

EVALUACIÓN DE LA LIGNINA DETERGENTE ÁCIDO COMO MARCADOR PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD EN OVINOS

Evaluation of Acid Detergent Lignin as Marker to Predict Digestibility in Sheep

Mariela Lachmann-Sevilla², Omar Araujo-Febres¹, Juan Vergara-López³

¹Facultad de Agronomía. Departamento de Zootecnia. Apartado 15205. Maracaibo, ZU. 4005. Venezuela.

²Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Producción e Industria Animal. Apartado 15205. Maracaibo, ZU. 4005.

Venezuela. E-mail: marielalachmann@cantv.net ³INIA. Estación Local El Guayabo. Zulia.

RESUMEN

Se emplearon 12 carneros mestizos castrados West African, para evaluar el uso de lignina detergente ácido (LDA) como marcador, empleando el método de las proporciones para determinaciones de digestibilidad contra el método de colección total de heces (CTH). La ración ofrecida fue 80% de heno de *Brachiaria humidicola* + 20% de alimento balanceado. Se estimaron las digestibilidades de la Materia Seca (DMS), la Materia Orgánica (DMO) y la Proteína Cruda (DPC). La recuperación del marcador fue 99,85% ± 2,68. Se ejecutaron pruebas de "t" pareadas entre CTH y LDA, para detectar errores sistemáticos y pruebas de "F" para comparar las desviaciones estándares (DE) ubicando errores aleatorios. Para aquellas determinaciones en las que no se detectaron diferencias significativas se realizó la prueba de comparación de las medias para métodos con DE sin diferencia significativa, se evaluó la correlación entre métodos y se determinaron las ecuaciones de estimación de los coeficientes de digestibilidad obtenidos por CTH a partir de los estimados por LDA. CTH y LDA no mostraron diferencia en precisión y exactitud. Las estimaciones de DMS no presentaron diferencia, pero si para DMO y DPC (P<0,01), debidas a efectos aleatorios. CTH y LDA están correlacionadas, generándose ecuaciones de predicción para: DMS estimada por CTH = 1,0077 DMS estimada por LDA; DMO por estimada CTH = 1,0133 DMO por estimada LDA y DPC por estimada CTH = 1,0114 DPC por estimada LDA. Se concluye que la LDA puede utilizarse satisfactoriamente como marcador interno para evaluar forrajes maduros.

Palabras clave: Lignina detergente ácido, marcador, digestibilidad, pastos tropicales.

ABSTRACT

Twelve crossbred West African castrated male sheep were used to evaluate acid detergent lignin (ADL) as marker using the ratio technique to predict digestibility. The total collection of feces method (FTC) was used to compare results. The sheep were fed with 80% *Brachiaria humidicola* hay + 20% concentrate. Digestibility of dry matter (DMD), organic matter (DOM) and CP (DCP) were determined. Recovery of lignin was 99,85% ± 2,6. Paired "t" test between FTC and ADL were executed to detect bias and "F-test" in order to compare the standard deviations (SD) to locate random errors. Determinations in which they were not detected significant differences a comparison test of means for methods with SD without significant difference was made, the correlation between methods was evaluated and the equations of estimation of the coefficients of digestibility obtained by FTC from the estimates by ADL were determined. FTC and ADL did not have difference in precision or accuracy. DMD estimations were not different, but DOM and DCP had to random effects (P<0,01). FTC and ADL are correlated, and the prediction equations were: DMD estimated by FTC = 1.0077 DMD estimated by ADL; DMO estimated by FTC = 1.0133 DMO estimated by ADL and CP estimated by FTC = 1.0114 DCP estimated by ADL. One concludes that the ADL can be used like internal marker to evaluate tropical mature forages.

Key words: Acid detergent lignin, marker, digestibility, tropical forages.

INTRODUCCIÓN

La eficiencia de utilización de los recursos disponibles para la alimentación animal está sujeta al conocimiento de sus características nutricionales, siendo indispensable conocer la

digestibilidad. Su correcta evaluación hace necesario que los investigadores validen las técnicas que usan.

La lignina detergente ácido (LDA) ha sido ampliamente utilizada para monitorear estudios de digestión con rumiantes [11, 15], principalmente en las zonas de clima templado [11, 21], sin embargo, existe poca información sobre su utilización con forrajes tropicales, por lo tanto es necesario validar la metodología bajo nuestras condiciones.

Esta investigación se realizó con el objeto de comparar la precisión y exactitud de la digestibilidad estimada por el método de las proporciones utilizando la LDA como marcador interno en relación con los valores obtenidos por colección total de heces (CTH) en la evaluación de la digestibilidad de heno de *Brachiaria humidicola* en ovinos mestizos West African.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 12 ovinos mestizos West African, machos castrados, con un peso de $18,07 \pm 1,67$ kg y $281,4 \pm 25,04$ días de edad, en condiciones de bosque seco tropical, colocados en jaulas individuales. Los animales fueron pesados y desparasitados, mediante la aplicación oral de albendazol al 11,36% en una dosis de 7,5 mg/kg de peso vivo, antes de iniciar el periodo de acostumbramiento. El acostumbramiento tuvo una duración de 30 días durante los cuales los animales consumieron la dieta experimental [18]. El 80% de la ración ofrecida fue heno de *Brachiaria humidicola* y 20% de alimento balanceado (TABLA I).

Durante el período de acostumbramiento, se observaron periódicamente los animales, se pesó el alimento ofrecido y el rechazado, asegurando una oferta del 110% del consumo observado.

El periodo de colección tuvo una duración de 6 días durante los cuales se tomaron muestras del concentrado, del heno ofrecido, se limpió diariamente el comedero, colectando el 100% del rechazo, se pesó el total de las heces y se colectó el 20% del peso. La CTH se llevó a cabo mediante una bolsa de tela con cierre metálico que se mantuvo en posición con un arnés. Todas las muestras fueron colectadas diariamente en forma secuencial comenzando la labor a las 08:00 horas, colectando primero el rechazo, seguido de la orina, las heces y por último el heno y el concentrado ofrecido.

TABLA I

COMPOSICIÓN DE LOS INGREDIENTES DE LA RACIÓN OFRECIDA Y COMPOSICIÓN DE LA RACIÓN OFRECIDA MENOS EL MATERIAL RECHAZADO

	MS (%)	MO (%)	PC (%)	LDA (%)
Heno	90,19	95,68	3,74	7,59
A. balanceado	89,12	81,46	12,86	3,60
Consumo	$89,92 \pm 0,1$	$92,07 \pm 0,4$	$6,11 \pm 0,4$	$6,65 \pm 0,2$

Las muestras simples del rechazo, las heces, el heno y el alimento balanceado, se trasladaron al laboratorio y se hicieron muestras compuestas de las cuales se tomó un 20% para la determinación de materia seca total (MST), cenizas (CEN), proteína cruda (PC), fibra detergente ácido (FDA) y lignina detergente ácido (LDA), según la AOAC [1], considerando las recomendaciones propuestas por Van Soest y col. [19] para la determinación de LDA.

Las estimaciones de digestibilidad por el método de las proporciones con el uso de la lignina detergente ácido (LDA) como marcador y por el método de colección total de heces (CTH) se realizó con todos los animales del ensayo.

La digestibilidad se estimó según las siguientes fórmulas:

1. CTH: $DMS, DMO \text{ o } DPC (\%) = (CN - NH)/CN \times 100$, donde: CN = Consumo del nutriente, NH = Nutriente en las heces [2, 3].

2. LDA: $DMS (\%) = (1 - CMF/CMH) \times 100$, donde: CMF = Concentración del marcador en el forraje (%), CMH = Concentración del marcador en las heces (%) y para DMO y DPC, digestibilidad aparente (%) = $100 - [100 (MA/MH)(NH/NA)]$, donde: MA = % de marcador en el alimento, MH = % de marcador en las heces, NH = % de nutriente en las heces, NA = % de nutriente en el alimento [3, 9].

La recuperación fecal de la LDA se calculó usando los datos de CTH, y sustrayendo el porcentaje de desaparición al 100% [4, 7].

Los valores de digestibilidad obtenidos fueron contrastados entre sí.

Los datos se analizaron, tomando como criterios de selección la precisión y exactitud de los métodos. Se ejecutaron pruebas de "t" pareadas entre CTH y LDA, para detectar errores sistemáticos y pruebas de "F" para comparar las desviaciones estándares (DE) ubicando errores aleatorios. Para aquellas determinaciones en las que no se detectaron diferencias significativas se realizó la prueba de comparación de las medias para métodos con DE sin diferencia significativa [10]. Se evaluó la correlación entre los métodos, seguido de la determinación de las ecuaciones de estimación de los coeficientes de digestibilidad obtenidos por CTH a partir de los estimados por LDA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuperación de la LDA en las heces

La LDA presentó una recuperación de $99,85\% \pm 2,68$, con un coeficiente de digestión aparente, estimado por CTH, de $0,94\% \pm 0,37$. Estos valores están en concordancia con reportes de 99,2% de recuperación de la LDA proveniente de heno de gramíneas, sin detectar diferencia en relación con 100% [7], lo que es de esperarse cuando el contenido de LDA en el material es del 5% o más [6]. Los resultados obtenidos permiten presumir que la LDA cumple con las especificaciones básicas para ser utilizada como marcador en la realización de

pruebas de digestibilidad sobre pasturas maduras, pero no podría inferirse la misma respuesta para pastos tiernos, ya que su uso eficiente sólo es posible cuando su recuperación fecal es alta [5, 16] y el incremento en el contenido de LDA en los pastos tropicales es directamente proporcional al avance del grado de madurez.

Precisión de LDA contra la de CTH

Al comparar la desviación estándar absoluta (DEA), el coeficiente de variación (CV) y la varianza muestral (S^2) de los coeficientes de digestión de la MS, MO y PC, estimadas de los datos de CTH y la LDA, calculadas en base a la media (χ), y a la mediana (m), se muestran valores similares (TABLA II), considerándose la dispersión observada baja.

Los CV se comparan con los valores de la escala propuesta por Pimentel [13] que clasifica como bajos aquellos menores de 10%, por lo que se afirma que la LDA presenta una alta precisión para las estimaciones de DMS, DMO, y DPC.

La menor dispersión en ambos métodos (DEA, CV, S^2) se presenta para la DMS, seguida de la DMO, y por último la DPC. Este comportamiento puede estar relacionado con la complejidad de los análisis, ya que la determinación de la DMS es el más sencillo y con menor número de pasos en la secuencia analítica, la determinación de la DMO implica la adición de pasos en las secuencias analíticas y DPC, aumentando la probabilidad de incorporar errores aleatorios.

Al comparar las varianzas, usando la prueba de F (TABLA III), se encontró que no existen diferencias en cuanto a la precisión de las estimaciones de digestibilidad de CTH y LDA, por lo que si se toma en cuenta únicamente la precisión como parámetro de selección del método más adecuado, ambos métodos pueden usarse indistintamente. Sin embargo, se ha recomendado precaución con el uso de la LDA como marcador, ya que ningún método es preciso en sus estimaciones bajo todas las condiciones [7].

Exactitud del método de la LDA

El cálculo de la exactitud de las estimaciones de la DMS, DMO y DPC, para el método de LDA (TABLA IV) permitió detectar la presencia de errores sistemáticos en las secuencias analíticas, tomando como valor referencial la media de observaciones repetidas de la digestibilidad de la MS, MO y PC de la ración determinada por CTH. Los valores estimados LDA se encuentran desplazados a la izquierda en relación con la curva de distribución normal descrita por los valores aceptados. La digestibilidad de cada una de las fracciones nutritivas estimado por la LDA presenta un desplazamiento de igual sentido pero diferente magnitud, -0,78% para la DMS, -1,31% para la DMO y -1,13% para la DPC. La importancia de considerar o no este desplazamiento, queda sujeta a los resultados obtenidos en las pruebas de media que se muestran a continuación.

Este parámetro al igual que la precisión no es normalmente tomado en cuenta en ensayos de validación de métodos de evaluación en el área de producción animal utilizándose de manera casi exclusiva para la validación de métodos de análisis químicos, sin embargo, su inclusión es válida y sumamente útil al contrastar metodologías de trabajo cuyos resultados finales sean cuantitativos.

Anova para LDA contra CTH

Al analizar DMS por el método de CTH y con LDA, no se encontró diferencia entre los métodos ($R^2 = 0,96$, $CV = 1,21$), pero sí un efecto ($P < 0,01$) por animal, coincidiendo con otros investigadores [12, 14]. Reportes anteriores afirman que la DMS estimada con LDA no muestran diferencias con la DMS estimada por CTH, cuando los animales consumen heno de gramíneas sin restricción [7, 8].

En cuanto a la DMO ($R^2 = 0,99$) y la DPC ($R^2 = 0,99$), se encontraron diferencias ($P < 0,01$), tanto entre los métodos como entre animales.

TABLA II
PRECISIÓN DE LOS MÉTODOS DE CTH Y LDA (n=12)

Método		Calculado en base a la χ				Calculado en base a la m			
		χ	DEA	CV (%)	Varianza	m	DEA	CV (%)	Varianza
DMS	CTH	38,93	1,69	4,34	2,86	39,42	1,77	4,48	3,11
DMS	LDA	38,63	1,73	4,49	3,00	38,59	1,73	4,49	3,00
DMO	CTH	41,81	1,96	4,68	3,84	41,58	1,97	4,75	3,90
DMO	LDA	41,27	1,96	4,75	3,84	41,30	1,96	4,74	3,84
DPC	CTH	45,23	4,26	9,42	18,16	43,70	4,55	10,41	20,70
DPC	LDA	44,72	4,24	9,47	17,94	43,32	4,48	10,34	20,06

TABLA III
PRUEBA DE F PARA COMPARACIÓN DE LAS DESVIACIONES ESTÁNDAR ENTRE LOS MÉTODOS DE CTH Y LDA (n=12)

Método		Calculado en base a la χ				Calculado en base a la m			
		S ²	F cal.	F tab.	Dif.	S ²	F cal.	F tab.	Dif.
DMS	CTH	2,86	1,05	2,821	Ns	3,11	1,04	2,821	ns
DMS	LDA	3,00				3,00			
DMO	CTH	3,84	1,00	2,821	Ns	3,90	1,02	2,821	ns
DMO	LDA	3,84				3,84			
DPC	CTH	18,16	1,01	2,821	Ns	20,70	1,03	2,821	ns
DPC	LDA	17,94				20,06			

TABLA IV
EXACTITUD DEL MÉTODO DE LIGNINA DETERGENTE ÁCIDO (n=12)

	Calculado en base a la χ de CTH			Calculado en base a la m de CTH		
	Valor aceptado	Exactitud absoluta	Exactitud relativa (%)	Valor aceptado	Exactitud absoluta	Exactitud relativa (%)
DMS	38,93	- 0,30	- 0,78	39,42	- 0,79	- 2,00
DMO	41,81	- 0,55	- 1,31	41,58	- 0,32	- ,076
DPC	45,23	- 0,51	- 1,13	43,70	1,02	2,32

Prueba de "T" pareada de LDA contra CTH

Las estimaciones de digestibilidad de los métodos de CTH y LDA, no mostraron diferencias entre las estimaciones de DMS, pero si ($P < 0,01$) para DMO y DPC obtenidas por los métodos contrastados (FIG. 1).

La LDA presentó una ligera subestimación del coeficiente de digestibilidad aparente para estas fracciones, posiblemente debido a la presencia de errores sistemáticos en las determinaciones de MO y PC.

Pruebas de comparación de medias entre LDA y CTH

Con la finalidad de comprobar que las diferencias detectadas entre los métodos de CTH y LDA se debían a errores sistemáticos o aleatorios se ejecutaron las pruebas de comparación de las medias para métodos con DE sin diferencias significativas (TABLA V), tomando como hipótesis nula que la media de los resultados dada por ambos métodos es igual. Al no encontrarse diferencia significativa para ninguna de las comparaciones, se acepta que la diferencia encontrada entre las estimaciones de DMO y DPC por los métodos de CTH y LDA se debe a errores aleatorios. Esto refuerza reportes anteriores donde otros investigadores no han encontrado diferencias significativas entre estos métodos para los coefi-

cientes de DPC [8]. Sin embargo, se encuentran reportes que muestran diferencias ($P < 0,05$) para los coeficientes de digestión estimados con la LDA como marcador y el método de CTH, aún cuando la recuperación del marcador fue muy cercana a 100% [17].

Ecuaciones de predicción para el cálculo de la digestibilidad con la LDA

Los coeficientes de digestión pueden ser ajustados introduciendo factores de corrección en función de la digestibilidad del marcador interno determinada por colección total [20]. Con esta finalidad se ejecutó un análisis de correlación entre los coeficientes de digestión estimados por ambos métodos para una misma fracción, obteniéndose una alta correlación de la DMS estimada por CTH (DMSCTH) con la DMS estimada con LDA (DMSLDA) ($r=0,93$; $P < 0,0001$), la DMO estimada por CTH (DMOCTH) con la DMO estimada con LDA (DMOLDA) ($r=0,99$; $P < 0,0001$) y la DPC estimada por CTH (DPCCTH) con la DPC estimada con LDA (DPCLDA) ($r=0,99$; $P < 0,0001$) calculándose posteriormente la ecuación de predicción para estimar el valor de la digestibilidad de cada una de las fracciones en estudio de la colección total de heces a partir del valor estimado por el método de la LDA. Las ecuaciones de predicción generadas fueron las siguientes:

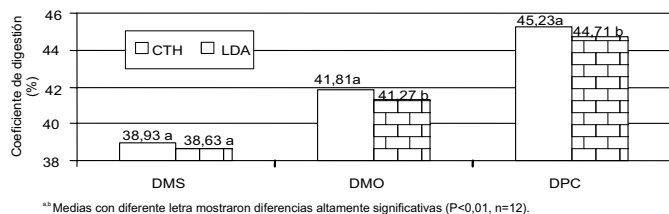


FIGURA 1. DIGESTIBILIDADES DETERMINADAS POR CTH Y LDA.

1. DMSCTH=1,0077 DMSLDA ($r^2=0,99$; C(p)=1,00; P<0,0001)
2. DMOCTH=1,0133 DMOLDA ($r^2=0,99$; C(p)=1,00; P<0,0001)
3. DPCCTH=1,0114 DPCLDA ($r^2=0,99$; C(p)=1,00; P<0,0001)

Estas ecuaciones son válidas únicamente al replicar las condiciones experimentales en las cuales se basó su determinación, ya que normalmente las ecuaciones derivadas de ensayos de digestión no necesariamente se aplican a diferentes tipos de forrajes con animales a pastoreo [16].

Para que este ajuste sea válido, además de cumplir con el requisito de ser un marcador interno, debe hacerse basado en la premisa de que el análisis es preciso y las pérdidas son constantes.

CONCLUSIONES

1. Las estimaciones de digestibilidad usando la LDA como marcador fueron muy cercanas a las obtenidas por el

método de CTH gracias a la alta recuperación de la LDA en las heces.

2. No existe diferencia en cuanto a la precisión de las estimaciones de digestibilidad del método de CTH y la LDA como marcador usando el método de las proporciones, por lo que sus estimaciones son válidas y repetibles.
3. El análisis de varianza y la prueba de "t" pareada no encontraron diferencias entre CTH y LDA para la DMS, pero sí para DMO y DPC, por lo que sólo se recomienda su uso para la estimación de la DMS.
4. Las pruebas de media evidenciaron que las diferencias encontradas entre CTH y LDA para DMO y DPC son debidas a efectos aleatorios, por lo que deben realizarse otras investigaciones analizando los mismos parámetros pero no sólo comparando los coeficientes estimados sino evaluando los distintos pasos para detectar donde se produce mayor variación.
5. Existe una alta correlación entre la DMSCTH con la DMSLDA, la DMOCTH con la DMOLDA y la DPCCTH con la DPCLDA. Generándose ecuaciones de predicción válidas cuando el contenido de LDA en la ración es cercano al 7%.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento de esta investigación. Proyecto No. 0738-97.

TABLA V
COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS PARA MÉTODOS CON DESVIACIONES ESTÁNDAR SIN DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LOS MÉTODOS DE CTH Y LDA (P<0,01, n=12)

Método	Método	Calculado en base a la χ				Calculado en base a la m			
		χ	t cal.	t tab.	Diferencia	m	t cal.	t tab.	Diferencia
DMS	CTH	38,93	0,44	3,11	Ns	39,42	1,16	3,11	ns
DMS	LDA	38,63				38,59			
DMO	CTH	41,81	0,69	3,11	Ns	41,58	0,35	3,11	ns
DMO	LDA	41,27				41,30			
DPC	CTH	45,23	0,47	3,11	Ns	43,70	0,21	3,11	ns
DPC	LDA	44,72				43,32			

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16th ED. AOAC International. Maryland, USA. Vol. I, Cap. 4: 1-29. 1997.
- [2] BONDI, A. A. **Nutrición Animal**. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 546 pp. 1989.
- [3] CHURCH, D. C.; POND, W. G.. **Fundamentos de nutrición y alimentación de animales**. Editorial Limusa, S. A. de C. V. Grupo Noriega Editores. México. 438 pp. 1994.
- [4] COCHRAN, R. C.; VANZANT, E. S.; DEL CURTO, T.. Evaluation of internal markers isolated by alkaline hydrogen peroxide incubation and acid detergent lignin extraction. **J. Anim. Sci.** 66: 3245-3251. 1988.
- [5] FAHEY, G. C.; JUNG, H. G. Lignin as marker in digestion studies: A review. **J. Anim. Sci.** 57: 220-225. 1983.
- [6] FORBES, R. M.; GARRIGUS, W. P. Some effects of forage composition on its nutritive value when cut and fed green to steers and wethers, as determined conventionally and by the lignin ratio. **J. Anim. Sci.** 9: 531-539. 1950.
- [7] JUDKINS, M. B.; KRYSL, L. J.; BARTON, R. K. Estimating diet digestibility: A comparison of 11 techniques across six different diets fed to rams. **J. Anim. Sci.** 68: 1405-1415. 1990.
- [8] KANE, E. A.; JACOBSON, W. C.; MOORE, L. A.. A Comparison of techniques used in digestibility studies with dairy cattle. **J. Nutr.** 41: 583-596. 1950.
- [9] LASCANO, C.; BOREL, R.; QUIROZ, R.; ZORRILLA, J.; CHAVES, C.; WERNLI, C. Recomendaciones sobre metodología para la medición de consumo y digestibilidad *in vivo*. En: M. E. Ruiz y A. Ruiz (Eds.). **Nutrición de Rumiantes**: Guía metodológica de investigación. IICA-ALPA-RISPAL. San José, Costa Rica.. 159 - 168 pp. 1990.
- [10] MILLER, J. C.; MILLER, J. N. **Estadística para química analítica**. Segunda edición. Adison-Wesley-Iberoamericana, S. A. Wilmington, Delaware. E. U. A. 211 pp. 1993.
- [11] MUNTIFERING, R. B. Evaluation of various lignin assays for determining ruminal digestion of roughages by lambs. **J. Anim. Sci.** 55: 432-438. 1982.
- [12] ORTEGA, M^a E.; CARRANCO, M^A. E. Factores que afectan la digestibilidad *in situ* de los alimentos en el rumen. Estudio recapitulativo. **Vet. Méx.** 24: 55-60. 1993.
- [13] PIMENTEL, G. F. **Curso de estadística experimental**. 4^{ta} Edición. Livraria Nobel S. A. So Paulo. Brasil. 468 pp. 1970.
- [14] PURSER, D. B.; MOIR, R. J. Rumen volume as a factor involved in individual sheep differences. **J. Anim. Sci.** 25: 509-515. 1966.
- [15] REEVES, J. B., III. Relationships between crude protein and determination of nondispersible lignin. **J. Dairy. Sci.** 80: 692-699. 1997.
- [16] STREET, CH. L. A review of techniques used to estimate the *in vivo* digestibility of grazed forage. **J. Anim. Sci.** 29:757-768. 1969.
- [17] SUNVOLD, G. D.; COCHRAN, R. C. Technical note: Evaluation of acid detergent lignin, alkaline peroxide lignin, acid soluble ash, and indigestible acid detergent fiber as internal markers for prediction of Alfalfa, Bromegrass, and Prairie hay digestibility by beef steers. **J. Anim. Sci.** 69: 4951-4955. 1991.
- [18] VAN KEULEN, J.; YOUNG, B. A. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. **J. Anim. Sci.** 44: 282-287. 1977.
- [19] VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J.; LEWIS, B. A.. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** 74: 3583-3597. 1991.
- [20] VAN SOEST, P.J. **Nutritional Ecology of the ruminant**. Cornell University Press. II Edición. 108-195pp. 1994.
- [21] WALLACE, J. D. VAN DYNE, G. M. Precision of indirect methods for estimating digestibility of forage consumed by grazing cattle. **J. Range Manage.** 26: 424-430. 1970.