro b), β_3 (ou parâmetro c) e possivelmente em β_1 .

Figura 12 - Intervalos de 95% de confiança dos parâmetros do modelo de Orskov e McDonald por indivíduo
- Degradação da MS

Considerando os modelos propostos na Tabela 5 anteriormente e variando a estrutura da matriz positiva definida $\mathbf{D}$, 16 modelos foram ajustados para os dados de MS e os resultados estão apresentados na Tabela 17. Na nomenclatura dos modelos

utilizou-se MF para indicar modelos fixos (sem efeitos aleatórios) e MR para indicar modelos com pelo menos um efeito aleatório. A numeração do modelo segue a ordem:

- a) O primeiro algarismo indica em quais parâmetros foram inseridos os efeitos aleatórios (como na Tabela 5).
- b) O segundo algarismo indica a estrutura da matriz $\mathbf{D}$, em que: 1 = identidade (*Ident*), 2 = diagonal (*Diag*), 3 = estruturada simétrica (*Symm*) e 4 = parametrização log-Cholesky (*LogChol*).
- c) O terceiro algarismo, a partir da Tabela 18, indica o número de curvas distintas relacionadas aos tratamentos.

Por exemplo, o modelo MR4.2_3 possui efeitos aleatórios nos parâmetros β_1 e β_2 ; a estrutura da matriz $\mathbf{D}$ é diagonal; descrevendo três curvas distintas para a representação dos tratamentos.

O processo de estimação não convergiu quando os efeitos aleatórios foram incluídos em todos parâmetros da função de Orskov e McDonald (modelo MR7.3), considerando a matriz $\mathbf{D}$ como não estruturada. Para casos de não convergência do processo iterativo, Pinheiro e Bates (1996) propuseram o uso da parametrização log-Cholesky (*LogChol* - já implementada na biblioteca `nlme`), pois ela herda boas propriedades computacionais da parametrização de Cholesky, tendo a vantagem de garantir que a matriz final seja positiva definida, deixando o problema de estimação sem restrições. A única desvantagem dessa parametrização é que ela não permite interpretação em termos das variâncias e covariâncias originais. Utilizando esta parametrização sugerida o modelo MR7.4 convergiu. As estimativas dos componentes de variâncias desses modelos são apresentadas na Tabela 45, no Anexo D.

Tabela 17 - Informações sobre o ajuste dos modelos propostos para a degradação da MS, considerando diferentes estruturas da matriz de variâncias e covariâncias entre-indivíduos $\mathbf{D}$ e o coeficiente de variação (cv) do experimento

Modelo	n.p. ⁽¹⁾	AIC	BIC	$\log(veros)$	$\mathbf{D}$
MF0	19	1719,05	1792,72	-	-
MR1.1	20	1668,06	1745,33	-814,03	Ident
MR2.1	20	1664,49	1741,76	-812,24	Ident
MR3.1	20	1655,46	1732,73	-807,73	Ident
MR4.1	20	1663,46	1740,73	-811,73	Ident
MR5.1	21	1655,45	1732,72	-807,73	Ident
MR6.1	21	1655,45	1732,72	-807,73	Ident
MR7.1	22	1655,45	1732,72	-807,73	Ident
MR4.2	21	1664,32	1745,46	-811,16	Diag
MR5.2	21	1657,45	1738,59	-807,73	Diag
MR6.2	21	1651,20	1732,34	-804,60	Diag
MR7.2	22	1653,21	1738,21	-804,60	Diag
MR4.3	22	1665,94	1750,94	-810,97	Symm
MR5.3	22	1659,63	1744,63	-807,82	Symm
MR6.3	22	1646,46	1731,45	-801,23	Symm
MR7.3	25	*	*	*	Symm
MR7.4	25	1652,33	1748,92	-801,17	LogChol

$cv_{MS} = 33,56\%$; ⁽¹⁾ n.p.: número de parâmetros;

*: O processo de ajuste do modelo não convergiu

Utilizando o TRV para comparar os modelos encaixados, confirmou-se que a inclusão de efeito aleatório é necessária somente para os parâmetros β_2 e β_3 , ou seja, modelo MR6.3 proporcionou o melhor ajuste, apresentando também menores valores de AIC e BIC dentre os modelos considerados. Depois de selecionada a estrutura da matriz $\mathbf{D}$, avaliou-se a necessidade de mudar a estrutura da matriz de covariâncias intra-indivíduos, $\mathbf{R}$. O processo de ajuste do modelo MR6.3 com a estrutura $\mathbf{R} = \text{ARH}$ não convergiu. Após a comparação dos modelos pelo TRV decidiu-se por manter a estrutura $\mathbf{I}\sigma^2$, considerada inicialmente

O modelo MR6.3 descreve o comportamento das respostas em seis curvas distintas (Figura 13 (a)), contudo, observa-se que os comportamentos dos perfis médios dos tratamentos T5 (30:70-TIF4) e T6 (30:70-TIF10) são muito semelhantes entre si,

assim bem como os comportamentos dos demais perfis médios. Logo, considerando a mesma estrutura aleatória do modelo MR6.3, os seguintes modelos foram propostos:

- (i) MR6.3.5: cinco curvas distintas, sendo uma para cada um dos tratamentos - T1, T2, T3 e T4 - e uma única curva para os tratamentos T5 e T6;
- (ii) MR6.3.3: três curvas distintas, sendo uma para os tratamentos T1 e T2, outra para T3 e T4, e por último T5 e T6; e
- (iii) MR6.3.2: uma única curva para os tratamentos T1, T2, T3 e T4 e uma outra para os tratamentos T5 e T6.

Os ajustes destes modelos podem ser visualizados na Figura 13 (b), (c) e (d), respectivamente, e os valores dos critérios de informação e o logaritmo de verossimilhança de cada um dos modelos se encontram na Tabela 18.

Figura 13 - Curvas ajustadas para o modelo MR6.3 (a); modelo MR6.3.5 (b); MR6.3.3 (c); e MR6.3.2 (d)

Tabela 18 - Informações sobre o ajuste dos modelos propostos para determinar o número de curvas referente aos tratamentos do modelo MR6.3 - Degradabilidade da MS

Modelo	n.p. ⁽¹⁾	AIC	BIC	$\log(veros)$
MR6.3	22	1661,57	1746,76	-810,23
MR6.3_5	19	1655,86	1729,43	-808,93
MR6.3_3	13	1646,46	1696,80	-808,79
MR6.3_2	10	1644,58	1683,31	-812,29

⁽¹⁾ n.p.: número de parâmetros

O uso do TRV indicou a existência de apenas duas curvas para representar os tratamentos (Tabela 19), ou seja, o modelo M6.3_2 que tem apenas 10 parâmetros, foi considerado tão bom quanto os outros modelos que têm 13,19 ou 22 parâmetros (Tabela 18). Logo, as curvas de degradabilidade da MS em função dos tempos de incubação foram consideradas idênticas para as porcentagens de volumoso de 70 e 50, sendo apenas a porcentagem de 30 considerada diferente das demais. A qualidade do capim Tifton 85 (TIF) não influenciou a degradabilidade.

Tabela 19 - TRV dos modelos propostos para a comparação entre os tratamentos

Teste	H ₀	H ₁	p-valor	Modelo escolhido
1	MR6.3_5	MR6.3	0,96	MR6.3_5
2	MR6.3_3	MR6.3_5	0,97	MR6.3_3
3	MR6.3_2	MR6.3_3	0,25	MR6.3_2

A seguir, os parâmetros das curvas do modelo MR6.3_2 foram comparados utilizando os modelos descritos na Tabela 20. Testes da razão de verossimilhanças foram realizados (Tabela 21) e permitiram concluir que o modelo MR6.3_2 com duas curvas e parâmetros distintos foi o mais indicado para a descrição da cinética de degradação da MS.

Tabela 20 - Informações sobre o ajuste dos modelos propostos para comparar os parâmetros das curvas do modelo MR6.3.2 - Degradabilidade da MS

Modelo	$\beta_{1u}^{(1)}$	β_{2u}	β_{3u}	n.p. ⁽²⁾	AIC	BIC	$\log(veros)$
MR6.3.2	diferentes	diferentes	diferentes	10	1644,58	1683,31	-812,29
MRa ⁽³⁾	$\beta_{11} = \beta_{12}$	diferentes	diferentes	9	1647,69	1682,54	-814,85
MRb	diferentes	$\beta_{21} = \beta_{22}$	diferentes	9	1645,79	1680,63	-813,89
MRc	diferentes	diferentes	$\beta_{31} = \beta_{32}$	9	*	*	*
MRab	$\beta_{11} = \beta_{12}$	$\beta_{21} = \beta_{22}$	diferentes	8	1647,14	1678,12	-815,57
MRac	$\beta_{11} = \beta_{12}$	diferentes	$\beta_{31} = \beta_{32}$	8	*	*	*
MRbc	diferentes	$\beta_{21} = \beta_{22}$	$\beta_{31} = \beta_{32}$	8	*	*	*
MRabc	$\beta_{11} = \beta_{12}$	$\beta_{21} = \beta_{22}$	$\beta_{31} = \beta_{32}$	7	1665,94	1693,05	-825,97

*: O processo de ajuste do modelo não convergiu; ⁽¹⁾ $u = 1, 2$; ⁽²⁾ n.p.: número de parâmetros

⁽³⁾ MRa: modelo MR6.3.2 em que os parâmetros β_1 das duas curvas são considerados iguais

Tabela 21 - Testes da razão de verossimilhanças para a comparação dos parâmetros das curvas do modelo MR6.3.2

Teste	H ₀	H ₁	p-valor	Modelo escolhido
1	MRa	MR6.3.2	0,0238	MR6.3.2
2	MRb	MR6.3.2	0,0736	MRb
3	MRab	MRa	0,2281	MRab
4	MRab	MRb	0,0669	MRab
5	MRab	MR6.3.2	0,0377	MR6.3.2
6	MRabc	MRab	<0,001	MRab
7	MRabc	MR6.3.2	<0,001	MR6.3.2

Após a escolha da parametrização da parte fixa do modelo (com duas curvas), de incluir efeitos aleatórios nos parâmetros β_2 e β_3 e usar a matriz $\mathbf{D}$ simétrica não estruturada, buscou-se verificar se a estrutura $\mathbf{R} = \mathbf{I}\sigma^2$ continua satisfatória. Dentre as estruturas AR, ARH e SC (Tabela 22), o TRV indicou a estrutura ARH como a mais

indicada para a matriz $\mathbf{R}$.

O gráfico dos valores preditos de MS *versus* os resíduos condicionais estudantizados do modelo MR6.3_2 sem e com estrutura ARH (Figura 14 (a) e (b), respectivamente) e o gráfico de resíduos estudantizados *versus* os quantis da distribuição normal padrão (Figura 15 (a) e (b)) do modelo MR6.3_2 sem e com estrutura ARH, indicaram também uma melhora no ajuste do modelo final (MR6.3_2) ao adotar a estrutura ARH para matriz $\mathbf{R}$.

Tabela 22 - Informações sobre o ajuste do modelo MR6.3_2 com diversas estruturas para a matriz $\mathbf{R}$ - Degradabilidade da MS

$\mathbf{R}$	n.p. ⁽¹⁾	AIC	BIC	$\log(veros)$
$\mathbf{I}\sigma^2$	10	1644,58	1683,31	-812,29
SC	11	1645,46	1688,05	-811,73
AR	11	1646,58	1689,18	-812,29
ARH	20	1494,30	1571,75	-727,15

⁽¹⁾ n.p.: número de parâmetros

Figura 14 - Resíduos condicionais estudantizados *versus* valores preditos dos modelos M6.3_2 (a) e M6.3_2 com estrutura $\mathbf{R}=\mathbf{ARH}$ (b)

Figura 15 - Quantis da normal padronizada *versus* os resíduos condicionais estudentizados do modelo M6.3_2 (a); M6.3_2 com estrutura $\mathbf{R}=\text{ARH}$ (b)

Considerando o modelo final, M6.3_2 com estrutura ARH para a matriz $\mathbf{R}$, a menor proporção de volumoso na ração proporcionou a menor $DE_{5\%}$ do capim-Tifton 85 (37,24%), em relação às outras proporções consideradas, estando próxima dos valores encontrados por Assis et al. (1999), Balieiro e Melloti (2007), como também próxima ao intervalo de valores obtidos nas abordagens 1 (37,68 a 40,01) e 2 (37,31 a 40,38) deste trabalho. Já a DP de ambos os tratamentos apresentaram valores muito próximos

(Tabela 23), estando também de acordo com os obtidos pela abordagem 1 (73,12 a 74,28), abordagem 2 (73,47), valores próximos aos obtidos por Jobim et al. (2011) e superiores aos encontrados por Balieiro e Melloti (2007). Além disso, a estimativa da variabilidade residual ($\hat{\sigma}^2$) dos modelos (Tabela 23) sofreu uma grande redução, já esperada, pois a variabilidade residual que antes era explicada por uma única fonte de variação no MNL clássico, passou a ser composta por variações entre indivíduos (variação residual mais efeitos aleatórios) e intra indivíduos (relativa à heterogeneidade de variâncias nos diversos tempos de incubação) nos MNLM, justificando sua redução.

Tabela 23 - Estimativa, erro padrão (e.p.) dos parâmetros dos modelos MF4 (abordagem 2) e M6.3_2 com estrutura ARH. DE_{5%} e DP calculadas por curva de tratamento de cada modelo - Degradabilidade da MS

Modelo	Vo:Co	Parâmetro						DE _{5%}	DP
		$\hat{\beta}_1$	e.p.	$\hat{\beta}_2$	e.p.	$\hat{\beta}_3$	e.p.		
MF4 (MNL)	70:30	18,73	0,42	54,74	0,44	0,0327	0,0011	40,38	73,47
	50:50	18,73	0,42	54,74	0,44	0,0305	0,0010	39,48	73,47
	30:70	18,73	0,42	54,74	0,44	0,0257	0,0008	37,31	73,47
M6.3_2 com ARH (MNLM)	70:30 e 50:50	18,77	0,32	55,71	0,47	0,0291	0,0008	39,28	74,48
	30:70	20,06	0,52	54,69	0,83	0,0229	0,0013	37,24	74,75

MF4: $\hat{\sigma}^2 = 6,84$

M6.3.2 com ARH: $\hat{\sigma}^2 = 2,0211$; $\hat{\sigma}_{b_2}^2 = 3,1073$; $\hat{\sigma}_{b_3}^2 = 6,02E^{-6}$; $\hat{\rho}_{b_2,b_3} = -0,451$; $\hat{\phi} = 0,1385$; $\hat{\sigma}_{t_3}^2 = 1,0000$; $\hat{\sigma}_{t_6}^2 = 1,5333$; $\hat{\sigma}_{t_{12}}^2 = 3,6352$; $\hat{\sigma}_{t_{24}}^2 = 10,5940$; $\hat{\sigma}_{t_{48}}^2 = 4,9199$; $\hat{\sigma}_{t_{60}}^2 = 2,5991$; $\hat{\sigma}_{t_{72}}^2 = 0,9303$; $\hat{\sigma}_{t_{84}}^2 = 0,6606$; $\hat{\sigma}_{t_{96}}^2 = 0,1756$; $\hat{\sigma}_{t_{120}}^2 = 0,0907$

Nas três abordagens as porcentagens 70 e 50 de volumoso na ração não apresentaram diferença para a fração rapidamente degradável (β_1) e para a fração potencialmente degradável (β_2). Já para a taxa de degradação da fração potencialmente degradável (β_3), apenas a abordagem 2 indicou diferença entre as porcentagens 70 e 50 de volumoso da ração; para as duas outras abordagens (1 e 3) estas porcentagens foram consideradas estatisticamente iguais. Os valores das estimativas dos parâmetros β_1 , β_2 e β_3 dos modelos finais das abordagens 2 e 3 estão próximos das faixas de variação (ou dos intervalos de variação) obtidos com a abordagem 1 (Tabela 24).

Tabela 24 - Comparação das estimativas dos parâmetros dos modelos resultantes das três abordagens propostas para a descrição da cinética de degradação ruminal da MS

Abordagem	$\hat{\beta}_1$	$\hat{\beta}_2$	$\hat{\beta}_3$
1	17,56 a 19,40	53,98 a 56,72	0,0260 a 0,0326
2	18,74	54,74	0,0257 a 0,0327
3	18,77 a 20,06	54,69 a 55,71	0,0229 a 0,0291

As predições dos efeitos aleatórios do modelo final foram feitas para todos os indivíduos e a dispersão destes podem ser conferidas na Figura 16. Nota-se um ponto distante da nuvem de pontos dos valores preditos referente ao parâmetro β_2 (b.(intercept)). Na Figura 17 percebe-se um comportamento das respostas do indivíduo 18 bem distinto dos outros indivíduos, apresentando a maior variação referente a fração potencialmente degradável (β_2). Este fato explica a necessidade de um maior valor predito do efeito aleatório, referente ao parâmetro β_2 , encontrado para o indivíduo 18.

Esta abordagem que utiliza MNLM é bastante atrativa pela sua flexibilidade em explicar a variabilidade dos dados, quando comparada ao MNL clássico (Figuras 17 e 18).

Figura 16 - Estimativas dos efeitos aleatórios por indivíduo do modelo M6.3.2 com estrutura ARH para a matriz **R**

Figura 17- Ajuste do modelo M6.3_2, com estrutura ARH para a matriz $\mathbf{R}$, aos dados de degradação da MS por indivíduo, considerando também o ajuste somente com parte fixa deste modelo

Note que os resultados finais obtidos na abordagem 3 não foram distintos dos obtidos na abordagem 1 que, em geral, é mais utilizada. Contudo, é expressiva a diminuição do erro padrão nas estimativas dos parâmetros β_1 e β_2 na abordagem 3 em relação as demais metodologias. Além disso, a abordagem 3 apresenta vantagens em relação a abordagem 1, quando o interesse está na descrição do comportamento dos perfis individuais de respostas e na separação da variabilidade residual em fontes de variação entre e intra indivíduos. A variabilidade provocada pelo delineamento experimental nas respostas foi bem explicada por essas estruturas de covariâncias, indicando que a inclusão de parâmetros relacionados aos fatores de delineamento seja desnecessária com o uso de MNLM.

Figura 18- Curvas ajustadas do modelo M6.3.2, com estrutura $\mathbf{R} = ARH$, por nível do fator Vo:Co - Degradabilidade de MS

4.2 Fibra em detergente neutro

Os dados de degradabilidade da FDN apresentam duas observações faltantes. Seguindo o procedimento descrito no Apêndice D, nenhum *outlier* foi detectado para a variável FDN.

Note que há um aumento da variância até 24h de incubação e uma dimi-

nuição gradual da variabilidade a partir deste tempo (Tabela 25). Ao longo do tempo também pode ser observado um decréscimo nas covariâncias, oscilações nos valores das correlações e das covariâncias também sugerem a escolha de uma estrutura com heterocedasticidade para a matriz de covariâncias.

Tabela 25 - Matriz de variâncias (diagonal principal), covariâncias (acima da diagonal) e correlações (abaixo da diagonal) amostrais nos diversos tempos de incubação (em hora) - Variável FDN (%)

Tempo (h)	Tempo (h)									
	3	6	12	24	48	60	72	84	96	120
3	9,9015	9,0829	3,7894	8,5938	5,5494	2,2994	2,1524	3,1118	2,6379	3,8537
6	0,5750	25,2022	13,4026	17,8167	6,5845	7,4251	6,6182	6,3162	5,5656	4,2128
12	0,1991	0,4414	36,5835	35,3012	17,2220	9,7098	6,8189	10,1926	8,2483	4,3041
24	0,3445	0,4476	0,7361	62,8626	26,1229	13,8777	14,0291	18,0433	11,3294	7,5417
48	0,2667	0,1983	0,4306	0,4982	43,7339	23,5626	19,3176	18,1247	12,1029	11,0267
60	0,1668	0,3376	0,3665	0,3996	0,8134	19,1884	15,3850	13,0391	8,3243	7,0154
72	0,1577	0,3040	0,2599	0,4080	0,6736	0,8099	18,8078	12,9161	8,3019	7,1690
84	0,2705	0,3442	0,4610	0,6226	0,7498	0,8143	0,8148	13,3617	8,0142	6,7323
96	0,3341	0,4418	0,5434	0,5694	0,7293	0,7573	0,7628	0,8737	6,2972	5,1214
120	0,5132	0,3517	0,2982	0,3986	0,6988	0,6711	0,6927	0,7718	0,8553	5,6941

4.2.1 Abordagem 1: ANOVAs das estimativas dos parâmetros

O modelo de Orskov e McDonald (1979) foi ajustado para cada indivíduo, resultante da combinação dos níveis dos fatores animal e período, totalizando trinta e seis modelos não lineares. As médias das estimativas dos parâmetros do modelo, por nível dos fatores Vo:Co e TIF e suas combinações, referente à variável FDN, se encontram na Tabela 26.

Em relação a fração rapidamente solúvel ($\hat{\beta}_1$) do capim Tifton 85, os valores obtidos neste trabalho variaram de 0,13 a 3,87%, estando de acordo com os encontrados por Balieiro e Melloti (2007), 3,43 a 3,67%. Ítavo et al. (2002) obtiveram estimativas nulas para este parâmetro.

Tabela 26 - Média e erro padrão (e.p.) das estimativas dos parâmetros do modelo de Orskov e McDonald, referente as combinações dos níveis dos fatores Vo:Co e TIF - Variável FDN (%)

Variável resposta	Estatística	TIF	Vo:Co		
			30:70	50:50	70:30
$\hat{\beta}_1$ (%)	Média	4%	3,28	3,87	0,13
	e.p.	4%	0,7646	0,5630	0,6141
	Média	10%	2,95	3,55	1,11
	e.p.	10%	0,6422	0,7544	0,8171
$\hat{\beta}_2$ (%)	Média	4%	69,94	65,79	71,24
	e.p.	4%	0,6350	1,0340	0,7197
	Média	10%	68,69	66,95	68,00
	e.p.	10%	0,6638	1,0594	0,8260
$\hat{\beta}_3$ (%/h)	Média	4%	0,0218	0,0306	0,0357
	e.p.	4%	0,0009	0,0010	0,0015
	Média	10%	0,0265	0,0318	0,0403
	e.p.	10%	0,0019	0,0014	0,0020

De acordo com Jobim et al. (2011), geralmente, a fração $\hat{\beta}_1$ da FDN deve ser próxima de zero, sendo representada pelas partículas que são perdidas pelos poros dos sacos, uma vez que os constituintes da parede celular são insolúveis em água. Todavia, este fato não foi observado no trabalho destes mesmos autores, que obtiveram o valor de 7,66% para a degradabilidade da FDN referente à fração solúvel. Já Assis et al. (1999) encontraram valores superiores (3,70 a 7,90%) aos obtidos no presente trabalho.

Para a fração potencialmente degradável ($\hat{\beta}_2$) obteve-se valores entre 65,79 a 71,24%. Assis et al. (1999) obtiveram valores de 76,41% a 78,39%, que são superiores aos obtidos no presente trabalho. O valor estimado por Ítavo et al. (2002) para este parâmetro foi de 75%, não pertencendo à amplitude encontrada por Assis et al. (1999). Balieiro e Melloti (2007) obtiveram valores inferiores aos apresentados estes, 57,17 a 59,30%, talvez por terem considerado um tempo menor de incubação para a avaliação da degradação da FDN, de até 48h. Jobim et al. (2011) obtiveram um valor superior (80,31%) para este parâmetro, considerando o tempo de incubação de 72h.

A taxa de degradação ($\hat{\beta}_3$) foi superior nos casos onde a proporção de

volumoso foi maior e/ou a qualidade do capim Tifton era melhor (Tabela 26). Assis et al. (1999) encontraram valores de 0,0265 a 0,0305%/h para a taxa de degradação, que estão dentro do intervalo obtido neste trabalho (0,0218 a 0,0403%/h). Jobim et al. (2011) obteve um valor inferior (0,0202%/h) aos já citados, enquanto Balieiro e Melloti (2007) encontraram valores superiores, entre 0,034 a 0,045%/h. O valor obtido por Ítavo et al. (2002), 0,035%/h, concorda com os valores de Balieiro e Melloti (2007) e os obtidos neste trabalho.

As condições de normalidade dos erros e homogeneidade de variâncias foram satisfeitas para as três variáveis respostas consideradas ($p > 0,05$). Os coeficientes de variação das análises referentes a abordagem 1 foram: 166,07%, 7,32% e 33,11% para as variáveis respostas $\hat{\beta}_1$, $\hat{\beta}_2$ e $\hat{\beta}_3$, respectivamente. As ANOVA's não indicaram evidências do efeito da interação em nenhuma das variáveis analisadas, logo, os fatores Vo:Co e TIF não interagem entre si. Apenas para $\hat{\beta}_3$ é que os fatores Vo:Co e TIF apresentaram efeito significativo (Tabela 27).

As médias dos níveis do fator Vo:Co apresentaram diferença entre si pelo teste de Tukey (Tabela 28), indicando que o aumento na proporção de volumoso provocou um aumento na taxa de desaparecimento de FDN. A maior porcentagem de proteína bruta do capim Tifton proporcionou a maior taxa de degradação da FDN.

Nos gráficos de resíduos estudentizados *versus* valores preditos para cada parâmetro (Figura 19), pode-se observar alguns pontos distantes das nuvens de pontos, contudo, eles estão dispersos de forma aleatória dentro da faixa ideal de -3 a 3 , indicando que os ajustes dos modelos foram satisfatórios.

Tabela 27 - Quadros das ANOVA's considerando as estimativas dos parâmetros do modelo de Orskov e McDonald como variáveis respostas e os coeficientes de variação (cv) de cada análise - Degradação da FDN (%)

Variável resposta	F.V.	g.l.	SQ	QM	F	p -value
$\hat{\beta}_1$	Animal	5	67,14	13,43	-	-
	Período	5	202,41	40,48	-	-
	Vo:Co	2	64,34	32,17	2,50	0,11
	TIF	1	0,12	0,12	0,01	0,93
	Vo:Co $\times$ TIF	2	3,35	1,68	0,13	0,88
	Resíduo	20	257,46	12,87	-	-
$\hat{\beta}_2$	Animal	5	119,85	23,97	-	-
	Período	5	238,40	47,68	-	-
	Vo:Co	2	77,42	38,71	1,92	0,17
	TIF	1	11,13	11,13	0,55	0,47
	Vo:Co $\times$ TIF	2	28,99	14,50	0,72	0,50
	Resíduo	20	404,17	20,21	-	-
$\hat{\beta}_3$	Animal	5	1,59E ⁻³	3,20E ⁻⁴	-	-
	Período	5	4,20E ⁻⁴	8,00E ⁻⁵	-	-
	Vo:Co	2	1,15E ⁻³	5,70E ⁻⁴	26,78	2,21E ⁻⁶
	TIF	1	1,10E ⁻⁴	1,10E ⁻⁴	5,22	0,03
	Vo:Co $\times$ TIF	2	2,00E ⁻⁵	1,00E ⁻⁵	0,55	0,59
	Resíduo	20	4,30E ⁻⁴	2,00E ⁻⁵	-	-
$cv_{\hat{\beta}_1} = 166,07\%$, $cv_{\hat{\beta}_2} = 7,32\%$, $cv_{\hat{\beta}_3} = 33,11\%$						

Tabela 28 - Médias do parâmetro $\hat{\beta}_3$ do modelo de Orskov e McDonald dos ajustes individuais por níveis de Vo:Co e TIF, referente a degradação da FDN - Teste de Tukey

TIF	Média		Vo:Co	Média	
4	0,0294	a	70:30	0,0380	a
10	0,0329	b	50:50	0,0312	b
			30:70	0,0242	c

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si

Figura 19- Resíduos estudantizados *versus* valores preditos referente a variável: (a) $\hat{\beta}_1$; (b) $\hat{\beta}_2$; e (c) $\hat{\beta}_3$

Os testes de tendência de regressão para os níveis quantitativos de Vo:Co indicaram que a taxa de degradação da fração potencialmente solúvel aumenta de forma linear ($p < 0,05$) com o aumento da proporção de volumoso, para ambos os capins ($\hat{\beta}_3 = 0,0155 + 0,0069Vo:Co$ para TIF4 e $\hat{\beta}_3 = 0,0191 + 0,0069Vo:Co$ para TIF10).

Calculou-se a DE considerando a taxa de passagem de 5%/h (DE_{5%}) e a DP para cada indivíduo, obtendo-se as médias e o erro padrão dos níveis de cada fator, Vo:Co e TIF, que estão apresentadas na Tabela 29.

Tabela 29 - Média e erro padrão (e.p.) da degradabilidade efetiva à taxa de 5% (DE_{5%}) e degradabilidade potencial (DP), referente as combinações dos níveis dos fatores Vo:Co e TIF - Degradação da FDN

Variável resposta	Estatística	TIF	Vo:Co		
			30:70	50:50	70:30
DE _{5%} (%)	Média	4%	24,19	28,52	29,29
	e.p.	4%	0,3179	0,7167	0,7244
	Média	10%	25,73	29,10	30,94
	e.p.	10%	0,4496	0,7793	0,6605
DP (%)	Média	4%	73,22	69,66	71,38
	e.p.	4%	0,9453	0,5463	0,5736
	Média	10%	71,65	70,50	69,11
	e.p.	10%	1,1104	0,6482	0,5483

O valor encontrado por Jobim et al. (2011) para a DE_{5%} da fração FDN foi de 30,33% para o feno de Tifton 85 é inferior aos encontrados por Assis et al. (1999) para a DE da fração da parede celular do capim Tifton 85, cortado aos 35 dias (33,21 a 34,26%). Estes valores são maiores que os encontrados no presente trabalho (24,19 a 30,94%), mas um pouco superior ao obtido por Ítavo et al. (2002), 30,74. Balieiro e Melloti (2007) encontraram valores bem semelhantes (29,67 a 34,85 para a taxa de 4%/h) para a DE da FDN.

Os valores obtidos aqui para a DP variaram de 69,11 a 73,22. Balieiro e Melloti (2007) encontraram valores inferiores a estes (60,84 a 62,73); Jobim et al. (2011) obtiveram o valor 67,74 e Ítavo et al. (2002), 75,00, estando estes mais próximos da faixa de valores obtida neste trabalho. Já Assis et al. (1999) encontraram valores bem superiores (82,09 a 84,31) para a DP.

A normalidade dos erros e a homogeneidade de variâncias dos tratamentos foram aceitas ($p > 0,05$) tanto para a DE_{5%}, quanto para a DP. A interação entre os fatores Vo:Co e TIF não foi significativa para DE_{5%} e para a DP, indicando que estes fatores não interagem entre si (Tabela 30). Para a DE_{5%}, o efeito do fator Vo:Co foi significativo, mas as médias de qualidade do capim Tifton (TIF) foram consideradas iguais. Entretanto, para a DP, nenhum dos fatores apresentou evidências de diferenças entre as médias ($p > 0,05$).

Tabela 30 - Quadros das ANOVA's considerando a degradabilidade efetiva à taxa de 5% (DE_{5%}) e a degradabilidade potencial (DP) como variáveis respostas, e os coeficientes de variação (*cv*) de cada análise - Degradação da FDN (%)

Variável resposta	F.V.	g.l.	SQ	QM	F	<i>p-value</i>
DE _{5%}	Animal	5	164,56	32,91	-	-
	Período	5	153,26	30,65	-	-
	Vo:Co	2	172,15	86,08	15,44	8,81E ⁻⁵
	TIF	1	14,21	14,21	2,55	0,13
	Vo:Co × TIF	2	2,06	1,03	0,19	0,83
	Resíduo	20	111,50	5,58	-	-
DP	Animal	5	211,60	42,32	-	-
	Período	5	230,25	46,05	-	-
	Vo:Co	2	41,42	20,71	2,26	0,13
	TIF	1	8,98	8,98	0,98	0,33
	Vo:Co × TIF	2	15,90	7,95	0,87	0,44
	Resíduo	20	183,63	9,18	-	-

$cv_{DE_{5\%}} = 15,02\%$, $cv_{DP} = 6,27\%$

A menor proporção de volumoso na ração apresentou menor média de DE_{5%} e diferiu das demais pelo teste de Tukey. Note que as médias dos níveis da DE_{5%} reduziram ao diminuir a porcentagem de volumoso do alimento. As porcentagens 70 e 50 de volumoso não apresentaram diferenças entre si para a DE_{5%} (Tabela 31).

Tabela 31 - Médias de DE_{5%} referente a degradação da FDN - Teste de Tukey

	Vo:Co		
	70:30	50:50	30:70
Média	30,11 a	28,81 a	24,96 b

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si

Os gráficos dos resíduos estudentizados *versus* valores preditos para DE_{5%} e DP (Figura 20) indicaram um razoável ajuste dos modelos.

Figura 20 - Resíduos estudantizados *versus* valores preditos referente a variável: **(a)** $DE_{5\%}$; e **(b)** DP

Testes de tendência indicaram que a $DE_{5\%}$ aumenta linearmente com o aumento da proporção de volumoso na ração ($\widehat{DE}_{5\%} = 21,5 + 0,13Vo : Co$).

4.2.2 Abordagem 2: Comparação de modelos não lineares clássicos

Os mesmos modelos sugeridos na abordagem 2 para análise da degradabilidade de MS foram considerados para a análise da variável FDN. Dentre os modelos que possuem o mesmo número de parâmetros (MF5, MF6 e MF7), os critérios de informação AIC e BIC indicaram o modelo MF5 (Tabela 32) como sendo o melhor modelo. Considerando os demais modelos propostos e seguindo a sequência de comparações (testes de razão de verossimilhanças) apresentada na Tabela 33, conclui-se pela existência de três curvas para representar os tratamentos (modelo MF4), ou seja, as frações rapidamente solúveis dos alimentos analisados são iguais, os tratamentos apresentam a mesma fração potencialmente degradável e não existiu diferença na qualidade do capim Tifton em cada Vo:Co, mas existe diferença entre as porcentagens de Vo:Co.

Tabela 32 - Informações sobre o ajuste dos modelos propostos para a explicação da cinética de degradação da FDN

Modelo	$\beta_{1u}^{(1)}$	β_{2u}	β_{3u}	n.p. ⁽²⁾	AIC	BIC	$\hat{\sigma}^2^{(3)}$
MF0 ⁽⁴⁾	diferentes	diferentes	diferentes	19	2085,23	2158,96	18,77
MF1	$\beta_{1u} = \beta_1$	diferentes	diferentes	14	2078,08	2132,40	18,65
MF2	diferentes	$\beta_{2u} = \beta_2$	diferentes	9	2072,45	2107,38	18,60
MF3	diferentes	diferentes	$\beta_{3u} = \beta_3$	4	2162,66	2178,18	24,27
MF4	$\beta_{1u} = \beta_1$	$\beta_{2u} = \beta_2$	$\beta_{31} = \beta_{32},$ $\beta_{33} = \beta_{34},$ $\beta_{35} = \beta_{36}$	6	2070,19	2093,47	18,64
MF5	$\beta_{1u} = \beta_1$	$\beta_{2u} = \beta_2$	$\beta_{31} = \beta_{32} = \beta_{33} = \beta_{34},$ $\beta_{35} = \beta_{36}$	5	2080,37	2099,78	19,23
MF6	$\beta_{1u} = \beta_1$	$\beta_{2u} = \beta_2$	$\beta_{31} = \beta_{32},$ $\beta_{33} = \beta_{34} = \beta_{35} = \beta_{36}$	5	2111,44	2130,84	20,97
MF7	$\beta_{1u} = \beta_1$	$\beta_{2u} = \beta_2$	$\beta_{31} = \beta_{32} = \beta_{35} = \beta_{36},$ $\beta_{33} = \beta_{34}$	5	2162,13	2181,53	24,16

⁽¹⁾ $u = 1, \dots, 6$; ⁽²⁾n.p.: número de parâmetros; ⁽³⁾ $\hat{\sigma}^2$: variância residual; ⁽⁴⁾ MF: modelo de efeitos fixos

Tabela 33 - Testes de hipóteses para os efeitos fixos para a degradabilidade da FDN (%)

Teste	H ₀	H ₁	p-valor	Modelo escolhido
1	MF1	MF0	0,74	MF1
2	MF2	MF1	0,52	MF2
3	MF3	MF2	2,20E ⁻¹⁶	MF2
4	MF4	MF2	0,30	MF4
5	MF5	MF4	5,00E ⁻⁴	MF4

Os valores observados e as curvas ajustadas do modelo MF4 aos dados de degradabilidade da FDN são apresentadas na Figura 21.

Figura 21 - Curvas ajustadas do modelo MF4, abordagem 2, da degradabilidade da FDN

Os testes de homogeneidade de variâncias e normalidade dos erros foram aceitos para a variável FDN ($p > 0,05$). Os gráficos dos resíduos estudatizados *versus* valores preditos e dos quantis teóricos *versus* os quantis amostrais do modelo MF4 (Figura 22) indicam que o ajuste não foi muito bom deste modelo.

Figura 22 - (a) Resíduos estudantizados *versus* valores preditos; e (b) Quantis teóricos *versus* os quantis amostrais do modelo MF4

As estimativas dos parâmetros do modelo final (Tabela 34) estão de acordo com os valores encontrados na abordagem 1, entretanto a estimativa do parâmetro β_3 obtida na abordagem 1 (0,0403) foi superior ao encontrado nesta abordagem (0,0343). Os resultados revelaram que a taxa de degradação da fração potencialmente degradável (β_3) aumenta com o aumento da proporção de volumoso na dieta. O mesmo comportamento foi observado para a $DE_{5\%}$, cujos valores estão próximos aos obtidos na abordagem 1 (24,96 a 30,11) e aos resultados da literatura. O valor da DP obtida nesta abordagem (70,07) é ligeiramente inferior aos valores obtidos na abordagem 1 (70,08 a 72,43). Entretanto, o fator TIF apresentou efeito significativo para a abordagem 1, mas não para a abordagem 2.

Tabela 34 - Estimativas dos parâmetros do modelo MF4, os erros padrões (e.p.), a degradabilidade efetiva à taxa de 5% ($DE_{5\%}$) e degradabilidade potencial (DP) - Variável FDN

Vo:Co	$\hat{\beta}_1$	e.p.	$\hat{\beta}_2$	e.p.	$\hat{\beta}_3$	e.p.	$DE_{5\%}$	DP
70:30 (4 e 10%)	3,20	0,68	66,87	0,72	0,0343	$1,55E^{-3}$	30,40	70,07
50:50 (4 e 10%)	3,20	0,68	66,87	0,72	0,0302	$1,31E^{-3}$	28,37	70,07
30:70 (4 e 10%)	3,20	0,68	66,87	0,72	0,0240	$9,56E^{-4}$	25,52	70,07

4.2.3 Abordagem 3: Análise utilizando o modelo não linear misto

O modelo de Orskov e McDonald (1979) foi ajustado para todos os indivíduos como na primeira etapa da abordagem 1. Os intervalos de 95% de confiança obtidos para os parâmetros dos 36 modelos ajustados para a variável FDN são ilustrados na Figura 23. Tendo em vista a não sobreposição de todos os intervalos construídos para os três parâmetros sugeriu-se incluir efeito aleatório em todos eles.

Considerando os modelos propostos na Tabela 5 e variando a estrutura da matriz positiva definida **D**, 16 modelos foram ajustados para os dados de FDN (Tabela 35). Os componentes de variâncias desses modelos são apresentados na Tabela 46, no Anexo D.

Figura 23 - Intervalos de 95% de confiança dos parâmetros do modelo de Orskov e McDonald por indivíduo
- Degradação da FDN

Tabela 35 - Informações sobre o ajuste dos modelos propostos para a descrição da cinética de degradação ruminal da FDN, considerando diferentes estruturas da matriz de variâncias e covariâncias entre-indivíduos $\mathbf{D}$ e o coeficiente de variação da análise (cv)

Modelo	n.p. ⁽¹⁾	AIC	BIC	$\log(veros)$	$\mathbf{D}$
MF0	19	2085,23	2158,96	-	-
MR1.1	20	2013,81	2091,42	-986,91	Ident
MR2.1	20	2049,86	2127,47	-1004,93	Ident
MR3.1	20	1998,36	2075,97	-979,18	Ident
MR4.1	20	2017,67	2095,28	-988,84	Ident
MR5.1	21	1998,36	2075,97	-979,18	Ident
MR6.1	21	1998,36	2075,97	-979,18	Ident
MR7.1	22	1998,36	2075,97	-979,18	Ident
MR4.2	21	2015,79	2097,28	-986,90	Diag
MR5.2	21	1998,70	2080,19	-978,35	Diag
MR6.2	21	2000,36	2081,85	-979,18	Diag
MR7.2	22	2000,70	2086,07	-978,35	Diag
MR4.3	22	2010,06	2095,43	-983,03	Symm
MR5.3	22	2000,69	2086,07	-978,35	Symm
MR6.3	22	1995,52	2080,89	-975,76	Symm
MR7.3	25	1991,99	2089,01	-970,99	Symm

$cv_{FDN} = 48,96\%$; ⁽¹⁾ n.p.: número de parâmetros

Após a comparação de modelos encaixados utilizando TRV e o uso dos critérios de informação nos demais casos optou-se pela inclusão de efeito aleatório em todos os parâmetros (β_1 , β_2 e β_3). O modelo com essas características (MR7.3) e que usa a estrutura positiva definida simétrica para a matriz $\mathbf{D}$ foi considerado melhor do que os demais.

Selecionada a matriz $\mathbf{D}$, avaliou-se possíveis estruturas para a matriz de covariâncias intra indivíduos, $\mathbf{R}$, pois até o momento, esta foi considerada como uma matriz $\mathbf{I}\sigma^2$. O processo de ajuste do modelo MR7.3 com a matriz $\mathbf{R} = \text{ARH}$ não convergiu. Pelo TRV a melhor estrutura para a matriz $\mathbf{R}$ continuou sendo $\mathbf{I}\sigma^2$.

Tendo definidas as melhores características para a parte aleatória do modelo, avaliou-se os efeitos fixos do modelo selecionado. Na Figura 24 (a), que mostra o ajuste de curvas distintas para cada tratamento, pode-se notar que os comportamentos de algumas curvas são muito semelhantes, sugerindo que elas possam ser juntadas em

uma só. Desta forma, considerando a estrutura aleatória do modelo M7.3, os seguintes modelos foram propostos:

- (i) MR7.3_5: cinco curvas distintas, sendo uma para cada um dos tratamentos - T1, T2, T3 e T4 - e uma única curva para os tratamentos T5 e T6;
- ii) M7.3_3: três curvas distintas, sendo uma para os tratamentos T1 e T2, outra para T3 e T4, e por último T5 e T6; e
- iii) M7.3_2: uma única curva para os tratamentos T1, T2, T3 e T4 e outra para os tratamentos T5 e T6.

O ajuste desses três modelos pode ser visualizado na Figura 24 e algumas informações de cada um dos modelos são apresentadas na Tabela 36.

Figura 24 - Curvas ajustadas para o modelo MR7.3 (a); modelo MR7.3_5 (b); MR7.3_3 (c); e MR7.3_2 (d)

Tabela 36 - Informações sobre o ajuste dos modelos propostos para determinar o número de curvas referente aos tratamentos do modelo MR7.3 - Degradabilidade da FDN

Modelo	n.p. ⁽¹⁾	AIC	BIC	$\log(veros)$
M7.3	25	1991,99	2089,01	-970,99
M7.3.5	22	1986,45	2071,83	-971,23
M7.3.3	16	1977,56	2039,65	-972,78
M7.3.2	13	1981,01	2031,46	-977,51

⁽¹⁾ número de parâmetros

Testes de razão de máxima verossimilhança realizados (Tabela 37) indicaram que apenas três curvas são necessárias para representar os tratamentos, ou seja, que o modelo MR7.3.3 é o mais indicado. Das comparações realizadas pode-se concluir que o efeito da qualidade do capim Tifton 85 não foi significativo, mas foram encontradas diferenças entre os níveis do fator Vo:Co.

Tabela 37 - TRV dos modelos propostos para a comparação entre os tratamentos

Teste	H ₀	H ₁	valor-p	Modelo escolhido
1	MR7.3.5	MR7.3	0,93	MR7.3.5
2	MR7.3.3	MR7.3.5	0,80	MR7.3.3
3	MR7.3.2	MR7.3.3	0,02	MR7.3.3
4	MR6.3.3	MR7.3	0,94	MR7.3.3

Outros modelos foram propostos (Tabela 38) com o intuito de comparar os parâmetros das curvas do modelo MR7.3.3. A realização de testes da razão de verossimilhanças (Tabela 39) permitiu concluir que as três curvas do modelo MR7.3.3 apresentam o mesmo valor para os parâmetros β_1 e β_2 , ou seja, que o modelo MRab é o mais adequado.

Tabela 38 - Informações sobre o ajuste dos modelos propostos para testar os parâmetros das curvas do modelo MR7.3.3 - Degradabilidade da FDN

Modelo	$\beta_{1u}^{(1)}$	β_{2u}	β_{3u}	n.p. ⁽²⁾	AIC	BIC	$\log(veros)$
MR7.3.3	diferentes	diferentes	diferentes	16	1977,56	2039,65	-972,78
MRa	$\beta_{11} = \beta_{12} = \beta_{13}$	diferentes	diferentes	14	1976,74	2031,06	-974,37
MRb	diferentes	$\beta_{21} = \beta_{22} = \beta_{23}$	diferentes	14	1975,64	2029,97	-973,82
MRc	diferentes	diferentes	$\beta_{31} = \beta_{32} = \beta_{33}$	14	*	*	*
MRab	$\beta_{11} = \beta_{12} = \beta_{13}$	$\beta_{21} = \beta_{22} = \beta_{23}$	diferentes	12	1972,67	2019,24	-974,34
MRac	$\beta_{11} = \beta_{12} = \beta_{13}$	diferentes	$\beta_{31} = \beta_{32} = \beta_{33}$	12	*	*	*
MRbc	diferentes	$\beta_{21} = \beta_{22} = \beta_{23}$	$\beta_{31} = \beta_{32} = \beta_{33}$	12	*	*	*
MRabc	$\beta_{11} = \beta_{12} = \beta_{13}$	$\beta_{21} = \beta_{22} = \beta_{23}$	$\beta_{31} = \beta_{32} = \beta_{33}$	10	1992,04	2030,84	-986,02

*: O processo de ajuste do modelo não convergiu; ⁽¹⁾ $u = 1, \dots, 3$; ⁽²⁾ número de parâmetros

Tabela 39 - Testes da razão de verossimilhanças para a comparação dos parâmetros das curvas do modelo MR7.3.3

Teste	H ₀	H ₁	p-valor	Modelo escolhido
1	MRa	MR7.3.3	0,2041	MRa
2	MRb	MR7.3.3	0,3525	MRb
3	MRab	MR7.3.3	0,5390	MRab
4	MRabc	MR7.3.3	<0,001	MR7.3.3
5	MRab	MRa	0,9680	MRab
6	MRab	MRb	0,5982	MRab
7	MRabc	MRab	<0,001	MRab
8	MRabc	MRa	<0,001	MRa
9	MRabc	MRb	<0,001	MRb

Com a escolha do modelo MRab a estrutura da matriz **R** foi novamente avaliada e os modelos com as estruturas apresentadas na Tabela 40 foram ajustados e comparados. Apesar dos testes indicarem que a estrutura ARH seja a mais indicada (Tabela 41), apareceu uma mensagem de alerta durante o ajuste deste.

Tabela 40 - Informações sobre o ajuste do modelo MRab com diversas estruturas para a matriz $\mathbf{R}$ - Degradabilidade da FDN

$\mathbf{R}$	n.p. ⁽¹⁾	AIC	BIC	$\log(veros)$
$\mathbf{I}\sigma^2$	12	1972,67	2019,24	-974,3351
AR	13	1974,67	2025,12	-974,3350
SC	13	1974,67	2025,12	-974,3351
ARH ⁽²⁾	22	1824,40	1909,77	-890,1974

⁽¹⁾ número de parâmetros

⁽²⁾ Warning message: Singular precision matrix in level -1, block 1

Tabela 41 - Testes de hipóteses realizados para escolha da estrutura $\mathbf{R}$ do modelo MRab

Teste	H_0	H_1	p-valor	Modelo escolhido
1	$\mathbf{I}\sigma^2$	AR	0,9954	$\mathbf{I}\sigma^2$
2	$\mathbf{I}\sigma^2$	SC	0,9978	$\mathbf{I}\sigma^2$
3	$\mathbf{I}\sigma^2$	ARH	$< 0,001$	ARH
4	AR	ARH	$< 0,001$	ARH
5	SC	ARH	$< 0,001$	ARH
6	AR	SC	*	SC

*: Decisão tomada pelo menor $\log(veross)$

A avaliação dos gráficos das Figuras 25 e 26 revelou um ajuste satisfatório dos modelos MRab com as estruturas $\mathbf{I}\sigma^2$ e ARH para a matriz $\mathbf{R}$. Como o ajuste das curvas do modelo MRab com estrutura $\mathbf{I}\sigma^2$ foi visualmente melhor que o da estrutura ARH (Figura 27) em praticamente todos os tempos de incubação, optou-se pela estrutura mais simples ($\mathbf{I}\sigma^2$), que tem um número menor de parâmetros. Contudo, note que a estrutura ARH parece explicar melhor a variabilidade das observações iniciais.

Figura 25 - Quantis da normal padronizada *versus* os resíduos condicionais estudantizados da degradação da FDN, referente ao modelo: (a) MRab; e (b) MRab com estrutura ARH para a matriz $\mathbf{R}$

Figura 26 - Resíduos condicionais estudantizados *versus* valores preditos da degradação da FDN, referente ao modelo: (a) MRab; e (b) MRab com estrutura ARH para a matriz $\mathbf{R}$

Figura 27 - Curvas ajustadas do modelo MRab com as estruturas $\mathbf{R} = \mathbf{I}\sigma^2$ (coluna da esquerda) e $\mathbf{R} = \mathbf{ARH}$ (coluna da direita), por nível do fator Vo:Co - Degrabilidade de FDN

As estimativas dos efeitos aleatórios por indivíduo do modelo final foram calculadas e os gráficos de dispersão desses valores (Figura 28) não indicou a presença de qualquer ponto discrepante. Na Figura 29 encontram-se as curvas do modelo MRab (MNLN) aos dados observados de degradação da FDN por indivíduo, considerando também o ajuste somente da parte fixa deste modelo.

Figura 28 - Estimativas dos efeitos aleatórios por indivíduo do modelo MRab

Considerando o modelo final, MRab com estrutura $\mathbf{I}\sigma^2$ para a matriz $\mathbf{R}$, a maior proporção de volumoso proporcionou a maior $DE_{5\%}$ do capim-Tifton 85, o que também foi obtido nas duas outras abordagens. A faixa de valores estimados para a $DE_{5\%}$ pela abordagem 3 (24,88 a 30,92) está de acordo com o valores encontrados por Jobim et al. (2011), Balieiro e Melloti (2007), Ítavo et al. (2002), como também muito próxima à faixa de valores obtida nas abordagens 1 (24,96 a 30,11) e 2 (25,52 a 30,40) deste trabalho.

Figura 29- Valores observados e ajuste do modelo Mab (MNLM) aos dados de degradação da FDN por indivíduo, considerando também o ajuste somente com parte fixa deste modelo

A DP foi a mesma para todos os tratamentos (Tabela 42) e a sua estimativa (70,07) concorda com os resultados obtidos pela abordagem 1 (70,08 e 72,43) e abordagem 2 (70,07). Estes valores estão próximos ao obtido por Ítavo et al. (2002) e superiores aos encontrados por Balieiro e Melloti (2007) e Jobim et al. (2011).

Comparando as estimativas dos modelos finais das abordagens 2 e 3 (Tabela 42), observa-se que as estimativas do parâmetro β_2 e do seu erro padrão foram maiores do que na abordagem 3. Os valores das estimativas dos outros parâmetros foram muito parecidos. Ambas as abordagens também proporcionaram valores de $DE_{5\%}$ e DP muito parecidos. A estimativa da variância residual na abordagem 2 foi reduzida pela metade na abordagem 3, o que pode ser explicado pela incorporação dos efeitos aleatórios.

Tabela 42 - Estimativas dos parâmetros dos modelos finais da abordagem 2 (MNL MF4) e 3 (MNL MMRab), erro padrão (e.p.), degradabilidade efetiva à taxa de 5% (DE_{5%}) e degradabilidade potencial (DP) - Degradabilidade da FDN.

Modelo	Vo:Co	Parâmetro						DE _{5%}	DP
		$\hat{\beta}_1$	e.p.	$\hat{\beta}_2$	e.p.	$\hat{\beta}_3$	e.p.		
MF4	70:30 (4 e 10%)	3,20	0,68	66,87	0,72	0,0343	0,0016	30,40	70,07
(MNL)	50:50 (4 e 10%)	3,20	0,68	66,87	0,72	0,0302	0,0013	28,37	70,07
	30:70 (4 e 10%)	3,20	0,68	66,87	0,72	0,0240	0,0010	25,52	70,07
MRab	70:30 (4 e 10%)	3,16	0,65	67,49	0,83	0,0349	0,0020	30,92	70,66
(MNL M)	50:50 (4 e 10%)	3,16	0,65	67,49	0,83	0,0296	0,0020	28,28	70,66
	30:70 (4 e 10%)	3,16	0,65	67,49	0,83	0,0237	0,0015	24,88	70,66

MNL: $\hat{\sigma}^2 = 18,6566$

MNL M: $\hat{\sigma}^2 = 9,9022$; $\hat{\sigma}_{b_1}^2 = 6,3830$; $\hat{\sigma}_{b_2}^2 = 14,3192$; $\hat{\sigma}_{b_3}^2 = 2,7277E^{-5}$; $\hat{\rho}_{b_1,b_2} = -0,8750$; $\hat{\rho}_{b_1,b_3} = 0,4020$;

$\hat{\rho}_{b_2,b_3} = -0,5940$

Nas três abordagens os níveis de porcentagens de volumoso na ração apresentaram diferenças entre si tanto para a fração rapidamente degradável (β_1) quanto para a fração potencialmente degradável (β_2). Já para a taxa de degradação da fração potencialmente degradável (β_3), apenas a abordagem 1 indicou diferença entre os níveis do fator TIF; para as duas outras abordagens (2 e 3) eles foram considerados estatisticamente iguais.

Os valores das estimativas dos parâmetros $\hat{\beta}_1$, $\hat{\beta}_2$ e $\hat{\beta}_3$ dos modelos finais das abordagens 2 e 3 estão dentro das faixas de variação (ou dos intervalos de variação) obtidos com a abordagem 1 (Tabela 43).

Tabela 43 - Estimativas obtidas nas três abordagens para os parâmetros de Orskov e McDonald (1979) - Degradabilidade da FDN.

Abordagem	$\hat{\beta}_1$	$\hat{\beta}_2$	$\hat{\beta}_3$
1	0,13 a 3,87	65,79 a 71,24	0,0218 a 0,0403
2	3,20	66,87	0,0240 a 0,0343
3	3,16	67,49	0,0237 a 0,0349

Apesar de os fatores associados ao delineamento experimental (animal e período) não serem incluídos no modelo usado na abordagem 3 a variabilidade devida

a estes fatores foi explicada pelas estruturas de variâncias e covariâncias entre e intra indivíduos utilizadas. A inclusão de efeitos aleatórios aos parâmetros β_1 e β_2 (com uma correspondente estrutura de covariâncias) deve explicar bem a variabilidade entre indivíduos, substituindo a inclusão dos fatores do delineamento no modelo. Este aspecto pode ser confirmado pelo fato de a estrutura de variâncias e covariâncias dos dados originais ter sido melhor descrita pelos modelos não lineares mistos (abordagem 3). Foram feitas algumas tentativas de incluir os fatores de delineamento no MNLM, mas a convergência dos processos de ajuste dos modelos ficou prejudicada, como também a interpretação das estimativas finais. Futuramente pretende-se voltar a pesquisar sobre este tema.

Como na abordagem 1, o MNLM é também proposto em duas etapas. Note que na primeira, a matriz de variâncias e covariâncias do modelo é suposta ser $\mathbf{I}\sigma^2$, não permitindo incluir o fato das observações serem possivelmente correlacionadas, e isto é facilmente incorporado ao considerar a abordagem não linear mista. Este é um dos motivos que torna a metodologia não linear mista mais atrativa, pela sua flexibilidade de explicar a variabilidade dos dados em relação ao MNL como foi apresentado nos gráficos da (Figura 27). Além disso, é expressiva a diminuição do erro padrão nas estimativas dos parâmetros na abordagem 3 em relação as demais metodologias. Dessa forma, quanto maior a variabilidade da variável resposta, a abordagem 3 se torna mais indicada.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de modelos não lineares mistos na análise de dados de digestibilidade *in situ* é bastante atraente quando a pesquisa tem também por objetivo entender o comportamento do processo de digestibilidade ao longo dos tempos de incubação. Mesmo não sendo incluído o delineamento experimental nessa abordagem, os modelos não lineares mistos conseguem explicar bem a variabilidade extra, provocada pelos efeitos dos fatores associados ao delineamento experimental, com a inclusão de efeitos aleatórios nos parâmetros do modelo de Orskov e McDonald (1979).

Quando o interesse for restrito à estimação dos parâmetros do modelo não linear de Orskov e McDonald (1979) e ao cálculo das degradabilidades efetiva e potencial dos alimentos, pode-se usar qualquer uma das três abordagens de análise apresentadas. Contudo, a segunda abordagem foi a que apresentou o pior desempenho. Já a terceira abordagem, utilizando o MNLM, é a única em que se modela a correlação dos dados longitudinais de maneira adequada, o que pode afetar as estimativas obtidas e o erro padrão associadas a elas e assim, alterar os resultados de maneira significativa.

O pacote estatístico `nlme` do R mostrou-se ágil e eficiente no ajuste dos modelos não lineares mistos e as suas ferramentas gráficas foram importantes na avaliação da qualidade dos ajustes e na escolha de modelos.

Trabalhos futuros

Muito trabalho precisa ser feito para a consolidar ainda mais a proposta apresentada neste trabalho, por exemplo:

- (i) Estudar a inserção dos fatores associados ao delineamento experimental no modelo não linear misto.
- (ii) Utilizar as metodologias de modelos mistos e bayesiana para a análise dos dados de degradabilidade ruminal, no intuito de permitir uma maior flexibilidade na análise.
- (iii) Estudar o ajuste de outros modelos de degradação ruminal utilizando o modelo não linear misto.

- (iv) Estudar a inclusão de covariáveis (peso, idade, volume do rumen etc) em MNLM usados em estudos de degradabilidade ruminal.
- (v) Verificar as facilidades no ajuste dos modelos não lineares mistos utilizando o pacote `nlme` do *software* R e o `proc nlmixed` do *software* SAS.
- (vi) Estudar a utilização da MANOVA na análise dos dados de degradabilidade ruminal, considerando como variáveis respostas as estimativas dos três parâmetros do modelo de Orskov e McDonald (1979) e como covariáveis, os fatores associados ao delineamento experimental e os fatores de tratamento.
- (vii) Realizar um estudo sobre técnicas de análise de resíduos em MNLM, buscando adequar os resultados apresentados por Nobre e Singer (2007) para MLM.

REFERÊNCIAS

- AKAIKE, H. A New Look at the Statistical Model Identification. **IEEE Transactions on automatic control**. New York, v. 19, n. 6, p. 716-723, 1974.
- ALCARDE, R. **Modelos lineares mistos em dados longitudinais com o uso do pacote ASReml-R**. 2012. 156p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- ALLEN, M.S. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, Lancaster, v. 74, n. 12, p. 3063-3075, 1996.
- ALVES, A.A.; MOREIRA FILHO, M.A.; SILVA, D.C.; AZEVÊDO, D.M.M.R. Avaliação de alimentos para ruminantes no Nordeste do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO, 2008, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 2008. 16 p.
- ANDRADE, P. de. Técnica *in situ* (saco de náilon) na avaliação de alimentos para ruminantes. In: Simpósio internacional de produção de ruminantes, REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 31., 1994, Maringá. **Anais...** Maringá: SBZ, 1994. p. 141-147.
- ANDRADE, D.F.; SINGER J.M. Análise de dados longitudinais. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE PROBABILIDADE E ESTATÍSTICA - SINAPE, 7., 1986, Campinas. **Anais...** Campinas: Associação Brasileira de Estatística, 1986. 106 p.
- AROEIRA, L.J.M.; LOPEZ, F.C.F.; DAYRELL, M.S. Degradabilidade de alguns alimentos no rúmen de vacas holandê/zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 25, n. 6, p. 1178-1186, 1996.
- ASSIS, M.A.; SANTOS, G.T.; CECATO U.; DAMASCENO, J.C.; PETIT, H.V.; BETT, V; GOMES, L.H.; DANIEL, M. Degradabilidade *in situ* de gramíneas do gênero *Cynodon* submetidas ou não a adubação nitrogenada. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 21, n. 3, p. 657-663, 1999.
- ATKINSON, A. **Plots, transformations and regression: an introduction to graphical methods of diagnostic regression analysis**. 2.ed., Oxford: Oxford University Press, 1985. 282 p.
- BALIEIRO NETO, G.; MELLOTI, L. Efeitos de níveis de sebo sobre a degradabilidade *in situ* do farelo de soja e do feno de Tifton {*Cynodon dactylon* (L.) pers.} em vacas secas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 243-253, 2007.
- BARBIN, D. **Planejamento e Análise Estatística de Experimentos Agronômicos**. Arapongas: Midas, 2003. 194 p.
- BARBOSA, G.S.S.C. **Influência de condições experimentais sobre a estimativa de parâmetros do modelo de Oskov para avaliação de digestibilidade em ruminantes**. 1996. 74p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.

BARBOSA, M. **Uma abordagem para análise de dados com medidas repetidas utilizando modelos lineares mistos**. 2009. 118 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

BATES, D.M.; WATTS, D.G. Relative curvature measures of nonlinearity. **Journal oh the royal society**. Serie B. Methodological, London, v. 42, n. 1, p. 1-25, 1980.

BATES, D.M.; WATTS, D.G. **Nonlinear regression analysis and its applications**. New York: John Wiley & Sons. 1988. 365 p.

BEALE, E.M. Confidence regions in non-linear estimation. **Journal oh the royal society**. Serie B. Methodological, London, v. 22, n. 1, p. 41-76, 1960.

BERCHIELI, T.T.; GARCIA, A.V.; OLIVEIRA, S.G. Principais técnicas aplicadas em estudo de nutrição. In: BERCHIELI, T.T.; PIRES, A.A; OLIVEIRA, S.G. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 397-418.

BOX, G. E. P. Some theorems on quadratics applied to the study of analysis of variance problems I. Effects of inequality of variance in the one-way classification. **Annals of Mathematical Statistics**, New York, v. 25, p. 290-302, 1954a.

BOX, G.E.P. Some theorems on quadratics applied to the study of analysis of variance problems II. Effects of inequality of variance and of correlation between errors in the two-way classification. **Annals of Mathematical Statistics**, Ann Arbor, v. 25, p. 484-98, 1954b.

BOX, M.J. Bias in nonlinear estimation. **Journal of royal statistical society**. Serie B. Methodological, London, v. 33, n. 2, p. 171-201, 1971.

BOZDOGAN, H. Model selection and Akaike's information criterion (AIC): The general theory and its analytical extensions. **Psychometrika**, New York, n. 52, p. 345-370, 1987.

BRACCINI-NETO, J.; DIONELLO, J.L.; JÚNIOR, P.S.; BONGALHARDO, D.; XAVIER, E. Análise de curvas de crescimento de aves de postura. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 25, n. 6, p. 1062-1073, 1996.

BRANDÃO, A.L.S. **Modelos não-lineares para análise de dados longitudinais**. 1996. 137 p. Dissertação (Mestrado em Estatística). Instituto de matemática, estatística e computação científica, UNICAMP, Campinas, 1996.

BURTON, G.W.; GATES, R.N.; IELL, G.M. Registration of “Tifton 85” bermudagrass. **Crop Science**, Madison, v.33, n.4, p.644-645, 1993.

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. **Estatística Básica**. 5 ed. São Paulo: Editora Saraiva, 2004, 526 p.

BUXTON, D.R.; REDFEARN, D.D. Plant limitations to fiber digestion and utilization. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 127, Suppl., p. 814S-818S, 1997.

CABRAL, L.S.; VALADARES FILHO, S.C.; ZERVOUDAKIS, J.T.; SOUZA, A.L.; DETMANN, E. Degradabilidade in situ da matéria seca, da proteína bruta e da fibra de alguns alimentos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 8, p. 777-81, 2005.

CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; VELOSO, C.M.; SILVA, F.F.; SILVA, R.R. Degradabilidade ruminal do feno de forrageiras tropicais. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 1, p. 81-85, 2006.

CAVALCANTE, A.C.R.; PEREIRA, O.G.; VALADARES FILHO, S.C.; RIBEIRO, K.G.; GARCIA, R.; LANA, R.P. Dietas contendo silagem de milho (*Zea mays L.*) e feno de capim-Tifton 85 (*Cynodon spp.*) em diferentes proporções para bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 33, n. 6, suplemento 3, p. 2394-2402, 2004.

CHIACCHIO, E. **Regressão não linear desenvolvimento de um sistema computacional e aplicações**. 1993. 149 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

COELHO DA SILVA, J.F.; LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição de ruminantes**. Piracicaba: Livroceres, 1979. 380p.

CROWDER, M.J.; HAND, J. **Analysis of repeated measures**. London: Chapman & Hall, 1990. 257 p.

DAVIDIAN, M. **Nonlinear Models for Univariate and Multivariate Response**. Lecture Notes. Department of Statistics - North Carolina State University, 2009. 423 p. Disponível em: <<http://www.stat.ncsu.edu/people/davidian/courses/st762/>>. Acesso em: 03 jan. 2011.

DAVIDIAN, M.; GALLANT, A.R. Smooth nonparametric maximum likelihood estimation for population pharmacokinetics, with application to quinidine. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, New York, v. 20, p. 529-556, 1992.

DAVIDIAN, M.; GILTINAN, D.M. **Nonlinear Models for Repeated Measurement Data**. London: Chapman & Hall, 1995.

DEMÉTRIO, C.G.B.; ZOCCHI, S.S. **Modelos de regressão**. Apostila. 2008. 204 p.

DHANO, M.S. On the analysis of dacron bag data for low degradability feeds. **Grass and forage Sci**, Oxford, v.43, p. 441-44, 1988.

DHANO, M.S.; FRANCE, J.; SIDDONS, R.C.; LOPEZ, S.; BUCHANAN-SMITH, J.G. A non-linear compartmental model to describe forage degradation kinetics during incubation in polyester bags in the rumen. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 73, n. 1, p. 3-15, 1995.

DIGGLE, P.J. An approach to the analysis of repeated measurements. **Biometrics**, Arlington, v. 44, n. 4, p. 959-971, 1988.

DIGGLE, P.; HEAGERTY, P.; LIANG, K.; ZEGER, S. **Analysis of Longitudinal Data**. 2nd ed., Oxford University Press, New York, 2002. 396 p.

DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 3.ed. New York: J. Wiley & Sons, 1998. 706 p.

FEITOSA, J.V. **Ensaio de degradabilidade in situ: uma abordagem estatística**. 1999. 117 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.

FEITOSA, J.V. **Avaliação de modelos matemáticos de degradação de fenos de capim-Tifton 85 e de concentrados em bovinos**. 129 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

FEITOSA, J.V.; MALHEIROS, E.B.; EZEQUIEL, J.M.B; ARAÚJO, A.A. Uso de modelos de regressão para o estudo da curva de degradação do feno de capim-Tifton 85 com 10% de proteína bruta e diferentes níveis de concentrados. **Ciência Animal**, Goiás, v. 14, n. 2, p. 77-88, 2004.

FERREIRA, A.B.H. **Miniaurélío século XXI escolar**: o minidicionário da língua portuguesa. Rio de Janeiro: Nova Fronteira. 2001. 790 p.

FERREIRA; G.D.G.; SANTOS, G.T.; CECATO, U.; CARDOSO, E.C. Composição química e cinética da degradação ruminal de gramíneas do gênero *Cynodon* em diferentes idades ao corte. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 189-197, 2005.

FRANCE, J.; DHANOA, M.S.; THEODOROU, M.K.; LISTER, S.J.; DAVIES, D.R.; ISAC, D. A model to interpret gas accumulation profiles with "in vitro" degradation of ruminants feeds. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 163, p. 99-111. 1993.

FREITAS, E.G. de **Análise de dados longitudinais em experimentos com cana-de-açúcar**. Piracicaba, 2007, 74 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia): Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2007.

GALLANT, A. R. The Power of the Likelihood Ratio Test of Location in Nonlinear Regression Models. **Journal of the American Statistical Association**, Alexandria, v. 70, 198-203, 1975.

GALLANT, A.R. **Nonlinear statistical models**. New York: J. Wiley & Sons, 1987. 610 p.

GEISSER, S.; GREENHOUSE, S.W. An extension of Box's results on the use of the F distribution in multivariate analysis. **Annals of Mathematical Statistics**, Ann Arbor, v. 29, p. 855-91, 1958.

GILMOUR, A.R.; THOMPSON, R.; CULLIS, B.R. Average information reml: an efficient algorithm for variance parameter estimation in linear mixed models. **Biometrics**, Arlington, v. 51, n. 4, p. 1440-1450, Dec. 1995.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analyses (Apparatus, regents, procedures, and some applications)**. Washington: U.S. Agricultural Research Service, 1970. 20 p.

GOMES, S.P.; BORGES, A.L.C.C.; CAMPOS, M.M. Fibra na nutrição de Ruminantes. **cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n. 55, p. 1-9, 2007.

GOMES, S.P.; LEÃO, M.I.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F. Consumo, digestibilidade e produção microbiana em novilhos alimentados com diferentes volumosos, com e sem suplementação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 5, p. 884-892, 2006.

GÓMEZ, D.A.A.; MUÑOZ, M.F.C.; BETANCUR, L.F.R. Modelación de las funciones de crecimiento aplicadas a la producción animal. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuárias**, Medellín, v. 21, n. 1, p. 39-58, 2008.

GONÇALVES, A.L.; LANA, R.P.; RODRIGUES, M.T.; VIEIRA, R.A.M.; QUEIROZ, A.C.; HENRIQUE, D.S. Degradabilidade ruminal da matéria seca e da fibra em detergente neutro de alguns volumosos utilizados na alimentação de cabras leiteiras, submetidas a dietas com diferentes relações volumoso:concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 1893-1903, 2001.

GONZALES, D.; RUIZ, M.E.; ROMERO, F.; PEZO, D. Recommendations on the utilization of the *in vitro*, *in situ* and enzymatic methods for study of feed digestion. In: _____. RUMINANT NUTRITION RESEARCH METHODOLOGICAL GUIDELINES. San Jose: Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture, 1992. p. 143-154.

GUIMARÃES JÚNIOR, R.; GONÇALVES, L.C.; JAYME, D.G.; PIRES, D.A.A.; RODRIGUES, J.A.S.; TOMICH, T.R. Degradabilidade *in situ* de silagens de milho em ovinos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 334-343, 2010.

GUTTMAN, I.; MEETER, D.A. On Beale's measure of nonlinearity. **Technometrics**, Washington, v. 7, n. 4, p. 623-637, 1965.

HALIMI, Rachid El. **Nonlinear mixed-effects models and nonparametric inference, a method based on bootstrap for the analysis of non-normal repeated measures data in biostatistic**. 2005. 247p. Tese (Doutorado em Estadística), Universitat de Barcelona, Barcelona, 2005, 247 p.

HARTFORD, A.; DAVIDIAN, M. Consequences of misspecifying assumptions in nonlinear mixed effects models. **Computational Statistics & Data Analysis**, Amsterdam, v. 34, p. 139-164, 2000.

HARTLEY, H.O.; BROOKER, A. Non-linear least squares estimations. **Annals of Mathematical Statistics**, Ann Arbor, v. 36, p. 638-50, 1965.

HARVILLE, D.A. Maximum likelihood approaches to variance component estimation and to related problems. **Journal of the American Statistical Association**, Washington, v. 72, n. 358, p. 320-340, 1977.

HAUSER, L.; VIGO, A.; KIELING, C.; JARDIM, L.B.; CAMEY, S.A.; LEOTTI, V.B. Curva de crescimento usando modelo misto: uma aplicação na progressão da doença de Machado-Joseph. **Revista Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 29, n. 1, p. 5-17, 2009.

HENDERSON, C.R. Estimation of changes in herd environment. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 32, p. 706, 1949. (abstract)

HENDERSON, C.R. Best Linear Unbiased Estimation and Prediction under a Selection Model. **Biometrics**, Arlington, v. 31, n. 2, p. 423-447, 1975.

HIRST, K.; ZERBE, G.O.; BOYLE, D.W.; WILKENING, R.B. On nonlinear random effects models for repeated measurements. **Communications in Statistics B, Simulation and Computation**, New York, v. 20, n. 2, p. 463-478, 1991.

HOFFMANN, R.; VIEIRA, S. **Análise de regressão: uma introdução à econometria**. 3.ed., São Paulo: Hucitec, 1998. 372p.

HUNGATE, R.E. **The rumen and its microbes**. London: Academic Press, 1966. 533p.

HUNTINGTON, J.A.; GIVES, D.I. The in situ technique for studying the rumen degradation of feeds: a review of procedure. **Nutrition Abstracts and Reviews** (Series B), Farnham Royal, v. 65, n. 2, p. 63-93, 1995.

HUYNH, H.; FELDT, L.S. Conditions under which mean square ratios in repeated measurements designs have exact F-distributions. **Journal of the American Statistical Association**, Boston, v. 65, n. 332, p. 1582-1589, 1970.

ÍTAVO, L.C.V.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, F.F.; VALADARES, R.F.D.; CECON, P.R.; ÍTAVO, C.C.B.F.; MORAES, E.H.B.K.; PAULINO, P.V.R. Consumo, degradabilidade ruminal e digestibilidade aparente de fenos de gramíneas do gênero *Cynodon* e rações concentradas utilizando indicadores internos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 1024-1032, suplemento, 2002.

JENNRICH, R.I.; SCHLUCHTER, M.D. Unbalanced repeated measures models with structure covariance matrices. **Biometrics**, Arlington, v. 42, p. 805-820, 1986.

JOBIM, C.C.; FERREIRA, G.A.; BUMBIERIS JUNIOR, V.H.; CALIXTO JUNIOR, M.; SANTOS, G.T. Cinética de degradação ruminal dos fenos de alfafa e Tifton-85 e da silagem de milho. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 747-758, 2011.

JOBIM, C.C.; REIS, R.A.; MARTINS, E.N.; ALCALDE, C.R.; ROSA, B. Degradabilidade *in situ* da matéria seca e da proteína bruta de silagens da planta de milho, dos grãos úmidos e das espigas sem brácteas. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 21, n. 3, p. 665-670, 1999.

JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis**. 6. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2007. 773 p.

KHURI, A.I.; CORNELL, J.A. **Response surface: designs and analyses**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1987.

KUHN, E.; LAVIELLE, M. Maximum likelihood estimation in nonlinear mixed effects models. **Computational Statistics & Data Analysis**, v. 49, p. 1020-1038, 2005.

LAIRD, N.M.; LANGE, N.; STRAM, D. Maximum likelihood computations with repeated measures: Application of the EM algorithm. **Journal of the American Statistical Association**, New York, v. 82, n. 397, p. 97-105, 1987.

LAIRD, N.M.; WARE, J.H. Random-effects models for longitudinal data. **Biometrics**, Arlington, v. 38, n. 4, p. 963-974, 1982.

LIMA, C.G. **Análise de dados longitudinais provenientes de experimentos em blocos casualizados**. 1996. 126 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

LINDSTROM, M.J.; BATES, D.M. Nonlinear Mixed Effects Models for Repeated Measures Data. **Biometrics**, Arlington, v. 46, n. 3, p. 673-687, 1990.

LOBÃO, A.O. O estômago do animal ruminante. *Jornal "O Estado de São Paulo" – Suplemento Agrícola* 1198 – Bovinos, São Paulo/SP, 17/05/1978, 4p. Disponível em: < http://www.cesaho.com.br/biblioteca_virtual/arquivos/arquivo_367_cesaho.pdf >. Acesso em: 12 ago. 2010.

- LUCCI, C.S. **Nutrição e manejo de bovinos leiteiros**. São Paulo: Manole LTDA, 1997. 169 p.
- MAGALHÃES, K.A. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos, determinação e estimativa do valor energético de alimentos para bovinos**. 2007. 263p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- MALHEIROS, E.B. Precisão da análise de experimentos com medidas repetidas no tempo usando procedimentos do SAS. **Revista de Matemática e Estatística**, São Paulo, n. 19, p. 253-272, 2001.
- MALINVAUD, E. **Statistical methods of econometrics**. Amsterdam: North-Holland. 1966. 631p.
- MANDEBVU, P.; WEST, J. W.; GATES, R. N.; HILL, G. M. Effect of hay maturity, forage source, or neutral detergent fiber content on digestion of diets containing tifton-85 bermudagrass and corn silage. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 73, n. 3/4, p. 281-290, 1998.
- MARSHALL, G.; BARÓN, A.E. Linear discriminant models for unbalanced longitudinal data. **Statistics in medicine**, New York, v. 19, n. 15, p. 1969-1981, 2000.
- MARTINS, A.S.; VIEIRA, P.F.; BERCHIELLI, T.T.; PRADO, I.N.; LEMPP, B.; PAULA, M.C. Degradabilidade *in situ* e observações microscópicas de volumosos em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 36, n. 6, p. 1927-1936, 2007.
- MAZUCHELI, J.; ACHCAR, J.A. Algumas considerações em regressão não linear. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 6, p. 1761-1770, 2002.
- MCDONALD, I.A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 96, n. 1, p. 251-252, 1981.
- MEHREZ, A.Z.; ORSKOV, E.R. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 88, n. 3, p. 645-650, 1977.
- MELLO, R.; MAGALHÃES, A.L.R.; BREDÁ, F.C.; REGAZZI, A.J. Modelos para ajuste da produção de gases em silagens de girassol e milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 2, p. 261-269, 2008.
- MERTENS, D.R. Dietary fiber components: Relationship to the rate and extent of ruminal digestion. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 36, p. 187-192, 1977.
- MERTENS, D.R. Análise da fibra e sua utilização na avaliação de alimentos e formulação de rações. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES, 1992, Lavras. **Anais...** Lavras: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1992. p.188-219.
- MERTENS, D.R. Rate and extent of digestion. In: FORBES, J. M.; FRANCE, J. (Ed.). **Qualitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. Wallingford: Cambridge University, 1993. cap. 2, p. 13-51.
- MERTENS, D.R.; ELY, L.O. Relationship of rate and extent of digestion to forage utilization - A dynamic model evaluation. **Journal Animal Science**, v. 54, n. 54, n.4, p. 895-905, 1982.

MERTENS, D.R.; LOFTEN, J.R. The effects of starch on forage fiber digestion kinetics in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, n. 9, p. 1437-1446, 1980.

MEZA, C.; JAFFRÉZIC, F.; FOULLEY, J.L. REML Estimation of variance parameters in nonlinear mixed effects models using the SAEM algorithm. **Biometrical Journal**, Berlin, v. 49, n. 6, p. 876-888, 2007.

MILGEN, J.V.; MURPHY, M.R.; BERGER, L.L. A compartmental model to analyze ruminal digestion. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 8, p. 2515-2529, 1991.

MILLIKEN, G.A.; JOHNSON, D.E. **Analysis of messy data**. New York: Chapman & Hall, 1992. 473 p.

MOIVRE, A. **The doctrine of chances**: or, a method of calculating the probabilities of events in play. London: Millar. 3.ed., 348 p., 1756. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=dyMOAAAAQAAJ&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>>. Acesso em: 1 out. 2012.

MOLENBERGHS, G.; VERBEKE, G. **Models for Discrete Longitudinal Data**. New York: Springer-Verlag, 2005.

MORRISON, D.F. **Multivariate statistical methods**. 3th ed. New York: McGraw- Hill, 1990. 415 p.

MOTULSKY, H.; CHRISTOPOULOS, A. **Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression**: a practical guide to curve fitting. 4. ed. San Diego, CA: GraphPad Software, 2003. 351 p.

NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. **Manipulation of ruminal fermentation**. London: Chapman and Hall, 1997. p. 523-632.

NESI, C.N.; BONAT, W.H.; ZEVIANI, W.M.; RIBEIRO JUNIOR, P.J.; MIO, L.L.M. Inferência do modelo logístico sob diferentes parametrizações. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 56.; SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA À EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA, 14. 2011. Maringá, PR. **Anais...** Maringá: UEM, 2011. 1 CD-ROM.

NOCEK, J.E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n. 8, p. 2051-2069, 1988.

NOCEK, J.E. Bovine acidosis: implications in laminitis. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 5, p. 1005-1028, 1997.

NOBRE, J.S.; SINGER, J.M. Residual analysis for linear mixed models. **Biometrical Journal**, Berlin, v. 49, n. 6, p. 863-875, 2007.

NOH, M.; LEE, Y. Hierarchical-likelihood approach for nonlinear mixed-effects models. **Computational Statistics & Data Analysis**, Amsterdam, v. 52, p. 3517-3527, 2008.

OGLIARI, P.J. **Modelos não lineares para dados longitudinais provenientes de experimentos em blocos casualizados**. 1998. 156 p. Tese (Doutorado em agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1998.

OGLIARI, P.J.; ANDRADE, D.F. Analysing longitudinal data via nonlinear models in randomized block designs. **Computational Statistics & Data Analysis**, Holanda, v. 36, n. 3, p. 319-332, 2001.

OLIVEIRA, E.R.; PAIVA, P.C.A.; BANY, V.L.; ANDRADE, I.F.; LOZANO, D.M. Cinética da digestão ruminal, de dietas compostas com cama de frangos, utilizando como substrato a casca de café, em bovinos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 6, n. 1, p. 11-18, 2005.

OLIVEIRA, M.V.M.; VARGAS JUNIOR, F.M.; SANCHEZ, L.M.B.; PARIS, W.; FRIZZO, A.; HAYGERT, I.P.; MONTAGNER, D.; WEBER, A.; CERDÓTES, L. Degradabilidade ruminal e digestibilidade intestinal de alimentos por intermédio da técnica *in situ* associada à do saco de náilon móvel. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 2023-2031, 2003.

ORSKOV, E.R. **Nutrición protéica de los ruminantes**. Zaragoza: Acribia S.A., 1988. 178 p.

ORSKOV, E.R.; McDONALD, I.M. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 92, n. 2, p. 499-503, 1979.

PANOSSO, A.R.; MALHEIROS, E.B. **Estatística experimental aplicada - Software R**. Apostila. Departamento de Ciências Exatas - FCAV / UNESP – Campus de Jaboticabal/SP. 2011. 52 p.

PEDDADA, S.D.; HASEMAN, J.K. Analysis Of Nonlinear Regression Models: A Cautionary Note. **Dose-Response**, Massachusetts, v. 3, n. 3, p. 342-352, 2005.

PEREIRA, J.C. **Degradación ruminal de diversos subproductos agroindustriales**. 223 p. 1992. Tese (Doutorado em Produção Animal), Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 1992.

PIKE, D.J., OWEN, E.; SAID, A.N. The dacron bag technique for comparing rumen degradability of untreated and ammonia-treated barley straw-effect of particle size and degree of replication. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 126, p. 201-205, 1996.

PINHEIRO, J.C.; BATES, D.M.; LINDSTROM, M. Nonlinear mixed effects classes and methods for S. Technical Report n.906, University of Wisconsin-Madison, Dept. of Statistics. 1993.

PINHEIRO, J.C.; BATES, D.M. Approximations to the Loglikelihood Function in the Nonlinear Mixed Effects Model. **Journal of Computational and Graphical Statistics**, Alexandria, v. 4, n. 1, p. 12-35, 1995.

PINHEIRO, J.C.; BATES, D.M. Unconstrained parametrizations for variance-covariance matrices. **Statistics and Computing**, London, v. 6, n. 3, p. 289-296, 1996.

PINHEIRO, J.C.; BATES, D.M. **Mixed-Effects Models in S and S-PLUS**. New York: Springer-Verlag, 2000. 528 p.

PINHEIRO, J.C.; BATES, D.M.; DEBROY, S.; SARKAR, D.; R Core team. (2009). **nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models**. R package version 3, p. 1-93, 2009.

PIRES, A.J.V.; REIS, R.A.; CARVALHO, G.G.P.; SIQUEIRA, G.R.; BERNARDES, T.F.; RUGGIERI, A.C.; ALMEIDA, E.O.; ROTH, M.T.P. Degradabilidade ruminal da matéria seca, da fração fibrosa e da proteína bruta de forrageiras. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 41, n. 4, p. 643-648, 2006.

POTTHOFF, R.F.; ROY, S.N. A generalized multivariate analysis of variance model useful especially for growth curve problems. **Biometrika**, Cambridge, v. 51, n. 3/4, p. 313-26, 1964.

PRADO, I.N.; MOREIRA, F.B.; ZEOULA, L.M.; WADA, F.Y.; MIZUBUTI, I.Y.; NEVES, C. A. Degradabilidade in situ da matéria seca, proteína bruta e fibra de detergente neutro de algumas gramíneas sob pastejo contínuo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 33, n. 5, p. 1332-1339, 2004.

PRUDENTE, A.A. **Modelos não-lineares de regressão**: alguns aspectos de teoria assintótica. 2009. 107p. Dissertação (Mestre em Biometria e Estatística Aplicada) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2009.

QUADROS, J.B.S.; FURTADO, C.E.; BARBOSA, E.D.; ANDRADE, M.B.; TREVISAN, A.G. Digestibilidade aparente e desenvolvimento de equínos em crescimento submetidos a dietas compostas por diferentes níveis de substituição do feno de Tifton 85 pela casca de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 564-574, 2004.

QUINN, J.L.; WATH, J.G.; MYBURGH, S. Studies on the alimentary tract of merino sheep in south Africa: IV. description of experiment technique. **Journal of Veterinary Science and Animal Industry**, Onderstepoort, v. 11, n. 2, p. 341-360, 1939.

R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 09 jan. 2011.

RATKOWSKY, D.A. **Nonlinear regression modeling**: a unified practical approach. New York: Marcel Dekker, 1983. v. 48, 276 p.

REGAZZI, A.J. Teste para verificar a igualdade de parâmetros e a identidade de modelos de regressão não-linear. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 50, n. 287, p. 9-26, 2003.

REGAZZI, A.J.; SILVA, C.H.O. Teste p verificar a igualdade de parâmetros e a identidade de modelos de regressão não linear em dados de experimento com delineamento em blocos casualizados. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n. 3, p. 315-320, 2010.

REHAGRO. Fibra em Detergente Neutro de Forragens - uma recomendação para cada situação. 2p. 2003. Disponível em: <<http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=405>>. Acesso em: 24 set. 2010.

RIAZOSHAMS, H.; MIDI, H. A nonlinear regression model for chickens growth data. **European Journal of Scientific Research**, Victoria, v. 35, n. 3, p. 393-404, 2009.

RIBOLDI, J. Modelos mistos aplicados. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 52.; SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA À EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA, 12., 2007. Santa Maria. **Anais...**Santa Maria: SEAGRO, 2007. 1 CD-ROM.

RITZ, C.; STREIBIG, J.C. **Nonlinear regression with R**. New York: Springer, 1.ed., 2008. Disponível em: <<http://www.leg.ufpr.br/~walmes/docs/Nonlinear%20Regression%20with%20R.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

ROMERO, F. Utilizacion de la técnica de digestion in situ para la caracterizacion de forrajes. In: RUIZ, M.E.; RUIZ, A. (Ed.). **Nutrición de rumiantes: guía metodológica de investigación**. San José: Red de investigación em sistemas de produccón animal em latinoamerica - RISPAL, 1990. p. 105-114.

RUGGIERI, A.C.; TONANI, F.L.; ANDRADE, P.; SILVEIRA, A.C. Efeito do emurchecimento e da adiçõ de fubá na degradabilidade *in situ* da silagem de alfafa (*Medicago sativa* L.). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 1, p. 94-99, 2001.

RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.G.; VAN SOEST, P.J.; SNIFFEN, C.J. A net carbohydrate and protein system for avaluating cattle diets: I. ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3551-3561, 1992.

SAKAMOTO, Y.; ISHIGURO, M.; KITAGAWA, G. **Akaike Information Criterion Statistics**, Dordrecht: Reidel, 1986. 290 p.

SAMPAIO, I.B.M. **Experimental designs and modelling techniques in the study of roughage degradation in rumen and growth of ruminants**. 1988. 288p. Thesis PhD, University of Reading, 1988.

SAMPAIO, I.B.M. Contribuições estatísticas e técnica experimental para ensaios de degradabilidade de forragens quando avaliada *in situ*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO DE RUMINANTES; REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 31. Maringá. **Anais ...** Maringá: SBZ, 1994. p. 81-88.

SAMPAIO, I.B.M. Métodos estatísticos aplicados à determinação de digestibilidade *in situ*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE DIGESTIBILIDADE EM RUMINANTES. Lavras. **Anais ...** Lavras: UFLA - FAEPE, 1997. p. 7-27.

SANTORO, K.R.; BARBOSA, S.B.P.; BRASIL, L.H.A.; SANTOS, E.S. Estimativas de parâmetros de curvas de crescimento de bovinos Zebu, criados no estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 34, n. 6, p. 2262-2279, 2005.

SANTOS, R.F.M. **Escolha dos tempos de incubação na adequação da estimativa do modelo da cinética de degradação ruminal em bovinos**. 2006. 32 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

SARTORIO, S.D. **Aplicações de técnicas de análise multivariada em experimentos agropecuários usando o software R**. 2008. 131 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SARTORIO, S.D.; ALCARDE, R.; LIMA, C.G.; PIEDADE, S.M.de S.; DEMÉTRIO, C.G.B.; OLIVEIRA, E.C.A. de; TRIVELIN, P.C.O. Um estudo não linear misto para um experimento de cana-de-açúcar. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 55.; REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO ARGENTINA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 15., 2010. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2010. 1 CD-ROM.

SAS Institute Inc. 2009. SAS OnlineDoc® 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SAVASTANO, S. **Efeito do nível de concentrado sobre parâmetros digestivos do feno de capim gordura (*Melinis minutiflora* Pal de Beauv.), em bovinos.** 1993. 142p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

SAVIAN, T.V. **Estimação dos parâmetros no modelo para degradabilidade *in situ* de Mertens e Loften.** 2005. 55 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

SAVIAN, T.V. **Análise bayesiana para modelos de degradabilidade ruminal.** 2008. 81 p. Tese (Doutorado em Estatística e Experimentação Agropecuária), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

SCHMIDEK, A. **Degradabilidade de cultivares de amoreira (*Morus alba* L.) no rúmen de caprinos.** 1999. 71 p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Zootecnia). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1999.

SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. **Journal Animal Science**, Tokyo, v. 72, n. 11, p. 2980-2991, 1994.

SCHWARZ, G. Estimating the dimension of a model. **Annals of Statistics**, Hayward, v. 6, n. 2, p. 461-464, 1978.

SEARLE, S.R.; CASELLA, G.; MCCULLOCH, C.E. **Variance components.** New York: John Wiley, 1992. p. 536.

SEBER, G.A.F., WILD, C.J. **Nonlinear Regression.** New Jersey: John Wiley & Sons, 2003. 768 p.

SHEINER, L.B.; BEAL, S.L. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. I. Michaelis-Menten model: Routine clinical pharmacokinetic data. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, New York, v. 8, n. 6, p. 553-571, 1980.

SILVA, J.F.C. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes.** Piracicaba: Ed. Livroceres, 1979. 384 p.

SILVA, E.A.; BERCHIELLI, T.T.; REIS, R.A.; PIRES, A.V.; SATO, K.J.; PAES, J.M.V.; LOPES, A.D. Teores de proteína bruta para bovinos alimentados com feno de capim-Tifton 85: parâmetros ruminais, eficiência de síntese microbiana e degradabilidade *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 225-236, 2007.

SINGER, J.M. **Análise de curvas de crescimento.** 1977. 113 p. Dissertação (Mestrado em Estatística). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1977.

SINGER, J.M.; ANDRADE, D.F. Análise de dados longitudinais. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE PROBABILIDADE E ESTATÍSTICA - SINAPE, 7., 1986. Campinas. **Anais...** São Paulo: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 1986. p. 1-44.

SINGER, J.M.; NOBRE, J.S.; ROCHA, F.M.M. **Análise de dados longitudinais.** São Paulo: Departamento de Estatística - USP, 2012. 225p. Disponível em: <<http://www.ime.usp.br/~jmsinger/Textos/Singer&Nobre&Rocha2012mar.pdf>>. Acesso: mar. 2012.

SMITH, L.W.; GOERING, H.K., GORDON, G.H. Relationships of forage compositions with rates of cell wall digestion and indigestibility of cell walls. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 55, n. 8, 1972.

- SOARES, A.P.M. **Ajuste do modelo de Orskov & McDonald (1979) a dados de degradação ruminal in situ utilizando mínimos quadrados ponderados**. 2007. 65 p. Dissertação (Mestre em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- SOUZA, G. da S. **Introdução aos modelos de regressão linear e não-linear**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-SEA, 1998. 489 p.
- STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and Procedures of Statistics - A Biometrical Approach**. 2 ed., Singapura: McGraw-Hill, Inc., 1980. 633 p.
- STENSIG, T.; WEISBJERG, M.R.; HVELPLUND, T. Estimation of ruminal digestibility of NDF from *in sacco* degradation and rumen fractional outflow rate. **Acta Agriculture Scandinavica**, Stockholm, v. 44, n. 1, p. 96-109, 1994.
- TEIXEIRA, J.C. Introdução aos métodos de determinação de digestibilidade em ruminantes. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE DIGESTIBILIDADE EM RUMINANTES. Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA - FAEPE, 1997. p. 28-39.
- THIAGO, L.R.L. de S. Utilização da técnica de degradabilidade in situ para avaliação de forragens e alimentos concentrados. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO DE RUMINANTES, REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 31, 1994, Maringá. **Anais...** Maringá:SBZ, 1994. p.89-93.
- THOMPSON, R. Estimation of quantitative genetic parameters. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, Bethesda, v. 22, n. 275, p. 679-686, 2008.
- THORNLEY, J.H.M.; FRANCE, J. **Mathematical models in agriculture. Quantitative methods for the plant, animal and ecological sciences**. Cambridge: CABI, 2.ed., 2007. 906p.
- TIERNEY, L.; KADANE, J.B. Accurate approximations for posterior moments and densities. **Journal of the American Statistical Association**, New York, v. 81, n. 393, p. 82-86, 1986.
- VALADARES FILHO. S.C.; ROCHA JR., V.R.; CAPPELLE, E.R. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 297p.
- VAN SOEST, P.J. **Nutriciona ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.
- VASQUEZ, A.I.; BATES, D.M.; ROSA, G.J.M.; GIANOLA, D.; WEIGEL, K.A. Technical note: An R package for fitting generalized linear mixed models in animal breeding. **Journal Animal Science**, Wisconsin, v. 88, p. 497-504, 2010. Disponível em: <jas.fass.org>. Acesso em: 13 set. 2011.
- VERBEKE, G.; MOLENBERGHS, G. **Linear mixed models for longitudinal data**. New York: Springer-Verlag, 2000. 568 p.
- VERBEKE, G.; MOLENBERGHS, G. **Models for longitudinal and incomplete data**. Piracicaba: Departamento de Matemática, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz-Universidade de São Paulo, 2008. 275p.

VIEIRA, R.A.M. **Modelos matemáticos para estimativa de parâmetros da cinética de degradação do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum., C.V. Mineiro) em diferentes idades de corte.** 1995. 88p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

VONESH, E.F.; CARTER, R.L. Mixed effects nonlinear regression for unbalanced repeated measures. **Biometrics**, Arlington, v. 48, p. 1-18, 1992.

VONESH, E.F.; CHINCHILLI, V.M. **Linear and Nonlinear Models for the Analysis of Repeated Measurements.** New York: Marcel Dekker, 1997.

WALDO, D.R.; SMITH, L.W.; COX, L.E. Model of cellulose disappearance from the rumen. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 55, n. 1, p. 125-129, 1972.

WOLFINGER, R.D. Covariance structure selection in general mixed models. **Communications in Statistics, Simulation and Computation**, New York, v. 22, n. 4, p. 1079-1106, 1993.

WOLFINGER, R.D. Heterogeneous variance-covariance structures for repeated measures. **Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics**, Alexandria, v. 1, n. 2, p. 205-230, 1996.

WANG, J. EM algorithms for nonlinear mixed effects models. **Computational Statistics & Data Analysis**, Amsterdam, v. 51, p. 3244-3256, 2007.

WARE, J.H. Linear models for the analysis of longitudinal studies. **The American Statistician**, Washington, v. 39, p. 95-101, 1985.

WEST, B.T.; WELCH, K.B.; GALECKI, A.T. **Linear mixed models. A practical guide using statistical software.** New York: Chapman & Hall, 2007. 376 p.

ZAMBOM, M.A.; SANTOS, G.T.; MODESTO, E.C.; ALCALDE, C.R.; GONÇALVES, G.D.; SILVA, D.C.; SILVA, K.T.; FAUSTINO, J.O. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 4, p. 937-943, 2001.

ZEVIANI, W.M. **Avaliação de modelos de regressão não linear na cinética de liberação de potássio de resíduos orgânicos.** 2009. 87 p. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agropecuária) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A - A trajetória do alimento nos ruminantes

Os seres vivos em geral, necessitam que alimentos seja previamente transformados para serem utilizados pelo organismo. Esse processo pode ser comparado a de fábrica, onde são feitas diversas transformações da “matéria prima” que é tritura, misturados e transformados, através de mecanismos de natureza mecânica, microbiana e química. Para os ruminantes tal procedimento não é diferente e o caminho percorrido pelos alimentos no tubo digestivo destes animais pode ser ilustrado pela Figura 30.

Figura 30 - Percurso do alimento no tubo digestivo dos ruminantes

Inicialmente, o alimento é apreendido com a boca, através dos dentes incisivos, e sofre apenas uma ligeira mastigação com auxílio dos dentes traseiros. Ao mesmo tempo, os alimentos são umedecidos pela saliva, que é secretada em grande quantidade, com o objetivo de amolecer o alimento. Em média, o bovino libera de 50 a 60 quilos de saliva por dia. Este amolecimento continuará no rúmen, onde chega também a água ingerida pelo animal. Durante o pastejo, o objetivo maior dos ruminantes é o de encher o rúmen, ingerindo o alimento de forma rápida. Através dos movimentos das paredes do rúmen, com auxílio dos músculos pilares, os alimentos continuam a ser triturados mecanicamente. O conteúdo do rúmen segue então seu caminho em sentido contrário, em direção à boca, constituindo o processo de ruminação, ou seja, o retorno do bolo alimentar do rúmen para a boca, onde é submetido a uma nova mastigação e salivação, agora mais demoradas e completas. A calma e tranquilidade ambiental são favoráveis a uma ruminação correta, com regurgitações espaçadas de um minuto. Após bem triturado, o bolo alimentar é novamente deglutido, voltando ao rúmen, que continua em movimento. O alimento passará para o retículo, quando se apresentar com partículas suficientemente pequenas e fluidas podendo, para isto, ocorrer várias ruminações.

O alimento, se adequadamente liquidificado, passa ao omaso onde é “prensado” pelas lâminas existentes na sua mucosa, perdendo assim boa parte do excesso de água passando, a seguir, ao abomaso. No abomaso (ou estômago verdadeiro), o alimento sofre ação química do suco gástrico (de forma semelhante ao que ocorre no estômago humano), secretado pelas glândulas presentes em sua mucosa. Na forma semifluida, o bolo alimentar passa ao intestino, onde continua o processo químico. As etapas seguintes seguem o processo semelhante aos demais mamíferos monogástricos.

Um fato interessante que ocorre nos ruminantes é que nas primeiras semanas de vida, o animal recém-nascido comporta-se como um monogástrico, uma vez que nesta fase a atividade gástrica digestiva é atribuída ao abomaso. Segundo Church (1975 apud SILVA, 1979), o desenvolvimento do estômago dos ruminantes está relacionado com o tamanho ou idade do animal e a dieta que lhe é fornecida. A ingestão de grãos de cereais e forragens a estes animais, favorecem o desenvolvimento do rúmen pela maior produção dos ácidos graxos voláteis (AGV), que constituem a principal forma de energia para os ruminantes. A partir do momento que o animal ingere alimentos sólidos, ocorre o alongamento das papilas do rúmen, estas por sua vez têm por função o aumento da superfície das paredes do rúmen havendo, conseqüentemente, um aumento na absorção de AVG e ajudam o movimento do material. Desta forma, o oferecimento de uma dieta líquida prolongada ao ruminante retardará o desenvolvimento do rúmen-retículo e assim o seu desenvolvimento funcional.

Na tabela 44 são apresentados os valores médios das diferenças de capacidade e da porcentagem em relação à capacidade de cada um dos compartimentos do aparelho digestivo de diferentes animais.

Tabela 44 - Volume e capacidade relativa do estômago e intestino de bovinos, eqüinos e suínos

Espécie	Estômago		Intestino Delgado		Colo-Reto		Intestino Grosso	
	litros	(%)	litros	(%)	litros	(%)	Ceco	
							litros	(%)
Bovinos	252	71	66	18	28	8	10	3
Eqüinos	18	9	64	30	95	45	33	16
Suínos	8	29	9	33	87	32	15	6

APÊNDICE B - Alguns compostos importantes

a) **Celulose:** é o polissacarídeo mais abundante na natureza e o principal constituinte da maioria das paredes celulares, exceto de algumas sementes. Sua utilização como nutriente para o ruminante é conhecida desde o século XIX e sua importância quantitativa como um componente do alimento tem conduzido a numerosas investigações sobre o seu valor nutritivo e digestibilidade. A digestão da celulose no aparelho digestivo do ruminante é resultado de fermentação microbiana, podendo ser degradada até 80% em forragens tenras com baixo teor de lignina (5%), essa porcentagem é reduzida para bem menos que 60% na presença de forragem que apresente cerca de 10% de lignina. A degradação da celulose também diminui quando se aumenta a proporção de amido ou açúcares na dieta, e é melhorada quando se tem a presença de pelo menos 1% de nitrogênio na dieta, devido os compostos nitrogenados serem indispensáveis aos microrganismos do rúmen (TEIXEIRA, 1997; SILVA, 1979).

b) **Hemicelulose:** é constituída por várias categorias de carboidratos, fazendo parte uma coleção heterogênea de polissacarídeos amorfos. As pentosanas são os seus principais constituintes na planta, além de pequenas quantidades de glucosana e ácido urônico. Possui rápida degradação no ambiente ruminal, pois cerca de 70 a 90% dela é digerida antes que a digesta alcance intestino delgado e a fração restante é digerida no ceco e cólon, portanto a quantidade digerida no intestino delgado é insignificante.

A hemicelulose possui uma grande correlação com a celulose, no sentido de apresentarem um coeficiente de digestibilidade aparente muito semelhante e com o aumento do ciclo vegetativo da planta, em que ocorre a elevação do teor de lignina, os coeficiente de ambas pode decrescer para 50% e ou menos. (SILVA, 1979).

c) **Lignina:** consiste de polímero complexo de estrutura não totalmente conhecida (ALVES et al., 2008). Contém carbono, hidrogênio e oxigênio em sua composição, mas a proporção de carbono é muito mais elevada que em carboidratos, contudo não pode ser classificada como um carboidrato, mas é considerada como tal porque ocorre em íntima associação com a celulose e está incluída entre os carboidratos nos métodos convencionais de análise de alimentos (MAYNARD, LOOSLI, 1974 apud SILVA, 1979).

Sua função é conferir rigidez, impermeabilizando e dando resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais. Na nutrição humana, a lignina é considerada fibra dietética indigerível, estando presente nas partes mais endurecidas de alguns alimentos vegetais. Este componente, a lignina, apresenta influência dominante sobre o grau de

digestibilidade de muitos alimentos. Sua mensuração é importante, pois afeta de forma bastante notável a digestibilidade da fibra dos alimentos (MAGALHÃES, 2007). Por exemplo, atribui-se à lignina a redução da digestibilidade da MS das espécies forrageiras, em virtude de apresentarem relação inversa, pois a concentração de lignina aumenta com a maturidade da planta diminuindo a digestibilidade; contudo, existe certas diferenças nessa variação de uma espécie para outra. Dessa forma, segundo Noller (1967, apud SILVA, 1979), sugere-se que a lignificação de forrageiras seja o fator mais importante que limita produtividade do animal. Alguns estudos mostraram que em forragem nova e pobre em lignina, o coeficiente de digestibilidade da lignina pode atingir até 64% (HUNGATE, 1966).

APÊNDICE C - História sobre os animais fistulados

Dr. William Beaumont, após ter recebido a sua licença para a prática de “física e da cirurgia” em 9 de junho de 1812 pela Terceira Sociedade de Medicina do Estado de Vermont, fez uma milagrosa descoberta em 6 de junho de 1822. Alexis St. Martin (Figura 31), um francês canadense foi ferido por um mosquete na altura do estômago no seu lado esquerdo, em Michillimackinac, Michigan. Dr. Beaumont, o médico da vila, foi chamado para socorrê-lo, mas ao final do atendimento deu o seu diagnóstico final, “Alexis não viveria mais do que trinta e seis horas”.

Figura 31 - Alexis St. Martin, o ferido (à esquerda) e Dr. William Beaumont (à direita)

Só que com grande surpresa, Beaumont notou que Alexis melhorava a cada passagem de hora e dois anos mais tarde ele recuperou a sua independência, já sendo capaz de andar e de amparar a si próprio com pouca assistência. Só que algo estranho acontecera, a abertura da ferida em seu estômago não cicatrizou. Apesar das muitas tentativas médicas permaneceu ali um buraco que permitia ver o ambiente interno do sistema digestivo, sem causar dor alguma a Alexis.

Dr. William Beaumont cuidou e pesquisou este fenômeno digestivo durante anos até quando, seu amigo, Alexis decidiu voltar para o Canadá onde casou e teve quatro filhos levando uma vida extraordinariamente normal apesar de tudo. Morreu de morte natural em 1880 com 83 anos. O buraco na barriga ainda não havia cicatrizado.

Segundo Lobão (1978), a técnica de fistular animais, para estudos de fisiologia e nutrição, foi iniciada há quase 150 anos, na França, quando se fistularam alguns carneiros.

A fístula é um orifício ou trajetória que permite o escoamento de líquidos fisiológicos ou patológicos. Em nutrição animal, ela representa importante instrumento de trabalho, sendo feita com o emprego de técnicas de cirurgia. Dependendo da experiência a realizar, ela pode ser feita em qualquer parte do trato digestivo, como esôfago, rúmen, omaso, abomaso, intestinos, etc. É realmente no rúmen que um maior número de fístulas tem sido realizado; aí, elas podem ter diferentes tamanhos, mas o mais comum é o de 10 cm, que permite a passagem da mão e do braço de uma pessoa.

Na realização da fístula experimental, é imprescindível que o animal receba anestesia geral, regional ou local e que se tomem todos os cuidados de higiene. Terminado o trabalho cirúrgico, costuma-se vedar a fístula com cânulas ou plugs que podem ser confeccionados de pvc e acrílico, látex, borracha dura, etc (Figura 32). Parece que as primeiras são mais indicadas devido, principalmente, à sua durabilidade. Os cuidados pós-operatórios são importantes. De acordo com os resultados de pesquisas, os animais fistulados adequadamente apresentam comportamento fisiológico normal, não havendo prejuízo na produção de leite, reprodução, longevidade etc. Macrae (1975 apud SILVA, 1979) e Brown et al. (1968 apud SILVA, 1979) afirmam que tanto os animais canulados quanto os intactos parecem ter habilidades semelhantes na digestão de alimentos.

Figura 32 - Vaca fistulada (à esquerda), e cânula aberta (à direita).

Na literatura científica dos Estados Unidos, há citação de um garrote da raça Jersey, que foi operado aos 10 meses de idade e viveu durante 12 anos com a fístula no rúmen. Esse animal foi estudado por aproximadamente 700 alunos do curso de fisiologia de uma Universidade, tendo sido o interior do rúmen observado por 50 mil pessoas e filmado interna e externamente várias vezes. O animal sempre teve boa saúde, tendo sido sacrificado aos 13 anos de idade, devido a uma ferida grave na perna, ocasião em que sua fístula estava em ótimas condições.

No Brasil, houve um incremento da técnica a partir do início desta década, já existindo um número grande de animais, de diferentes raças, portadores de fístulas experimentais, de rúmen e de esôfago, vedados com os mais variados tipos de material. Contudo, segundo Gonçalves et al. (2001), a manutenção de animais fistulados para estudos dos eventos digestivos constitui altos custos e requer cuidados especiais com estes animais durante toda sua vida.

APÊNDICE D - O ajuste de um MNL no software R

Os dados

O conjunto de dados usado para ajuste de modelos mistos tem várias características: (i) Medições de uma resposta em vários níveis de uma covariável (tempo, dose, etc); (ii) As medições são agrupadas de acordo com um ou mais fatores (por exemplo, tratamento) e desta forma adição de covariáveis pode estar presente. Algumas variam dentro um grupo e algumas não. A escolha de uma estrutura para o tipo de dados afetará a flexibilidade com a qual se poderá exibir os dados e ajustar o modelo.

Uma maneira natural para representar tais dados no R é pelo objeto chamado `data.frame`, que serve para exibir e modelar os dados agrupados. Por meio deste é possível especificar alguns dos papéis das variáveis (resposta, 1.^a covariável, 2.^a covariável e fatores agrupados) no `data.frame`. Os diferentes papéis das variáveis no `data.frame` podem ser descritos por uma fórmula do tipo:

$$\text{resposta} \sim \text{primeira} | \text{agrupamento1/agrupamento2} \dots$$

A especificação mínima que o `data.frame` deve conter é: (i) a resposta; e (ii) a primeira covariável (tempo) e os fatores de agrupamento (como indivíduo).

Fatores adicionais e covariáveis contínuas podem ser representados. Contudo, a classe de objeto `groupedData` é mais conveniente para compactar a fórmula com os dados. Com a função `groupedData` estabelece-se os papéis das variáveis, converte o agrupamento de fatores para fatores de forma ordenada, ordenando os painéis de acordo com a resposta máxima. O mínimo que a função necessita é:

$$\text{groupedData}(\text{fórmula}, \text{data}, \text{outer}).$$

em que `formula` é a especificação da variável resposta, do fator longitudinal e da variável indicadora de indivíduo sobre o qual estão sendo feitas as medidas repetidas; `data` é o banco de dados onde se encontram as variáveis de interesse; e o argumento opcional `outer` que indica como a fórmula deve armazenar os dados, por exemplo, por tratamento. Uma outra vantagem de se usar fórmulas para descrever os papéis das variáveis é que estas informações podem ser usadas com funções de ajuste de modelos, tornando a especificação do modelo mais fácil.

Escolhendo a função não linear a ser utilizada

Esta deve ser escolhida observando o comportamento da curva, o fenômeno de interesse e a interpretação dos parâmetros do modelo em questão. Um bom indicativo para a

escolha da função não linear é observar o **gráfico dos perfis individuais**, por meio deles é possível se ter idéia do comportamento geral dos dados longitudinais.

No software R, estes gráficos são obtidos facilmente pela função `plot` do objeto `groupedData`, criado para o banco de dados em estudo. Para que os gráficos de perfis seja confeccionado corretamente, os dados devem estar organizados de tal forma que, na primeira coluna estejam todos os tempos (ordenados) referentes ao i -ésimo indivíduo estejam na sequência, um tempo em cada linha, e na segunda coluna a variável resposta referente a cada tempo, respectivamente. Especificando `outer=~ 1`, todos os perfis individuais são traçados em um único gráfico. Na presença de outros fatores, por exemplo tratamento, utilizando o argumento `outer=~tratamento` são traçados os perfis individuais por tratamento, ou seja, separa os indivíduos que receberam o mesmo tratamento em uma única janela, podendo-se observar o comportamento dos indivíduos por tratamento. Para ambos os ensaios utilizados neste trabalho o modelo de Orskov e McDonald (1979) descrito em (6) foi o escolhido.

O MNL clássico é ajustado no software R pela função `nls` (*Nonlinear Least Squares*), contudo é necessário criar uma `function` da função (6), por exemplo, para que o modelo possa ser ajustado. Para seu uso, a especificação mínima é:

```
nls(formula, data, start, weights),
```

em que `formula` é a especificação da fórmula do modelo não linear, uma função, que pode definida; `data` é o banco de dados onde se encontram as variáveis de interesse; `start` deve-se indicar uma lista de valores iniciais para que o processo iterativo possa ser iniciado. Se a opção `weights` for especificada, estima os parâmetros pelo método dos mínimos quadrados não linear ponderados. A `function` para a função (6) é escrita como:

```
orskov = function(t,a,b,c) (a + b*(1-exp(-c*t)))
```

Existem algumas funções não lineares prontas, do tipo `SS` (*SelfStart*), no pacote `stats`, nas quais os valores iniciais não precisam ser especificados, pois são gerados automaticamente. Mais funções deste tipo podem ser encontradas carregando outros pacotes do R, como por exemplo, `drc` (*dose response curve*), `nlstools` etc. É possível também construir outras funções com esta propriedade, para isso a função `selfStart` pode ser utilizada.

Vale ressaltar que deve-se ter muito cuidado com a parametrização do modelo não linear utilizado, pois certamente influenciará na interpretação dos resultados. Diferentes parametrizações de um mesmo modelo levam a diferentes interpretações dos mesmos parâmetros, como mostra o trabalho de Nesi et al. (2011), em um estudo das diferentes parametrizações do modelo logístico.

Determinar os valores iniciais

Para o modelo de Orskov e McDonald (1979) as estimativas iniciais (a_0 , b_0 , c_0) para os parâmetros β_1 , β_2 e β_3 para cada tratamento, podem ser obtidas da seguinte maneira:

Passo 1: Faça o gráfico de dispersão da variável resposta $y \times t$ (tempo). Uma estimativa inicial razoável para b_0 pode ser obtida visualmente pela assíntota horizontal sugerida no gráfico, pois o valor máximo aproximado é modelado pela resposta y quando $t \rightarrow \infty$ (RATKOWSKY, 1983). Uma alternativa simples para o valor inicial de b , consiste em tomar um valor um pouco maior do que o maior valor observado y (REGAZZI, 2003). No entanto, sabe-se que $b_0 = a + b$ e consequentemente $b = b_0 - a$.

Passo 2: Para determinar a_0 , deve-se proceder da mesma forma que no Passo 1, obtendo como estimativa o valor de y quando $t = 0$. Uma alternativa simples para o valor a_0 , consiste em tomar o menor valor observado da variável resposta y .

Passo 3: Para obtenção de c_0 deve-se linearizar a função resposta, como segue:

$$y_i = a + b(1 - e^{-ct_i}) \implies y_i - a - b = -be^{-ct_i} \implies \frac{y_i - a - b}{-b} = e^{-ct_i}$$

Linearizando a função, tem-se:

$$\ln\left(\frac{y_i - a - b}{-b}\right) = \ln(e^{-ct_i}) \implies \ln\left(\frac{y_i - a - b}{-b}\right) = -ct_i$$

Como $b = b_0 - a$, tem-se que:

$$\ln\left(\frac{y_i - b_0}{a - b_0}\right) = -ct_i$$

Ajustando-se um modelo de regressão linear simples, sem intercepto:

$$z_i = Bt_i + e_i \implies \hat{z}_i = \hat{B}t_i,$$

sendo $z_i = \ln\left(\frac{y_i - b_0}{a - b_0}\right)$. Dessa forma, a estimativa inicial de c é dada por:

$$c_0 = -\hat{B}.$$

Uma boa prática é a utilização de outros conjuntos de valores iniciais para verificar a convergência do processo para os mesmos resultados. Chiacchio (1993) propõe em seu trabalho alguns métodos para a obtenção de valores iniciais para alguns modelos.

Identificação de observações discrepantes e influentes

Como a suposição dos erros no MNL é que sejam iid (independentes e identicamente distribuídos) e que tenham distribuição normal, $N(0, \sigma^2)$, faz-se necessário a análise de resíduos para o estudo em questão. Esta pode ser feita usando o gráfico *valor predito* $\times$ *resíduo estudentizado*, que permite diagnosticar a condição dos erros serem iid.

O i -ésimo resíduo ordinário estudentizado internamente (Rs_i) é expresso por:

$$Rs_i = \frac{r_i}{s(1 - h_{ii})^{1/2}}, \quad i = 1, \dots, n. \quad (70)$$

onde r_i é o i -ésimo resíduo ordinário, definido por $r_i = y_i - \mu_i(\hat{\beta})$, sendo $\mu_i(\hat{\beta})$ a média do modelo ajustado aos dados, com vetor de parâmetros estimado $\hat{\beta}$; s^2 é o quadrado médio residual, ou seja, a estimativa de σ^2 ; e $h_{ii} = h_i$ que é o i -ésimo elemento da diagonal principal da matriz $\mathbf{H} = \mathbf{X}(\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T$, em que $\mathbf{X}$ é a matriz de covariáveis do modelo em questão (DEMÉTRIO; ZOCCHI, 2008). Neste trabalho, será considerado um valor como *outlier* se o resíduo estudentizado (Rs) satisfizer a condição:

$$Rs < -3 \text{ ou } Rs > 3.$$

Estes resíduos podem ser obtidos utilizando o pacote **nls2**, usando a função **as.lm()** que converte um **nls** para **lm**, assim os diferentes resíduos ordinários, padronizados e estudentizados podem ser obtidos usando os comandos: **residuals**, **rstandard** e/ou **rstudent**, respectivamente.

Contudo, os resíduos ordinários e os estudentizados podem produzir resultados enganosos, pois eles foram definidos para regressões lineares, mas que são também utilizados para modelos não lineares. Um melhor resíduo, segundo Prudente (2009), são os resíduos projetados, que em teoria, superam essa deficiência dos resíduos ordinários e dos estudentizados para a regressão não linear. Todavia, estes não serão utilizados nestas análises.

Em relação a pontos influentes, encontram-se na literatura algumas estatísticas usadas para diagnosticar estes, como por exemplo: $DFBetas$, $FDFits$, $|1 - COVRATIO|$, Distância de Cook e h -leverage (DEMÉTRIO; ZOCCHI, 2008). É considerado ponto influente se pelo menos uma das estatísticas exceder o seu limite crítico. Na prática, escolhe-se uma das estatísticas – aqui usaremos a h -leverage – e plota-se o gráfico h -leverage $\times$ Rs , que permite diagnosticar: *outliers*, valores influentes ou ambos. A Figura 33 ilustra as regiões onde os valores são considerados *outliers* ou influentes (PANOSSO; MALHEIROS, 2011).

Figura 33 - Gráfico das regiões onde os valores são considerados *outliers* ou influentes

APÊNDICE E - Sintaxe do software R para a ajuste de um MNL

```

#####
(Dados_FDN<- na.omit(data.frame(tempo, periodo, animal, IND, trat, nome, FDN)))
#
### Valores iniciais (a1,b1,c1) para o Modelos de Orskov e McDonald
x<- Dados_FDN$tempo;    y<- Dados_FDN$FDN;        n = length(x)
#
# a1: Menor valor observado em p. (t = 0)
a1 = min(y)
#
# b1: Valor um pouco maior do que o valor observado em p. (t --> inf)
b0 = max(y) + 1
b1 = b0 - a1    # sabe-se que b1 = b0 - a1;
#
# c1: Linearizar a função resposta do modelo de Orskov:
y1 = log((y - b0)/(a1 - b0))
beta_estim1 = solve(t(x) %*% x) %*% t(x) %*% y1
c1 = - beta_estim1
#
# Valores iniciais
c(a1,b1,c1)
###-----###
###          MODELO DE ORSKOV e MCDONALD (1979)          ###
###          orskov = function(t,a,b,c) (a + b*(1-exp(-c*t)))          ###
###-----###
### Modelo Completo - Com todos os parâmetros diferentes
orskov0 = function(t,a1,b1,c1,a2,b2,c2,a3,b3,c3,
                  a4,b4,c4,a5,b5,c5,a6,b6,c6) {
  Dados_MS$D1 * (a1 + b1 * (1 - exp(-c1 * t))) +
  Dados_MS$D2 * (a2 + b2 * (1 - exp(-c2 * t))) +
  Dados_MS$D3 * (a3 + b3 * (1 - exp(-c3 * t))) +
  Dados_MS$D4 * (a4 + b4 * (1 - exp(-c4 * t))) +
  Dados_MS$D5 * (a5 + b5 * (1 - exp(-c5 * t))) +
  Dados_MS$D6 * (a6 + b6 * (1 - exp(-c6 * t))) }
#
# Ajustes individuais - obtidos da combinação de animal e período
(FDN.list.ind = nlsList(FDN ~ orskov(tempo,a,b,c)|IND,
                        data = na.omit(Dados_FDN),
                        start = list(a=a1, b=b1, c=c1)))

summary(FDN.list.ind)
#
### Separando as estimativas obtidas dos parâmetros e os desvios padrões
# do modelo FDN.list.ind para usar como estimativas iniciais do modelo M0
A<- summary(MS.list.ind)$para[ 1: 36]
dp_A<- summary(MS.list.ind)$para[ 37: 72]
B<- summary(MS.list.ind)$para[145:180]
dp_B<- summary(MS.list.ind)$para[181:216]
C<- summary(MS.list.ind)$para[289:324]
dp_C<- summary(MS.list.ind)$para[325:360]
TRATAMENTO<- factor(rep(c('T1.70TIF484", 'T2.70TIF106", 'T3.50TIF43",

```

```

                                'T4.50TIF1012", 'T5.30TIF46", 'T6.30TIF1084"), each=6))
(ANIMAL<- factor(rep(c(1:6), time=6)))
teste<- matrix(perodo, ncol=10, byrow=T)
PERIODO<- factor(as.numeric(teste[,1]))
#
G<- cbind(TRATAMENTO, ANIMAL, PERIODO, A, B, C, dp_A, dp_B, dp_C) ; round(G,4)
(trat_A<- colMeans(G[ 1: 6,4:9]));   (trat_B<- colMeans(G[ 7:12,4:9]))
(trat_C<- colMeans(G[13:18,4:9]));   (trat_D<- colMeans(G[19:24,4:9]))
(trat_E<- colMeans(G[25:30,4:9]));   (trat_F<- colMeans(G[31:36,4:9]))
#
### Ajuste de um modelo não linear por tratamento
M0 = nls(FDN~orskov0(tempo,a1,b1,c1,a2,b2,c2,a3,b3,c3,
                    a4,b4,c4,a5,b5,c5,a6,b6,c6), Dados_FDN,
        start=list(a1=trat_A[1], b1=trat_A[2], c1=trat_A[3],
                  a2=trat_B[1], b2=trat_B[2], c2=trat_B[3],
                  a3=trat_C[1], b3=trat_C[2], c3=trat_C[3],
                  a4=trat_D[1], b4=trat_D[2], c4=trat_D[3],
                  a5=trat_E[1], b5=trat_E[2], c5=trat_E[3],
                  a6=trat_F[1], b6=trat_F[2], c6=trat_F[3]))
summary(M0)
AIC(M0); BIC(M0)
summary(M0)$sigma^2
#-----#
### OBS: O ajuste M0 é diferente deste:
FDN.list.ind = nlsList(FDN~orskov(tempo,a,b,c)|trat, data=na.omit(Dados_FDN),
                      start=list(a=a1,b=b1,c=c1))
summary(FDN.list.ind)$sigma^2
#-----#
### Modelo considerando que a1=a2=a3=a4=a5=a6
aa<- mean(trat_A[1],trat_B[1],trat_C[1],trat_D[1],trat_E[1],trat_F[1])
#
orskov1 = function(t,a,b1,c1, b2,c2, b3,c3, b4,c4, b5,c5, b6,c6) {
  Dados_MS$D1 * (a + b1 * (1 - exp(-c1 * t))) +
  Dados_MS$D2 * (a + b2 * (1 - exp(-c2 * t))) +
  Dados_MS$D3 * (a + b3 * (1 - exp(-c3 * t))) +
  Dados_MS$D4 * (a + b4 * (1 - exp(-c4 * t))) +
  Dados_MS$D5 * (a + b5 * (1 - exp(-c5 * t))) +
  Dados_MS$D6 * (a + b6 * (1 - exp(-c6 * t))) }
#
M1 = nls(FDN ~ orskov1(tempo, a, b1,c1, b2,c2, b3,c3,
                      b4,c4, b5,c5, b6,c6), Dados_FDN,
        start=list(a=aa, b1=trat_A[2], c1=trat_A[3],
                  b2=trat_B[2], c2=trat_B[3],
                  b3=trat_C[2], c3=trat_C[3],
                  b4=trat_D[2], c4=trat_D[3],
                  b5=trat_E[2], c5=trat_E[3],
                  b6=trat_F[2], c6=trat_F[3]))
# Teste da Razão de Verossimilhança
anova(M1,M0)
#-----#
### Diferentes Resíduos

```



```
require(nls2)
M2 <- as.lm(M1)
residuals(M2) # residuo ordinário, este é igual ao comando: summary(M1)$residuals
rstandard(M2) # resíduo padronizado
rstudent(M2)  # resíduo estudentizado
###====###====###====###====###====###====###====###====###==== FIM!
```

APÊNDICE F - Sintaxe do software R para a ajuste de um MNLM

```
#####
require(nlme)
(Dados_FDN<- na.omit(data.frame(tempo, periodo, animal, IND, trat, nome, FDN)))
fdn=groupedData(FDN~tempo|IND,data=Dados_FDN, order.groups=F)
#-----
### Gráficos de perfis
plot(fdn, key=F, outer=~1, cex=.5, pch=19, col='black') # Única janela
plot(fdn, key=F, outer=~nome, cex=.5, pch=19, col='black') # por tratamento
#-----
### Valores iniciais (a1,b1,c1) para o Modelos de Orskov e McDonald
x<- Dados_FDN$tempo
y<- Dados_FDN$FDN
n = length(x); n
#
# a1: Menor valor observado em p. (t = 0)
a1 = min(y)
#
# b1: Valor um pouco maior do que o valor observado em p. (t --> inf)
b0 = max(y) + 1
b1 = b0 - a1 # sabe-se que b1 = b0 - a1;
#
# c1: Linearizar a função resposta do modelo de Orskov:
y1 = log((y - b0)/(a1 - b0))
beta_estim1 = solve(t(x) %*% x) %*% t(x) %*% y1
c1 = - beta_estim1
#
# Valores iniciais
c(a1,b1,c1)
###-----###
###          MODELO DE ORSKOV e MCDONALD (1979)          ###
###          orskov = function(t,a,b,c) (a + b*(1-exp(-c*t)))          ###
###-----###
(FDN.list.ind = nlsList(FDN~orskov(tempo,a,b,c)|IND, data=fdn,
                        start=list(a=a1, b=b1, c=c1)))
summary(FDN.list.ind)
#
### gráfico dos intervalos de confiança dos parâmetros do modelo de Orskov,
#                               obtido dos ajustes individuais.
plot(intervals(FDN.list.ind), layout=c(3,1))
#
#####
### ESTRUTURANDO A MATRIZ D:
#####
# Efeito aleatório nos parâmetros a, b e c
(FDNO <- nlme(FDN.list.ind, fixed=a+b+c~trat)); summary(FDNO)
(abcfix = fixef(FDNO)) # Obtém a média das estimativas de cada parâmetro
#
library(lattice)
options(contrasts = c('contr.treatment','contr.poly'))
```

```

nlmeControl(500)
#-----
### Efeito aleatório em todos os parâmetros -
#          matriz D=General positive-definite, Log-Cholesky parametrization
FDN1 <- update(FDN0, fixed=a+b+c~trat,
              random=a+b+c~1
              start=c(abcfix[1],0,0,0,0,0,
                      abcfix[2],0,0,0,0,0,
                      abcfix[3],0,0,0,0,0))

summary(FDN1)
FDN1_1<- update(FDN1,random= pdDiag(a+b+c~1)) # matriz D=Diagonal
FDN1_2<- update(FDN1,random=pdIdent(a+b+c~1)) # matriz D=Multiple of an Identity
FDN1_3<- update(FDN1,random= pdSymm(a+b+c~1)) # matriz D=General p.d.
#-----
### Efeito aleatório no parâmetro a
FDN2  <- update(FDN1, random = a~1)
#-----
### Efeito aleatório no parâmetro b
FDN3  <- update(FDN1, random = b~1)
#-----
### Efeito aleatório no parâmetro c
FDN4  <- update(FDN1, random = c~1)
#-----
### Efeitos aleatórios nos parâmetros a e b
FDN5  <- update(FDN1, random = a+b~1)
#-----
### Efeitos aleatórios nos parâmetros a e c
FDN6  <- update(FDN1, random = a+c~1)
#-----
### Efeitos aleatórios nos parâmetros b e c
FDN7  <- update(FDN1, random = b+c~1)
#-----
# Teste da Razão de Verossimilhança
anova(FDN1_2 , FDN1_1, FDN1_3, FDN1)
anova(FDN1_2,FDN1_3)
anova(FDN2, FDN3, FDN4, FDN6, FDN5, FDN7, FDN1)
#
###=====###=====###=====###=====###=====###=====###=====###
### ESTRUTURA DA MATRIZ R:
###=====###=====###=====###=====###=====###=====###=====###
### matriz R = AR(1)
FDN1_3_AR<- update(FDN1_3,corr=corAR1(form=~tempo|IND)) ; summary(FDN1_3_AR)
#
### matriz R = Simetria Composta
FDN1_3_SC<- update(FDN1_3,corr=corCompSymm(,form=~1|IND)); summary(FDN1_3_SC)
#
### matriz R = ARH(1)
FDN1_3_ARH<- update(FDN1_3,corr=corAR1(form=~1|IND),
                   weight=varIdent(form=~1|tempo))
#
anova(FDN1_3, FDN1_3_AR)

```

```

anova(FDN1_3, FDN1_3_SC)
anova(FDN1_3_AR, FDN1_3_SC)
#####
### JUNTANDO OS TRATAMENTOS SEMELHANTES (exemplo para 3 curvas):
#####
TRAT3<- factor(c(rep(70,120), rep(50,120), rep(30,118)))
DADOS3<- cbind(Dados_FDN,TRAT3)
fdn3=groupedData(FDN~tempo|IND,data=DADOS3,outer=~factor(TRAT3), order.groups=F)
FDN3.list = nlsList(FDN ~ orskov(tempo,a,b,c)|IND, data=fdn3,
                    start=list(a=a1, b=b1, c=c1))

FDN.30<- nlme(FDN3.list, fixed=a+b+c~TRAT3)
(abcfix3 = fixef(FDN.30))
FDN1_3_3<- update(FDN.30, fixed=a+b+c~TRAT3,
                  random=pdSymm(a+b+c~1), start=c(abcfix3[1],0, 0,
                                                    abcfix3[2],0, 0,
                                                    abcfix3[3],0, 0))

#####
### COMPARANDO OS PARÂMETROS DAS CURVAS:
#####
# H0: a1=a2=a3
FDNa <- update(FDN1_3_3, random = pdSymm(a+b+c ~ 1),
               fixed = list(a~1,b+c~TRAT3), start=c(abcfix3[1],
                                                       abcfix3[2],0,0,
                                                       abcfix3[3],0,0))

# H0: b1=b2=b3
FDNb <- update(FDN1_3_3, random = pdSymm(a+b+c ~ 1),
               fixed = list(b~1,a+c~TRAT3), start=c(abcfix3[1],0,0,
                                                       abcfix3[2],
                                                       abcfix3[3],0,0))

# H0: c1=c2=c3
FDNc <- update(FDN1_3_3, random = pdSymm(a+b+c ~ 1),
               fixed = list(c~1,a+b~TRAT3), start=c(abcfix3[1],0,0,
                                                       abcfix3[2],0,0,
                                                       abcfix3[3]))

# H0: a1=a2=a3 e b1=b2=b3
FDNab <- update(FDN1_3_3, random = pdSymm(a+b+c ~ 1),
               fixed = list(a+b~1,c~TRAT3), start=c(abcfix3[1],
                                                       abcfix3[2],
                                                       abcfix3[3],0,0))

# H0: a1=a2=a3 e c1=c2=c3
FDNac <- update(FDN1_3_3, random = pdSymm(a+b+c ~ 1),
               fixed = list(a+c~1,b~TRAT3), start=c(abcfix2[1],
                                                       abcfix2[2],0,0,
                                                       abcfix2[3]))

# H0: b1=b2=b3 e c1=c2=c3
FDNbc <- update(FDN1_3_3, random = pdSymm(a+b+c ~ 1),
               fixed = list(b+c~1,a~TRAT3), start=c(abcfix2[1],0,0,
                                                       abcfix2[2],
                                                       abcfix2[3]))

# H0: a1=a2=a3, b1=b2=b3 e c1=c2=c3
FDNabc <- update(FDN1_3_3, random = pdSymm(a+b+c ~ 1),

```

```

fixed = list(a+b+c~1), start=c(abcfix2[1],
                                abcfix2[2],
                                abcfix2[3]))

anova(FDNa,FDN1_3_3)
anova(FDNb,FDN1_3_3)
anova(FDNab,FDN1_3_3)
anova(FDNabc,FDN1_3_3)
anova(FDNab,FDNa)
anova(FDNab,FDNb)
anova(FDNabc,FDNab)
anova(FDNabc,FDNa)
anova(FDNabc,FDNb)
###====###====###====###====###====###====###====###====###====###
### GRÁFICOS DE RESÍDUOS:
###====###====###====###====###====###====###====###====###====###
# gráfico dos resíduos estudentizados versus quantis da normal padronizada
qqnorm(FDN1_3, ~resid(.,type="n"), main='FDN1_3')
#
# gráfico dos resíduos estudentizados versus valores ajustados
plot(FDN1_3, resid(.,type="n")~fitted(.), main='FDN1_3')
###====###====###====###====###====###====###====###====###====### FIM!

```

ANEXOS

ANEXO A - Condições de regularidade

As condições de regularidade para n variáveis aleatórias i.i.d., $X_1, X_2, \dots, X_n$, com função de densidade de probabilidade $f(x, \theta)$ são:

- 1) O espaço paramétrico Θ é um intervalo aberto.
- 2) A distribuição de probabilidade acumulada, $F(x)$, tem suporte comum, ou seja, o conjunto $A = \{x : f(x, \theta) > 0\}$ é independente de $\theta \in \mathfrak{R}$.
- 3) $f(x, \theta)$ admite terceira derivada contínua em θ .
- 4) $\int_{-\infty}^{\infty} f(x, \theta) dx$ pode ser derivada três vezes dentro do sinal da integral.
- 5) A informação de Fisher, $I_F(\theta)$, satisfaz: $0 < I_F(\theta) < \infty$, em que:

$$I_F(\theta) = E \left\{ \left[\frac{\partial \log[f(x, \theta)]}{\partial \theta} \right]^2 \right\} = -E \left[\frac{\partial^2 \log(f(x, \theta))}{\partial \theta^2} \right].$$

- 6) Existe a terceira derivada satisfazendo:

$$\left| \frac{\partial^3 \log[f(x, \theta)]}{\partial \theta^3} \right| \leq M(x),$$

para $\forall x \in A$ com $E[M(x)] < \infty$.

ANEXO B - Condição de Esfericidade ou Circularidade

De acordo com Huynh e Feldt (1970) uma condição necessária e suficiente para que os testes F sejam exatos, é que a matriz Σ satisfaça a condição de esfericidade (condição H-F, ou circularidade), isto é, que Σ satisfaça a condição:

$$\sigma_{kk'} = \frac{(\sigma_k^2 + \sigma_{k'}^2)}{2} - \lambda, \quad k \neq k',$$

em que λ é a diferença entre as médias das variâncias e as médias das covariâncias. Tal condição equivale a especificar que as variâncias das diferenças entre pares de tempos sejam todas iguais, ou seja,

$$\sigma_{T_k - T_j}^2 = \sigma_{T_k}^2 + \sigma_{T_j}^2 - 2\sigma_{T_k T_j} = c, \quad k \neq j.$$

Para testar a hipótese que a matriz Σ satisfaz a condição de esfericidade utiliza-se o teste desenvolvido por Mauchly (1940), cuja estatística é dada por:

$$W = \frac{(t-1)^{t-1} |\mathbf{P}^t \mathbf{S} \mathbf{P}|}{tr\{\mathbf{P}^t \mathbf{S} \mathbf{P}\}^{t-1}}$$

em que $\mathbf{S}$ é a matriz de covariâncias amostrais, de dimensões $t \times t$; $\mathbf{P}$ é uma matriz de contrastes ortogonais de dimensão $t \times (t-1)$ e tr é o operador traço. Sob a hipótese nula, tem-se que:

$$\chi_{calc}^2 = - \left[\nu - \frac{2t^2 - 3t + 3}{6(t-1)} \right] \ln(W),$$

que tem distribuição quiquadrado com $f = \frac{1}{2}t(t-1) - 1$ graus de liberdade, quando ν (número de graus de liberdade do resíduo) é grande. Portanto, se essa hipótese nula é aceita, a análise de perfis pode ser feita utilizando uma abordagem univariada. Caso contrário, se é rejeitada, utiliza-se a abordagem multivariada.

Crowder e Hand (1990) consideraram este teste “o mais popular para verificar a condição de circularidade” e alertaram para o fato de que, como todos os testes que envolvem variâncias e covariâncias, este teste é bastante sensível à não normalidade dos dados.

ANEXO C - Estruturas para matrizes de variâncias e covariâncias

Algumas das diferentes estruturas que a matriz $\mathbf{R}$ pode assumir:

a) **Componente de variância - CV** (1 parâmetro):

$$\begin{bmatrix} \sigma^2 & 0 & 0 \\ 0 & \sigma^2 & 0 \\ 0 & 0 & \sigma^2 \end{bmatrix}$$

Utilizada geralmente nos modelos ANOVA. Essa estrutura supõe independência e homogeneidade entre os componentes e homogeneidade de variâncias.

b) **Componente de variância com heterogeneidade de variâncias - CVH** (w parâmetros, em que w é igual a ordem da matriz):

$$\begin{bmatrix} \sigma_1^2 & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_2^2 & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_3^2 \end{bmatrix}$$

Conserva a suposição de independência, porém admite heterogeneidade de variâncias.

c) **Simetria Composta - SC** (2 parâmetros):

$$\begin{bmatrix} \sigma^2 & \sigma_1 & \sigma_1 \\ \sigma_1 & \sigma^2 & \sigma_1 \\ \sigma_1 & \sigma_1 & \sigma^2 \end{bmatrix}$$

Essa matriz pode ser encontrada em experimentos casualizados em blocos, para os quais o efeito de bloco é aleatório. Na matriz $\mathbf{V}$, observam-se tantas matrizes SC quantos forem os blocos, sendo assim chamada de matriz bloco diagonal, apresentando homogeneidade de variâncias e covariâncias constantes.

d) **Simetria composta com heterogeneidade de variâncias - SCH** ($w+1$ parâmetros):

$$\begin{bmatrix} \sigma_1^2 & \sigma_4 & \sigma_4 \\ \sigma_4 & \sigma_2^2 & \sigma_4 \\ \sigma_4 & \sigma_4 & \sigma_3^2 \end{bmatrix}$$

Esta matriz apresenta variâncias e covariâncias distintas, mas correlações iguais.

e) **Autoregressiva de primeira ordem - AR(1)** (2 parâmetros):

$$\begin{bmatrix} \sigma^2 & \phi\sigma^2 & \phi^2\sigma^2 \\ \phi\sigma^2 & \sigma^2 & \phi\sigma^2 \\ \phi^2\sigma^2 & \phi\sigma^2 & \sigma^2 \end{bmatrix}$$

em que ϕ é a correlação entre as observações, sendo $|\phi| < 1$. Esta matriz apresenta homogeneidade de variâncias e covariâncias em função das distâncias entre as observações, ou seja, a correlação decresce à medida que aumenta a distância entre as observações. Somente deve ser utilizada quando as observações são igualmente espaçadas (no tempo ou no espaço).

f) **Autoregressiva de primeira ordem com heterogeneidade de variâncias - ARH(1)** ($w + 1$ parâmetros) :

$$\begin{bmatrix} \sigma_1^2 & \phi\sigma_1\sigma_2 & \phi^2\sigma_1\sigma_3 \\ \phi\sigma_1\sigma_2 & \sigma_2^2 & \phi\sigma_2\sigma_3 \\ \phi^2\sigma_1\sigma_3 & \phi\sigma_2\sigma_3 & \sigma_3^2 \end{bmatrix}$$

em que ϕ é a correlação entre as observações, sendo $|\phi| < 1$. Note que esta matriz é uma generalização da AR(1), em que são consideradas variâncias e covariâncias distintas entre as observações.

g) **Potência** (2 parâmetros):

$$\begin{bmatrix} \sigma^2 & \rho^{d_{12}}\sigma^2 & \rho^{d_{13}}\sigma^2 \\ \rho^{d_{12}}\sigma^2 & \sigma^2 & \rho^{d_{23}}\sigma^2 \\ \rho^{d_{13}}\sigma^2 & \rho^{d_{23}}\sigma^2 & \sigma^2 \end{bmatrix}$$

Essa matriz apresenta características semelhantes a AR(1), porém seu uso é aconselhado para os casos em que as observações não são equidistantes. Admite homogeneidade de variâncias e covariâncias decrescente em função das distâncias entre os componentes. O parâmetro d_{ij} é a distância entre as observações i e j , com i e $j = 1, 2, 3$.

h) **Banda:**

$$\begin{bmatrix} \sigma_1^2 & \sigma_{12}^2 & 0 \\ \sigma_{12}^2 & \sigma_2^2 & \sigma_{23}^2 \\ 0 & \sigma_{23}^2 & \sigma_3^2 \end{bmatrix}$$

Essa matriz supõe heterogeneidade de variâncias e apresenta covariâncias em bandas, considerando-se um passo (distância) pré estabelecido, em que observações com passos maiores que o suposto são independentes.

i) Não Estruturada ou completamente parametrizada - NE ($\frac{w(w+1)}{2}$ parâmetros):

$$\begin{bmatrix} \sigma_1^2 & \sigma_{12} & \sigma_{13} \\ \sigma_{21} & \sigma_2^2 & \sigma_{23} \\ \sigma_{13} & \sigma_{23} & \sigma_3^2 \end{bmatrix}$$

Admite variâncias e covariâncias distintas.

ANEXO D - Componentes de variâncias dos modelos da abordagem 3

Tabela 45 - Componentes de variâncias e correlações - Modelos sugeridos para a descrição da cinética de degradação da MS

Modelo	$\hat{\sigma}^2$	$\hat{\sigma}_{b_1}^2$	$\hat{\sigma}_{b_2}^2$	$\hat{\sigma}_{b_3}^2$	$\hat{\rho}_{b_1, b_2}$	$\hat{\rho}_{b_1, b_3}$	$\hat{\rho}_{b_2, b_3}$
M0	6,84	-	-	-	-	-	-
MR1.1	5,33	1,12	-	-	-	-	-
MR2.1	5,24	-	2,33	-	-	-	-
MR3.1	4,99	-	-	7,56E ⁻⁶	-	-	-
MR4.1	5,14	0,88	0,88	-	-	-	-
MR5.1	4,99	7,56E ⁻⁶	-	7,56E ⁻⁶	-	-	-
MR6.1	4,99	-	7,56E ⁻⁶	7,56E ⁻⁶	-	-	-
MR7.1	4,99	7,56E ⁻⁶	7,56E ⁻⁶	7,56E ⁻⁶	-	-	-
MR4.2	5,11	0,51	1,64	-	-	-	-
MR5.2	4,99	3,73E ⁻⁸	-	7,50	-	-	-
MR6.2	4,68	-	1,39	6,83	-	-	-
MR7.2	4,68	2,99E ⁻⁸	1,39	6,84	-	-	-
MR4.3	5,03	0,92	2,49	-	-0,41	-	-
MR5.3	4,98	0,02	-	9,29E ⁻⁶	-	-1,00	-
MR6.3	4,38	-	4,30	1,71E ⁻⁵	-	-	-0,75
MR7.3	*	*	*	*	*	*	*
MR7.4	4,37	0,03	4,31	1,79E ⁻⁵	-0,11	-0,62	-0,68

*: O processo de ajuste do modelo não convergiu

Tabela 46 - Componentes de variâncias e correlações - Modelos sugeridos para a descrição da cinética de degradação da FDN

Modelo	$\hat{\sigma}^2$	$\hat{\sigma}_{b_1}^2$	$\hat{\sigma}_{b_2}^2$	$\hat{\sigma}_{b_3}^2$	$\hat{\rho}_{b_1, b_2}$	$\hat{\rho}_{b_1, b_3}$	$\hat{\rho}_{b_2, b_3}$
M0	18,80	-	-	-	-	-	-
MR1.1	12,22	5,59	-	-	-	-	-
MR2.1	14,15	-	7,08	-	-	-	-
MR3.1	11,36	-	-	2,30E ⁻⁰⁵	-	-	-
MR4.1	11,95	4,32	4,32	-	-	-	-
MR5.1	11,36	2,30E ⁻⁰⁵	-	2,30E ⁻⁰⁵	-	-	-
MR6.1	11,36	-	2,30E ⁻⁰⁵	2,30E ⁻⁰⁵	-	-	-
MR7.1	11,36	2,30E ⁻⁰⁵	2,30E ⁻⁰⁵	2,30E ⁻⁰⁵	-	-	-
MR4.2	12,18	5,57	0,25	-	-	-	-
MR5.2	11,10	1,28	-	1,998E ⁻⁰⁵	-	-	-
MR6.2	11,36	-	7,89E ⁻⁰⁷	2,30E ⁻⁰⁵	-	-	-
MR7.2	11,10	1,28	9,19E ⁻⁰⁷	1,998E ⁻⁰⁵	-	-	-
MR4.3	11,30	12,56	7,77	-	-0,79	-	-
MR5.3	11,05	1,57	-	2,17E ⁻⁰⁵	-	-0,13	-
MR6.3	10,55	-	5,08	4,38E ⁻⁰⁵	-	-	-0,79
MR7.3	9,92	5,29	11,30	2,52E ⁻⁰⁵	-0,92	0,41	-0,56