

ARTIGO



AUTORES:

Anna Carolynne Alvim
 Duque¹

Fernando César Ferraz
 Lopes²

Rosemeire Aparecida de
 Carvalho Dornelas²

José Alberto Bastos
 Portugal²

Rui da Silva Verneque²
 Jackson Silva e
 Oliveira²

¹Universidade Federal de Minas
 Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627,
 Pampulha, CEP 31270-901,
 Belo Horizonte – MG, Brasil
²Embrapa Gado de Leite, Juiz de
 Fora, MG, Brasil

Recebido: 07/11/2011

Aceito: 07/12/2011

Autor correspondente:

Anna Carolynne Alvim Duque
 E-mail: alvimduque@yahoo.com.
 br

PALAVRAS-CHAVE:

Brachiaria
 Cynodon
 Extrusa
 Panicum
 Silagem

KEY-WORDS:

Brachiaria
 Cynodon
 Extrusa
 Panicum
 Silage

Efeito da dieta basal do animal doador de líquido ruminal sobre a digestibilidade in vitro de volumosos

*Effect of the basal diet of the donor animal
 of ruminal fluid on the in vitro digestibility of
 roughages*

RESUMO: Para otimizar o emprego da mão de obra especializada e dos recursos financeiros, físicos e materiais do laboratório, sistemas automatizados de fermentação *in vitro* foram desenvolvidos, permitindo processar maior número de amostras em relação ao método de dois estágios realizado em tubos individuais, tradicionalmente adotado na determinação da digestibilidade *in vitro*. Diferentes resultados foram relatados para o efeito da dieta basal dos animais doadores de líquido ruminal sobre a digestibilidade *in vitro*. Foi objetivo deste experimento avaliar o efeito da dieta basal do animal doador de líquido ruminal sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de volumosos, determinada após 48 h de incubação, em equipamento de fermentação automatizado. Foram utilizados líquidos ruminais coletados de animal consumindo silagem de milho ou de animal manejado sob pastejo. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 × 4 (tipos de inóculo × tipos de alimentos). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores de DIVMS determinados utilizando-se os dois tipos de inóculos.

ABSTRACT: In order to optimize the specialized labor and the financial, physical and material resources of the laboratory, automated systems of *in vitro* fermentation were developed, allowing to process a larger amount of samples than that processed in the two-stage 48 h digestion technique carried through in individual sample digestion tubes, traditionally adopted for *in vitro* digestibility determination. Different results were reported regarding the effect of the basal diet offered to the donor animal on the *in vitro* digestibility. The purpose of this experiment was to study the basal diet effect on ruminal fluid of donor animal on 48 h *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) of roughages, using an automatized equipment of fermentation (filter bag technique). Ruminal fluid from cattle consuming corn silage or cattle under tropical pasture grazing was used. The experimental design was completely randomized with a 2 × 4 factorial arrangement (source of inoculum × food classes). The sources of inoculum had no effect ($p > 0.05$) on the IVDMD values.

1 Introdução

Equipamentos automatizados de determinação de digestibilidade *in vitro* estão sendo atualmente comercializados com a promessa de redução dos custos e de rapidez nas análises (ALCALDE et al., 2001). Ademais, permitem economia de espaço no laboratório e aumentam a segurança dos laboratoristas pela redução na manipulação de reagentes, sendo sua utilização na análise de digestibilidade *in vitro* da matéria seca recomendada por diversos autores (HOLDEN, 1999; MABJEESH; COHEN; ARIELI, 2000; ADESOGAN, 2005; DUQUE et al., 2011).

Conquanto Ayres (1991) tenha relatado efeito da dieta basal dos animais doadores de líquido ruminal sobre os valores de digestibilidade *in vitro*, no trabalho de Holden (1999) os resultados foram dependentes do alimento avaliado. Diversamente, Mabjeesh, Cohen e Arieli (2000) não observaram diferença nos valores de digestibilidade *in vitro* dos alimentos avaliados em seu estudo, quando dois tipos de inóculo foram comparados. Resultado observado por Mabjeesh, Cohen e Arieli (2000) corrobora com Scales et al. (1974), que concluíram ser desnecessário fornecer aos animais doadores de inóculo ruminal os mesmos alimentos avaliados no ensaio de digestibilidade *in vitro*, haja vista que confiáveis estimativas de digestibilidade *in vivo* de forragem selecionada sob pastejo foram obtidas quando a dieta do animal doador de líquido ruminal foi baseada em feno de gramínea.

Avaliou-se o efeito da dieta basal do animal doador de líquido ruminal sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca de volumosos, determinada após 48 h de incubação em equipamento de fermentação automatizado.

2 Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Digestibilidade da Embrapa Gado de Leite, situado no Campo Experimental de Coronel Pacheco (Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil).

Utilizou-se líquido ruminal de duas vacas Holandês × Zebu, fistuladas no rúmen, dotadas de cânulas de borracha com 110 mm de diâmetro interno de abertura (Kehl Ind. Com. Ltda., São Carlos-SP, Brasil). Um dos animais foi mantido confinado em curral de piso cimentado, consumindo *ad libitum*

dieta baseada em silagem de milho (*Zea mays*, L.), enquanto que o outro foi manejado em pastagem formada por gramíneas de clima tropical, com predominância de *Brachiaria* spp. Os dois animais passaram por período de adaptação às respectivas dietas de, no mínimo, 14 dias.

Foram avaliadas amostras pertencentes a quatro classes de volumosos comumente empregados na formulação de dietas para bovinos (Tabela 1), a saber: (1) silagens de milho; (2) extrusas de gramíneas; (3) silagens de sorgo, e (4) forragens de gramíneas obtidas por corte, sendo que para cada classe houve cinco amostras. Todas as amostras utilizadas foram pré-secadas por 72 h em estufa de ventilação forçada, regulada para 55 °C, sendo, posteriormente, moídas em moinho de facas dotado de peneira com abertura de malhas de 1 mm e analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), segundo métodos descritos por Silva e Queiroz (2002).

O efeito da dieta basal sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de volumosos foi avaliado sob delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 × 4 (dois tipos de inóculo × quatro classes de alimentos).

As silagens de milho e as extrusas de gramíneas foram incubadas em dois dos quatro jarros de fermentação da “Incubadora *In vitro*” modelo TE-150 (Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba-SP, Brasil). Em um dos jarros, adicionou-se 1.200 mL de solução tamponada (pH final = 6,72) preparada utilizando-se relação 4:1 (v/v) de saliva artificial e inóculo ruminal coletado do animal alimentado com silagem de milho. No outro jarro, no preparo da solução tamponada, o inóculo ruminal utilizado foi aquele obtido do animal manejado em condição de pastejo. As silagens de sorgo e as forragens das gramíneas foram incubadas nos dois outros jarros de fermentação, sendo realizada da mesma forma como descrito anteriormente.

Em cada jarro de fermentação, incubaram-se as amostras das forrageiras em duplicata, acondicionadas em sacos confeccionados em TNT-100 (tecido-não-tecido, 100% polipropileno, dimensões 5,5 × 5,5 cm). Foram incubados também dois sacos vazios (“prova-em-branco”) e dois outros

Tabela 1. Composição química das forrageiras avaliadas no estudo.

Alimentos	PB ¹	FDN	FDA
Silagens de milho (% da matéria seca)			
Híbrido duplo, grão semiduro	9,5	51,0	41,0
Híbrido triplo, grão dentado	10,2	41,5	37,6
Híbrido triplo, grão duro	10,7	49,1	37,3
Híbrido duplo, grão duro	9,1	45,5	38,4
Híbrido duplo, grão semiduro (utilizada na dieta basal)	6,3	52,7	37,2
Extrusas coletadas em pastagens tropicais			
Capim-elefante – 30 dias de descanso – 1º dia de pastejo	15,4	72,2	41,1
Capim-elefante – 45 dias de descanso – 1º dia de pastejo	10,5	77,0	46,6
Capim-elefante – 30 dias de descanso – 3º dia de pastejo	8,0	80,0	46,2
<i>Cynodon</i> spp. – 28 dias de descanso – estação das chuvas	14,6	64,0	28,6
<i>Cynodon</i> spp. – 38 dias de descanso – estação da seca	14,3	60,5	33,7
Silagens de sorgo			
Cultivar 1	4,1	68,3	29,3
Cultivar 2	3,8	58,0	34,8
Cultivar 3	4,7	60,5	33,6
Cultivar 4	5,4	67,1	29,4
Cultivar 5	5,3	56,3	33,0
Forragens de gramíneas tropicais, obtidas por corte			
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Xaraés – 20 dias de crescimento	11,6	58,9	35,7
<i>Brachiaria decumbens</i> – 20 dias de crescimento	13,2	57,6	33,3
<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça – 20 dias de crescimento	10,2	64,0	41,7
<i>Panicum maximum</i> cv. Tanzânia – 20 dias de crescimento	12,4	61,1	37,6
<i>Panicum purpureum</i>	8,5	69,7	44,3

contendo amostra de forragem de digestibilidade conhecida (“alimento-padrão”), totalizando 24 sacos por jarro de fermentação.

Depois de 48 h de incubação, o equipamento foi desligado e todos os jarros foram esvaziados, sendo os sacos de incubação lavados em água corrente (até a mesma tornar-se límpida), secados em estufa regulada a 105 °C e pesados, visando aos cálculos de DIVMS descritos por Silva e Queiroz (2002).

Os procedimentos de coleta e de processamento do líquido ruminal foram realizados segundo recomendações de Silva e Queiroz (2002). Cada tipo de inóculo foi obtido de uma mesma alíquota, processada em quantidade suficiente para ser dispensada nos dois jarros de fermentação da “Incubadora *In vitro*”, sendo a temperatura de incubação no equipamento mantida em 39 °C. O ensaio foi repetido no tempo, o que duplicou o número de réplicas por tratamento.

O experimento foi analisado pelo procedimento GLM, sendo a comparação das médias ($p < 0,05$) realizada com auxílio do LSMEANS do pacote estatístico SAS (1985).

3 Resultados e Discussão

Em função do inóculo utilizado, são apresentados os valores médios de DIVMS dos 20 alimentos volumosos, depois de 48 h de incubação em equipamento de fermentação automatizado (Tabela 2). De modo geral, mesmo referindo-se apenas ao primeiro estágio (48 h) de determinação da DIVMS, esses valores foram superiores aos publicados na literatura para alimentos similares (VALADARES FILHO; ROCHA JÚNIOR; CAPPELLE, 2002).

Alguns autores relataram que valores de digestibilidade *in vitro* determinados em sistemas automatizados de fermentação foram superestimados em relação aos obtidos de métodos tradicionais (TILLEY; TERRY, 1963) realizados em tubos individuais (SANTOS et al., 2000). Os resultados de digestibilidade obtidos desses equipamentos podem ser afetados por: tamanho da amostra incubada; método de processamento; proximidade dos jarros de incubação em relação à fonte de calor; diferenças na extensão pela qual cada saco encontra-se imerso na solução de inóculo ruminal, e potencial ocorrência de efeito associativo na digestão de alimentos

Tabela 2. Efeito da dieta basal do animal doador de líquido ruminal sobre os valores médios \pm desvios padrão de digestibilidade *in vitro* da matéria seca dos alimentos volumosos incubados por 48 h em equipamento de fermentação automatizado.¹

Alimento	Dieta basal	
	Silagem de milho	Pasto
Silagens de milho (% da matéria seca)		
Híbrido duplo, grão semiduro	68,0 \pm 2,08	65,7 \pm 0,40
Híbrido triplo, grão dentado	70,5 \pm 1,28	67,0 \pm 2,17
Híbrido triplo, grão duro	69,6 \pm 2,00	69,5 \pm 1,13
Híbrido duplo, grão duro	71,8 \pm 4,20	71,5 \pm 1,45
Híbrido duplo, grão semiduro (utilizada na dieta basal)	67,8 \pm 4,07	71,2 \pm 1,10
Extrusos coletadas em pastagens tropicais		
Capim-elefante – 30 dias de descanso – 1º dia de pastejo	4,9 \pm 1,24	66,1 \pm 1,85
Capim-elefante – 45 dias de descanso – 1º dia de pastejo	59,3 \pm 3,32	58,7 \pm 4,81
Capim-elefante – 30 dias de descanso – 3º dia de pastejo	55,9 \pm 2,29	56,6 \pm 1,16
<i>Cynodon</i> spp. – 28 dias de descanso – estação das chuvas	69,0 \pm 1,93	65,5 \pm 4,34
<i>Cynodon</i> spp. – 38 dias de descanso – estação da seca	65,6 \pm 3,28	66,3 \pm 4,17
Silagens de sorgo		
Cultivar 1	60,2 \pm 3,17	60,0 \pm 2,90
Cultivar 2	56,9 \pm 2,90	56,3 \pm 1,61
Cultivar 3	50,5 \pm 7,63	55,8 \pm 4,85
Cultivar 4	66,5 \pm 0,38	61,0 \pm 3,06
Cultivar 5	56,6 \pm 3,16	58,6 \pm 1,18
Forragens de gramíneas tropicais, obtidas por corte		
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Xaraés	59,0 \pm 3,18	74,7 \pm 2,11
<i>Brachiaria decumbens</i>	67,5 \pm 3,18	71,7 \pm 0,58
<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça	61,0 \pm 3,47	60,6 \pm 2,30
<i>Panicum maximum</i> cv. Tanzânia	62,9 \pm 0,13	63,1 \pm 3,72
<i>Panicum purpureum</i>	63,4 \pm 0,12	62,2 \pm 1,87

¹Incubadora *In vitro* modelo TE-150 (Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba-SP).

incubados em um mesmo jarro de fermentação (ADESOGAN, 2005). Adicionalmente, a própria forragem (SANTOS et al., 2000) ou suplementos (MABJEESH; COHEN; ARIELI, 2000) avaliados – diante do seu processamento prévio (MABJEESH; COHEN; ARIELI, 2000; ADESOGAN, 2005) ou mesmo da quantidade de amostra em relação à área de superfície dos sacos de incubação (MABJEESH; COHEN; ARIELI, 2000) – e a rotação contínua dos jarros de fermentação (FIGUEIREDO; MBHELE; ZONDI, 2000) são fontes de variações, que, em função do método de análise, podem influenciar nos resultados de DIVMS.

Não houve evidência de maior precisão dos resultados obtidos a partir de um inóculo em relação ao outro, haja vista que, em função do alimento avaliado, houve variações nos desvios padrão das médias de DIVMS, obtidas depois de 48 h de incubação (Tabela 2). Ademais, em função do tipo de inóculo utilizado, foram verificados diferentes ordenamentos dos alimentos dentro de cada classe

avaliada. Ressaltem-se os resultados extremos observados para *B. brizantha* cv. Xaraés, quando a DIVMS foi determinada ao utilizar-se inóculo do animal que recebeu silagem de milho, bem como quando se realizou a determinação utilizando-se inóculo coletado do animal manejado sob condição de pastejo.

Lopes et al. (2010) observaram que os sacos confeccionados com TNT-100 frequentemente desfiavam-se, facilitando a adesão de partículas suspensas da solução tamponada, o que pode ser observado também no presente trabalho.

Contudo, Santos et al. (2000) relataram que valores de DIVMS de três das cinco gramíneas tropicais avaliadas em seu estudo foram superestimados ($p < 0,05$) em relação aos obtidos por meio do método tradicional realizado em tubos.

Na Tabela 3, em função do tipo de inóculo utilizado, são apresentados os valores médios de DIVMS das quatro classes de alimentos volumosos

avaliadas neste estudo, depois de 48 h de incubação em equipamento de fermentação automatizado.

Não foi observada diferença ($p > 0,05$) nos valores de DIVMS, determinados depois de 48 h de incubação dos volumosos no equipamento de fermentação automatizado, utilizando líquido ruminal de animal recebendo diferentes dietas basais. Também não foi observada interação entre os fatores estudados ($p > 0,05$).

Exceto pelas forragens de gramíneas tropicais incubadas em inóculo ruminal coletado do animal mantido sob condição de pastejo (Tabelas 2 e 3), aparentemente não houve, para as demais classes de volumosos, vantagem explícita, quando incubadas em inóculo do animal recebendo dieta cujo ingrediente base fosse semelhante ao próprio alimento-teste. Por exemplo: determinação da DIVMS das silagens de milho ou de sorgo, utilizando inóculo do animal recebendo dieta baseada em silagem de milho ou determinação da DIVMS de extrusas e forragens de gramíneas, utilizando inóculo do animal manejado a pasto. Desses últimos resultados, a despeito de diferenças na composição química, depreende-se que as dietas consumidas pelos dois animais permitiram suficiente crescimento de similar microbiota ruminal, conforme também relataram Mabjeesh, Cohen e Arieli (2000).

Scales et al. (1974) concluíram ser desnecessário fornecer aos animais doadores de inóculo ruminal dieta contendo os mesmos alimentos avaliados no ensaio de digestibilidade *in vitro*, haja vista que confiáveis estimativas de digestibilidade *in vivo* de forragem selecionada sob pastejo foram obtidas quando a dieta do animal doador de líquido ruminal foi baseada em feno de gramínea. Entretanto, esses autores relataram maior variação na predição da

digestibilidade *in vivo*, quando o inóculo obtido de novilho manejado em condição de pastejo foi utilizado na determinação da digestibilidade *in vitro*, em detrimento de inóculo de novilho mantido confinado e recebendo feno de gramínea.

Os resultados do presente estudo corroboram aqueles relatados por Mabjeesh, Cohen e Arieli (2000), que também não observaram efeito da dieta basal sobre a DIVMS de vários alimentos volumosos e concentrados. No entanto, outros autores relataram que houve efeito da dieta basal dos animais doadores de líquido ruminal sobre valores de digestibilidade *in vitro* (AYRES, 1991; HOLDEN, 1999). Dos dez alimentos avaliados no estudo de Holden (1999), oito foram ordenados de forma similar quanto à DIVMS, independentemente do inóculo utilizado na incubação. Por outro lado, Ayres (1991) relatou que, em apenas dez das quinze dietas basais avaliadas em seu estudo, houve consistência no ordenamento dos alimentos pelo valor de digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO), concluindo, assim, que a dieta basal pode ser a principal fonte de variação na determinação da digestibilidade *in vitro*.

Ayres (1991) relatou que diferenças individuais na atividade do fluido ruminal podem constituir-se em importante fonte de erro biológico. Esse autor trabalhou com líquido ruminal de quatro ovinos, além de um adicional, referente a um *pool* destes. A despeito da uniformidade entre os resultados de DIVMO, houve diferença ($p < 0,001$) entre fontes de inóculo para todos os sete alimentos avaliados em seu estudo. Ademais, foi detectada interação significativa ($p < 0,001$) entre fonte de inóculo e alimento, em razão da menor atividade do fluido ruminal de dois animais.

Tabela 3. Efeito da dieta basal do animal doador de líquido ruminal sobre os valores médios de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de quatro classes de alimentos volumosos, incubados por 48 h em equipamento de fermentação automatizado.¹

Classe de alimento	Dieta basal	DIVMS ² (%)
Silagens de milho	Silagem de Milho	68,7
	Pasto	69,0
Extrusas de gramíneas tropicais	Silagem de Milho	62,9
	Pasto	62,6
Silagens de sorgo	Silagem de Milho	58,1
	Pasto	58,3
Forragens de gramíneas tropicais	Silagem de Milho	62,8
	Pasto	67,2

¹Incubadora *In vitro* modelo TE-150 (Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba-SP). ²Erro padrão da média = 1,88.

4 Conclusões

A recomendação para o emprego do equipamento de fermentação automatizado de fermentação para determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca deve estar condicionada ao fornecimento de líquido ruminal condizente com o alimento a ser avaliado na bateria, exceto para forragens de gramíneas tropicais incubadas em inóculo ruminal obtido de animal em pastejo, que pode apresentar vantagem.

Agradecimentos

Ao Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES-JF), pela concessão de Bolsa de Iniciação Científica ao segundo autor deste trabalho, e à Fapemig (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), pelo apoio financeiro ao trabalho.

Referências

ADESOGAN, A. T. Effect of bag type on the apparent digestibility of feeds in ANKOM Daisy II incubators. *Animal Feed Science and Technology*, v. 119, p. 333-344, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.09.012>

ALCALDE, C. R.; MACHADO, R. M.; SANTOS, G. T.; PICOLLI, R.; JOBIM, C. C. Digestibilidade *in vitro* de alimentos com inóculos de líquido de rúmen ou de fezes de bovinos. *Acta Scientiarum*, v. 23, n. 4, p. 917-921, 2001.

AYRES, J. F. Sources of error with *in vitro* digestibility assay of pasture feeds. *Grass and Forage Science*, v. 46, p. 89-97, 1991. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2494.1991.tb02210.x>

DUQUE, A.; LOPES, F.; DORNELLAS, R.; PORTUGAL, J.; VERNEQUE, R.; OLIVEIRA, J.; DE AZAMBUJA, A. Digestibilidade da matéria seca de alimentos volumosos e concentrados determinada por procedimentos “*in vitro*”. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 12, n. 3, p. 680-690, 2011.

FIGUEIREDO, M.; MBHELE, A.; ZONDI, J. A modification of the Daisy II-220 technique for determining *in vitro* digestibility of animal feeds in comparison with the Minson & McLeod technique.

South African Journal of Animal Science, v. 30, p. 45-46, 2000. Suplemento 1.

HOLDEN, L. A. Comparison of methods of *in vitro* dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of Dairy Science*, v. 82, n. 8, p. 1791-1794, 1999. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75409-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75409-3)

LOPES, F. C. F.; DORNELAS, R. A. C.; PORTUGAL, J. A. B.; CARNEIRO, J. C.; VERNEQUE, R. S.; SILVA E OLIVEIRA, J.; ARCURI, P. B.; DUQUE, A. C. A. Digestibilidade da matéria seca de silagens de milho e de suplementos concentrados determinada por procedimentos *in vitro*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 5, 2010.

MABJEESH, S. J.; COHEN, M.; ARIELI, A. *In vitro* methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: comparison of methods and inoculum sources. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 2289-2294, 2000. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75115-0](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75115-0)

SANTOS, G. T.; ASSIS, M. A.; GONÇALVES, G. D.; MODESTO, E. C.; CECATO, U.; JOBIM, C. C.; DAMASCENO, J. C. Determinação da digestibilidade *in vitro* de gramíneas do gênero *Cynodon* com uso de diferentes metodologias. *Acta Scientiarum*, v. 22, p. 761-764, 2000.

SCALES, G. H.; STREETER, C. L.; DENHAM, A. H.; WARD, G. M. A comparison of indirect methods of predicting *in vivo* digestibility of grazed forage. *Journal of Animal Science*, v. 38, p. 192-199, 1974.

SILVA, J. S.; QUEIROZ, A. C. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002. 235 p.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE – SAS. *SAS User's Guide: Statistics*. version 5. Cary: SAS Institute Inc., 1985. 956 p.

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

VALADARES FILHO, S. C.; ROCHA JÚNIOR, V. R.; CAPPELLE, E. R. *Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos*. Viçosa: UFV/DZO/DPI, 2002. 297 p.