

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

Mixed nonlinear models in ruminal *in situ* degradability trials

Simone Daniela Sartorio de Medeiros¹ , César Gonçalves de Lima² , Taciana Villela Savian³ , Euclides Braga Malheiros⁴ , Simone Silmara Werner⁵ 

¹Centro Tecnológico, INE/UFSC - Trindade, Florianópolis, SC, Brasil.

²Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, ZAB/USP, Pirassununga, SP, Brasil.

³Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", LCE/USP, Piracicaba, SP, Brasil.

⁴Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

⁵Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, EPAGRI, Lages, SC, Brasil.

*Correspondente - sisartorio@gmail.com

Resumo

Métodos clássicos de análise de modelos não lineares são amplamente utilizados em estudos da cinética de degradação ruminal. Como esse tipo de estudo envolve medidas repetidas na mesma unidade experimental, propõe-se o uso de modelos não lineares mistos (MNLM), buscando resolver os problemas de heterogeneidade de variâncias das respostas, de correlação entre as medidas repetidas e a consequente falta de esfericidade da matriz de covariâncias. Os objetivos deste trabalho envolvem apresentar uma avaliação da aplicabilidade dos MNLM na estimação de parâmetros para descrever a cinética de degradação ruminal *in situ* da matéria seca de fenos de capim-Tifton 85 e comparar os seus resultados com os obtidos da análise usual realizada em duas fases. Os novilhos utilizados no ensaio foram alimentados com rações compostas por três diferentes combinações de volumoso e concentrado e dois fenos com diferentes qualidades nutricionais. A abordagem proposta mostrou-se tão efetiva quanto a tradicional para a estimação dos parâmetros do modelo. Contudo, ela modela de forma adequada a correlação entre os dados longitudinais, o que pode afetar as estimativas obtidas, o erro padrão associado a elas e, potencialmente, alterar os resultados das inferências. É bastante atraente quando a pesquisa busca entender o comportamento do processo da degradação dos alimentos ao longo dos tempos de incubação.

Palavras-chave: Cinética de degradação ruminal; Dados longitudinais; Efeitos aleatórios; Matéria seca; Matriz de variâncias e covariâncias.

Abstract

Classical methods of analysis of nonlinear models are widely used in studies of ruminal degradation kinetics. As this type of study involves repeated measurements in the same experimental unit, the use of mixed nonlinear models (MNLM) is proposed, in order to solve problems of heterogeneity of variances of the responses, correlation among repeated measurements and consequent lack of sphericity in the

Seção: Zootecnia

Recebido

9 de março de 2019.

Aceito

7 de maio de 2019.

Publicado

16 de junho de 2020.

www.revistas.ufg.br/vet

Como citar - disponível no site, na página do artigo.

covariance matrix. The aims of this work are to present an evaluation of the applicability of MNLM in the estimation of parameters to describe the *in situ* ruminal degradation kinetics of the dry matter of Tifton 85 hay and to compare the results with those obtained from the usual analysis in two-phases. The steers used in the trial were fed diets composed of three different combinations of roughage and concentrate and two hays with different nutritional qualities. The proposed approach was proven as effective as the traditional one for estimating model parameters. However, it adequately models the correlation among the longitudinal data, which can affect the estimates obtained, the standard error associated with them and potentially change the results of the inferences. It is quite attractive when the research seeks to understand the behavior of the process of food degradation throughout the incubation times.

Keywords: Ruminal degradation kinetics; Longitudinal data; Covariance matrix; Random effects; Dry matter.

Introdução

O conhecimento do processo de degradação dos alimentos pelos microrganismos do rúmen é importante em estudos de avaliação de alimentos para ruminantes, pois o conhecimento do valor nutritivo potencial dos alimentos, por meio da degradação ruminal, permite o seu emprego racional como alimento único ou como ingrediente de misturas mais complexas^(1,2).

O consumo alimentar é altamente correlacionado com a sua composição nutricional e com a digestibilidade, uma vez que a regulação fisiológica ocorre quando há o aumento de consumo de matéria seca com o aumento da digestibilidade, corroborando a saciedade do animal^(3,4).

Dentre as técnicas empregadas para avaliar a degradação ruminal dos alimentos, a técnica *in situ* tem sido a mais extensivamente utilizada, a qual consiste em determinar o desaparecimento de componentes da amostra de alimentos acondicionados em sacos de náilon incubados no rúmen, por períodos variáveis⁽⁵⁾. Embora não permita que o alimento sofra todos os eventos digestivos, como mastigação e ruminação, de acordo com Pereira et al.⁽⁶⁾, o extenso uso dessa técnica está ligado à sua rápida e fácil execução, pois requer uma pequena quantidade de amostra do alimento-teste, possibilita sua exposição ao ambiente ruminal, além dos seus resultados serem próximos aos encontrados com ensaio *in vivo*.

Os modelos não lineares são amplamente utilizados em estudos que buscam estimar os parâmetros da cinética de degradação ruminal *in situ*⁽⁷⁾. Porém, devido à grande quantidade de fatores envolvidos na realização desses experimentos, diferentes procedimentos e modelos de análises podem ser utilizados^(6,8-12). Como esses estudos envolvem dados longitudinais, pois as medidas de degradação são obtidas

sistematicamente ao longo do tempo nas mesmas unidades experimentais, espera-se que exista correlação não nula entre as medidas sucessivas e heterogeneidade das variâncias entre as medidas feitas nas diversas ocasiões. Esses aspectos não são levados em conta nos métodos clássicos de estimação e de análise univariada de variância, o que pode alterar os resultados das inferências feitas sobre os parâmetros do modelo. Pasternak e Shalev⁽¹³⁾ afirmaram que o simples ajuste de uma regressão não linear a dados longitudinais pode ser ineficiente, uma vez que não considera a heterogeneidade de variâncias. Sartorio⁽¹⁴⁾ e Carvalho et al.⁽¹⁵⁾, dentre outros, afirmaram que a análise tradicional de dados realizada em duas fases^(5,8,9) também deve ser ineficiente, porque, além de não considerar a heterogeneidade das variâncias, também não leva em conta a possível correlação entre as medidas repetidas ao longo do tempo, o que fere a premissa da esfericidade da estrutura de variâncias e covariâncias, que é exigência dos modelos de regressão clássicos. Uma abordagem mais atual para análise de dados longitudinais com comportamento não linear para as respostas médias envolve o uso de modelos não lineares mistos (MNLMM), que ainda são pouco empregados na análise de ensaios de degradabilidade ruminal⁽¹⁴⁾. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é apresentar e avaliar a aplicabilidade de modelos não lineares mistos para descrever a cinética de degradação ruminal *in situ* de fenos de capim-Tifton 85, em novilhos alimentados com rações compostas por diferentes combinações de volumoso:concentrado e fenos de duas diferentes qualidades nutricionais, comparando os seus resultados com os obtidos da análise tradicional, que é realizada em duas fases.

Materiais e métodos

Os dados foram obtidos do experimento desenvolvido por Feitosa et al.⁽¹⁷⁾, na Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Campus de Jaboticabal, no período de maio de 2001 a dezembro de 2002.

Foram utilizados seis novilhos mestiços (*Bos taurus* × *Bos taurus indicus*) canulados no rúmen, com peso médio de 550±35kg e aproximadamente três anos e meio de idade. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em baias individuais, providos de bebedouro e comedouro, recebendo dietas compostas de feno de capim-Tifton 85 (TIF) e concentrado em duas refeições diárias, às 7h30 e às 18h30. A quantidade de alimento fornecida foi estabelecida em função do consumo máximo diário verificado com a dieta de maior porcentagem do volumoso e de pior qualidade nutricional. Os animais foram adaptados aos tratamentos durante 14 dias, seguidos de 10 dias de coleta de amostras para cada período experimental.

As seis rações formuladas foram compostas pela combinação de três diferentes relações, 70:30, 50:50 e 30:70 de volumoso (V) e concentrado (C), com base na matéria seca, e dois fenos de capim-Tifton 85 com 4% (TIF4) e 10% (TIF10) de proteína bruta, ambos picados em partículas de 5 mm. O concentrado foi composto de casca de soja (*Glycine max*L.), milho (*Zea mays*L.) moído e farelo de girassol (*Helianthus annuus* L.). Os tratamentos foram identificados como: V70TIF4, V70TIF10, V50TIF4, V50TIF10, V30TIF4

e V30TIF10.

A degradabilidade ruminal da matéria seca (MS) foi determinada pela técnica *in situ*, usando-se sacos confeccionados em náilon, medindo aproximadamente 14×7 cm, com poros de 50µm, contendo amostras de cada uma das dietas experimentais moídas com granulometria de 5 mm. Foram incubados 4,5g de amostra (base na MS), amarrados em elos de uma corrente de aço para todos os tempos de incubação. Os dez tempos de incubação no rúmen foram de 120, 96, 84, 72, 60, 48, 24, 12, 6 e 3 horas com duas réplicas para cada horário e animal, adotando-se o sistema de colocação dos sacos de náilon nos tempos de incubação e retirada simultânea de todos os sacos ao final do período.

Após a incubação, os sacos de náilon foram pré-lavados em água corrente para a retirada do excesso de conteúdo ruminal e colocados em água com gelo por 20 min. Em seguida, foram lavados durante 15 minutos em uma máquina do tipo tanquinho (sendo que a água da máquina foi trocada a cada cinco minutos). Após esta etapa, os sacos com os resíduos foram secos em estufa a 65°C, com circulação forçada de ar durante 48 horas.

Os sacos com os resíduos secos foram pesados e seus resíduos moídos em moinho de facas, com peneira de 1mm de diâmetro, armazenados em frascos com tampa e identificados. As amostras foram secas em estufa regulada a 105°C por 12 horas e as análises para determinação da matéria seca foram realizadas no Laboratório de Ingredientes e Gases Poluentes (LIGAP) do Departamento de Zootecnia da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal – SP.

O experimento básico foi planejado em quadrado latino 6×6 com seis animais em seis períodos experimentais distintos, recebendo um dos seis tratamentos (V70TIF4, V70TIF10, V50TIF4, V50TIF10, V30TIF4 e V30TIF10). Em todas as unidades experimentais, foram feitas as medidas repetidas ao longo do tempo. Dentre as características avaliadas nas amostras, a variável resposta considerada nesse trabalho foi a porcentagem de desaparecimento da matéria seca (%MS).

Admitiu-se que o comportamento não linear da porcentagem de desaparecimento da matéria seca (%MS) ao longo dos tempos de incubação pode ser bem explicado pelo modelo de Orskov e McDonald⁽¹⁶⁾. Assim, a %MS avaliada no instante x_{ij} , no i -ésimo animal que recebeu o κ -ésimo tratamento no j -ésimo período, para $i, j, \kappa = 1, 2, \dots, 6$, pode ser expressa por:

$$y_{ijk} = \beta_{1\kappa} + \beta_{2\kappa}[1 - \exp(-\beta_{3\kappa} x_{ij})] + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

em que $\beta_{1\kappa}$ representa a fração rapidamente solúvel das parcelas que receberam o tratamento κ , $\beta_{2\kappa}$ é a fração que pode ser degradada, se houver tempo, das parcelas que receberam o tratamento κ , $\beta_{3\kappa}$ é a taxa de degradação da fração das parcelas que receberam o tratamento κ e ε_{ijk} é o erro experimental associado à observação y_{ijk} . Admitiu-se que $\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma_{\varepsilon}^2)$, ou seja, as medidas repetidas nas mesmas unidades experimentais são independentes e a variância é constante em todos os tratamentos e períodos.

Do modelo (1) derivam parâmetros importantes para o balanceamento de rações, como a degradabilidade potencial, definida como $PD = \beta_1 + \beta_2$, e a degradabilidade efetiva (ED) que é calculada como: $DE_{5\%} = \beta_1 + (\beta_2\beta_3)/(\beta_3 + c)$, em que $c = 5\%/hora$ é a taxa de passagem das partículas no rúmen para animais com médio consumo.

A metodologia denominada análise usual em duas fases foi a mesma utilizada nos trabalhos de Santoro et al.⁽⁸⁾; Teixeira et al.⁽⁵⁾ e Jobim et al.⁽⁹⁾, dentre outros. Na primeira fase, ajustou-se o modelo de Orskov e McDonald⁽¹⁶⁾ para os dados de %MS de cada unidade experimental e com as estimativas dos seus parâmetros ($\beta_{1\kappa}$, $\beta_{2\kappa}$, $\beta_{3\kappa}$) criou-se uma nova planilha de dados. Na segunda fase, essas estimativas foram utilizadas como variáveis respostas em uma série de três análises de variância univariadas (ANOVA) independentes tendo como covariáveis os fatores associados ao delineamento experimental (Animal, Período e o fator de Tratamento), que até o momento não foram incorporados na análise. Desta forma tem-se, para $u = 1, 2, 3$ o modelo:

$$\hat{\beta} = \mu + A_{ui} + P_{uj} + T_{u\kappa} + \varepsilon_{ij\kappa} \quad (2)$$

em que μ é uma constante comum a todas as observações; A_{ui} é o efeito do i -ésimo animal na u -ésima variável resposta; P_{uj} é o efeito do j -ésimo período na u -ésima variável resposta; $T_{u\kappa}$ é o efeito do κ -ésimo tratamento na u -ésima variável resposta e $\varepsilon_{ij\kappa}$ é o erro experimental associado à u -ésima variável medida no i -ésimo animal, que no j -ésimo período que recebeu o tratamento κ , para $i, j, \kappa = 1, 2, \dots, g$ e g é o número de tratamentos envolvidos no ensaio. Quando a hipótese de igualdade das médias dos tratamentos for rejeitada ($p < 0,05$), elas podem ser comparadas utilizando um teste de comparações múltiplas, como o teste de Tukey, por exemplo.

A análise utilizando o modelo não linear misto (MNLM) foi realizada como descrita por Lindstrom e Bates⁽¹⁸⁾ e utilizada por Gómez, Muñoz e Betancur⁽¹⁹⁾. De acordo com Lindstrom e Bates⁽¹⁸⁾, o MNLM pode ser escrito como:

$$y_i = f(X_i \beta, Z_i b_i) + \varepsilon_i \quad (3)$$

em que $y_i = [y_{i1}, y_{i2}, \dots, y_{ini}]$ é o vetor ($n_i \times 1$) de respostas do i -ésimo indivíduo, sendo n_i o número de tempos observados no i -ésimo indivíduo; $f(X_i \beta, Z_i b_i)$ é um vetor ($n_i \times 1$) de funções de resposta não linear; $X_i = [x_{i1}, \dots, x_{iW}]$ é uma matriz ($n_i \times W$) de valores intraindivíduos, podendo incluir somente os instantes de avaliação; β é um vetor ($p \times 1$) de parâmetros populacionais desconhecidos; Z é uma matriz ($n_i \times q$) de posto completo, de constantes conhecidas que associa y_i a b_i , que é um vetor ($q \times 1$) de coeficientes aleatórios de regressão, não observados e é um vetor ($q \times 1$) de erros aleatórios intraindivíduo. É comum assumir que as observações feitas em diferentes indivíduos são independentes entre si e que $\varepsilon_i \sim N_{ni}(0, R_i)$, sendo R_i a matriz de variâncias e covariâncias de dimensão ($n_i \times n_i$), que depende de somente pela sua dimensão. Apesar de se admitirem diversas aplicações que $R_i = \sigma^2 I_{ni}$, onde I_{ni} é uma matriz identidade de dimensão n_i , R_i pode assumir qualquer estrutura de covariâncias marginal especial, como a autorregressiva de primeira ordem (AR(1)), por exemplo. Admite-se que os efeitos aleatórios, b_i , são independentes e identicamente distribuídos, $b_i \sim Nq(0, \sigma^2 D)$, em que $\sigma^2 D$ é uma matriz de variâncias e covariâncias, cuja dimensão depende do número de efeitos aleatórios considerados no modelo. Admite-se ainda que os b_i são independentes dos ε_i .

Para explicar o comportamento da digestibilidade média da MS (%), por tratamento, utilizou-se a função não linear apresentada em (1), para $i, j, \kappa = 1, \dots, 6$. Os animais fistulados avaliados em períodos distintos foram considerados unidades experimentais diferentes. Como os dados em análise são completos e balanceados em relação ao tempo, tem-se inicialmente, porque ainda não se sabe quantos e onde serão incluídos os efeitos aleatórios, que: $n_i = 10$ tempos, $x_i = 3, 6, 12, 24, 48, 60, 72, 84, 96$ e 120 e $R_i = R = \sigma^2 I$, é comum a todos os perfis individuais de resposta.

Para sugerir em quais parâmetros é conveniente incluir um efeito aleatório, foram confeccionados os gráficos de perfis individuais de respostas e de intervalos de 95% de confiança para cada um dos parâmetros do modelo não linear, utilizando as estimativas dos parâmetros dos ajustes feitos para todos os indivíduos. Uma variabilidade incomum dos pontos em alguma parte do gráfico de perfis individuais de resposta (nos pontos iniciais ou finais do processo, ou na curvatura dos perfis, por exemplo), associada a algum(ns) parâmetro(s) do modelo não linear escolhido, sugere a inclusão de efeito aleatório nesse(s) parâmetro(s). Já no gráfico de intervalos de 95% de confiança, a não sobreposição dos intervalos calculados para certo parâmetro indica a inclusão de um efeito aleatório a este parâmetro⁽²⁰⁾.

O modelo (1) com efeito aleatório associado à fração rapidamente solúvel, β_1 , pode ser escrito como:

$$y_{ik} = (\beta_{1k} + b_{1i}) + \beta_{2k}[1 - \exp(-\beta_{3k}x_i)] + \varepsilon_{ijk} \quad (4)$$

em que b_{1i} é o efeito aleatório associado a β_1 . Neste exemplo, diz-se que o efeito aleatório está associado de forma linear ao parâmetro de efeito fixo β_1 , como descrito por Hist et al.⁽²¹⁾ e Vonesh e Carter⁽²²⁾. Se o efeito aleatório está associado ao parâmetro β_2 , diz-se que o mesmo ocorrerá de forma linear. Porém, quando um efeito aleatório está associado ao parâmetro β_3 , este ocorrerá na forma não linear, como proposto por Lindstrom e Bates⁽¹⁸⁾.

Se essas técnicas informais de escolha de efeitos aleatórios não forem conclusivas, podem ser comparados todos os possíveis modelos, utilizando testes de razão de verossimilhanças (TRV) em modelos encaixados ou os critérios de informação de Akaike (AIC) ou bayesiano (BIC), quando os modelos não forem encaixados. Neste caso, o modelo que apresentou o menor valor dessas estatísticas (AIC ou BIC) foi considerado o mais adequado⁽²⁰⁾.

Quando o modelo envolveu mais de um efeito aleatório, escolheu-se uma estrutura para a matriz **D**, associada ao vetor de efeitos aleatórios, que seja parcimoniosa e consiga explicar bem a variabilidade e as covariâncias entre tais efeitos.

Para o modelo final e após a escolha dos efeitos aleatórios, foram ajustadas curvas médias distintas para cada tratamento e as comparações entre tratamentos foram feitas como descrito em Sartorio⁽¹⁴⁾. Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote *nlme* do software R⁽²³⁾, considerando um nível de significância $\alpha = 0,05$ em todos os testes de hipóteses.

Resultados e Discussão

Os perfis individuais da degradabilidade da matéria seca (MS) ao longo do tempo, por tratamento (Figura 1) têm comportamentos semelhantes, apresentam certa heterogeneidade de variâncias ao longo do tempo e indicam que o modelo não linear (1) pode explicar bem a relação entre a porcentagem de degradação da MS e os tempos de incubação.

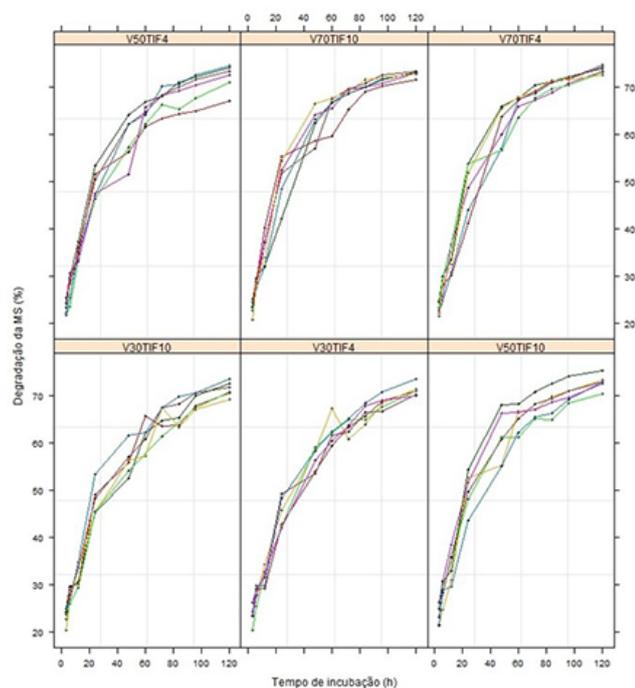


Figura 1. Perfis individuais por tratamento da degradabilidade de MS ao longo dos tempos de incubação.

Tabela 1. Média e erro padrão (e.p.) da degradabilidade da MS (%) do feno de capim-Tifton 85, por tratamento e por tempo de incubação (h)

Tratamento		Tempo (h)									
		3	6	12	24	48	60	72	84	96	120
70:30_TIF4	Média	23,2	28,4	33,4	48,8	61,4	66,5	68,7	70,5	71,4	73,6
	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	23,3	28,8	35,4	50,7	61,9	65,5	68,6	70,2	71,4	72,7
	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	23,1	27,3	34,9	49,3	58,9	64,1	67,3	68,3	69,8	72,1
	e.p.	1,53	2,87	1,52	2,87	4,71	2,03	2,36	2,87	3,02	2,8
50:50_TIF10	Média	23,3	28,5	33,9	49,8	61,1	64,9	67,3	68,6	70,5	72,9
	e.p.	1,91	1,19	3,36	3,85	5,41	2,79	2,06	2,69	2,03	1,52
30:70_TIF4	Média	23,5	28,1	31,6	45,0	56,5	62,1	63,3	66,2	68,5	71,1
	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	23,3	27,6	32,0	47,8	56,2	61,5	65,3	66,1	68,9	71,3
	e.p.	1,62	1,56	2,21	3,15	3,10	3,03	2,58	2,83	1,64	1,56

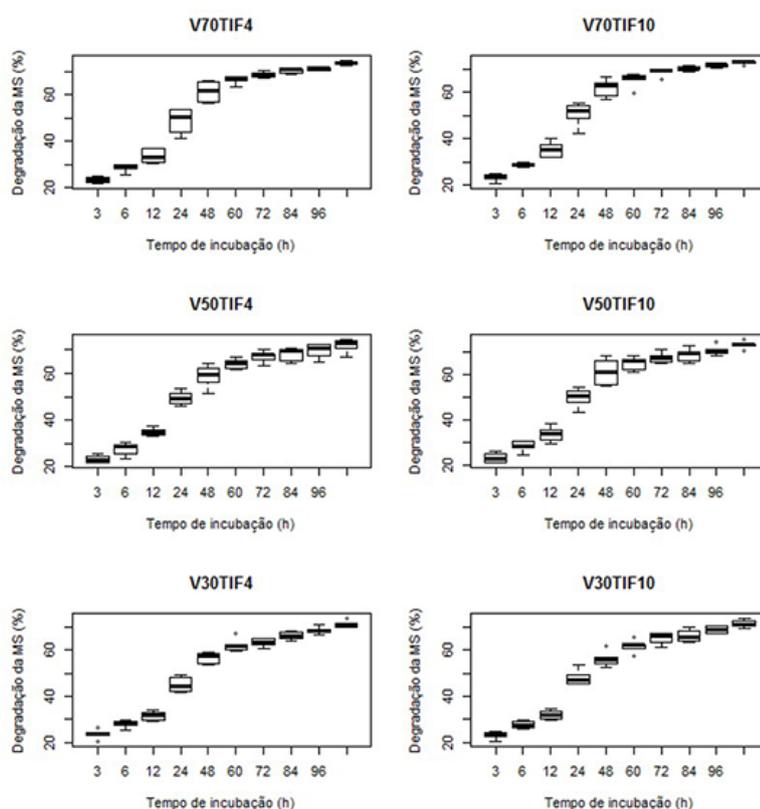


Figura 2. Boxplot da degradabilidade de MS (%) por tratamento e tempo de incubação.

O modelo de Orskov e McDonald (1979) foi ajustado para cada um dos trinta e seis indivíduos, resultantes da combinação dos seis animais avaliados em seis diferentes períodos. Para as três variáveis respostas estudadas (estimativas de β_1 , β_2 , e β_3), os testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett confirmaram a normalidade dos erros ($p > 0,05$) e a homogeneidade de variâncias entre os seis tratamentos ($p > 0,05$), respectivamente.

As ANOVAs individuais dessas variáveis respostas indicaram que não houve interação ($p > 0,05$) entre os níveis dos fatores V:C e TIF, que não se observou efeito do fator TIF na degradabilidade da MS, ocorrendo diferenças significativas ($p < 0,05$) somente entre as médias dos níveis do fator V:C. Esses resultados concordaram com aqueles obtidos por Feitosa et al.⁽¹⁷⁾.

Os coeficientes de variação (Tabela 2) foram considerados médio-alto para os parâmetros β_1 e β_3 , e baixo-médio para o parâmetro β_2 , segundo a classificação de Vaz et al.⁽²⁴⁾. Pelo teste de Tukey, percebeu-se que os animais que receberam 70% de volumoso na ração apresentaram maior valor de β_2 e menor valor de β_1 que os animais que receberam somente 30% de volumoso. Os tratamentos com 70 e 50% de volumoso apresentaram valores médios de β_3 iguais entre si e superiores ao do tratamento com 30% de volumoso.

Tabela 2. Médias das estimativas dos parâmetros do modelo de Orskov e McDonald por nível de V:C, coeficientes de variação (CV%) e estimativa da variância (s^2) para cada ANOVA referentes à degradação da MS (%)

V:C	Parâmetro					
	β_1		β_2		β_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
CV(%)	11,15		5,98		21,34	
s^2	2,11		6,01		$1,27 \times 10^5$	

*Médias de um mesmo parâmetro seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%)

Os intervalos de 95% de confiança construídos para os três parâmetros a partir dos ajustes do modelo para os 36 perfis individuais de degradabilidade da MS (%) (Figura 3), sugerem a inclusão de efeito aleatório em β_2 , β_3 e, possivelmente, em β_1 , pois o número de intervalos não sobrepostos para este parâmetro é pequeno. Para confirmar essas sugestões, sete modelos com efeitos aleatórios foram sugeridos (Tabela 3).

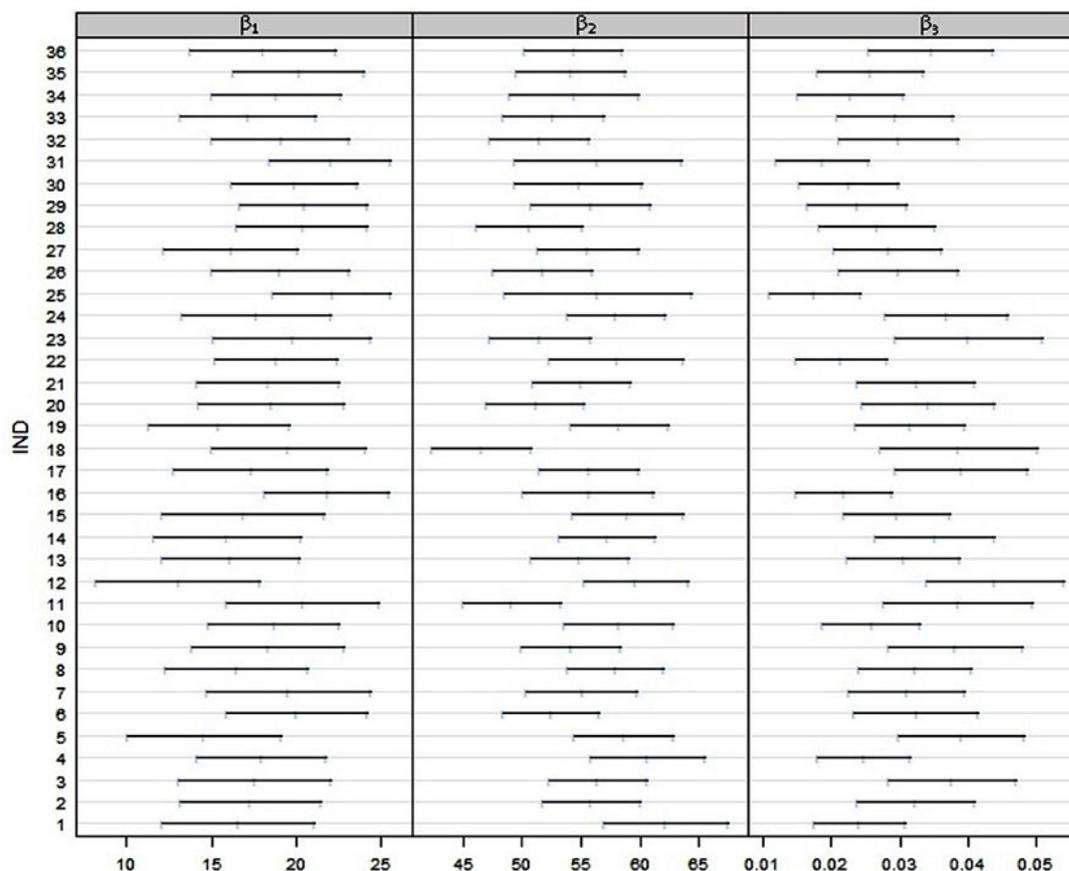


Figura 3. Intervalos de 0,95 de confiança dos parâmetros do modelo de Orskov e McDonald por indivíduo.

Tabela 3. Critério de informação de Akaike (AIC) e logaritmo da função de máxima verossimilhança (logLik) dos modelos de Orskov e McDonald sem e com efeitos aleatórios, propostos para explicar a cinética da degradação ruminal

Modelo	Efeito aleatório em [#]	Expressão	AIC	logLik
MF0*	-	$\beta_{1k} + \beta_{2k}[1 - \exp(-\beta_{3k}x_i)]$	1700,33	**
MR1 ^{&#}	β_1	$(\beta_{1k} + b_1) + \beta_{2k}[1 - \exp(-\beta_{3k}x_i)]$	1683,65	-821,82
MR2	β_2	$\beta_{1k} + (\beta_{2k} + b_2)[1 - \exp(-\beta_{3k}x_i)]$	1680,87	-820,44
MR3	β_3	$\beta_{1k} + \beta_{2k}[1 - \exp(-(\beta_{3k} + b_3)x_i)]$	1670,90	-815,45
MR4	β_1 e β_2	$(\beta_{1k} + b_1) + (\beta_{2k} + b_2)[1 - \exp(-\beta_{3k}x_i)]$	1681,61	-818,80
MR5	β_1 e β_3	$(\beta_{1k} + b_1) + \beta_{2k}[1 - \exp(-(\beta_{3k} + b_3)x_i)]$	1675,06	-815,53
MR6	β_2 e β_3	$\beta_{1k} + (\beta_{2k} + b_2)[1 - \exp(-(\beta_{3k} + b_3)x_i)]$	1661,57	-808,79
MR7	β_1, β_2 e β_3	$(\beta_{1k} + b_1) + (\beta_{2k} + b_2)[1 - \exp(-(\beta_{3k} + b_3)x_i)]$	1667,47	-808,74

*MF: modelo de efeitos fixos; &MR: modelo com efeitos aleatórios; **Método dos mínimos quadrados ordinários; #Os sete modelos com efeitos aleatórios foram ajustados considerando a estrutura da matriz D como *pdSymm*

Para buscar a estrutura de variâncias e covariâncias adequada para os efeitos aleatórios, combinaram-se os sete modelos com efeitos aleatórios apresentados na Tabela 3, com quatro estruturas para a matriz D (*pdSymm*: matriz geral positiva definida, sem estrutura adicional; *pdLogChol*: matriz geral positiva definida, sem estrutura adicional, usando uma parametrização log-Cholesky; *pdDiag*: diagonal; *pdIdent*: múltiplo de uma identidade), admitindo $R_i = \sigma^2 I_{n_i}$.

Testes da Razão de Verossimilhanças (TRV) e os critérios AIC e BIC indicaram que o modelo MR6, com efeitos aleatórios em β_2 e β_3 , com matriz não estruturada para D , proporcionou melhor ajuste que o modelo com efeitos fixos (MF0) e todos os demais modelos não lineares mistos.

Também foi testada a necessidade de utilizar outra estrutura para a matriz R (autorregressiva de primeira ordem – AR(1); autorregressiva de primeira ordem com heterogeneidade de variâncias – ARH(1) ou simetria composta – SC), mas os resultados confirmaram que a estrutura $R = \sigma^2 I_{10}$ é a mais adequada.

Na Figura 4, que apresenta as curvas médias ajustadas aos seis tratamentos, observa-se que as curvas dos tratamentos V30TIF4 e V30TIF10 são muito semelhantes, assim como as curvas dos demais tratamentos. Considerando a estrutura aleatória do modelo MR6 e as curvas médias apresentadas, foram propostos alguns modelos alternativos: i) MR6.5: cinco curvas distintas, sendo uma única curva para os tratamentos V30TIF4 e V30TIF10 e uma curva para cada um dos outros tratamentos; ii) MR6.3: três curvas distintas, sendo uma para os tratamentos V70TIF4 e V70TIF10, outra para V50TIF4 e V50TIF10 e outra para V30TIF4 e V30TIF10; iii) MR6.2: duas curvas distintas, sendo uma para os tratamentos V30TIF4 e V30TIF10 e outra para os demais tratamentos V70TIF4, V70TIF10, V50TIF4 e V50TIF10; iv) MR6.1: uma única curva para todos os perfis médios. Os modelos foram comparados utilizando TRV e os critérios AIC e BIC e concluiu-se que o modelo MR6.2 com 10 parâmetros é tão bom quanto os demais modelos, que envolvem 13, 19 ou 22 parâmetros (Tabela 4). 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 nutricional dos fenos de capim-Tifton 85 (TIF4 e TIF10) não influenciou na degradabilidade da MS (%).

Os parâmetros do modelo MR6.2 também foram comparados utilizando os modelos apresentados na Tabela 5. Testes da razão de verossimilhanças foram realizados e permitiram concluir que o modelo MR6.2 com duas curvas e parâmetros distintos foi o mais indicado para a descrição da variável resposta em estudo.

Lembrando que a estrutura aleatória do modelo foi selecionada anteriormente à dos efeitos fixos, Pinheiro e Bates⁽²⁰⁾ recomendam conferir a estrutura da matriz R , ou seja, se essa estrutura permanece a mesma escolhida antes de definir os efeitos fixos. Dentre as estruturas mais complexas (AR(1), ARH(1), e CS) comparadas, por meio de TRV, com $R = \sigma^2 I_{10}$, a estrutura ARH(1), com variâncias diferentes nos diversos tempos de incubação e autocorrelação de primeira ordem, foi considerada mais adequada.

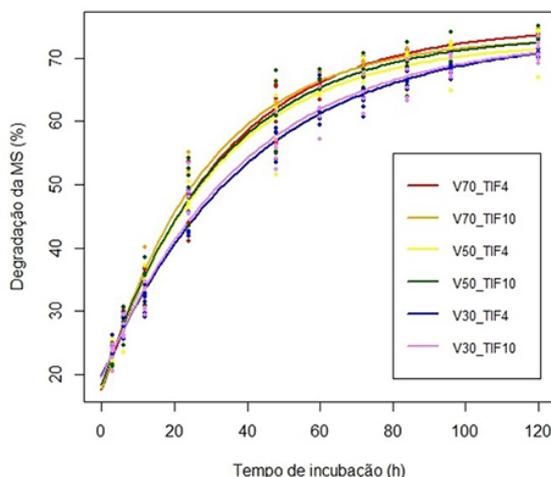


Figura 4. Curvas ajustadas para a degradação da MS (%) utilizando o modelo MR6.

Tabela 4. Informações sobre o ajuste dos modelos propostos para determinar o número de curvas referente aos tratamentos do modelo MR6

Modelo	n.p.	AIC	BIC	logLik**
MR6	22	1661,57	1746,76	-808,79
MR6.5	19	1655,86	1729,43	-808,93
MR6.3	13	1646,46	1696,80	-810,23
MR6.2	10	1644,58	1683,31	-812,29
MR6.1	7	1665,94	1693,05	-825,97

*n.p.: número de parâmetros do modelo; **logLik: logaritmo da função de máxima verossimilhança

Tabela 5. Informações sobre os ajustes dos modelos usados para comparar os parâmetros das curvas do modelo MR6.2

Modelo	β_{1u}	β_{2u}	β_{3u}	n.p.	AIC	BIC	logLik
MR6.2	diferentes	diferentes	diferentes	10	1644,58	1683,31	-812,29
MR6.2a	$\beta_{11}=\beta_{12}$	Diferentes	diferentes	9	1647,69	1682,54	-814,85
MR6.2b	diferentes	$\beta_{21}=\beta_{22}$	diferentes	9	1645,79	1680,63	-813,89
MR6.2c	diferentes	diferentes	$\beta_{31}=\beta_{32}$	9	***	***	***
MR6.2ab	$\beta_{11}=\beta_{12}$	$\beta_{21}=\beta_{22}$	diferentes	8	1647,14	1678,12	-815,57
MR6.2ac	$\beta_{11}=\beta_{12}$	diferentes	$\beta_{31}=\beta_{32}$	8	***	***	***
MR6.2bc	diferentes	$\beta_{21}=\beta_{22}$	$\beta_{31}=\beta_{32}$	8	***	***	***

$u = 1, 2$; *n.p.: número de parâmetros do modelo; **logLik: logaritmo da função de máxima verossimilhança; ***O processo iterativo de ajuste não convergiu. Notou-se uma grande sensibilidade na convergência do processo relativa aos valores iniciais fornecidos. Nesses casos, acredita-se que o processo não tenha convergido por não ter sido possível encontrar estimativas iniciais adequadas para o parâmetro β_3 (taxa de velocidade da degradabilidade da MS) das duas curvas, indicando que esses parâmetros das duas curvas são realmente diferentes.

Os tratamentos com 70 ou 50% de volumoso não apresentaram diferenças entre si para todos os parâmetros do modelo, mas foram diferentes dos tratamentos em que a porcentagem de volumoso foi de 30% (também para todos os parâmetros do modelo). O modelo não linear misto final explica praticamente toda a variabilidade presente nos dados (Figuras 5 e 6), o que não ocorre com o modelo de duas fases.

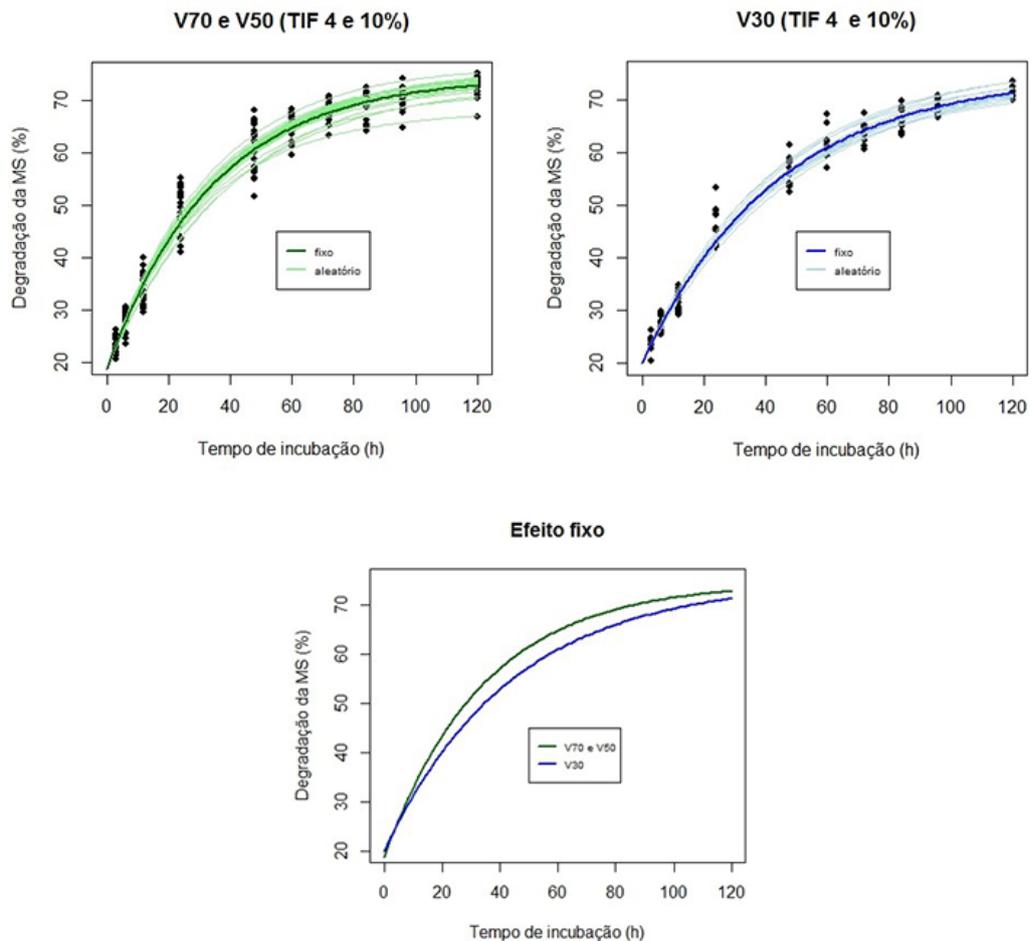


Figura 5. Curvas ajustadas do modelo MR6.2, com estrutura $R = ARH(1)$.

Na Figura 6 percebe-se um comportamento das respostas do indivíduo 18 bem distinto dos outros indivíduos, apresentando a maior variação referente à 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.

A menor proporção de concentrado proporcionou uma $DE_{5\%}$ maior do feno de capim-Tifton, em relação às outras proporções consideradas. Já as DPs de ambos os tratamentos apresentaram praticamente os mesmos valores (Tabela 6), que foram condizentes aos obtidos por Jobim et al.⁽⁹⁾.

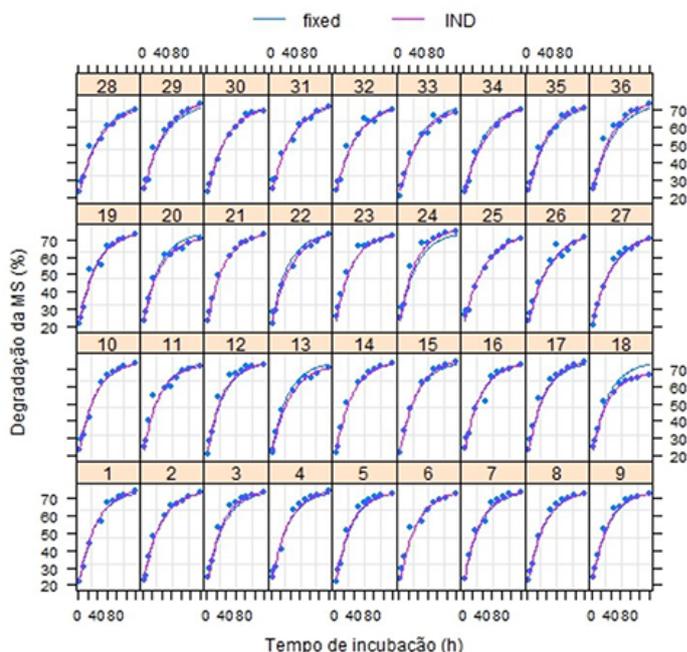


Figura 6. Ajuste do modelo M6.2, com estrutura ARH para a matriz **R**, aos dados de degradação da MS por indivíduo, considerando também o gráfico de ajuste somente da parte fixa deste modelo.

Nas duas abordagens, as porcentagens 70 e 50 de volumoso na ração não apresentaram diferença para nenhum dos parâmetros avaliados, ou seja, para a fração rapidamente degradável (β_1), para a fração potencialmente degradável (β_2) e para a taxa de degradação da fração potencialmente degradável (β_3). Os valores das estimativas dos parâmetros β_1 , β_2 e β_3 dos modelos finais da abordagem mista estão próximos das faixas de variação (ou dos intervalos de variação) obtidos com a abordagem de duas fases (Tabelas 6 e 7), tendo menor variação a abordagem mista.

Tabela 6. Estimativas dos parâmetros e erro padrão (e.p.) do modelo misto selecionado com estrutura ARH(1) e $DE_{5\%}$ e DP calculadas por curva de tratamento

Análise	Vo:Co	Parâmetro						$DE_{5\%}$	DP
		β_1	e.p.	β_2	e.p.	β_3	e.p.		
Mista*	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

*M6.2 com ARH(1): $s^2 = 2,0211$; $s_{b_2}^2 = 3,1073$; $s_{b_3}^2 = 6,02 \times 10^{-6}$; $r_{b_2, b_3} = -0,451$; $\hat{\phi} = 0,1385$; $s_{t_3}^2 = 1,0000$; $s_{t_6}^2 = 1,5333$; $s_{t_{24}}^2 = 10,5940$; $s_{t_{48}}^2 = 4,9199$; $s_{t_{60}}^2 = 2,5991$; $s_{t_{72}}^2 = 0,9303$; $s_{t_{84}}^2 = 0,6606$; $s_{t_{96}}^2 = 0,1756$; $s^2_{V70T1F42} = 3,6352$; $s^2_{V70T1F420} = 0,0907$

Tabela 7. Comparação das estimativas dos parâmetros dos modelos resultantes das duas análises para a descrição da cinética de degradação ruminal da MS

Análise	β_1	β_2	β_3
Duas fases	17,56 a 19,40	53,98 a 56,72	0,0260 a 0,0326
MNLM	18,77 a 20,06	54,69 a 55,71	0,0229 a 0,0291

Considerando o modelo final, MR6.2 com estrutura ARH(1) para a matriz **R**, a menor proporção de volumoso na ração proporcionou a menor $DE_5\%$ do feno de capim-Tifton 85 (37,24%), em relação às outras proporções consideradas, estando próxima dos valores encontrados por Assis et al.⁽²⁶⁾, Balieiro e Melloti⁽²⁵⁾, como também próxima ao intervalo de valores obtidos na abordagem de duas fases (37,68 a 40,01) e mista (37,31 a 40,38). Já as DPs de ambos os tratamentos apresentaram valores muito próximos, estando também de acordo com os obtidos pela de duas fases (73,12 a 74,28), valores próximos aos obtidos por Jobim et al.⁽⁹⁾ e superiores aos encontrados por Balieiro e Melloti⁽²⁵⁾. Além disso, a estimativa da variabilidade residual (s^2) referente à análise de duas fases sofreu uma grande redução (de 6,84 para 2,02) já esperada, pois a variabilidade residual, que antes era explicada por uma única fonte de variação no modelo não linear clássico (análise de duas fases), passou a ser composta por variações entre indivíduos (variação residual mais efeitos aleatórios) e intraindivíduos (relativa à heterogeneidade de variâncias nos diversos tempos de incubação) no modelo não linear misto, justificando a sua redução. Dessa forma, o uso do MNLM se apresenta melhor que o método em duas etapas para diferenciar a degradabilidade efetiva e potencial de alimentos, pois, se o erro padrão das estimativas dos parâmetros é maior, os respectivos intervalos de 95% de confiança também serão maiores, diminuindo a probabilidade de encontrar diferença entre os tratamentos, ou seja, aumenta-se a probabilidade de aceitar erroneamente a hipótese de efeito nulo dos tratamentos (erro tipo II).

Os resultados referentes aos efeitos fixos obtidos com o uso de MNLM não foram distintos dos obtidos na análise de duas fases, nas condições deste ensaio. Contudo, a abordagem mista apresenta vantagens em relação à abordagem de duas fases, 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 intraindivíduos.

Resultados semelhantes foram obtidos por Zanton e Heinrichs⁽²⁷⁾ que fizeram um estudo para a variável resposta fibra de detergente neutro (FDN), em que avaliaram três metodologias de análises de perfis de degradação alimentar *in situ*. Para isso, simularam 500 experimentos, considerando apenas quatro animais, dois períodos e oito tempos de incubação (72, 48, 24, 16, 8, 4, 2, e 1 hora). Nessas condições, os autores puderam concluir que, em muitos casos, o MNLM é tão bom ou melhor que a análise de duas fases.

A variabilidade provocada pelo delineamento experimental nas respostas foi bem explicada pelas estruturas de covariâncias utilizadas, indicando que a inclusão de

parâmetros relacionados aos fatores de delineamento não seja necessária com o uso do modelo não linear misto.

Conclusão

O uso do modelo de Orskov e McDonald⁽¹⁶⁾ com efeitos aleatórios proporcionou o melhor ajuste aos dados de degradabilidade de matéria seca, pois a variabilidade dos dados é mais bem descrita. O pacote nlme do software R foi bastante versátil no ajuste, possibilitando o ajuste e comparação de diversos modelos para a parte fixa, alternando diversas estruturas de variâncias e covariâncias.

O uso de modelos não lineares mistos na análise de dados de digestibilidade *in situ* é bastante vantajoso quando a pesquisa tem por objetivo entender o comportamento do processo de digestibilidade ao longo dos tempos de incubação. Se o interesse for restrito à estimação dos parâmetros do modelo não linear de Orskov e McDonald e ao cálculo das degradabilidades efetiva e potencial de dietas, pode-se usar qualquer uma das duas abordagens de análise apresentadas.

Apesar de esse estudo sugerir que, por reduzir a estimativa da variabilidade residual (s^2) o uso do MNLM se apresenta melhor que o método em duas etapas para diferenciar a degradabilidade efetiva e potencial de alimentos, é necessário realizar simulações para comprovar tal afirmação.

Agradecimentos

Ao prof. Dr. José Valmir Feitosa por ceder os dados. À CAPES pela bolsa de estudos. Este trabalho é parte da tese de doutorado do primeiro autor, obtida pela ESALQ/USP.

Referências

1. Moreira JFC, Rodriguez NM, Fernandes PCC, Veloso CM, Saliba EOS, Gonçalves LC, Borges I, Borges ALCC. Concentrados protéicos para bovinos. 1. Digestibilidade *in situ* da matéria seca e da proteína bruta [Protein concentrates for bovines.1. *In situ* digestibility of dry matter and crude protein]. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [periódico na Internet]. 2003 [citado 2016 Dez 10]; 55(3):315-323. Available in: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352003000300011>. Portuguese.
2. Cabral LS, Valadares Filho SC, Zervoudakis JT, Souza AL, Detmann E. Degradabilidade *in situ* da matéria seca, da proteína bruta e da fibra de alguns alimentos [In situ degradability of dry matter, crude protein and fiber of some feeds]. Pesquisa Agropecuária Brasileira [periódico na Internet]. 2005 [citado 2016 Jul 15]; 40(8):777-81. Available in: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2005000800007>. Portuguese.
3. Maggioni D, Marques JA, Rotta PP, Zawadzki F, Ito RH, Prado IN. Ingestão de Alimentos.

Semina: Ciências Agrárias. 2009; 30(4):963-974.

4. Santos S, Santos-Cruz CL, Rocha JB, Pires AJV, Santos IPA, Lima TR, Junqueira RS. Degradação ruminal da silagem de capim elefante com diferentes componentes de algaroba [Ruminal degradation of silage of elephant grass with mesquite different components]. Revista Brasileira de Saúde e Produção animal [Internet]. 2012 [cited 2016 Jan 09]; 13(1):123-136. Available in: <http://www.scielo.br/pdf/rbspa/v13n1/a11v31n1.pdf> . Portuguese.
5. Teixeira FA, Veloso CM, Pires AV, Silva FF, Nascimento PVN, Carvalho GGP. Degradação ruminal da silagem de capim-elefante aditivado com cana-de-açúcar e farelo de cacau [Ruminal degradation of elephant grass silage added with sugarcane and cocoa meal]. Ciência e Agrotecnologia[Internet]. 2008 [cited 2016 Fev 13]; 32(3):948-954. Available in: <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v32n3/a36v32n3.pdf> . Portuguese.
6. Pereira ES, Carneiro MSS, Cavalcante MAB, Villarroel ABS, Pimentel PG. Degradação ruminal da matéria seca e proteína bruta de silagens de híbridos de milho [Ruminal degradation of dry matter and crude protein of different silages of corn hybrids]. Revista Ciência Agronômica[Internet]. 2008 [cited 2016 Fev 20]; 39(4):603-608. Available in: <http://www.ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/download/394/290>. Portuguese.
7. Alves AA, Sales RO, Neiva JNM, Medeiros AN, Braga AP, Azevedo AR. Degradabilidade ruminal *in situ* de vagens de faveira (*Parkia platycephala* Benth.) em diferentes tamanhos de partículas [In situ ruminal degradability of faveira (*Parkia platycephala* Benth.) pods in different particle sizes]. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [periódico na Internet].2007 [citado 2017 Jul 04]; 59(4):1045-1051. Available in: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000400034>. Portuguese.
8. Santoro KR, Barbosa SBP, Brasil LHA, Santos ES. Estimativas de parâmetros de curvas de crescimento de bovinos Zebu, criados no estado de Pernambuco [Growth curve parameters for Zebu breeds raised at Pernambuco State, Northeastern Brazil]. Revista Brasileira de Zootecnia [periódico na Internet]. 2005 [citado 2017 Jul 21]; 34(6): 2262-2279. Available in: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982005000700013>. Portuguese.
9. Jobim CC, Ferreira GA, Bumbieris Junior VH, Calixto Junior M, Santos GT. Cinética de degradação ruminal dos fenos de alfafa e Tifton-85 e da silagem de milho. Ciências Agrárias. 2011; 32(2):747-758.
10. Rego AC, Paiva PCA, Muniz JA, Cleef EHCB, Machado-Neto OR. Degradação ruminal de silagem de capim-elefante com adição de vagem de algaroba triturada [Ruminal degradation of elephant grass silage with mesquite pods]. Revista Ciência Agronômica [periódico na Internet]. 2011 [citado 2017 Set 05]; 42(1):199-207. Available in: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902011000100025>. Portuguese.
11. Muniz EB, Mizubuti IY, Pereira ES, Pimentel PG, Ribeiro ELA, Pinto AP. Cinética ruminal da fração fibrosa de volumosos para ruminantes [Ruminal kinetics of the fibrous fraction of ruminant roughages]. Revista Ciência Agronômica [Internet]. 2012 [citado 2016 Dez 12]; 43(3):604-610. Available in: <http://www.scielo.br/pdf/rca/v43n3/a25v43n3.pdf>. Portuguese.
12. Santos EJ, Pereira MLA, Presídio PJA, Moreira JV, Souza ACS, Pereira CAR. Mesquite pod meal in sheep diet: intake, apparent digestibility of nutrients and nitrogen balance. Acta

Scientiarum, Animal Sciences [Internet]. 2015 [cited 2017 Jul 29]; 37(1):55-59. Available in: <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v37i1.24466>. English.

13. Pasternak H, Shalev BA. The effect of a feature of regression disturbance on the efficiency of fitting growth curves. *Growth, Development & Aging*, Bar Harbor. 1994; 58(1):33-39.

14. Sartorio SD. Modelos não lineares mistos em estudos de degradabilidade ruminal *in situ*. 2012. 188f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013. Available in: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11134/tde-08012013-151513/pt-br.php>. Portuguese.

15. Carvalho LR, Pereira GMS, Silva HOF, Mischan MM, Furtado EL. Ajuste de modelos não lineares de efeitos fixos, com ponderação e misto - aplicações. *Revista Brasileira de Biometria* [Internet]. 2014 [cited 2016 Nov 30]; 32(2):296-307. Available in: http://jaguar.fcav.unesp.br/RME/fasciculos/v32/v32_n2/A9_LidiaRaquel.pdf. Portuguese

16. Orskov ER, McDonald IM. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science* [periódico na Internet]. 1979Abr [cited 2017 Out 28]; 92(2):499-503. Available in: <https://doi.org/10.1017/S0021859600063048>. English.

17. Feitosa JV, Malheiros EB, Ezequiel JMB, Araújo AA. 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 [The use of regression models for the study of the degradation curve of the hay grass-tifton 85 with 10% crude protein and different levels of concentrate]. *Ciência Animal* [Internet]. 2004 [cited 2016 Dez 20]; 14(2):77-88. Available in: <http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/Artigo2.2004.2.pdf>. Portuguese.

18. Lindstrom MJ, Bates DM. Nonlinear Mixed Effects Models for Repeated Measures Data. *Biometrics* [Internet] 1990 Sep [cited 2017 Nov 11]; 46(3):673-687. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2242409>. English.

19. Gómez DAA, Muñoz MFC, Betancur LFR. Modelación de las funciones de crecimiento aplicadas a la producción animal [Modeling of growth functions applied to animal production]. *Revista Colombiana de Ciências Pecuárias* [Internet]. 2008 [cited Jun 12]; 21(1):39-58. Available in: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v21n1/v21n1a05.pdf>. Spanish.

20. Pinheiro JC, Bates DM. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. 1 st ed. New York: Springer-Verlag; 2000. 528 p. English.

21. Hirst K, Zerbe GO, Boyle DW, Wilkening RB. On nonlinear random effects models for repeated measurements. *Communications in Statistics B, Simulation and Computation*. 1991; 20(2):463-478.

22. Vonesh EF, Carter RL. Mixed effect nonlinear regression for unbalanced repeated measures. *Biometrics* [Internet]. 1992 [cited Aug 27]; 48:1-18. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1581479> . English.

23. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*, versão 3.4.3. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2018.

24. Vaz MAB, Pacheco PS, Seidel EJ, Ansuaj AP. Classification of the coefficient of variation to variables in beef cattle experiments. *Cienc. Rural* [Internet]. 2017 [cited 2019-04-27]; 47(11), e20160946. Available in: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160946>. English.
25. Balieiro Neto G, Melotti 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* [periódico na Internet]. 2007 [citado Oct 04]; 44(4): 243-253. Available in: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2007.26624>. Portuguese.
26. Assis MA, Santos GT, Cecato U, Damasceno JC, Petit HV, Bett V, Gomes LH, Daniel M. Degradabilidade *in situ* de gramíneas do gênero *Cynodon* submetidas ou não a adubação nitrogenada. *Acta Scientiarum*. 1999; 21(3):657-663.
27. Zanton GI, Heinrichs AJ. Evaluation of modeling procedure for fitting *in situ* feed degradation profiles. *American Society of Animal Science* [Internet]. 2014 Dec [cited Ago 10]; 87:2080-2088. Available in: <https://pdfs.semanticscholar.org/6ca8/c2697d4d48a53cf37d8c9254dfe38d9c6489.pdf>. English.