

Métodos de digestibilidade *in vitro* na avaliação dos alimentos para coelhos¹

In vitro digestibility methods for feed evaluation for rabbits

Métodos de digestibilidad *in vitro* en la evaluación de los alimentos para conejos

Luiz Carlos Machado², Walter Motta Ferreira³, Ana Carolina Castro Euler⁴, Wellington Tadeu Vilela Carvalho⁴, Rogério Martins Maurício⁵, Guilherme Rocha Moreira⁴, Adriano Geraldo²

¹ Parte da tese de doutorado do primeiro autor

² Professores do IFMG Campus Bambuí. Rod. Bambuí-Medeiros, km 05, Bambuí-MG. CEP 38900-000.

luiz.machado@ifmg.edu.br

³ Professor Titular da EV-UFMG

⁴ Estudantes de doutorado da EV-UFMG

⁵ Professor da UFSJ

RESUMO

Os ensaios de determinação da digestibilidade *in vitro* são mais rápidos, práticos e econômicos quando comparados aos ensaios *in vivo*. Este estudo objetivou identificar e avaliar diferentes técnicas de determinação *in vitro* para coelhos, determinando a degradabilidade, digestibilidade, produção de gases e cinética de fermentação. Foram utilizados sete grupos de coelhos doadores, compostos cada um por três animais de 75 dias de idade, que recebiam sete diferentes dietas experimentais divididas em tradicional, simplificada e semi-simplificadas. A avaliação dos métodos de digestibilidade *in vitro* foi realizada através de dois métodos. O primeiro consistiu do método *in vitro* de produção de gases onde cada grupo forneceu material para uma repetição de todas as dietas experimentais avaliadas (tratamentos), sendo consideradas 49 unidades experimentais. Foi medida a pressão em intervalos previamente definidos e através de equação matemática se determinou o Volume de Gases Produzido (VGP). Foram determinadas também a correlação entre a digestibilidade *in vivo* e a degradabilidade *in vitro* bem como entre a digestibilidade *in vivo* e o VGP. O segundo método *in vitro* consistiu do tradicional de duas etapas, modificado de tal forma que foram utilizadas quatro diferentes técnicas, sendo modificados o tempo da primeira fase (12 ou 24h) e o meio para execução da segunda fase (digestão ácida com pepsina ou digestão com o detergente neutro). Como inóculo, foi utilizada mistura de material colhido a partir do ceco de coelhos de 75 dias de idade. Foram avaliadas sete dietas experimentais sendo uma tradicional, uma simplificada e cinco semi-simplificadas. Para obtenção dos valores base foi realizado experimento *in vivo*, antes da determinação *in vitro*. Ao estudo da modificação do tradicional método de duas etapas, foram feitas somente comparações descritivas e regressão simples. Foram observadas diferenças significativas entre a degradabilidade da matéria seca e degradabilidade da matéria orgânica, bem como para o volume de gases produzidos. A dieta referência apresentou os maiores valores de degradabilidade *in vitro* bem como de VGP. As equações de regressão linear encontradas apresentaram elevado coeficiente de determinação, indicando a possibilidade de utilização da técnica de produção de gases. Em relação às modificações propostas ao método de digestibilidade *in vitro* proposto por Tilley e Terry, dentre as metodologias testadas, a de 12 h de fermentação, com posterior digestão ácida com pepsina, apresentou maior similaridade com os valores *in vivo*. A partir da regressão linear, foi verificada alta correlação entre os dados de digestibilidade *in vivo* e de digestibilidade *in vitro* obtidos em todas as metodologias. Os métodos de digestibilidade *in vitro* se mostraram eficientes na avaliação dos alimentos para coelhos.

Palavras Chave: cunicultura, produção de gás, técnica semi-automática, Tilley e Terry.

ABSTRACT

Tests to determine the *in vitro* digestibility are faster, practical and economical when compared to *in vivo*. This study aimed to identify and evaluate different *in vitro* techniques, to determine the degradability, digestibility, gas production and fermentation kinetics for rabbits. Seven groups of donor rabbits, each one with by 3 animals of 75 days of age, received seven different experimental feed (one traditional, one simplified and five semi – simplified) were used. The evaluation of *in vitro* methods was made using two tests. The first consisted of *in vitro* gas production method where each group provided a repetition of all the tested diets (treatments), being considered 49 experimental units. The pressure was measured at predefined intervals and by mathematical equation the determination of the Volume of Gas Produced (VGP) was made. The correlation between *in vivo* digestibility and degradability *in vitro* and between *in vivo* digestibility and VGP was also determined. The second method consisted of the *in vitro* by two step method, modified. Four different techniques were used, varying the time of the first stage (12 and 24h), and the form of execution of the second phase (acidic pepsin digestion or digestion with neutral detergent). A mix of material was used as inoculum to mix the material collected from the 75 day old rabbit cecum. To determine base values, an experiment *in vivo* took place. The same experimental diets were utilized. To study the modification of the two stage traditional test, only descriptive comparisons and simple regression were made. Significant differences between the degradability of dry matter and the degradability of the organic matter was observed, as well as the VGP. The reference diet had the highest values of *in vitro* degradability as well as VGP. The linear regression equations found high coefficient of determination, indicating the possibility of using the technique of gas production. About the changes to the traditional test, the fermentation of 12 h with subsequent acid digestion with pepsin, showed a greater similarity with the values *in vivo*. From the linear regression, there was a high correlation between the data of digestibility *in vivo* and *in vitro* obtained from all methodologies, considering the exclusion of data obtained from diets containing cassava leaves flour. *In vitro* methods proved to be efficient in the evaluation of feed for rabbits.

Key words: rabbit production, gas production, semi-automatic method, and Terry Tilley.

RESUMEN

Las pruebas para determinar la digestibilidad *in vitro* son más rápidas, prácticas y económicas en comparación con las pruebas *in vivo*. Este estudio tuvo como objetivo identificar y evaluar diferentes metodologías para la valoración *in vitro* de los alimentos para conejos, determinando la degradabilidad, la digestibilidad, la producción de gas y la cinética de fermentación. Se utilizaron siete grupos de conejos para la donación de inóculo, cada uno compuesto por tres animales de 75 días de edad, que recibieron siete diferentes dietas, divididas en tradicional, simplificada y semisimplificadas. Las evaluaciones *in vitro* para conejos se realizaron utilizando dos métodos. El primer método consistió en la producción semiautomática de gas, donde cada grupo ha proporcionado material para una repetición de todas las dietas experimentales evaluadas (tratamientos), considerando siete repeticiones y 49 unidades experimentales. Se midió la presión de gas a intervalos definidos previamente y por una ecuación matemática se determinó el volumen de gas producido (VGP). Fueran determinadas también la correlación entre la digestibilidad *in vivo* y degradabilidad *in vitro* además de la digestibilidad *in vivo* y el VGP. El segundo experimento consistió del tradicional método de dos etapas modificado de modo que se utilizaron cuatro metodologías diferentes. Hubo la modificación del tiempo de la primera etapa (12 o 24h) y los medios para la ejecución de la segunda etapa (digestión ácida con pepsina o la digestión con detergente neutro). Como inóculo se utilizó una mezcla de material recogido de ciegos de conejos de 75 días de edad, que han recibido las mismas dietas experimentales señaladas anteriormente. Para obtener los valores básicos se llevó a cabo un experimento *in vivo* antes de la determinación *in*

vitro. Para evaluar la modificación del método tradicional de dos etapas se hicieron comparaciones descriptivas y regresión simples. Se observaron diferencias significativas entre la degradabilidad de la materia seca y la degradabilidad de la materia orgánica, así como el volumen de gas producido. La dieta referencia tuvo los más altos valores de degradabilidad *in vitro*, así como VGP. Las ecuaciones de regresión lineal tuvieron elevado coeficiente de determinación, lo que indica la posibilidad de utilizar la técnica de producción de gas para la valoración de la digestibilidad de los alimentos. En cuanto a los cambios propuestos en el método de digestibilidad *in vitro* en dos etapas, una de las metodologías probadas, la de 12h de fermentación con posterior digestión ácida con pepsina, mostró una mayor similitud con los valores *in vivo*. A partir de la regresión lineal, hubo una alta correlación entre los datos de la digestibilidad *in vivo* y digestibilidad *in vitro* obtenido en todas las metodologías. Los métodos de digestibilidad *in vitro* fueron eficaces en la evaluación de los alimentos para conejos.

Palavras Clave: cunicultura, producción de gas, técnica semi-automática, Tilley y Terry.

INTRODUÇÃO

A determinação da digestibilidade dos nutrientes para os animais normalmente é baseada em métodos que demandam tempo, grande quantidade de alimentos e mão de obra, dentre outros. Nos últimos anos se desenvolveram várias técnicas para simulação e quantificação do aproveitamento digestivo dos nutrientes. Os ensaios *in vitro* avaliam a digestibilidade de forma rápida, econômica, podendo apresentar alta correlação com as determinações *in vivo* (Maurício et al., 2003)

Tradicionalmente, o método proposto por Tilley e Terry (1963) vem sendo extensamente utilizado na avaliação dos alimentos para ruminantes, sendo modificado e adaptado para utilização em outros animais, dentre eles o coelho, como apontado por Euler et al. (2009). As técnicas de digestibilidade *in vitro* baseadas na produção de gases durante a simulação das fermentações bacterianas proporcionam maior acurácia, repetibilidade e elevada

sensibilidade, sendo possível o estudo da cinética de fermentação. A metodologia semi-automática proposta por Maurício et al. (1999) é uma excelente ferramenta, medindo a pressão interna de frascos de vidro com amostras em fermentação, podendo ser calculado o volume de gases produzido, o qual é proporcional à quantidade de matéria seca fermentada. Para estudo da cinética de fermentação, é aplicado o modelo de France et al. (1993).

Ensaio avaliando a digestibilidade *in vitro* têm sido utilizados por alguns autores na avaliação dos alimentos para coelhos (Souza et al., 1998; Calabro et al., 1999; Ferreira et al., 2001; Coelho et al., 2008; Euler et al., 2008; Euler et al., 2009). Entretanto estas metodologias ainda não foram validadas ainda restam várias dúvidas sobre o assunto. Assim, este trabalho teve como objetivo principal avaliar diferentes metodologias alternativas, baseadas nos métodos de

produção semiautomática de gases e no método proposto por Tilley e Terry (1963).

MATERIAL E MÉTODOS

Condições gerais

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Nutrição Animal e de produção de gases do departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais, em Janeiro de 2010.

Foram utilizadas sete dietas experimentais, com diferentes composições químico-bromatológicas (tabela 01), sendo denominadas de referência, simplificada com base na mistura entre Farinha das Folhas de Mandioca (FFM) e Feno de Alfafa (FAL), semi-simplificada com base em Feno do Terço Superior da Rama da Mandioca (FTSRM), semi-simplificada com base em FAL, semi-simplificada com base em FFM, semi-simplificada com base na mistura de

FFM e FAL e semi-simplificada com base na mistura entre FTSRM e FAL. Parte representativa desse material foi amostrada para os ensaios, sendo a granulometria reduzida a partir de moinho analítico, utilizando peneira de um milímetro.

O material cecal foi retirado de coelhos que recebiam as dietas experimentais, sendo esses animais abatidos no período da manhã, a partir das 8h. Para a coleta dos cecos foram utilizados coelhos da raça Nova Zelândia branca, de ambos os sexos, com 75 dias de idade, mantidos em gaiolas de aço galvanizado, utilizando bebedouros chupeta e comedouros semi-automáticos. Os cecos foram retirados e acondicionados em garrafas térmicas, previamente aquecidas e transportados imediatamente aos laboratórios, buscando-se ao máximo a manutenção da temperatura original.

Tabela 01 - Composição analisada das dietas experimentais oferecidas aos coelhos doadores de inóculo cecal.

Ingredientes	Dietas experimentais						
	REF	SFA	SSM	SSA	SSF	SSFA	SSMA
Feno de alfafa	37,735	47,000	-	83,759	-	41,039	40,095
Farinha das folhas de mandioca	-	41,826	-	-	78,410	40,000	-
Feno terço superior da rama da mandioca	-	-	70,329	-	-	-	37,282
Milho	7,548	-	8,000	5,000	5,000	5,000	5,000
Farelo de soja	4,184	-	10,000	0,043	6,874	5,525	6,020
Farelo de trigo	25,000	-	-	-	-	-	-
Óleo de soja	-	5,327	5,961	5,363	4,282	4,811	6,000
Milho desintegrado com palha e sabugo	20,000	-	-	-	-	-	-
Premix ¹	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
Fosfato monoamônio	0,979	0,571	0,578	0,647	0,434	0,534	0,603
Sal comum	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
Melaço em pó	2,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
Bentonita	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Calcário	0,544	-	-	0,187	-	0,091	-
DL-metionina	0,011	-	-	-	-	-	-
Lisina-HCl	-	0,276	0,133	-	-	-	-
Princípios nutritivos	REF	SFA	SSM	SSA	SSF	SSFA	SSMA
Matéria seca (MS)	91,31	91,12	91,12	91,18	90,17	90,26	90,89

Proteína bruta (PB)	15,15	17,13	17,42	16,41	17,76	19,55	17,47
Matéria mineral	8,43	9,56	9,04	9,77	7,93	8,62	9,47
Fibra em detergente neutro (FDN)	36,35	32,95	46,53	42,16	31,26	33,71	41,30
Fibra em detergente ácido (FDA)	16,46	23,76	27,71	25,52	23,74	23,83	26,67
Nitrogênio insolúvel em detergente ácido (%FDA)	0,67	1,74	1,62	0,96	2,68	2,24	1,68
Proteína bruta lignificada (%) ²	4,58	15,12	16,14	9,30	15,76	17,03	15,38
Hemiceluloses (FDN - FDA)	19,89	9,19	18,82	16,64	7,52	9,88	14,63
Lignina em detergente ácido (LDA)	2,71	8,17	8,79	7,05	8,86	8,16	8,78
Celulose (FDA - LDA)	13,75	15,59	18,92	18,47	14,88	15,67	17,89
Relação LDA/Celulose	0,20	0,52	0,46	0,38	0,60	0,52	0,49
Cálcio	0,91	1,40	1,42	1,34	1,09	1,32	1,35
Fósforo	0,69	0,47	0,47	0,43	0,38	0,45	0,48
Energia bruta (kcal/kg)	3945	4391	4356	4214	4524	4294	4327
Energia digestível ¹ (kcal/kg)	2519	2394	2156	2204	2453	2326	2196

REF: referência, SFA: dieta simplificada com base na mistura entre farinha das folhas de mandioca (FFM) e feno de alfafa (FAL), SSM: semi-simplificada com base em feno do terço superior da rama da mandioca (FTSRM), SSA: semi-simplificada com base em FAL, SSF: semi-simplificada com base em FFM, SSFA: semi-simplificada com base na mistura de FFM e FAL, SSMA: semi-simplificada com base na mistura entre FTSRM e FAL

¹ED (kcal/kgMS)= EB(kcal/kg MS) x (84,77 - 1,16 X %FDA MS)/100 (De Blás e Mateos, 1998)

²Se está denominando de PB lignificada àquela fração da PB contida no resíduo de FDA

Ensaio de digestibilidade in vitro com produção de gases

Para avaliação do método de digestibilidade *in vitro* a partir da produção de gases, cada grupo de três coelhos, que recebiam uma determinada dieta experimental, forneceu material para uma repetição de cada tratamento, o qual consistiu de cada uma das sete dietas experimentais descritas na tabela 01. Houve um total de sete repetições e 49 unidades experimentais. Para medição da produção de gases, foram utilizados três frascos por repetição, cada um constituindo de uma réplica, num total de 147 frascos. Em cada bandeja foram mantidos três frascos em branco, contendo somente o líquido cecal e o meio de cultura

Um grama de amostra foi adicionado aos frascos de fermentação (160 mL) previamente injetados com CO₂. Os frascos foram vedados com rolhas de silicone, garantindo a manutenção dos gases em seu

interior. Para evitar que qualquer tipo de fermentação ocorresse, os frascos foram mantidos a 4°C durante a noite, até a inoculação no dia seguinte.

O meio de cultura utilizado foi a solução de Theodorou et al. (1994), composta por solução macromineral (9,5 g/L Na₂HPO₄.12H₂O, 6,2 g/L KH₂PO₄ e 0,6 g/L MgSO₄.7H₂O), solução micromineral (132 g/L CaCl₂.2H₂O, 100 g/L MnCl₂.2H₂O, 10 g/L CoCl₂.6H₂O e 80g/L FeCl₃.6H₂O), solução tampão (4 g/L de NH₄CO₃ e 35 g/L de NaHCO₃), indicador (0,01 g/L de Rezasurin) e agente redutor (625mg de HCl Cysteíne, 95 mL de água destilada, 4 mL de NaOH 1M e 625 mg de Na₂S.9H₂O), sendo as soluções misturadas na seguinte ordem e proporção: 500 mL de água destilada, 200 mL de solução tampão, 200 mL de solução macromineral, 0,1mL de solução micromineral e 1mL de solução indicadora.

O material cecal foi diluído na proporção 1:1 com a solução de Theodorou et al. (1994), previamente preparada, e mantida aquecida a 39°C. Esse procedimento é necessário, haja vista a alta viscosidade do material cecal, permitindo a filtração. Posteriormente, 10mL desse inóculo foi adicionado a cada um dos frascos, através de seringa graduada. Esses frascos, pré-aquecidos, já continham 90mL do meio de cultura. Em seguida, os frascos foram manualmente agitados e colocados em estufa a 39°C (tempo zero). A pressão originada pelos gases acumulados na parte superior dos frascos foi medida por intermédio de um transdutor de pressão (tipo T443A, Bailey&Mackey, Inglaterra) conectado em sua extremidade a uma agulha (0,6 mm). Após a leitura, o transdutor foi removido e a agulha permaneceu inserida na tampa por alguns segundos para completa estabilização entre a pressão interna e externa. Logo após, os frascos foram agitados e recolocados na estufa. As leituras de pressão foram tomadas no período de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21 e 24 horas após o início da incubação. No final do período de fermentação, os frascos foram colocados na geladeira a 4°C para interrupção do processo fermentativo. O conteúdo restante no frasco foi filtrado em cadinhos de borossilicato (porosidade 1) usando bomba a vácuo. Os cadinhos, previamente preparados, foram secos a 105°C, durante 4 h, resfriados em dessecador e pesados para que fossem

calculados os valores de degradabilidade da matéria seca (MS) e matéria orgânica (MO), sendo essa última determinada após a calcinação do cadinho por 3h a 500°C.

Os dados de pressão (P = pressão por polegada quadrada) foram utilizados para o cálculo do volume de gases produzidos através da equação matemática:

$$V = -0,004 \text{ (s.e. 0,06)} + 4,43P \text{ (s.e. 0,043)} + 0,051 P^2 \text{ (s.e. 0,007)}$$

A fórmula anterior, desenvolvida por Maurício et al. (2003), relaciona pressão e volume sendo específica para este laboratório, situado na cidade de Belo Horizonte. Os dados de volume de gás produzido foram somados e convertidos para 1g de MS. Após, foi descontada a produção média de gás advinda dos três frascos em branco de cada bandeja.

Para estudo da cinética de fermentação, foi utilizada o modelo (France et al., 1993):

$$Y = A \{1 - \exp[-b(t-L) - c \times (\sqrt{t} - \sqrt{L})]\} \quad (1)$$

Onde:

Y = produção cumulativa de gases (mL)

A = assíntota ou potencial máximo de produção de gases

L = tempo de colonização (lag time)

B (h^{-1}) e c ($h^{-0,5}$) = taxas fracionais constantes.

A taxa fracional (h^{-1}) combinada com a produção de gases (μ) foi calculada sendo:

$$\mu = b + c/2\sqrt{t} \quad (2)$$

Onde: μ = taxa de produção de gases (h^{-1})

b e c = parâmetros semelhantes ao da equação

(1)

t = tempo de incubação em horas.

Foram determinadas as correlações entre a produção total de gases (PTG) e a digestibilidade *in vivo* determinada previamente. Também os dados de degradabilidade foram comparados aos de digestibilidade *in vivo*, para identificação de alguma correlação.

Os dados de degradabilidade *in vitro* da MS e MO das dietas e volume de gás produzido (VGP) foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas através do teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, num delineamento inteiramente casualizado, utilizando os recursos computacionais do programa SISVAR. Foram realizadas também comparações entre a degradabilidade obtida a partir dos sete diferentes grupos de coelhos fornecedores de inóculos cecal. Aos demais dados obtidos, foram feitas comparações descritivas.

Ensaio de digestibilidade in vitro com diferentes modificações a partir do método proposto por Tilley e Terry (1963)

Para avaliação das modificações propostas ao método, várias metodologias foram propostas, sendo:

Metodologia 1 (M1) – Método de Tilley e Terry (1963), com 24 h de fermentação e inóculo cecal.

a) Primeira etapa

Pesou-se 0,25 g de amostra, sendo transferida para bolsas de filtro (Filter Bags F-57), previamente pesadas e numeradas. As bolsas de filtro foram acondicionadas no jarro de fermentação do aparelho Daisy II (Ankom Technology). Adicionou-se ao jarro 1330 mL da solução A (10,0 g/L KH_2PO_4 ; 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g/L NaCl; 0,1 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,5g/L de uréia) e 266 mL da solução B (15,0 g/L Na_2CO_3 ; 1,0 g/L $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) sendo pré aquecidas a 39°C. Foi conferido o pH dessa solução final, que ficou em 6,8. Adicionou-se ao jarro, 400mL de inóculo cecal previamente diluído com o meio de cultura na proporção 1:1. Esse procedimento é necessário, em função da alta viscosidade do inóculo cecal. Saturou-se, com CO_2 , o meio sobre a superfície do jarro. Incubou-se durante 24 horas, a 39°C, no aparelho especificado.

b) Segunda etapa

Após a incubação, foi adicionado 40mL de HCl 6,0 N e 8g de pepsina 1:10000. Incubou-se novamente, por mais 24 horas, a 39°C. Após, as bolsas de filtro foram removidas, lavadas com água e colocadas em estufa a 105°C, durante quatro horas. Resfriou-se em dessecador e após foram feitas pesagem e registro.

Metodologia 2 (M2) – Redução do tempo de incubação da M1.

Considerando que o tempo de fermentação em coelhos é relativamente

curto, nesta metodologia, se reduziu o tempo de incubação da primeira fase do teste de Tilley e Terry (1963) para 12h. A segunda etapa não foi alterada. As demais condições foram semelhantes às descritas em M1.

Metodologia 03 (M3) – Metodologia M1 com posterior tratamento com o detergente neutro.

A primeira etapa desta metodologia seguiu a primeira etapa da M1. Na segunda etapa, o resíduo foi submetido ao detergente neutro, conforme a metodologia proposta por Van Soest et al. (1991) para determinação da FDN. As demais condições foram semelhantes às descritas em M1.

Metodologia 04 (M3) – Redução do tempo de incubação da M1 com posterior tratamento com o detergente neutro.

O tempo utilizado na primeira fase desta metodologia foi de 12h. Assim como descrito na M3, foi utilizada segunda digestão com o detergente neutro. As demais condições foram semelhantes às descritas em M1.

A cada jarro de fermentação, foram adicionadas 17 bolsas de filtro, sendo 14 referentes às amostras (duas de cada dieta experimental), duas provas em branco e uma testemunha (feno de alfafa).

A equação utilizada para cálculo da digestibilidade *in vitro* da MS, utilizando-se de diferentes metodologias, foi a seguinte:

$$\text{DivMS}(\%) = \frac{(\text{MSI} - (\text{MSF} - \text{MSB}))}{\text{MSI}} \times 100$$

MSI

Onde:

DivMS = Digestibilidade *in vitro* da MS, MSI = quantidade de matéria seca inicial, MSF = quantidade de matéria seca final e MSB = quantidade de matéria seca do branco.

Para esse teste, foi feita uma mistura de material cecal colhido a partir de coelhos de 75 dias de idade, que recebiam diferentes dietas experimentais. Em todas as metodologias, o conteúdo cecal foi misturado às soluções tampão, na proporção de 1:1, para confecção do inóculo cecal, e mantido a 39°C.

Aos resultados foi feita somente análise descritiva, utilizando-se regressão simples a partir dos dados de digestibilidade *in vivo* da MS comparando com os dados obtidos previamente em ensaio de digestibilidade com animais vivos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1) Técnica in vitro semi automática de produção de gases

Os resultados para a degradabilidade *in vitro* da MS e MO (DMS e DMO) das dietas são apresentados na tabela 2. Pode-se verificar que houve diferenças ($p < 0,05$) na DMS e DMO das diferentes dietas testadas. Nota-se que a maior capacidade de aproveitamento digestivo da MS e MO da dieta REF, evidenciada pela sua menor

quantidade de FDA (16,46%), menor quantidade de LDA (2,71%) e maior quantidade de hemiceluloses (19,89%), foi confirmada pela maior degradabilidade observada para essa dieta ($p < 0,05$). Na comparação entre a origem dos inóculos, aquele provido dos coelhos que recebiam o tratamento SSA apresentou resultado superior

de DMO. Os resultados indicam que coelhos que recebiam dietas altamente fibrosas como a SSM, SSA e SSMA, apresentaram altos valores de DMO em função da origem dos inóculos, havendo seleção de microrganismos cecais, a partir de dietas mais fibrosas.

Tabela 02 – Degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DMS) e matéria orgânica (DMO) de dietas tradicional, simplificada e semi-simplificadas após 24h de inoculação.

Parâmetro	Dietas experimentais							CV (%)
	REF	SFA	SSM	SSA	SSF	SSFA	SSMA	
Degradabilidade <i>in vitro</i>								
DMS	45,38 a	31,44 b	27,69 c	32,20 b	32,76 b	32,53 b	29,97 c	7,48
DMO	48,01 a	34,48 b	29,77 b	34,85 b	34,55 b	35,14 b	31,70 b	13,10
Degradabilidade em função da origem dos inóculos*								
DMS	31,25 a	31,34 a	34,31 a	36,58 a	31,79 a	32,67 a	34,04 a	17,77
DMO	35,05 b	33,35 b	37,20 b	43,91 a	29,30 b	33,90 b	35,80 b	16,92
Digestibilidade <i>in vivo</i> (previamente realizada)								
DMS	65,57	53,91	54,23	56,94	53,07	57,29	57,52	-
DMO	67,25	54,13	54,28	56,69	52,75	56,98	56,82	-

Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

*A doação do inóculo foi feita por cada grupo de três coelhos que recebiam cada uma das dietas experimentais

REF: referência, SFA: dieta simplificada com base na mistura entre farinha das folhas de mandioca (FFM) e feno de alfafa (FAL), SSM: semi-simplificada com base em feno do terço superior da rama da mandioca (FTSRM), SSA: semi-simplificada com base em FAL, SSF: semi-simplificada com base em FFM, SSFA: semi-simplificada com base na mistura de FFM e FAL, SSMA: semi-simplificada com base na mistura entre FTSRM e FAL

É necessário enfatizar que a degradabilidade considera somente o estágio de degradação cecal. Os valores de degradabilidade observados serão sempre inferiores aos de digestibilidade determinados em estudo *in vivo*, onde acontecem pelo menos dois estágios de digestão. É importante que as equações que correlacionam os dois parâmetros, tenham alto coeficiente de determinação, para maior confiabilidade e melhor predição do fenômeno biológico.

A grande variação entre os métodos *in vitro* e condições utilizadas, na avaliação de alimentos para coelhos, dificulta as

comparações entre os diferentes trabalhos. Coelho et al. (2008) avaliaram cinco dietas para coelhos e verificaram valores de degradabilidade da MS após 24h de 47,95 a 51,14, sendo esses valores superiores aos aqui observados, exceto pela dieta referência, a qual apresenta maior similaridade com as dietas avaliadas pelos autores. Euler et al. (2008) perceberam valores de 47,56 a 50,53% para DMS e valores de 53,80 a 56,67% para DMO, quando rações, com diferentes níveis de *lithothamnium sp.* foram avaliadas pela técnica semi-automática de produção de gases. Embora ligeiramente superior ao

observado para o tratamento referência, a degradabilidade observado pelos autores é bastante alta em comparação à observada aqui para os tratamentos SFA, SSM, SSA, SSF, SSFA e SSMA, que continham altos níveis de FDA (23,74 a 27,71%) e LDA (7,05 a 8,86%). Pascual, Cervera e Fernandez-Carmona (2000) avaliaram dietas com diferentes níveis de FDA, através de diferentes técnicas de digestibilidade *in vitro*. Para os níveis de fibra próximos aos utilizados neste ensaio (17,5; 23,3 e 31,3% de FDA na MS), foram obtidos valores médios de 68,87; 44,59 e 45,04% para os métodos multienzimático, incubação durante 36h com inóculo cecal e incubação pelo mesmo período usando inóculo fecal, respectivamente, sendo esses valores superiores aos aqui observados. Já Calabró et al. (1999) verificaram degradabilidades de 49,6 a 70,8 para a MS e 53,8 a 70,8 para a MO, de 10 diferentes dietas, após 96 h de fermentação.

A partir dos dados de digestibilidade *in vivo*, determinados em experimento prévio, e da degradabilidade *in vitro* para a MS e MO, aqui observados, foi possível a elaboração de equações lineares: $y = 0,6446x + 35,57$ ($R^2 = 0,76$)
MO: $y = 0,7353x + 30,882$ ($R^2 = 0,80$)
Onde: y = valor de digestibilidade *in vivo*,
x = valor de DMS para a primeira equação e
valor de DMO para a segunda equação.

Nota-se que essas equações correlacionam os dois parâmetros de forma confiável, pois o coeficiente de determinação (R^2) é próximo a 1,00 (Sampaio, 2002). Contudo, alguns alimentos apresentam características antinutricionais que podem favorecer ou desfavorecer a digestibilidade *in vivo* e *in vitro*, diretamente ou indiretamente. Percebe-se grande variação no teor de proteína lignificada, entre os tratamentos, principalmente nas dietas SFA e SSF e SSFA que continham farinha das folhas de mandioca (FFM). No processo de fabricação deste ingrediente, a parte aérea da mandioca passa por altas temperaturas (superior a 100°C), ocorrendo reação de Maillard, caracterizada pela ocorrência de aroma caramelizado, característico das dietas citadas anteriormente. Dessa forma, haverá considerável redução no valor de digestibilidade *in vivo*, o que colabora para que haja maior distorção entre os valores. Assim, se optou em determinar novamente as equações, excluindo-se os dados das dietas SFA, SSF e SSFA, sendo obtidas novas equações:

$$\text{MS: } y = 0,6054x + 38,097 \quad (R^2 = 0,97)$$

$$\text{MO: } y = 0,6932x + 33,749 \quad (R^2 = 0,97)$$

Onde: y = valor de digestibilidade *in vivo*

x = valor de DMS para a primeira equação e
valor de DMO para a segunda equação.

Nota-se que o coeficiente de determinação R^2 foi melhorado a partir dessa modificação, embora deva-se considerar que

o número de dados para determinação da equação tenha se reduzido. Pascual, Cervera e Fernandez-Carmona (2000) obtiveram elevada correlação quando métodos enzimáticos e fermentativos foram utilizados para prever a digestibilidade da MS. Naquele trabalho, o R² obtido, entre a digestibilidade *in vivo* da MS e a degradabilidade com 36h de incubação foi de 0,88. Calabro et al. (1999) verificaram também coeficientes de determinação acima

de 0,7 para comparações entre a digestibilidade *in vivo* e *in vitro* da MS. Verifica-se que é possível a obtenção dos valores de digestibilidade *in vivo* a partir dos dados de degradabilidade obtidos *in vitro*. A tabela 03 apresenta o volume total de gás produzido em função das diferentes dietas e do inóculo cecal.

Tabela 03 – Produção de gás total (mL/g MS) obtida a partir da fermentação de dietas tradicional, simplificadas e semi-simplificadas para coelhos utilizando diferentes fontes de inóculo cecal.

Parâmetro	Dietas experimentais							CV (%)
	REF	SFA	SSM	SSA	SSF	SSFA	SSMA	
Volume de gás produzido								
Volume de gás (mL)	136,55 a	109,09 b	94,95 c	111,07 b	109,01 b	113,01 b	101,18 c	9,74
Volume de gás em função dos inóculos*								
Volume de gás (mL)	100,68 b	108,73 b	119,73 a	110,40 b	123,03 a	115,25 a	97,04 b	12,61
Digestibilidade <i>in vivo</i> (previamente determinada)								
DMS	65,57	53,91	54,23	56,94	53,07	57,29	57,52	-
DMO	67,25	54,13	54,28	56,69	52,75	56,98	56,82	-

REF: referencia, SFA: dieta simplificada com base na mistura entre farinha das folhas de mandioca (FFM) e feno de alfafa (FAL), SSM: semi-simplificada com base em feno do terço superior da rama da mandioca (FTSRM), SSA: semi-simplificada com base em FAL, SSF: semi-simplificada com base em FFM, SSFA: semi-simplificada com base na mistura de FFM e FAL, SSMA: semi-simplificada com base na mistura entre FTSRM e FAL

DMS: Digestibilidade da matéria seca; DMO: Digestibilidade da matéria orgânica.

Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

*A doação do inóculo foi feita por cada grupo de três coelhos que recebiam cada uma das dietas experimentais

Pode-se observar que o tipo de dieta, que o animal doador recebia, influenciou a produção de gases, onde o maior volume foi proporcionado pelo tratamento referência, o qual possui menor teor de FDA, e maior de carboidratos facilmente fermentáveis, como as hemiceluloses. As dietas com maior conteúdo de FDA apresentaram menor produção de gases. O volume de gás foi influenciado também pela dieta que os animais recebiam (p<0,05). Diferentemente

do que foi observado para a DMO, o SSA apresentou valor de volume de gás produzido inferior ao observado para os inóculos provindos de coelhos que recebiam as dietas SSM, SSF e SSFA.

Euler et al. (2008), quantificaram o volume total de gás produzido após 24 h, a partir de cinco dietas, utilizando inóculo fresco, e verificaram valores de 78,43 a 87,46mL, estando esses valores abaixo dos aqui encontrados.

Fica claro que o tipo de dieta influencia a permanência de microrganismos especializados. Um mesmo inóculo que proporciona ampla degradabilidade pode não proporcionar ampla produção de gases. Maurício et al. (2003) observaram que a relação propionato/acetato pode interferir no volume de gases produzidos, onde a maior produção de acetato favorece a produção. Já Carabaño et al. (1988) observaram tendência de aumento nas concentrações de acetato e propionato quando na elevação dos níveis de fibra. Gidenne et al. (2000) explicam que o pH e a proporção de AGVs do ceco são influenciados pela quantidade e proporção da fibra dietética. Um maior conteúdo de fibra proporciona diminuição na concentração de butirato e aumento na de acetato, o que pode favorecer à produção de gases. Confirmando essas observações, Belenguer et al. (2008) verificaram diferenças na proporção de AGVs, quando diferentes fontes de fibra e amido foram utilizadas. Tal efeito foi observado também na produção de gases.

A partir da regressão linear entre a digestibilidade *in vivo* da MS e MO com o

volume total de gás produzido, pode-se propor as seguintes equações:

$$\text{MS: } y = 0,2677x + 27,3 \quad (R^2 = 0,69)$$

$$\text{MO: } y = 0,3155x + 22,058 \quad (R^2 = 0,73)$$

Onde: y = valor de digestibilidade *in vivo*(%)

x = volume total de gás produzido durante 24h (mL)

Assim, como descrito anteriormente, foram eliminados os tratamentos que continham alta inclusão da FFM. Dessa forma, as novas equações obtidas foram:

$$\text{MS: } y = 0,2569x + 30,06 \quad (R^2 = 0,93)$$

$$\text{MO: } y = 0,3056x + 24,853 \quad (R^2 = 0,94)$$

Onde: y = valor de digestibilidade *in vivo*(%)

x = volume total de gás produzido durante 24h (mL).

A figura 1 apresenta a evolução da produção de gases, durante o experimento. Nota-se que a maior quantidade de gás é produzida entre 4 a 8 horas, em função da fermentação de carboidratos solúveis. A fermentação dos carboidratos fibrosos, como a celulose, se processa após as 15h, o que provoca leve inclinação, como também observado por Euler et al. (2008).

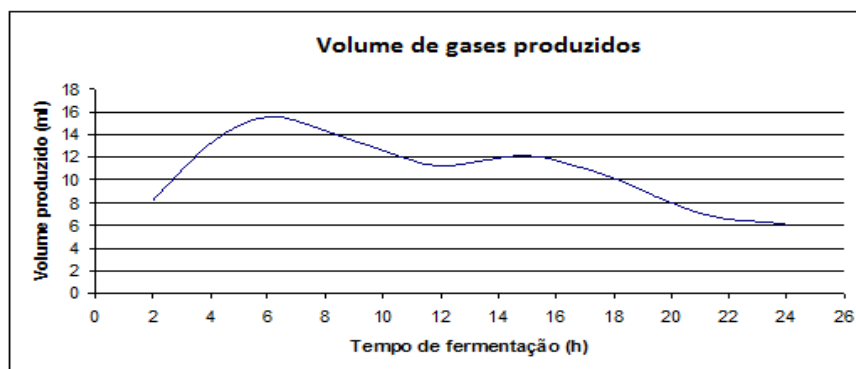


Figura 1 – Volume médio de gases produzidos (produção não acumulativa) a partir da fermentação microbiana de dietas tradicional, simplificadas e semi-simplificadas a partir de diferentes inóculos cecais, em função do tempo de fermentação.

Os parâmetros de produção de gases, estimados pelo modelo de France et al. (1993) são apresentados na tabela 04. O potencial máximo de produção de gases (A), parâmetro que representa a máxima produção de gases quando a curva atinge o seu platô, foi superior

para a dieta referência. Para os parâmetros “fase lag”(L) e taxa de fermentação (μ), verifica-se que a dieta referência apresentou a maior taxa de fermentação, provavelmente em razão do maior conteúdo de substratos facilmente fermentáveis.

Tabela 04 – Parâmetros de produção de gases, estimados pelo modelo de FRANCE et al. (1993), obtidos a partir da fermentação microbiana de dietas tradicional, simplificada e semi simplificadas para coelhos, utilizando diferentes fontes de inóculo cecal

Dietas	A ¹	L (h) ²	μ (h ⁻¹) ³	R ²
REF	150,78297	1,1916	0,1086	0,99
SFA	120,15165	0,5487	0,1020	0,99
SSM	108,86611	1,1159	0,0938	0,99
SSA	124,22698	0,4698	0,0980	0,99
SSF	128,72805	0,7440	0,0820	0,99
SSFA	128,22971	0,3226	0,0924	0,99
SSMA	111,32059	1,0102	0,1027	0,99

REF: referência, SFA: dieta simplificada com base na mistura entre farinha das folhas de mandioca (FFM) e feno de alfafa (FAL), SSM: semi-simplificada com base em feno do terço superior da rama da mandioca (FTSRM), SSA: semi-simplificada com base em FAL, SSF: semi-simplificada com base em FFM, SSFA: semi-simplificada com base na mistura de FFM e FAL, SSMA: se mi-simplificada com base na mistura entre FTSRM e FAL

¹ A = assíntota ou potencial máximo de produção de gases

² L = tempo de colonização (lag time)

³ μ = taxa de produção de gases (h⁻¹)

2) Método tradicional de digestibilidade *in vitro* com fases modificadas

Os valores encontrados para a digestibilidade *in vitro*, de acordo com as diferentes metodologias utilizadas, se encontram na tabela 05. Os valores *in vivo*

apresentados foram previamente determinados a partir da utilização de animais vivos.

Tabela 05 – Digestibilidade da matéria seca de dietas tradicional, simplificada e semi-simplificadas de acordo com diferentes metodologias *in vitro*

Dieta	Metodologia				
	<i>In vivo</i>	M1	M2	M3	M4
REF	65,57	72,43	65,55	67,81	68,93
SFA	53,91	57,19	54,22	63,49	66,83
SSM	54,23	56,01	51,70	60,10	63,27
SSA	56,94	57,69	54,02	62,73	63,55
SSF	53,07	59,36	50,86	70,13	67,40
SSFA	57,29	58,07	57,70	67,59	67,42
SSMA	57,52	57,87	51,24	61,74	63,61

REF: referência, SFA: dieta simplificada com base na mistura entre farinha das folhas de mandioca (FFM) e feno de alfafa (FAL), SSM: semi-simplificada com base em feno do terço superior da rama da mandioca (FTSRM), SSA: semi-simplificada com base em

FAL, SSF: semi-simplificada com base em FFM, SSFA: semi-simplificada com base na mistura de FFM e FAL, SSMA: semi-simplificada com base na mistura entre FTSM e FAL

M1, M2, M3 e M4: Metodologias obtidas após diferentes adaptações da metodologia tradicional proposta por Tilley e Terry (1963).

Observa-se que as metodologias com a segunda etapa baseada na digestão ácida com pepsina (M1 e M2), se mostraram mais adequadas para estimativas da digestibilidade *in vivo*, evidenciado pela maior proximidade entre os dados obtidos *in vivo* e *in vitro*. Verifica-se grande semelhança entre obtidos em M1 e M2 para a dieta SSFA, o que não é observado para a M3 e M4. O tempo de fermentação de 12h para a primeira etapa, como utilizado em M2 e M4, parece ser o que proporciona resultados mais próximos aos obtidos *in vivo*. Deve-se considerar que o tempo de fermentação na espécie cunícula é curto, quando comparado a outros animais (De Blás et al., 2002).

Quando se usou o detergente neutro, na segunda etapa, as diferenças entre rações de baixa e alta qualidade nutricional foram reduzidas. Isso pode ser confirmado pela falta de ajuste da equação linear das metodologias M3 e M4, em relação aos valores de digestibilidade *in vivo*. As quatro metodologias apresentaram as seguintes equações:

$$\text{Metodologia 1: } y = 1,1946x - 8,2113 \text{ (R}^2 = 0,79)$$

$$\text{Metodologia 2: } y = 1,1006x - 7,6168 \text{ (R}^2 = 0,79)$$

$$\text{Metodologia 3: } y = 0,257x + 40,279 \text{ (R}^2 = 0,05)$$

$$\text{Metodologia 4: } y = 0,7391x + 8,2597 \text{ (R}^2 = 0,17)$$

Onde y = valor de digestibilidade *in vivo* da MS

x = valor de digestibilidade *in vitro* da MS.

A farinha das folhas de mandioca contém fatores antinutricionais, principalmente aminoácidos complexados com carboidratos (reação de Maillard), que prejudicaram a digestibilidade *in vivo*, o que favorece a distorção entre os valores observados. Assim, eliminando as dietas que contêm alta inclusão deste ingrediente (SFA, SSF, SSFA), pode-se obter as seguintes equações:

$$\text{Metodologia 1: } y = 0,6259x + 20,384 \text{ (R}^2 = 0,96)$$

$$\text{Metodologia 2: } y = 0,6906x + 20,147 \text{ (R}^2 = 0,90)$$

$$\text{Metodologia 3: } y = 1,4477x - 32,778 \text{ (R}^2 = 0,97)$$

$$\text{Metodologia 4: } y = 1,7362x - 54,008 \text{ (R}^2 = 0,94)$$

Nota-se que é possível estimar os valores de digestibilidade *in vivo*, a partir dos valores *in vitro*.

Os resultados encontrados estão em acordo com os obtidos por Euler et al. (2009) que encontraram valores similares entre a digestibilidade *in vivo* de dietas para coelhos e a digestibilidade *in vitro* com primeiro estágio

de 24 h de fermentação, seguida de digestão ácida com pepsina.

Pascual, Cervera e Fernandez-Carmona (2000) avaliaram dietas com diferentes níveis de FDA, e para os níveis fibrosos próximos aos trabalhados neste ensaio (17,5; 23,3 e 31,3% de FDA na MS), foram obtidos valores médios de 68,87; 44,59 e 45,04% para os métodos multienzimático, incubação durante 36h com inóculo cecal e incubação pelo mesmo período usando inóculo fecal, sendo esses valores bastante diferentes dos aqui observados. Na determinação das equações de regressão, os autores encontraram coeficientes de determinação (R^2) da ordem de 0,95; 0,88 e 0,68, para os respectivos métodos citados acima, o que demonstra a possibilidade de estimativa da digestibilidade *in vivo*, a partir dos valores *in vitro*.

Ensaio com maior número de rações, com diferentes composições, devem ser realizados para confirmar os dados obtidos, elaborando equações com alto coeficiente de determinação, para predição dos valores *in vivo*.

CONCLUSÕES

A degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica se mostrou como método eficiente para avaliar as dietas experimentais, assim como a produção de gases. A exceção das dietas que continham alta inclusão de farinha das folhas de mandioca, essas medidas

se correlacionaram bem com a digestibilidade *in vivo* da MS. Esses parâmetros foram influenciados pelo tipo de inóculo cecal utilizado, o qual varia conforme a dieta que os animais recebem.

Em relação às modificações propostas ao método de digestibilidade *in vitro* proposto por Tilley e Terry (1963), dentre as metodologias testadas, a de 12 h de fermentação, com posterior digestão ácida com pepsina, apresentou maior similaridade com os valores *in vivo*. A partir de regressão linear simples, verifica-se alta correlação entre os dados de digestibilidade *in vivo* e de digestibilidade *in vitro* obtidos.

REREFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELENGUER A.; FONDEVILA M. BALCELLS J., et al. In vivo and in vitro study of caecal fermentation pattern and methanogenesis in rabbits. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 9, 2008, Verona. **Proceedings...** Verona, 2008. p. 535-540.

CARABAÑO, R. M.; FRAGA, M. J.; SANTOMÁ, G.; et al. Effect of diet on composition of cecal contents and on excretion and composition of soft and hard feces of rabbits. **Journal off Animal Science**, v. 66, n. 4, p. 901-910, 1988.

DE BLAS, J. C.; MATEOS, G. G. Feed formulation. In: DE BLAS, J. C.; WISEMAN, J. **The nutrition of the rabbit**.

Cambridge: CAB International, 1998. p. 241-253.

DE BLAS, J. C.; GARCIA J.; CARABAÑO R. M. Avances em nutrición de conejos. In: SIMPOSIUM DE CUNICULTURA, 27, 2002, Réus. **Anais...** Réus, 2002. p. 83-91.

CALABRÓ S.; NIZZA A.; PINNA W.; et al. Estimation of digestibility of compound diets for rabbits using the *in vitro* gas production technique. **World Rabbit Science**, v. 7, n. 4, p. 197-201, 1999.

COELHO C. C. G. M.; EULER A. C. C.; FERREIRA W. M.; et al. Comparação da digestibilidade da matéria seca *in vivo* com a estimativa da digestibilidade *in vitro* em coelhos. In: ZOOTEC, 2008, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: ABZ/UFPB, 2008. CD-ROM.

EULER A. C. C.; FERREIRA W. M.; MAURÍCIO R. M.; SOUSA L., CARVALHO W., TEIXEIRA E. A., COELHO C. C. G. M., MATOS C. In Vitro gas production of diets with inclusion of seaweed (*Lithothamnium* sp.) flour for white new zealand rabbits. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 9, 2008, Verona. **Proceedings...** Verona, 2008. p. 655-659.

EULER A. C. C., FERREIRA W. M.; TEIXEIRA E. A.; SALIBA E. O. S. O uso da

técnica de Tilley e Terry como avaliação de alimentos para coelhos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 19, 38, 2009, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: ABZ, 2009. CD-ROM.

FERREIRA V. P. A.; MAURÍCIO R. M.; FERREIRA W. M.; et al. Comparação entre a digestibilidade *in vivo* e digestibilidade obtida através da técnica *in vitro* semi-automática de produção de gás de coelhos em crescimento alimentados com dietas contendo diferentes tipos e níveis de gordura. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba - SP. **Anais...** Piracicaba: SBZ, 2001. CD-ROM.

FRANCE J.; DHANOA M. S.; THEODOROU M. K.; et al. A model to interpret gas accumulation profiles associated with *in vitro* degradation of ruminants feeds. **Journal Theory Biology**, v. 163, p. 99-111, 1993.

GIDENNE T. Recent advances in rabbit nutrition: emphasis on fibre requirements, a review. **World Rabbit Science**, v. 8, n. 1, p. 23-32, 2000.

MAURÍCIO R. M.; MOULDA F. L.; DHANOAB M. S.; et al. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, p. 321-330, 1999.

MAURÍCIO R. M.; PEREIRA L. G. R.; GONÇALVES L. C.; et al. Potencial da técnica *in vitro* semi-automática de produção de gás para avaliação de silagens de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.4, p. 1013-1020, 2003.

PASCUAL J. J.; CERVERA C.; FERNANDEZ-CARMONA J. Comparison of different *in vitro* digestibility methods for nutritive evaluation of rabbit diets. **World Rabbit Science**, v. 8, n. 2, p. 93-97, 2000.

SAMPAIO I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 2ª ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.

SOUZA A. V. C.; LOPES D. C.; MALAFAIA P. A. M.; et al. Avaliação da qualidade da fibra do rami em duas idades diferentes, para coelhos, pelo método da digestibilidade *in vitro*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu. **Anais...Botucatu: SBZ**, 1998. v. 4, p. 240-242.

THEODOROU M. K.; WILLIAMS B. A.; DHANOA M. S.; et al. A simple gas production method using a pressure

transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Feed Science Technology**, v. 48, p. 185-197, 1994.

TILLEY J. M. A.; TERRY R. A. A two stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. **Journal British Grassland Society**, v. 8, n. 2, p. 263-287, 1963

VAN SOEST P. J.; ROBERTSON J. B.; LEWIS B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. In: Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583-3597, 1991.