UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

GABRIELA DO VALE POMBO

Avaliação de indicadores internos para determinação da digestibilidade aparente total
em equinos com dietas completas

Pirassununga

2014

GABRIELA DO VALE POMBO

Avaliação de indicadores internos para determinação da digestibilidade aparente total
em equinos com dietas completas

“Versão Corrigida”

Dissertação apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos, da
Universidade de São Paulo, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal

Orientador: Prof. Dr. Ives Cláudio da Silva Bueno

Pirassununga

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

P784a	<p>Pombo, Gabriela do Vale</p> <p>Avaliação de indicadores internos para determinação da digestibilidade aparente total em equinos com dietas completas / Gabriela do Vale Pombo. -- Pirassununga, 2014.</p> <p>42 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Zootecnia.</p> <p>Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Ives Cláudio da Silva Bueno.</p> <p>1. Viés 2. Precisão 3. Recuperação fecal 4. Cavalos. I. Título.</p>
-------	--

Papai, mamãe, irmão e dedê...
Vovó e vovô...
Família... Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus e a toda espiritualidade por iluminarem meus caminhos e decisões.

À minha família que sempre me apoiou e esteve comigo em todos os momentos, sem eles, eu não teria chego até aqui.

Ao Prof. Dr. Ives, que além de orientador foi um grande “pai”, me ensinou, corrigiu e me deu forças para me tornar uma pessoa melhor...

À Priiiii! Obrigada pela companhia, dedicação e amizade.

À Profa. Catarina, Rose e Rosilda, pelos conselhos e paciência nos muitos dias de laboratório e na amizade construída.

Ao Prof. Dr. Francisco Rennó, pelo espaço concedido e conselhos.

À Profa. Dra. Roberta Ariboni, muito obrigada pela oportunidade de evoluir.

Ao Tiago, muito, muito obrigada! E a todos do laboratório LPBL que participaram de altos e baixos, sendo mais que colegas, grandes amigos.

À Bolonha, Bia, Giga, Naxa, Mada, Lana, Chan, Boo, Perla e às meninas do GEPEAC por fazerem parte da minha vida na FZEA.

Chitaaa! Minha inspiração, amiga e irmã... Elisa...Letícia... obrigada!

A Anita, amiga que me ensinou o gosto pela pesquisa!

E claro, aos cavalos, muitíssimo obrigada.

Oração a São Jorge

“... para que meus inimigos, tendo pés não me alcancem, tendo mãos não me peguem, tendo olhos não me vejam, e nem em pensamentos eles possam me
fazer mal.

... Armas de fogo o meu corpo não alcançarão, facas e lanças se quebrem sem
o meu corpo tocar, cordas e correntes se arrebentem sem o meu corpo
amarrar...”

RESUMO

POMBO, G.V. **Avaliação de indicadores internos para determinação da digestibilidade aparente total em equinos com dietas completas.** 2014. 42f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Com o objetivo de avaliar a acurácia, a precisão e a robustez de diferentes indicadores internos na predição da digestibilidade aparente total da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), energia bruta (EB) e fibra em detergente neutro (FDN) para equinos, foi realizado um experimento no Setor de Equideocultura da Prefeitura do Campus de Pirassununga da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos em parceria com o Laboratório de Fermentabilidade Ruminal, no qual foram utilizadas cinco éguas em manutenção, alojadas em baias individuais, dispostas em quadrado latino 5x5 (cinco dietas e cinco animais) sendo as formulações isoproteicas e isoenergéticas. Os alimentos e as fezes deste experimento foram usados para a comparação dos dados estimados com os dados calculados através do experimento *in vivo* de coleta total de fezes. A determinação das frações indigestíveis foi feita após incubação *in vitro* com inóculo fecal equino diluído e tamponado. As amostras foram incubadas por 168 horas, retiradas, lavadas e então realizadas as análises dos nutrientes e estimativas da digestibilidade aparente, corrigida pela taxa de recuperação dos indicadores internos. A acurácia foi avaliada pela comparação do viés médio (dado predito – dado observado) entre os indicadores; a precisão, por meio da raiz quadrada do erro de predição e do erro residual; e a robustez, pelo estudo da regressão entre o viés e o consumo de matéria seca, consumo do indicador e peso vivo. Observando as taxas de recuperação (TR), pode-se dizer que a celulose indigestível (CELi) e a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) tiveram melhores TR, uma vez que sua recuperação média não diferiu de 100% ($P>0,05$). O viés médio obtido com FDNi não difere do viés médio obtido pela lignina em detergente ácido indigestível (LDAi). Por consequência de uma menor TR, os indicadores FDNi e LDAi possuem vieses negativos e diferentes de zero ($P<0,05$), mostrando que estes são menos acurados e subestimam o coeficiente de digestibilidade da MS. Quanto à precisão, as variâncias dos vieses ($RQMEP^2$) para os indicadores CELi e LDAi foram maiores que a dos demais indicadores avaliados, pelo teste de Barlett. Não houve diferença significativa entre os coeficientes angulares da regressão dos vieses dos indicadores e as variáveis consumo de matéria seca, consumo de indicador e peso vivo ($P>0,05$). Nas condições em que o trabalho foi realizado, pode-se concluir que os indicadores mais acurados foram FDAi e CELi, seguidos da FDNi e LDAi. Quanto à precisão, FDAi e FDNi foram mais precisos que CELi e LDAi, sendo todos os indicadores robustos quanto a consumo de matéria seca, consumo de indicador e peso vivo.

Palavras-chave: viés, precisão, recuperação fecal, cavalos.

ABSTRACT

POMBO, G.V. **Evaluation of internal markers to determine apparent total tract digestibility in horses with complete diets.** 2014. 42f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Aiming to evaluate the accuracy, precision and robustness of different internal markers to predict total digestibility of dry matter (DM), organic matter (OM), crude protein (CP), gross energy (GE) and detergent fiber neutral (NDF) in horses, an experiment was carried out at the Horse Breeding Sector of the Faculty of Animal Science and Food Engineering in partnership with the Laboratory of Rumen Fermentability, in which five maintenance mares were used, housed in individual pens, arranged in a 5x5 Latin square design (five treatments and five animals) with isoproteic and isocaloric formulations. Feeds and faeces from this experiment were used to compare estimated and observed data obtained by the *in vivo* assay with total faecal collection. The determination of indigestible fractions was done after *in vitro* incubation with buffered diluted equine faecal inoculum. The samples were incubated for 168 hours, removed, washed and then conducted to the analysis of nutrients and the estimative of apparent digestibility, corrected by the recovery rate of internal markers. The accuracy was evaluated by comparing the mean bias (predicted data - observed data) between indicators; the precision by means of the square root of the prediction error and the residual error, and the robustness, by the study of regression between the bias and dry matter intake, marker intake and body weight. Observing the recovery rates (RR), it is possible to see that indigestible cellulose (CELi) and indigestible acid detergent fibre (ADFi) had better RR, since their average recovery did not differ of 100% ($P>0.05$). The mean bias obtained with indigestible NDF (NDFi) was not different of mean bias obtained by indigestible acid detergent lignin (ADLi). By consequence of lower RR, the markers NDFi and LDAi have negative biases and different of zero ($P<0.05$), showing that they are less accurate and underestimate the coefficient of DM digestibility. For precision, the variances of the biases ($RQMEP^2$) for markers CELi and ADLi were higher than the other markers (Barlett test). There was no significant difference between the slopes of the regression of the biases of markers and the variables dry matter intake, markers intake and body weight ($P>0.05$). In conditions in which the work was done, it can be concluded that the most accurate indicators were ADFi and CELi followed by NDFi and ADLi. For precision, ADFi and NDFi were more precise than CELi and ADLi, and all markers were robust for dry matter intake, markers intake, and body weight.

Keywords: bias, precision, fecal recovery horses.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição percentual dos concentrados experimentais usadas no ensaio <i>in vivo</i> de digestibilidade em equinos	14
Tabela 2. Composição química (em % na MS) dos concentrados com teores crescentes de polpa cítrica e do feno usados no ensaio <i>in vivo</i> de digestibilidade em equinos.....	14
Tabela 3. Concentração dos indicadores internos (em % da MS) nos concentrados e no feno usados para alimentação dos animais no ensaio <i>in vivo</i>	15
Tabela 4. Recuperação fecal obtida com os indicadores internos para estimativa da digestibilidade da matéria seca em equinos	21
Tabela 5. Acurácia e precisão da estimativa da digestibilidade aparente da matéria seca (DAMS) determinada utilizando-se diferentes indicadores internos	23
Tabela 6. Robustez (coeficientes angulares, R^2 e probabilidade) das estimativas da digestibilidade aparente da matéria seca determinada utilizando-se diferentes indicadores internos em equinos	27
Tabela 7. Acurácia e precisão na predição da digestibilidade dos nutrientes por diferentes indicadores internos, com ou sem aplicação da taxa de recuperação, em equinos	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regressão dos vieses dos indicadores em função do coeficiente de digestibilidade da MS pela coleta total.....	25
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC – Association of Official Analytical Chemistry

CD – Coeficiente de digestibilidade

CDMS – Coeficiente de digestibilidade da matéria seca

CDN – Coeficiente de digestibilidade do nutriente

CEL – Celulose

CELi – Celulose indigestível

CIA – Cinza insolúvel em ácido

CIDA – Cinza insolúvel em detergente ácido

CTF – Coleta total de fezes

DAMS – Digestibilidade aparente da matéria seca

EB – Energia bruta

EE – Extrato etéreo

ENN – Extrativo não nitrogenado

FB – Fibra Bruta

FDAi – Fibra em detergente ácido indigestível

FDNi – Fibra em detergente neutro indigestível

LDA – Lignina em detergente ácido

LDAi – Lignina em detergente ácido indigestível

LIG – Lignina

µm- Micrômetro

MM – Matéria mineral

MO – Matéria orgânica

MS – Matéria seca

PB – Proteína bruta

RQMEP – Raiz quadrada média do erro de predição

TR – Taxa de recuperação

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Digestibilidade e caracterização química	3
2.2 Avaliação da digestibilidade	4
2.3 Indicadores internos	7
2.3.1 Fibra em detergente ácido (FDAi) e fibra em detergente neutro (FDNi)	7
2.3.2 Celulose indigestível (CELi)	9
2.3.3 Lignina indigestível (LDAi)	10
3 OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral	13
3.2 Objetivos específicos	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Local, animais e período experimental	14
4.2 Coleta total fezes	16
4.3 Determinação dos indicadores pelo método in vivo	17
4.3.1 Pré ensaio	17
4.3.2 Preparação do inóculo	17
4.3.3 Determinação dos indicadores internos	18
4.4 Análise estatística	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22

5.1 Pré ensaio	22
5.2 Taxa de recuperação (TR).....	22
5.3 Avaliação dos indicadores internos	24
6 CONCLUSÃO	32
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento do valor nutritivo dos alimentos é indispensável na formulação de dietas balanceadas e fundamental para os estudos de nutrição animal. Ensaio de digestibilidade envolvendo a coleta total de fezes são trabalhosos e onerosos e necessitam que os animais sejam contidos para o controle rigoroso da ingestão e da excreção, o que torna a técnica, muitas vezes, impraticável (ARAÚJO et al., 2000).

O sistema de avaliação de alimentos para ruminantes é o mesmo empregado para equinos, embora diferenças importantes no processo de digestão devam ser levadas em consideração devido às diferenças fisiológicas no trato gastrointestinal, o que se traduz em diferentes coeficientes de digestibilidade nos nutrientes dos alimentos (ALMEIDA et al., 1998).

O uso dos indicadores para determinar a digestibilidade assume grande importância nos ensaios, nos quais não é possível realizar a coleta total de fezes, principalmente em condições de pastejo ou nas digestões parciais. Para se estimar a digestibilidade dos nutrientes por meio de indicadores, pode-se optar por indicadores internos, que ocorrem naturalmente nos alimentos, ou por indicadores externos, que são adicionados à dieta ou fornecidos diretamente ao animal (ARAÚJO et al., 2000).

Considerando que os indicadores internos podem ser úteis nos estudos da digestão nos equinos, trabalhos iniciais foram desenvolvidos por Martin-Rosset e Dulphy (1987) (apud ALVARENGA et al., 1996; VARLOUD et al., 2004) que avaliaram o uso da fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), da fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), da celulose indigestível e da lignina como indicadores internos em estudos de digestão com dietas com alimentos volumosos.

Posteriormente, Miraglia et al. (1999) avaliaram o uso dos indicadores internos: cinzas insolúveis em ácido (CIA) e lignina na estimativa da digestibilidade aparente de nutrientes em dietas mistas para equinos.

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

Indicadores têm sido utilizados em muitos estudos para avaliação da digestibilidade em equinos (SALIBA et al., 2002; SILVA et al., 2006; STEIN et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2009; GOBESSO et al., 2011). Entretanto, nenhuma substância reúne todas as características necessárias para ser considerada um indicador perfeito.

Segundo Maynard et al. (1979), o indicador ideal para determinar a digestibilidade e a produção fecal total deve possuir algumas propriedades fundamentais: indigestibilidade total, ser farmacologicamente inativo no trato digestivo, taxa de passagem no trato digestivo uniforme, poder ser determinado quimicamente e, de preferência, ser uma substância naturalmente presente nos alimentos.

Com base nestas informações, o objetivo deste trabalho foi avaliar a acurácia, a precisão e a robustez de diferentes indicadores internos na predição da digestibilidade aparente total da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), energia bruta (EB) e fibra em detergente neutro (FDN) para equinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Digestibilidade e caracterização química

O termo digestibilidade pode ser definido como a proporção do alimento consumido que é digerida e metabolizada pelo animal (WHITEMAN, 1980). Tendo a quantidade consumida pelo animal, a porção que não foi recuperada nas fezes, recebe o nome de coeficiente de digestibilidade (ANDRIGUETTO et al., 2002). A digestibilidade dos alimentos é medida segundo cada espécie animal, usando técnicas distintas de campo e de laboratório.

O sistema mais utilizado para a caracterização química dos nutrientes dos alimentos é o chamado sistema de Weende, no qual se tem a análise. As análises mais frequentemente realizadas são para a determinação de: matéria seca (MS), proteína bruta (PB), gordura ou extrato etéreo (EE), fibra bruta (FB), extrato (ou extrativo) não-nitrogenado (ENN), e cinza ou matéria mineral (MM).

No sistema de Weende, para a análise de fibra bruta, durante a digestão básica, ocorre solubilização parcial da lignina e da hemicelulose contidas na amostra. Um grande erro, pois essa solubilidade parcial pode fazer com que a digestibilidade do ENN, seja menor do que a da fibra bruta.

Van Soest (1991), tentando minimizar o problema da porção fibrosa, desenvolveu uma divisão dos componentes da amostra analisada em conteúdo celular, onde fazendo uso de soluções neutras e ácidas, foi possível a separação entre conteúdo celular e parede celular, separando com maior precisão a fração fibrosa da amostra.

De acordo com Merchen (1988), o objetivo de experimentos de digestibilidade é obter de forma acurada a quantidade de alimento fornecido e a quantidade excretada em determinado período de tempo.

2.2. Avaliação da digestibilidade

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

O método *in situ* consiste no desaparecimento da amostra de alimento acondicionada em sacos de náilon ou outro material sintético, incubados em compartimentos do trato digestório onde ocorre algum processo fermentativo microbiano, por diferentes períodos de tempo. Seu maior uso é em estudos com ruminantes, contudo também pode ser adotado como método para estudo em monogástricos. Como vantagem, o método apresenta o fato do processo de degradação ocorrer em condições reais do compartimento em questão (rúmen ou intestino grosso). É uma técnica amplamente utilizada em estudos para o desaparecimento de diferentes frações do alimento, fornecendo informações utilizadas na elaboração de sistemas para predição das exigências nutricionais dos animais (BERCHIELLI et al., 2006).

Os métodos *in vitro* devem ser capazes de representar o processo de digestão que ocorre no animal, para estimar quantitativamente a taxa e o grau de digestão similar aos obtidos *in vivo*. A metodologia mais utilizada na predição da digestibilidade é ainda hoje a descrita por Tilley e Terry (1963). Essa técnica consiste na simulação da digestibilidade ruminal/intestinal por 48 horas, seguida de uma digestão com pepsina e ácido fraco (pH 2). Nesse caso, o resíduo indigestível engloba microrganismos e outros compostos insolúveis em pepsina. Para ruminantes, a técnica normalmente exige um animal doador canulado, para coleta do líquido ruminal, mas também é possível a preparação do inóculo com fezes (o que possibilita o uso da técnica para monogástricos), onde posteriormente será utilizado no laboratório para incubação das amostras. O objetivo inicial da condução do trabalho irá determinar o tempo de incubação necessário para obtenção da digestibilidade desejada. O valor da digestibilidade *in vitro* do alimento em alto nível de consumo pode ser obtido em incubações por períodos mais curtos, enquanto incubações por períodos acima de 96 horas podem ser necessárias para obtenção da digestibilidade potencial em forragens (VAN SOEST, 1994)

Muitos são os marcadores internos utilizados também na estimativa da produção fecal e fluxo da digesta duodenal, em especial a cinza insolúvel em ácido (CIA), cinza insolúvel em detergente ácido (CIDA), lignina em detergente ácido (LDA), fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e celulose indigestível (CELi). Entretanto, tais marcadores exigem longo período de incubação, seja *in vitro* ou *in situ* (VAN SOEST, 1994), uma vez que a recuperação de frações indigestíveis do alimento é a base para determinar a concentração dos marcadores internos (BERCHIELLI et al., 2006).

Porém, ensaios de digestibilidade envolvendo coleta total de fezes com equinos, durante o período experimental, quando os animais ficam confinados em condições desfavoráveis à manutenção da espécie, podem ocorrer irregularidades fisiológicas, com influência negativa sobre o processo digestivo (LEWIS, 2000; ARRUDA; RIBEIRO; PEREIRA, 2009).

O uso de indicadores internos na predição da digestibilidade tem conduzido alguns estudos, entretanto não conseguiram encontrar um nutriente que apresente todas as características desejadas para que o indicador apresente acurácia nos dados sem apresentar diferença entre técnicas analíticas usadas para determinação dos nutrientes ou condições experimentais utilizadas.

Os estudos com indicadores internos na produção fecal resumem-se à comparação das estimativas de digestibilidade àquelas observadas pela coleta total de fezes, o que permite a avaliação da acurácia das estimativas, mas não de sua precisão. Neste caso, os coeficientes de digestibilidade obtidos pela coleta total de fezes representam o valor real para aquela resposta e devem ser utilizados como base para os estudos do erro residual, também chamado viés, e das estimativas obtidas com os indicadores, sendo que a avaliação de acurácia e de precisão são fundamentais neste parâmetro (RODRIGUES; GOMES; SIQUEIRA, 2010).

Raros são os estudos que incluíram uma avaliação da robustez dos indicadores na estimativa da digestibilidade dos nutrientes da dieta diante da variação de outros fatores associados às condições experimentais, sejam eles ligados aos animais (como o peso vivo), à dieta (como digestibilidade e relação volumoso:concentrado), ou a ambos (RODRIGUES; GOMES; SIQUEIRA, 2010).

2.3. Indicadores Internos

2.3.1. Fibra em detergente ácido indigestível (FDAi) e fibra em detergente neutro indigestível (FDNi)

As substâncias que estão sendo avaliadas como indicadores internos são os componentes da parede celular, como fibra em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA) indigestíveis, pois a predição da digestibilidade *in vivo* de dietas a base de forragens, podem acabar sofrendo alguns efeitos associativos, como nível de consumo e taxa de passagem, dificultando o uso dessa técnica (PENNING; JOHNSON, 1983; COCHRAN et al., 1986). Tais indicadores podem superestimar os coeficientes de digestão da fração fibrosa da dieta para equinos, tornando as técnicas inadequadas (BERCHIELLI; ANDRADE; FURLAN, 2000). Stein et al. (2006), ao trabalharem com equinos, verificaram que esses indicadores apresentaram boa acurácia e precisão, como indicador indigestível.

Estudos pioneiros com resíduos de fermentação *in vitro* submetidos à extração com detergente neutro ou ácido foram propostos, em pesquisas com ruminantes (LIPPKE, 2002, OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2004; WATANABE et al., 2010).

A técnica de digestão *in vitro* desenvolvida para uso em ruminantes (TILLEY; TERRY, 1963) tem sido adaptada para equinos (ABDOULI; BEM ATTIA, 2007; EARING et al., 2010). Entretanto, as fermentações *in vitro* apresentam limitações inerentes à técnica, o que impossibilita simular todas as situações ocorridas *in vivo* como, efeitos associativos, nível de ingestão e taxa e passagem (LATTIMER et al., 2007).

Zeoula et al. (2002) confirmam que a característica de maior importância de um indicador ideal baseia-se em sua capacidade de resistir à digestão durante a exposição pelo trato gastrointestinal.

Oliveira et al. (2003), avaliando estimativas de coeficientes de digestibilidade de nutrientes, em dietas para equinos, por meio do uso de óxido de cromo (indicador externo), FDAi, FDNi, CELi, LIG, CIDA em relação à coleta total de fezes, concluíram que a FDNi e a FDAi superestimaram os valores dos coeficientes de digestibilidade da fração fibrosa das dietas com diferentes proporções de volumoso.

No mesmo estudo, os autores encontraram taxa de recuperação fecal para a técnica de FDAi de 98,75%. Os coeficientes de digestibilidade aparente para os nutrientes: matéria seca (MS), energia bruta (EB) e FDN, não tiveram diferença significativa.

Oliveira et al. (2012) estudaram a viabilização das técnicas *in vitro* das fibras indigestíveis, utilizando inóculos de líquido ruminal e de fezes equinas para estimar a digestibilidade dos nutrientes em equinos, em comparação ao método de coleta total de fezes. A análise da taxa de recuperação fecal dos indicadores demonstrou ocorrer digestão nula para FDAi, em inóculo com fezes equinas, por ter promovido a melhor recuperação fecal (103,67%). Essa indigestibilidade da FDAi, em fezes equinas, para animais que consumiam feno de *coastcross*, conferiu grande capacidade em prever acuradamente a digestibilidade a esse indicador.

Em contrapartida, as determinações da FDAi e FDNi em líquido ruminal resultaram nas piores taxas de recuperação com média de 85,85%, o que denota significativo desaparecimento desses indicadores durante o trânsito gastrointestinal. Ainda assim, essa taxa foi inferior ao verificado na literatura para diferentes volumosos na alimentação de ruminantes, em que se utilizou da técnica *in vitro* em líquido ruminal, o

que resultou nos valores entre 90,8 e 94,1% para FDNi e entre 87,7 e 89,6% para FDAi (LIPPKE; ELLIS; JACOBS, 1986; MAEDA et al., 2011). Essa inabilidade da técnica com líquido ruminal, como inóculo na incubação *in vitro*, em recuperar quantitativamente a FDNi e a FDAi demonstra sua fragilidade em prever a digestibilidade aparente de nutrientes do feno de *coastcross* quando fornecido exclusivamente na alimentação de equinos.

Os autores, então concluíram que as fezes equinas podem ser utilizadas como inóculo em substituição ao líquido ruminal, na obtenção dos indicadores indigestíveis por meio de incubação *in vitro*, o que a torna uma técnica promissora na experimentação com cavalos. Adicionalmente, a FDAi e a FDNi, mediante o uso de fezes equinas como inóculo, apresentaram-se como os melhores indicadores para estimar os coeficientes de digestibilidade da MS, MO, PB, FDN e amido para equinos alimentados exclusivamente com feno de *coastcross* ou com dieta mista. O líquido ruminal utilizado na incubação *in vitro* para obtenção dos indicadores apresentou baixa taxa de recuperação e, conseqüentemente, digestibilidade aparente de nutrientes subestimadas para o feno e feno mais grãos na alimentação dessa espécie animal.

2.3.2. Celulose indigestível (CELi)

Em dois ensaios, com as diferentes relações de concentrado e volumoso, Oliveira et al. (2003) mostraram que a CELi foi o indicador interno mais adequado. A taxa de recuperação fecal superou os 100%. Os teores dos indicadores usados no estudo, FDNi, FDAi, lignina indigestível (LDAi) e CELi nas amostras e nos alimentos, sobras e fezes, foram obtidos após incubação *in vitro*, segundo a metodologia descrita por Cochran et al. (1986).

Os coeficientes de digestibilidade aparente da MS (55,06%), EB (60,01%), FDN (48,18%) e FDA (38,92%) estimados com a CELi e os obtidos com a coleta total de fezes foram similares e diferiram dos valores estimados com a FDNi, FDAi e LDAi. Portanto, a CELi foi o indicador que melhor estimou os coeficientes de digestibilidade dos nutrientes quando comparado ao método da coleta total de fezes.

Resultados semelhantes foram observados por Oliveira (1998), indicando a CELi como o melhor indicador interno para se estimar a digestibilidade aparente de dietas para equinos. Almeida et al. (1999) não encontraram diferenças significativas entre os coeficientes de digestibilidade da MS obtidos com CELi comparados à CTF, tendo encontrado taxa de recuperação para o indicador de 101, 72%.

2.3.3. Lignina em detergente ácido indigestível (LDAi)

A lignina é utilizada como indicador interno, mas, devido à sua indefinição de composição química e consequente variação dos resultados de análises, tem apresentado estimativas variáveis dos coeficientes de digestibilidade (FAHEY; JUNG, 1983). Esses autores, revisando o uso da lignina como indicador, usaram dietas contendo desde 100% de forragem até 90% de concentrado, podendo, por conseguinte, ser usada como indicador somente quando apresentar alta recuperação fecal.

A recuperação incompleta da lignina foi verificada em ruminantes por vários autores (KOTB; LUCKEY, 1972; FAHEY; JUNG, 1983; CARVALHO, 1989), o que também foi observado por Machado (1992) e Miraglia et al. (1999), em ensaios de digestão com equinos, com 58,3 e 59,0% de recuperação fecal da lignina, respectivamente. Van Soest (1994) verificou digestibilidade aparente de 20 a 40% em gramíneas imaturas e forragens com baixo conteúdo de lignina.

Em equinos, Fonnesbeck (1968) e Maurício (1993) obtiveram resultados insatisfatórios no uso da lignina, como indicador, para estimar a digestibilidade aparente dos nutrientes. De acordo com esses autores, a lignina poderia ser usada como indicador em dietas com alto conteúdo de lignina (acima de 5% na matéria seca).

Segundo Araujo et al.(2000), existem vários fatores que afetam a recuperação desse nutriente. Muntifering (1982) citou as prováveis razões da ineficiência da recuperação da lignina: diferenciação dos monômeros fenólicos da lignina original (digestão verdadeira); digestão aparente obtida pela formação de complexos solúveis lignina-carboidratos; destruição parcial da lignina fecal pelos reagentes usados nos métodos analíticos; e diferenças físicas e/ou químicas entre os alimentos e as fezes na natureza do material definido como lignina.

Mauricio (1993) comparou os valores de digestibilidade de uma dieta composta de feno de capim *coastcross* e concentrado em equinos, estimados por meio da lignina e do óxido crômico, com os obtidos pelo método de coleta total de fezes. Os resultados mostraram que a lignina e óxido crômico subestimaram os coeficientes de digestibilidade aparente da MS, PB, EB, FDN e FDA, devido às suas baixas recuperações. Resultados semelhantes foram obtidos por Machado (1992) com potros alimentados com diferentes combinações de cana-de-açúcar e capim elefante, em que a lignina apresentou recuperação fecal média de 58,33%, permitindo concluir que foi ineficiente para estimar a digestibilidade dos nutrientes em equinos.

Gobesso et al. (2011), avaliando diferentes indicadores para estimar digestibilidade aparente total dos nutrientes em equinos que consumiam concentrados com diferentes tipos de processamento para o milho (triturado, extrusado, floculado e laminado), encontraram valores subestimados para a LDAi na predição da digestibilidade da matéria orgânica (variação entre 57 e 63%). Os autores atribuíram

esse fato à baixa taxa de recuperação fecal do indicador (68,18%), valor próximo ao encontrados por Araujo et al. (2000), Oliveira et al. (2003), Almeida et al. (1997) e Miraglia et al. (1999).

Saliba et al. (2002) não encontraram associação entre o conteúdo de lignina e a digestibilidade aparente, porém observaram variação em até 50% nos resultados conforme as técnicas analíticas utilizadas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a acurácia, a precisão e a robustez da utilização de indicadores internos para a determinação da digestibilidade aparente total de dietas para equinos e compará-los com os coeficientes de digestibilidade aparente total, obtidos pelo método de coleta total de fezes.

3.2. Objetivos Específicos

- I. Comparar os coeficientes de digestibilidade aparente total da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, energia bruta, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido e celulose pelo método de indicadores internos com o método de coleta total de fezes;
- II. Através da acurácia, da precisão e da robustez, avaliar os indicadores internos: fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), lignina em detergente ácido indigestível (LDAi) e celulose indigestível (CELi).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local, animais e período experimental

O experimento foi conduzido no Setor de Equideocultura, do Campus Administrativo de Pirassununga e no Laboratório de Fermentabilidade Ruminal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, no período de setembro de 2012 a julho de 2013.

Foram utilizadas cinco éguas em manutenção, com peso de $406 \pm 76,9$ kg e idade aproximada de 3,5 anos, alojadas em baias individuais. As dietas experimentais foram compostas por 60% de volumoso (feno *coastcross*) e 40% de concentrado. Os concentrados foram elaborados a base de milho, farelo de trigo, farelo de soja, calcário, fosfato bicálcico, premix vitamínico e mineral para equinos, com teores crescentes de inclusão de polpa cítrica: 0, 7, 14, 21 e 28% (Tabela 1), dispostos em quadrado latino 5x5 (cinco dietas e cinco animais), sendo as formulações isoproteicas e isoenergéticas. A composição química das dietas pode ser observada na Tabela 2. As dietas foram formuladas para atender as exigências da categoria animal especificadas pelo *Nutrient Requirements of Horses* (NRC, 2007).

O período experimental foi dividido em cinco períodos, tendo cada período 10 dias para adaptação à dieta, três dias de coleta total de fezes e dois dias de descanso, quando os animais ficaram soltos em piquetes, totalizando 75 dias.

A composição de nutrientes indigestíveis (indicadores internos) nos alimentos (concentrados e feno) pode ser observada na Tabela 3. O cálculo do consumo dos indicadores foi feito para cada animal, dentro do quadrado (animal, período, dieta).

Assim, os indicadores puderam ser analisados de forma precisa dentro do consumo de cada animal por período e por dieta.

Tabela 1. Composição percentual dos concentrados experimentais usadas no ensaio *in vivo* de digestibilidade em equinos

Ingredientes	Níveis de inclusão de Polpa cítrica				
	0%	7%	14%	21%	28%
Milho moído	60,4	60,3	59,0	58,0	55,9
Farelo de soja	3,9	6,2	5,7	7,9	9,4
Farelo de trigo	30,0	21,0	16,0	7,9	1,7
Polpa Cítrica	0,0	7,0	14,0	21,0	28,0
Premix	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Calcário	2,8	2,3	1,8	1,3	0,8
Fosfato bicálcico	1,2	1,63	1,9	2,25	2,5
Sal comum	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8

Fonte: MOREIRA et al. (2013) (dados não publicados)

Tabela 2. Composição química (em % na MS) dos concentrados com teores crescentes de polpa cítrica e do feno usados no ensaio *in vivo* de digestibilidade em equinos

Nutriente	Concentrados					Feno
	0%	7%	14%	21%	28%	
Matéria Seca	88,4	88,6	87,9	88,2	88,2	84,7
Matéria Orgânica	93,2	92,3	93,7	93,9	93,2	93,6
Matéria Mineral	6,7	7,6	6,2	6,1	6,7	6,3
Proteína Bruta	13,9	12,5	13,7	13,9	13,9	12,8
Fibra Bruta	5,7	6,5	5,8	5,9	6,0	31,2
Extrato Étero	3,8	3,0	3,2	3,1	7,7	0,8
Extrato não nitrogenado	69,6	70,2	70,9	70,9	65,4	48,8
Fibra em detergente ácido	5,2	5,7	8,9	7,0	7,6	36,6
Fibra em detergente neutro	22,2	26,0	21,4	26,9	21,7	74,0
Carboidrato não fibroso	56,5	60,1	59,7	62,0	56,1	3,2
Hemicelulose	13,8	10,8	11,6	9,4	9,3	37,3
Celulose	3,3	3,8	6,6	5,0	3,7	30,7
Lignina em detergente ácido	1,7	1,9	1,4	1,7	1,8	6,0
Cálcio	1,6	1,5	1,4	1,4	1,3	n.d.
Fósforo	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	n.d.
Amido	39,0	35,5	34,6	36,5	32,2	n.d.
Energia digestível (kcal/kg)	3393	3266	3382	3374	3594	2182

n.d.: não determinado

Tabela 3. Concentração dos indicadores internos (em % da MS) nos concentrados e no feno usados para alimentação dos animais no ensaio *in vivo*

Indicador	Concentrados					Feno
	0%	7%	14%	21%	28%	
FDNi	9,92	7,11	5,20	4,44	2,92	48,41
FDAi	3,83	3,04	2,06	1,78	1,32	26,73
CELi	2,36	1,75	1,31	1,01	0,79	15,49
LDAi	1,09	0,88	0,39	0,54	0,21	9,98

4.2. Coleta Total de Fezes (CTF)

Para a avaliação da digestibilidade aparente total dos nutrientes, foi realizada coleta total de fezes. A produção diária de fezes foi colhida em sua totalidade, submetida à pesagem e homogeneização e em seguida subtraída alíquota de 10% do peso que foi acondicionada em congelador.

Ao final do protocolo foi gerada uma amostra composta de cada animal na qual foram levadas ao laboratório para análises bromatológicas. As fezes foram pesadas, colocadas em estufa de ventilação forçada a 65°C por 72 horas, para se obter a matéria seca a 65°C. Após este procedimento, as amostras foram novamente pesadas, devidamente moídas em moinho tipo Willey com peneira com furos de 1 mm e acondicionados em recipientes plásticos devidamente identificados. As análises para determinação de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) das fezes foram realizadas segundo a metodologia descrita pela AOAC (1995). As análises de fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN), segundo Van Soest (1991). A determinação da energia bruta foi realizada através de uso de bomba calorimétrica. As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia da FZEA/USP.

A determinação da lignina e a estimativa da celulose foram feitas de forma sequencial, após as análises de FDN e FDA, onde as amostras após digestão com

solução em detergente neutro e ácido foram imersas em H₂SO₄ 72%, lavadas com água quente até a neutralização, secas em estufa, queimadas em forno mufla e pesadas para determinação de lignina em detergente ácido (LDA) e estimativa da celulose (CEL).

4.3. Determinação dos indicadores pelo método de *in vitro*

4.3.1. Pré ensaio

Antes do período experimental da fase de incubação, foi realizado um pré-ensaio para determinar o melhor tempo na avaliação dos indicadores, visto que na literatura, os horários de incubação para determinação de indicadores para predição da digestibilidade de nutrientes em equinos se comparam ao tempo de incubação para degradação de nutrientes em bovinos.

Foram incubados 3,5 g de amostra de feno de Tifton-85 (composição bromatológica: MM = 5,7; FDN = 75,3; FDA = 39,3; CEL = 32,9; e LDA = 5,0% da MS). Os horários testados neste pré-ensaio foram: 96, 120, 144, 168, 192, 216 e 240 horas. Sendo que as amostras foram incubadas simultaneamente e retiradas após as primeiras 96 horas e continuamente de 24 em 24 horas até completar as 240 horas.

4.3.2. Preparação do inóculo

Para a determinação das frações indigestíveis por meio de incubação *in vitro*, foi usada uma incubadora *in vitro* (modelo TE-150, Tecnal). O inóculo foi preparado segundo a metodologia descrita para outros estudos *in vitro*, conforme proposto por Theodorou et al. (1994) e Mauricio et al. (1999).

A preparação do inóculo foi iniciada com coleta de fezes de um equino adulto. Essas foram colhidas direto do reto do animal no período da manhã e levadas diretamente ao laboratório para processamento.

No laboratório, as fezes foram misturadas a solução tampão mineralizada e batidas em liquidificador por 10 segundos, com a intenção de obtenção de inóculo com cerca de 2,5% de MS. Após esta homogenização, as fezes diluídas foram coadas em tecido com porosidade de 35µm e o fluído recolhido e transferido para os balões de fermentação onde se adicionou CO₂ por 15 segundos.

Foram utilizados quatro balões de fermentação no equipamento que se mantiveram a temperatura de 39°C, por 168 horas (período determinado pelo pré-ensaio), lacrados para não entrar O₂, apenas com válvulas de escape para os gases que se formavam devido à fermentação.

As amostras incubadas, tanto as de fezes como os de alimentos, foram pesadas dias antes em sacos de TNT (tecido-não tecido) de porosidade de 100 µm, previamente secos e pesados, com dimensões de 10 por 5 cm. Em cada saco, foram utilizadas 3,5g de amostra, previamente moídas e pré secas.

4.3.3. Determinação dos indicadores internos

Após o período de incubação, os balões de fermentação foram abertos, e os saquinhos lavados com água destilada até ficarem limpos.

Para determinação da FDNi e da FDAi, utilizou-se Determinador de Fibras modelo TE – 149[®] (Tecnal), de forma sequencial. Os saquinhos após digestão com solução detergente neutro foram secos em estufa a 105°C por 4 horas, os pesos foram devidamente anotados e então voltaram para o equipamento para determinação da

FDAi. De volta à estufa a 105°C por 4 horas e os pesos foram anotados. A determinação do FDNi e FDAi foi feita pelos cálculos da análise dos nutrientes.

Com os saquinhos secos e pesados, após a análise de FDAi, foram imersos em H₂SO₄ 72%, homogenizados com bastão de vidro e guardados por uma hora para depois, serem lavados para retirada do ácido com água destilada fervente e cobertos novamente com ácido e guardados por mais uma hora, esse processo foi repetido por três vezes. Então, lavados com água quente até a neutralização, secos em estufas a 105°C, queimados em mufla a 450°C por 3 horas e pesados, para determinação de lignina em detergente ácido indigestível (LDAi) e estimativa da celulose indigestível (CELi).

O coeficiente de digestibilidade aparente da MS (CDMS) foi calculado de acordo com SILVA; LEÃO (1979). Para determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes (CDN) obtidos pelo método indireto, a metodologia usada foi a descrita por (VAN KEULEN; YOUNG, 1977)

$$CDMS = 100 - 100 \times \frac{(\% \text{ do Indicador na dieta})}{(\% \text{ de Indicador nas fezes})}$$

$$CDN = 100 - 100 \times \frac{(\% \text{ de indicador na MS da dieta} \times \% \text{ nutriente nas fezes})}{(\% \text{ de Indicador na MS das fezes} \times \% \text{ nutriente no alimento})}$$

As taxas de recuperação calculadas para correção dos valores dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes com os métodos dos indicadores, foi calculada segundo Stein et al. (2006):

$$TR (\%) = \frac{\text{quantidade de indicador excretado}}{\text{quantidade de indicador ingerido}} \times 100$$

4.4. Análises estatísticas

Os dados de degradabilidade para determinação do melhor horário de incubação para matéria seca, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido foram submetidos à análise de regressão em função do tempo de incubação, utilizando o PROC REG (SAS, 2009).

A acurácia dos indicadores foi avaliada pelo viés médio, que é a diferença entre o valor predito pelo indicador e o valor observado pela coleta total de fezes. Portanto, o indicador mais acurado é aquele que possui um viés médio mais próximo de zero (KOHN et al., 1998). O cálculo do viés médio foi realizado segundo:

$$\text{Viés Médio} = \frac{\sum(\text{predito} - \text{observado})}{n^{\circ} \text{ de observações}}$$

A precisão é a medida de dispersão entre os valores preditos e observados, ou seja, a variabilidade média da distância entre o valor predito e o observado ou ainda, a variabilidade dos vieses (KOHN et al., 1998), que pode ser avaliada pela raiz quadrada média do erro de predição (RQMEP):

$$\text{RQMEP} = \sqrt{\frac{\sum(\text{predito} - \text{observado})^2}{n^{\circ} \text{ observações}}}$$

A precisão da estimativa dos coeficientes de digestibilidade foi avaliada pelo teste de Barlett para homogeneidade das variâncias, aplicado sobre a variância dos vieses. O erro residual é também referido como o erro de predição, excluindo-se o viés médio, calculado pela fórmula:

$$\text{Erro residual} = \sqrt{[RQMEP^2 - (\text{viés médio})^2]}$$

Para se comparar a taxa de recuperação fecal e a acurácia das estimativas de digestibilidade aparente dos nutrientes entre os indicadores, os dados de recuperação e vieses foram submetidos à análise de variância (PROC GLM do SAS) e as médias

comparadas pelo teste Tukey (SAMPAIO, 1998). O teste t para média igual a zero (PROC TTEST do SAS) foi utilizado para avaliar a significância dos vieses médios e as taxas de recuperação foram submetidas ao teste de t para média igual a 100, pelo mesmo procedimento. O nível de significância utilizado foi o de 5%.

Para se comparar a precisão entre os indicadores, os valores do erro residual foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias de Hartley, segundo Ott (1983), comparando-os dois a dois.

Para avaliar o comportamento do erro de predição dos marcadores (vieses) em função da variação dos valores observados de digestibilidade aparente da matéria seca, foi estimada a regressão entre os vieses e a digestibilidade aparente da matéria seca observada (coleta total de fezes), obtendo-se, desta forma, o viés linear (coeficiente angular), o coeficiente de determinação do modelo (R^2) e a significância do viés para cada indicador, pelo procedimento REG do SAS (SAS, 1998), segundo Kohn et al. (1998).

A avaliação da robustez de cada indicador foi obtida regredindo-se o viés em função das variáveis selecionadas (consumo de matéria seca, consumo do indicador e peso vivo), realizada também pelo procedimento REG do SAS (SAS, 2009). A comparação entre os coeficientes angulares das retas foi realizada pela metodologia de comparação de retas, cujo princípio é testar a interação entre a variável selecionada e os indicadores, por meio da análise de variância (teste F) pelo PROC GLM (SAS, 2009), com os indicadores comparados dois a dois (MEYER et al., 2006a; 2006b).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Pré-ensaio

Pela análise de regressão quadrática das degradabilidade em função do tempo, obtiveram-se os coeficientes da equação quadrática. O ponto de inflexão da curva ocorreu por volta de 168 horas de incubação para os diferentes nutrientes, mostrando que a degradação a partir desse tempo de incubação tende não aumentar.

5.2. Taxas de recuperação (TR)

Os indicadores estudados tiveram médias de taxa de recuperação muito próximas a 100%, porém, a CELi apresentou TR maior que 100%, sem diferir da FDNi e FDAi (Tabela 4). A FDNi e FDAi não diferiram entre si ($P>0,05$) e a LDAi, apresentou menor TR que CELi, sem diferir de FDAi e FDNi.

Tabela 4. Recuperação fecal obtida com os indicadores internos para estimativa da digestibilidade da matéria seca em equinos

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

¹ Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

² Coeficiente de variação

³ Probabilidade do teste de t para média igual a 100.

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

Stein et al. (2006) estudaram a recuperação dos indicadores internos em equinos alimentados com concentrado e feno e encontraram valores de 94,49% para CELi e 98,49% para FDAi. Valores superiores para FDAi foram encontrados por Oliveira et al. (2012), em que a TR foi de 103,67%, sendo que a FDNi apresentou valor de 94,08%. Porém, nesse estudo os cavalos consumiam exclusivamente feno *coastcross*. Poucos resultados foram encontrados para a LDAi de forma que se pudesse comparar resultados. A falta de homogeneidade dos métodos de análises são as principais responsáveis pelas divergências de resultados entre pesquisas, o que já foi mencionado por diversos autores (DETMANN et al., 2001; SILVA et al., 2009).

Rodrigues et al. (2010) avaliaram lignina indigestível em ovelhas com dietas próximas as usadas no presente estudo e apresentaram TR de 90,4%.

Gobesso et al. (2011) estudaram a TR para indicadores internos e externos para equinos alimentados a base de feno e concentrado, chegando a um valor de LDAi de 68,18%. Muito abaixo do encontrado neste estudo. A lignina demonstra problemas em sua determinação e, por conseguinte, na recuperação fecal. Baixos índices de recuperação fecal desse nutriente também foram observados por Almeida et al. (1997) e Miraglia et al. (1999). A literatura mostra variação em até 50% nos resultados conforme as técnicas analíticas utilizadas.

5.3. Avaliação dos indicadores internos

Os coeficientes de digestibilidade aparente para matéria seca (CDMS), determinados usando os indicadores encontram-se na Tabela 5. Toda a avaliação dos indicadores foi realizada a partir do modelo baseado na diferença da estimativa do CDMS pelo indicador e do CDMS obtido pela CT, a qual se denominou *viés* (JONKER et al., 1998).

Tabela 5. Acurácia e precisão da estimativa da digestibilidade aparente da matéria seca (DAMS) determinada utilizando-se diferentes indicadores internos

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

¹ Coeficiente de digestibilidade aparente obtido pelos diferentes indicadores.

² Diferença média entre o predito e o observado.

³ Raiz quadrada média do erro de predição.

⁴ Erro residual obtido pela raiz de diferença entre os quadrados e da média do viés.

⁵ Probabilidades do teste de t para média igual a zero dos vieses.

⁶ Slope da função de regressão do viés em função do coeficiente de digestibilidade observado.

⁷ R² da função

⁸ Probabilidade do teste ser igual a zero

Não foi objetivo deste trabalho a discussão sobre a digestibilidade das dietas, mas sim, mostrar se haveria diferença nas estimativas da digestibilidade aparente da matéria seca (DAMS) entre os métodos obtidas pelos diferentes indicadores.

Analizando os vieses médios, pode-se notar que a CELi, FDAi e FDNi possuem menores vieses. O viés médio obtido com FDNi não difere do viés médio obtido pela LDAi. Por consequência de uma menor TR, os indicadores FDNi e LDAi possuem vieses negativos e diferentes de zero ($P < 0,05$), mostrando que estes são menos acurados e subestimam o coeficiente de digestibilidade da MS. Em estudo realizado por Stein (2002), no qual avaliaram CDMS obtido pelo método de coleta total de fezes e pelo uso de indicadores internos para equinos alimentandos com dietas completas, os indicadores CELi e FDAi, assim como no presente estudo, não apresentaram diferença significativa entre as médias dos vieses, caracterizando deste modo, os indicadores mais acurados no estudo.

Quanto à precisão, as variâncias dos vieses ($RQMEP^2$) para os indicadores CELi e LDAi foram maiores que a dos demais indicadores avaliados, pelo teste de Barlett. Segundo Kohn et al. (1998), ocorre superestimativa da falta de precisão caso se avalie apenas a variância dos vieses ($RQMEP^2$), uma vez que a falta de acurácia pode contribuir para uma maior variabilidade. A precisão, corrigida para a falta de acurácia (erro residual), avaliada pelo teste de Hartley, apresentou resultados semelhantes aos encontrados no teste de Barlett. Estes resultados estão relacionados à dificuldade de mensuração da LDAi, que faz com a variância dos vieses para este indicador aumente, assim como a do CELi, uma vez que este é obtido por diferença. Assim, CELi e LDAi, são menos precisos que FDAi e FDNi.

Quando o viés é alto (falta de acurácia), ocorre superestimativa da falta de precisão, ou seja, superestimativa da raiz quadrada média do erro de predição, uma vez

que a distância média entre o valor predito e o observado leva também ao aumento da variabilidade entre o predito e o observado. Portanto, a precisão é mais bem avaliada quando a raiz quadrada média do erro de predição é corrigida para falta de acurácia, gerando assim o erro residual, que é definido como o erro restante no modelo de predição, excluindo-se o erro devido ao viés médio (KOHN et al., 1998).

Regredindo-se os vieses dos indicadores em função do coeficiente de digestibilidade da MS observado, observou-se que os indicadores FDAi, FDNi e LDAi superestimam a digestibilidade quando esta é baixa e passam a subestimar quando esta é superior a 0,4236; 0,3844 e 0,3786, respectivamente. Para o CELi, apesar do coeficiente angular não diferir dos obtidos para FDAi e FDNi, os vieses não são influenciados pelo coeficiente de digestibilidade da matéria seca (Figura 3), sugerindo que este indicador é mais robusto que os demais quando a estes fator.

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

Oliveria et al. (2003), apesar de não avaliarem o efeito da digestibilidade observada sobre o viés médio, observaram taxas de recuperação maiores para FDAi e FDNi em dietas contendo 60% de concentrado que em dietas sem a inclusão de concentrado. Assim, os coeficientes de digestibilidade tenderam a ser superestimados quando o teor de volumoso na dieta foi aumentado, o que pode estar associado à redução da digestibilidade.

Uma explicação plausível para esta relação inversa entre os vieses observados para estes indicadores e a digestibilidade observada é a alteração da qualidade da fibra ingerida pelos animais. Muito provavelmente, as fibras de melhor qualidade, que proporcionam maiores CDMS nestas dietas ricas em fibras, têm uma capacidade maior de serem degradadas. Esta maior degradabilidade parece não ter sido identificada pela metodologia de determinação da concentração dos indicadores utilizada. Assim, a relação entre as concentrações nos alimentos e as concentrações fecais é superestimada, levando à estimativa de coeficientes de digestibilidade menores que os reais. Quando se reduz digestibilidade, especialmente da fração fibrosa, a concentração do indicador no alimento aumenta e a metodologia utilizada passa a superestimá-la.

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

Não houve diferença significativa entre, os coeficientes angulares da regressão dos vieses dos indicadores e as variáveis consumo de matéria seca, consumo de

indicador e peso vivo ($P>0,05$). Tal fato mostra que os indicadores foram robustos para as variáveis estudadas, mantendo sua capacidade de predição da digestibilidade aparente da matéria seca (Tabela 6).

Estes resultados diferem dos encontrados por Gobesso et al. (2011), quando estudaram LDAi na predição da digestibilidade de dietas completas para equinos. Segundo esses autores, a LDAi sofre influência da variável FDAi. O coeficiente de determinação (R^2) alto que encontraram (0,91) demonstra a interferência da FDAi na estimativa da LDAi, pois quanto maior o R^2 , maior a relação entre o viés e a variável. Uma vez que a digestão incompleta pode subestimar as quantidades de FDA, afetando a estimativa de digestibilidade através desse indicador (OLIVEIRA; FONTES; SILVA, 1991).

Tabela 6. Robustez (coeficientes angulares, R^2 e probabilidade) das estimativas da digestibilidade aparente da matéria seca determinada utilizando-se diferentes indicadores internos em equinos

Variável	Indicadores			
	CELi	FDAi	FDNi	LDAi
Consumo de matéria seca				
Coeficiente angular ¹	0,00796	0,00019	0,00086	-0,01851
R^2 [2]	0,05208	0,00014	0,00257	0,13487
P^3	0,33320	0,96010	0,82710	0,12190
Consumo de indicador				
Coeficiente angular ¹	0,03799	0,01257	0,01214	0,00975
R^2 [2]	0,03183	0,05299	0,12659	0,00041
P^3	0,45170	0,32890	0,11340	0,93450
Peso vivo				
Coeficiente angular ¹	0,00026	0,00005	0,00004	-0,00075
R^2 [2]	0,02504	0,00390	0,00289	0,09704
P^3	0,50520	0,79370	0,81700	0,19420

¹ Estimativa do coeficiente angular da equação linear de regressão entre os vieses e a respectiva variável independente.

² Coeficiente de determinação do modelo de regressão linear entre vieses e variável independente.

³ Probabilidade de aceitação da hipótese nula: coeficiente angular igual a zero.

Considerando os conceitos de acurácia, precisão e robustez, o modelo possibilita o mais perfeito conhecimento potencial real do indicador. A forma de avaliação ainda é inovadora, ainda assim, nas condições do trabalho, os indícios apontam que a CELi e a FDAi são os melhores indicadores internos estudados para predizer digestibilidade aparente da MS.

Uma vez que todos os cálculos foram feitos com base na ingestão e excreção da MS, podemos observar pela Tabela 7 que a acurácia e precisão para a predição da digestibilidade aparente dos nutrientes, comportam-se de maneira semelhante ao CDMS.

Ao lado esquerdo da Tabela 7, tem-se os valores de acurácia e precisão dos diferentes nutrientes sem correção pela TR. Pode-se notar, que a acurácia da CELi, FDAi e FDNi, não diferem entre si ($P>0,05$) para predição da MO, PB e EB. Para predição da digestibilidade de todos os nutrientes avaliados, LDAi foi indicador menos acurado.

Para MO e PB, o viés médio observado para o indicador FDNi difere de zero e não difere do viés do indicador LDAi, mostrando-se menos acurado que os demais indicadores. Fato este que pode ser explicado pela menor TR observada para os indicadores FDNi e LDAi, seguindo a mesma tendência do que ocorre com o CDMS.

Tabela 7. Acurácia e precisão na predição da digestibilidade dos nutrientes por diferentes indicadores internos, com ou sem aplicação da taxa de recuperação, em equinos

Variável	Sem aplicação da taxa de recuperação				Com aplicação da taxa de recuperação			
	CELi	FDAi	FDNi	LDAi	CELi	FDAi	FDNi	LDAi
<i>Matéria orgânica</i>								
Viés médio ¹	-0,01009 ^a	-0,0178 ^a	-0,0440 ^{a,b}	-0,1035 ^b	-0,0179	-0,0147	-0,0208	-0,0366
P[2]	0,54260	0,081	<0.001	0,003	0,290	0,144	0,053	0,201
Erro residual ³	0,07017 ^{A,B}	0,0393 ^B	0,0159 ^C	0,0728 ^A	0,0695 ^{A,B}	0,0405 ^B	0,0413 ^B	0,1109 ^A
<i>Proteína Bruta</i>								
Viés médio ¹	-0,00348 ^a	-0,0158 ^a	-0,0373 ^{a,b}	-0,0760 ^b	-0,0153	-0,0133	-0,0188	-0,0236
P[2]	0,78270	0,050	<0.001	0,006	0,261	0,092	0,038	0,300
Erro residual ³	0,05255 ^A	0,0298 ^B	0,0140 ^C	0,0639 ^A	0,0553 ^{A,B}	0,0309 ^B	0,0338 ^B	0,0877 ^A
<i>Energia Bruta</i>								
Viés médio ¹	-0,00938 ^a	-0,0179 ^a	-0,0465 ^a	-0,1109 ^b	-0,0179	-0,0145	-0,0212	-0,0380
P[2]	0,60520	0,106	<0.001	0,003	0,261	0,092	0,038	0,300
Erro residual ³	0,07717 ^{A,B}	0,0436 ^B	0,0184 ^C	0,0800 ^A	0,0765 ^{A,B}	0,0448 ^B	0,0450 ^B	0,1209 ^A
<i>Fibra em detergente neutro</i>								
Viés médio ¹	0,00474	-0,0134	-0,0423	-0,0864	-0,0046	-0,0042	-0,0120	-0,0212
P[2]	0,81910	0,276	0,011	0,070	0,816	0,716	0,343	0,598
Erro residual ³	0,08653 ^B	0,0456 ^C	0,0436 ^C	0,1467 ^A	0,0849 ^B	0,0509 ^B	0,0552 ^B	0,1560 ^A

¹Viés médio para a estimativa da digestibilidade dos nutrientes. Médias com letras minúsculas sobrescritas não diferem entre si pelo teste de Tukey a %5 de significância.

²Probabilidade do viés não diferir de zero pelo teste de t.

³Médias com letras maiúsculas e semelhantes sobrescritas não diferem entre si pelo teste de Hartley a 5% de significância.

A predição da digestibilidade aparente do FDN apresentou maiores erros residuais, com isso os vieses médios não apresentaram diferença entre si, entre os diferentes indicadores, mesmo corrigindo para a falta de acurácia.

A aplicação da TR média foi eficiente para reduzir o viés médio para predição da digestibilidade dos nutrientes, fazendo com que as predições ficassem mais acuradas e os vieses não diferissem entre si.

6. CONCLUSÕES

Nas condições em que o trabalho foi realizado, pode-se concluir que os indicadores mais acurados foram FDAi e CELi, seguidos da FDNi e LDAi. Quanto à precisão, FDAi e FDNi foram mais precisos que CELi e LDAi.

Na escolha de um indicador mais adequado, deve-se considerar não apenas sua acurácia (proximidade do valor real) e precisão (variabilidade), mas também o modo e a extensão em que seu viés é influenciado pela variação dos fatores relacionados às condições experimentais. Sendo assim, a CELi foi o indicador mais robusto, uma vez que seus vieses não sofrem influência do coeficiente de digestibilidade observado.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A FDAi parece ser o indicador mais indicado para se estabelecer valores de referências para digestibilidade. A CELi parece ser o mais indicado para se comparar fatores dentro o um mesmo estudo. Porém, devem-se ressaltar os problemas analíticos que podemos ter nas duas análises, visto que a celulose indigestível pode ser calculada pela estimativa entre fibra em detergente ácido e lignina em detergente ácido.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOULI, H.; BEN ATTIA, S. Evaluation of a two-stage in vitro technique for timating digestibility of equine feeds using horse faeces as the source of microbial inoculums. **Animal Feed Science and Technology** Amsterdam, v. 132, p. 155-162, 2007.

ALMEIDA, F. Q. et al. Digestibilidade aparente e verdadeira pré-cecal e total da proteína em dietas com diferentes níveis proteicos em equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 521-529, 1998.

ALMEIDA, F. Q. et al. Digestão pré cecal em equinos: 2- estimativa do fluxo da digesta ileal com indicadores internos e externos. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34,. 1997, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: SBZ, 1997.

ALMEIDA, M.I.V. et al. Composição química e predição do valor nutritivo de dietas para equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 28, n. 6, p. 1268-1278, 1999.

ANDRIGUETTO, J. M. et al. Nutrição animal: as bases e os fundamentos da nutrição animal: os alimentos. In: ANDRIGUETTO, J. M. et al. **Nutrição Animal**. São Paulo: Nobel, 2002.

ARRUDA, A. M. V.; RIBEIRO, L. B.; PEREIRA, E. S. Avaliação de alimentos alternativos para cavalos adultos da raça crioulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 1, p. 61-68, 2009.

ALVARENGA, R. C. **Fluxo de matéria seca ileal, metodologias de coleta de digesta e digestibilidade aparente total e parcial em equinos**. 1996. 59 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

ARAÚJO, K. V. et al. Comparação entre indicadores internos e o método de coleta total na determinação da digestibilidade dos nutrientes de alimentos volumosos, em equinos.

Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 754-751, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025 p.

BERCHIELLI, T. T. et al. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. 583 p.

BERCHIELLI, T. T.; ANDRADE, P.; FURLAN, C. L. Avaliação de indicadores internos em ensaios de digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 830-833, 2000.

CARVALHO, F. F. R. **Efeitos de diferentes níveis de proteína bruta para cabras em lactação e uso de indicadores internos para estimar a digestibilidade dos nutrientes**. 1989. 72 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1989.

COCHRAN, R.C. Predicting digestibility of different diets with internal markers: evaluation of four potential markers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 63, p. 1476–1483, 1986.

DETMANN, E. et al. Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 1600-1609, 2001.

EARING, J. E. et al. Comparison of in vitro digestibility estimates using the DaisyII incubator with in vivo digestibility estimates in horses. **Journal Animal Science**, Savoy, v. 12, n. 88, p. 3954-3963, 2010.

FAHEY, G. C.; JUNG, H. G. Lignin as a marker in digestion studies: a review. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 57, n. 1, p. 220-225, 1983.

- FONNESBECK, P. V. Digestion of soluble and fibrous carbohydrate of forage by horse. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 7, n. 6, p. 1336-1344, 1968.
- GOBESSO, A. A. O. et al. Indicadores para estimativa da digestibilidade aparente total em equinos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 12, n. 1, p. 264-274 jan./mar. 2011.
- JONKER, J. S. et al. Using milk rea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactanting dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 81, n. 10, p. 2681 – 2692, 1998.
- KOHN, R. A.; KALSCHUR, K. F.; HANIGAN, M. Evaluation of models for balancing the protein requirements of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 81, n. 12, p. 3401-3414, 1998.
- KOTB, A. K.; LUCKEY, T. D. Markers in nutrition. **Nutrition Abstract Review**, Oxfordshire, v. 42, p. 813-845, 1972.
- LATTIMER, J. M. et al. Effect of yeast culture on in vitro fermentation of a high-concentrate or high-fiber diet using equine fecal inoculum in a Daisy II incubator. **Journal Animal Science**, Savoy, v. 25, n. 5, p. 655-683, 2007.
- LEWIS, L. D. **Nutrição clínica equina: alimentação e cuidados**. São Paulo: Rocca, 2000. 710 p.
- LIPPKE, H. Estimation of forage intake by ruminants on pasture. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 3, p. 869-872, 2002.
- LIPPKE, H.; ELLIS, W. C.; JACOBS, B. F. Recovery of indigestible fiber from feces of sheep and cattle on forage diets. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 69, n. 2, p. 403-412, 1986.

MAEDA, E. M. Avaliação de indicadores usados nos estudos de ingestão e digestibilidade em bovinos e bubalinos. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 60, n. 229, p. 123-131, 2011.

MACHADO, H. M. **Efeitos de diferentes combinações de capimelefante (*Pennisetum purpureum*, Schum): cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.) sobre a digestibilidade em eqüinos, utilizando diferentes metodologias de determinação**. 1992. 71 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.

MARTIN-ROSSET, W.; DULPHY, J. P. Digestibility interactions between forages and concentrates in horses: Influence of feeding level – comparison with sheep. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 17, p. 263–276, 1987.

MAURÍCIO, R. M. **Determinação da digestibilidade aparente em eqüídeos através do óxido crômico, da lignina e da coleta total das fezes**. 1993. 62 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Viçosa, 1993.

MAURICIO, R. M. et al. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 79, p. 321–330, 1999.

MAYNARD, L. A. et al. **Animal nutrition**. 7. ed. New York: McGraw-Hill, 1979. p. 44-46.

MERCHEN, N. R. Digestion, absorption and excretion in ruminants. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. 2. ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1988. P. 172-201.

MEYER, P. M. et al. Fatores não-nutricionais e concentração de nitrogênio uréico no leite de vacas Holandesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 3, p. 1114-1121, 2006a.

MEYER, P. M. et al. Validação de modelos de predição de nitrogênio uréico no leite, estimando-se o consumo individual pelo consumo do rebanho. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 73-79, 2006b.

MIRAGLIA, N. et al. Studies of apparent digestibility in horses and use of internal markers. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 60, p. 21-25, 1999.

MUNTIFERING, R. B. Evaluation of various lignin assays for determining ruminal digestion of roughages by lambs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 55, n. 2, p. 432-438, 1982.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THE NATIONAL ACADEMIES (NRC). **Nutrient requirements of horses**. 6th ed. Washington DC: The National Academies Press, 2007. 341 p.

OLIVEIRA, A. A. M. A. et al. Digestão total e pré-cecal dos nutrientes em potros fistulados no íleo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 331-337, 1998.

OLIVEIRA, C. A. A. et al. Estimativa da digestibilidade aparente de nutrientes em dietas para equinos com uso de óxido crômico e indicadores internos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, supl. 1, p. 1681-1689, 2003.

OLIVEIRA, K. et al. Fezes equina como fonte de inóculo na obtenção de indicadores indigestíveis para estimar a digestibilidade em equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 13, n. 2, p. 410-423, abr./jun. 2012.

OLIVEIRA JÚNIOR, R. C. Avaliação de indicadores para estimar a digestibilidade dos nutrientes em novilhos nelore alimentados com dietas contendo alto teor de concentrado e fontes nitrogenadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 3, p. 749-758, 2004.

OLIVEIRA, R. F. M.; FONTES, C. A. A.; SILVA, J. F. C. Estudo da recuperação fecal de oxido crômico e dos indicadores internos cinza insolúvel, cinza insolúvel em detergente ácido e lignina em períodos de coleta de dois a sete dias em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 20, n. 5, p. 522-31, 1991.

ØRSKOV, E. R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubated measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, Belgrade, v. 92, p. 499-503, 1979.

OTT, R. L. **An introduction to statistical methods and data analysis**. Wadsworth: Duxbury Press, 1983. 354 p.

PENNING, P. D., JONHSON, R. H. The use of internal markers to estimate herbage digestibility and intake. 2. Indigestible acid insoluble fibre. **Journal of Agricultural Science**, Belgrade, v. 100, n. 1, p. 133-138, 1983.

RODRIGUES, P. H. M. et al. Acurácia, precisão e robustez das estimativas da digestibilidade aparente da matéria seca determinada com uso de indicadores em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 5, p. 1118-1126, 2010.

SALIBA, E. O. S. Lignina isolada da palha de milho utilizada como indicador em ensaios de digestibilidade. Estudo comparativo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54. n. 1, p. 52-56, 2002.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária, 1998. 221 p.

- SILVA, J. F. C.; LEÃO, M. I. **Fundamentos de nutrição de ruminantes**. Piracicaba: Livroceres, 1979. 384 p.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 235 p.
- SILVA, V. P. et al. Digestibilidade dos nutrientes de alimentos volumosos determinada pela técnica dos sacos móveis em equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 1, p. 82-89, 2009.
- SIQUEIRA, R. F. Uso da cutina na estimativa da digestibilidade aparente de dietas para equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 6, p. 1373-1381, 2009.
- STEIN, R. B. S. **Avaliação de métodos para determinação da digestibilidade aparente utilizando farelo de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora* (Swartz) D.C) em equinos**. 2002. 69 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2002.
- STEIN, R. B. S. et al. Estimativa da digestibilidade aparente da matéria seca por meio de indicadores internos em equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 2, p. 504-511, 2006.
- THEODOROU, M. K. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 48, p. 185–197, 1994.
- TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A twostage technique for the “in vitro” digestion of forage crops. **Journal British of Grassland Society**, West Sussex, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.

VAN KEULEN, J.; YOUNG, B. A. Evaluation of acid insoluble ash as a natural marker for digestibility studies. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 44, p. 282-287, 1977.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Comstock Publ. Association, 1994. 476 p.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. P.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VARLOUD, M. et al. Partial and total apparent digestibility of dietary carbohydrates in horses as affected by the diet. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 79, p. 61–72, 2004.

WATANABE, P. H. Indicadores internos indigestíveis para a estimativa das digestibilidades de dietas à base de coprodutos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.11, n. 3, p. 849-857, 2010.

WEISS, W. P. et al. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 39, p. 95-110, 1992.

WHITEMAN, P. C. **Tropical Pasture Science**. New York: Oxford University Press, 1980. 392 p.

ZEOULA, L. M. Recuperação fecal de indicadores internos avaliados em ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 1865-1874, 2002.