



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACION DE LAS CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO
COMO UN MARCADOR NATURAL PARA DETERMINAR LA
DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA SECA EN RUMIANTES.**

T E S I S

Que para obtener el título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

p r e s e n t a

ANDRES AGUILAR MARCOS

**Asesores: M.V.Z. FERNANDO PEREZ - GIL ROMO
M.V.Z. ARTURO CASTELLANOS RUELAS**

México, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E.

	PAG.
CAPITULO I	
Resumen	1
CAPITULO II	
Introducción	3
CAPITULO III	
Material y Métodos	8
CAPITULO IV	
Resultados	15
CAPITULO V	
Discusión	22
CAPITULO VI	
Conclusiones	26
CAPITULO VII	
Bibliografía	28

CAPITULO I

R E S U M E N

" EVALUACION DE LAS CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO COMO UN MARCADOR
NATURAL PARA DETERMINAR LA DIGESTIBILIDAD DE LA MATERIA SECA EN
RUMIANTES "

ANDRES AGUILAR MARCOS

ASESORES:

M.V.Z. FERNANDO PEREZ-GIL ROHO

M.V.Z. ARTURO CASTELLANOS RUELAS

R E S U M E N

La finalidad del presente trabajo, fue la de evaluar el método de las cenizas ácido insolubles (CAI), como un marcador natural para determinar la digestibilidad de la materia seca en borregos, comparándolo con el método in vivo mediante la recolección total de heces y el método in vitro con tres modificaciones en el tiempo de digestión con pepsina de 12, 24 y 48 horas. Las tres variaciones en el tiempo de digestión con pepsina en la digestibilidad in vitro, fueron estadísticamente diferentes entre sí, únicamente la digestión con pepsina durante 48 hs no tuvo diferencias significativas comparado con el método in vivo ($P < 0.05$). El método CAI -- fue significativamente diferente ($P < 0.05$), comparado con los métodos in vivo e in vitro (48 hs). La recuperación de cenizas en heces fue del 83.2 % lo que fue significativamente diferente al 100% de recuperación teórica ($P < 0.01$). No se detectó un patrón de variación en la estimación del coeficiente de digestibilidad y excreción de CAI durante las 24 horas del día.

CAPITULO II

INTRODUCCION

I N T R O D U C C I O N

Los coeficientes de digestibilidad aparente no son la medida ideal para indicar el valor nutritivo de un alimento, pero no hay duda que reflejan en cierto grado el aprovechamiento de los alimentos. El concepto de digestibilidad verdadera es puramente teórico; para su determinación se requeriría hacer una diferenciación de -- los nutrimentos o elementos que apareciendo en las heces no son de origen alimenticio directo, sino de origen metabólico (4, 11, 13, 15).

El uso de la técnica de la evaluación de la digestibilidad, -- mediante la recolección total de heces, es difícil de realizar, debido al costo y tiempo en que se lleva a cabo, por lo que ha sido reemplazada gradualmente por métodos más sencillos.

En el laboratorio se han reproducido exitosamente las reacciones que tienen lugar en el tracto digestivo del rumiante, por medio del método llamado de "dos etapas in vitro". En el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (INIP), el método más empleado es el de la medición realizada in vitro (17), similar al propuesto originalmente en 1963 (19). Diversas modificaciones se han sugerido al método original, algunas de estas son más utilizadas -- en diferentes institutos de investigación (2, 9, 14). Esta técnica

ha sido comparada con la digestibilidad in vivo encontrando una alta correlación en pastos tropicales, según Minson y McLeod (14).

Todo esto resulta laborioso, por lo que en 1972 (10), se determina la ventaja del uso de los marcadores haciendo una revisión bibliográfica de éstos, no se considera específicamente el uso de las cenizas ácido Insolubles (CAI) como un marcador para determinar la digestibilidad, el cual es similar a los componentes de sílice. Shrivastava y Talapatra en 1962 (16), usaron residuos insolubles en ácido de alimento y heces como un marcador natural en alimentos de rumiantes. Sus investigaciones indicaron una cantidad recuperada de residuo de 99.8 % y el coeficiente de digestibilidad estimada fue desde un punto de vista práctico, similar al método tradicional de colección total. Posteriormente utilizaron este marcador para determinar la composición del pasto y el nivel de nutrición de ovejas en pastoreo. En 1974 (12) evaluaron el uso de CAI como un marcador natural para la determinación de la digestibilidad del alimento de cerdos en crecimiento, llegando a la conclusión que el método CAI era superior al método de óxido de cromo como marcador en dietas para cerdos. En 1975 (23), se determinó que el método CAI era de similar exactitud al método de colección total para la determinación de energía metabolizable y digestibilidad de ácidos grasos en dietas de pollos de engorda. En 1977 (22), hicieron una comparación entre el método de colección total de he-

ces y el método CAI en la determinación del coeficiente de digestibilidad de la materia seca en raciones para ovinos, para ello utilizaron tres procedimientos analíticos de laboratorio (HCl concentrado, HCl 4N y HCl 2N), los cuales difirieron en la secuencia y temperatura de incineración y en la concentración de ácido. Los coeficientes de digestibilidad de la materia seca estimados por el método de las cenizas insolubles con tres procedimientos analíticos, no tuvo diferencias significativas con el estimado por el método tradicional de colección total de heces. No encontraron evidencia de variación diurna en la excreción de CAI que afectara la estimación del coeficiente de digestibilidad. De los tres procedimientos analíticos utilizados, concluyeron que el más conveniente y que menos tiempo consume fue el HCl 2N. En 1979 (20), comparando las cenizas insolubles y el permanganato de lignina como indicadores indigestibles para determinar la digestibilidad en dietas de ganado, llegaron a la conclusión que el método CAI es de gran exactitud en la determinación de la digestibilidad en rumiantes. En México en 1980, se utilizó también este método en experimentos con rumiantes (7).

La probable ventaja de este método radica en que su determinación no requiere de técnicas ni aparatos especiales.

Debido a lo anterior, se consideró la posibilidad de susti---

tuir el método de la digestibilidad in vitro, ampliamente difundido, por el de cenizas ácido insolubles como estimador de la digestibilidad aparente.

A nuestro juicio, no se ha establecido un paralelismo en México entre estas técnicas, que permitan valorarlas y ajustar su uso a las condiciones existentes en los institutos de investigación,-- que facilite y abarate el costo del cálculo de la digestibilidad de los alimentos. Este estudio tiene por objetivo, evaluar el método de las cenizas insolubles en ácido para la determinación de la digestibilidad de la materia seca en raciones de rumiantes.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

Este trabajo fue realizado en el Centro Experimental Pecuario "Tizimín", dependiente del Instituto Nacional de Investigaciones - Pecuarias - SARH, en Tizimín, Yucatán.

DISEÑO EXPERIMENTAL

PRUEBA IN VIVO.: Se utilizaron 6 borregos Pelibuey con un peso promedio de 18.5 Kg. Los animales tuvieron un período de adaptación a las jaulas metabólicas y al zacate Green panic (Panicum maximum, var. Trichoglume) de 15 días. Posteriormente, se realizó un período de recolección total de heces durante 7 días; una vez determinada la cantidad de heces producidas, se tomó una muestra del 10 % y se le determinó el porcentaje de materia seca. Simultáneamente, se midió el consumo y rechazo de alimento al cual se le determinó la materia seca. El método utilizado fue el sugerido por Rodríguez (15).

El coeficiente de digestibilidad de la materia seca (M.S.) se calculó por medio de la siguiente ecuación:

Coeficiente de

$$\text{digestibilidad} = \frac{\text{M.S. consumida} - \text{M.S. excretada}}{\text{M.S. consumida}} \times 100$$

de la M.S. (%)

M.S. consumida

PRUEBA IN VITRO.: Se utilizó el mismo zacate de la prueba anterior, el cual se deshidrató y se molió en cribas de 1mm. Se empleó el método Moore (9), realizando tres modificaciones en el tiempo de digestión con pepsina de 12, 24 y 48 horas. El líquido ruminal provino de los borregos de la prueba in vivo, las muestras se trabajaron por sextuplicado.

Procedimiento:

- 1.- Se pesó 0.5 g de materia seca (M.S.) de pasto en tubos de nalgene (se determinó M.S. en otra muestra). Se utilizaron blancos a los cuáles se les puso las soluciones buffer-inóculo sin forraje.
- 2.- Se adicionaron 20 ml de solución buffer-inóculo precalentado a 39 °C a cada tubo y se colocaron en baño de agua a la misma temperatura. Se burbujó cada tubo con CO₂ por 10 - 15 seg., se taparon con válvulas Bunsen y se incubaron por 48 horas.
- 3.- Se agregaron 4 gotas de alcohol isoamílico (para reducir la espuma) y se agregaron 2 ml de HCl 2.2 N. Se adicionaron 0.1 g de pepsina a cada tubo con agitación suave. Se taparon los tubo y se incubaron nuevamente a 39 °C durante 12, 24 y 48 horas.

Al final de la incubación, se filtró el contenido de cada tubo a través de un crisol con fibra de vidrio tarado y se secó a -- 100 °C.

El porcentaje de la digestibilidad in vitro de la M.S. se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Peso muestra seca} - (\text{peso residuo seco} - \text{peso blanco})}{\text{peso muestra seca}} \times 100$$

PRUEBA DE CENIZAS INSOLUBLES.: La cantidad de CAI se determinó por el método sugerido por Van Keulen y Young en 1977 (22), a partir del alimento y heces obtenidas de los borregos de la prueba in vivo.

Procedimiento:

- 1.- Se pesó por duplicado 5 g. de muestra de alimento o heces (seco y molido) en un crisol de 50 ml.
- 2.- Se secó 2 hs en una estufa de aire forzado a 135 °C, se dejó enfriar en un desecador a temperatura ambiente y se volvió a pesar (Pn).
- 3.- Se incineró toda la noche a 450 °C. Las cenizas fueron---

transferidas a un vaso Berzellius de 600 ml. (sin pico) y se le agregó 100 ml. de HCl 2N., la mezcla se hirvió por 5 minutos sobre un aparato de digestión de fibra cruda--- (Labconco Corp. Kansas City MO).

- 4.- El hidrolizado caliente se filtró en papel Whatman No. 40 y lavó con agua destilada caliente de 85 - 100 °C hasta quedar libre de ácido.
- 5.- Las cenizas y el papel filtro fueron transferidos nuevamente al crisol e incinerados toda la noche a 450 °C.
- 6.- El crisol y su contenido fueron enfriados en un desecador a temperatura ambiente, pesado con las cenizas (Pc) y vuelto a pesar inmediatamente después de vaciarlo (Pv).

El porcentaje de CAI fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ CAI} = (P_c - P_v) / P_m \times 100, \text{ donde:}$$

P_c = Peso del crisol con cenizas.

P_v = Peso del crisol vacío.

P_m = Peso de la materia seca de la muestra.

La digestibilidad de la M.S. se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ C.D.} = \frac{\% \text{ indicador en heces} - \% \text{ indicador en alimento}}{\% \text{ indicador en heces}} \times 100$$

C.D. = Coeficiente de digestibilidad.

Durante un día se realizó el muestreo de heces de los animales; durante 24 horas con intervalos de 2 horas entre muestreos para determinar si existía variación diurna en la determinación de la digestibilidad con el método CAI.

Los resultados numéricos obtenidos, fueron analizados usando la técnica de análisis de varianza y las medias comparadas mediante la prueba de Scheffe.

SOLUCION BUFFER McDOUGALL:

La solución buffer se preparó adicionando 10 ml. de la solución 2 a un litro de la solución 1, se agitó la mezcla con agitador magnético durante 15 minutos., durante los cuales se burbujeo CO_2 . El pH obtenido debe ser de 6.9.

1) Solución 1

Na_2HPO_4 anhidro	3.7 g
Na HPO_3	9.8 g
Agua desionizada a 40 °C	1.0 lt

2) Solución 2

NaCl	4.7 g
KCl	5.7 g
CaCl_2	0.4 g
MgCl_2	0.6 g
Agua desionizada	100.0 ml

CAPITULO IV

RESULTADOS

RESULTADOS

Los resultados del coeficiente de digestibilidad (%) de la materia seca del Green panic (Panicum maximum, var. Trichoglume) obtenidos por los métodos: in vivo, in vitro y por cenizas ácido Insolubles son descritas a continuación:

Con el método in vivo por medio de la recolección total de heces durante un periodo de 7 días, el consumo voluntario de la materia seca fue de 2.4 ± 0.3 % del peso vivo (P.V.), los borregos tuvieron una ganancia de peso de 1.6 ± 0.25 Kg. El coeficiente de digestibilidad (%) fue de 57.6 ± 3.06 (ver cuadro 1).

El método in vitro con 3 variaciones en el tiempo de digestión con pepsina de; 12, 24 y 48 horas, dió un coeficiente de digestibilidad (%) de; 48.2 ± 1.4 , 51.9 ± 1.2 y 57.1 ± 1.3 respectivamente (ver cuadro 1). El porcentaje se incrementó linealmente conforme aumentó el tiempo de digestión con pepsina (ver gráfica 1).

Con el método de cenizas ácido Insolubles HCl 2N, el coeficiente de digestibilidad (%) fue de 49.0 ± 1.26 (ver cuadro 1).

Las 3 variaciones en el método in vitro, resultaron estadísti

camente diferentes entre sí ($P < 0.05$). No se encontró diferencia estadística significativa entre la digestibilidad in vivo y la in vitro empleando 48 hs de digestión en pepsina. El método CAI fue estadísticamente diferente ($P < 0.05$) a los coeficientes calculados in vivo e in vitro (48 hs). No hubo diferencias significativas con las variaciones del método in vitro de 12 y 24 horas (ver cuadro 1).

En el cuadro 2 se presenta el promedio de recuperación (%) de CAI en heces, utilizando las mediciones de ingestión de alimento y excreción fecal. El promedio de recuperación obtenido, fue de 83.2 % y resultó estadísticamente diferente ($P < 0.01$) del total (100 %) de recuperación teórica (ver cuadro 2).

En la gráfica 2, se muestran los promedios con su desviación estandard de los coeficientes de digestibilidad, determinados por el método CAI en las muestras fecales de 5 borregos, colectadas a intervalos de 2 hs durante las 24 horas del día. Analizando dichos resultados y removiendo los efectos de variación entre animales, no se determinó variación durante el período de muestreo en las estimaciones de la digestibilidad de la materia seca, así como, en la excreción de CAI (ver gráfica 2).

C U A D R O 1

COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD (%) DE LA MATERIA SECA DEL GREEN PANIC POR 3 METODOS

Muestra	Método <u>In vivo</u>	Método <u>In vitro</u>			Método por CIA HCl 2N
		12 hrs	24 hrs	48 hrs	
1	58.0	48.0	50.0	56.9	48.4
2	55.4	46.5	52.0	59.4	49.9
3	61.9	48.6	52.1	55.8	47.3
4	57.4	49.6	52.5	57.5	48.3
5	53.4	46.5	51.3	56.1	49.4
6	59.6	49.7	53.4	56.9	50.8
$\bar{X} \pm s$	57.6 ± 3.06^a	48.2 ± 1.4^b	51.9 ± 1.2^c	57.1 ± 1.3^a	49.0 ± 1.26^{bc}

a, b, c Valores con diferente literal son estadísticamente diferentes ($P < .05$)

X = PROMEDIO

S = DESVIACION ESTANDARD

C U A D R O 2

RECUPERACION (2) EN HECES DE CENIZAS INSOLUBLES EN ACIDO HCl 2N

Muestra	Cenizas Insolubles en ácido HCl 2N
1	82.4
2	87.4
3	74.8
4	83.6
5	91.8
6	79.3
$\bar{X} \pm s$	83.2 \pm 6.0

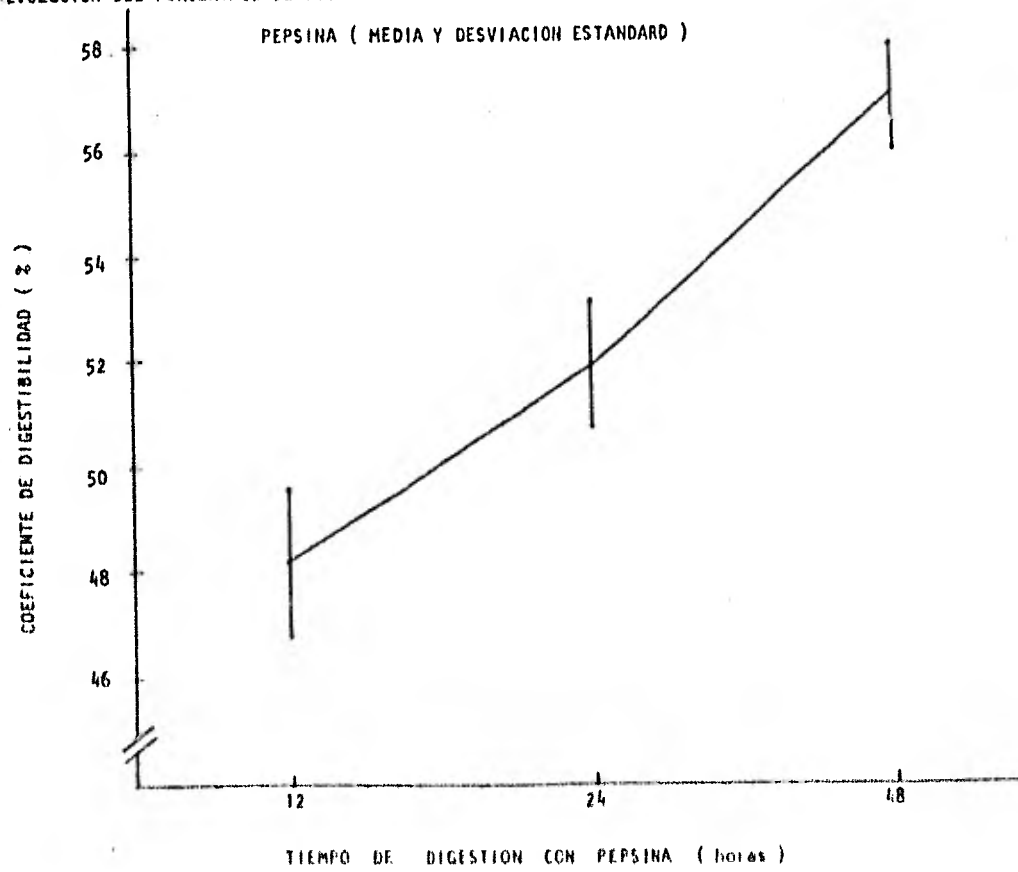
X = PROMEDIO

S = DESVIACION ESTANDARO

GRAFICA 1

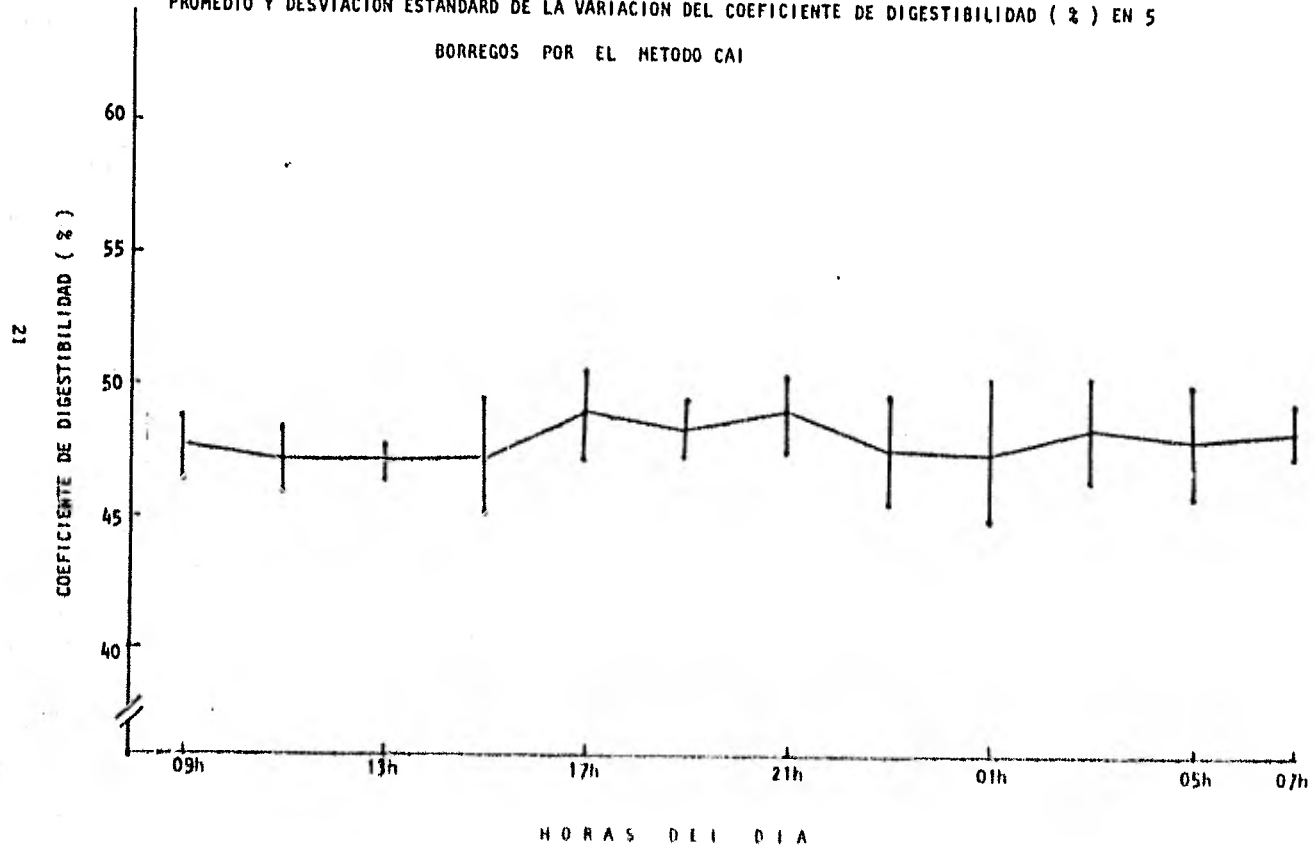
EVOLUCION DEL PORCENTAJE DE DIGESTIBILIDAD IN VITRO EN FUNCION DEL TIEMPO DE DIGESTION CON

PEPSINA (MEDIA Y DESVIACION ESTANDARD)



GRAFICA 2

PROMEDIO Y DESVIACION ESTANDAR DE LA VARIACION DEL COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD (%) EN 5
BORREGOS POR EL METODO CAI



CAPITULO V

DISCUSION

D I S C U S I O N

De acuerdo a los resultados encontrados en el análisis para la digestibilidad in vitro, con variaciones en el tiempo de digestión con pepsina, se encontró que el tiempo óptimo para la determinación de la digestibilidad de la materia seca, es de 48 horas, la cual no tuvo diferencias significativas con la digestibilidad in vivo, lo que concuerda con lo propuesto por Tilley y Terry en 1963 (19) y por Minson y McLeod en 1972 (14). Respecto a la digestión con pepsina durante 24 horas sugerido por Barnes y Lynch en 1969 (2); Cowlishaw y Unsworth en 1976 (3), resultó significativamente inferior ($P < 0.05$) comparada con la obtenida mediante la digestión con pepsina durante 48 horas y con la digestibilidad determinada in vivo.

Para el establecimiento de líneas de correlación entre la digestibilidad in vivo e in vitro, debe de ser cuidadosamente estudiada en cada laboratorio, debido a que las pruebas in vitro, involucran diferentes factores de variación (2, 3, 8, 14, 19). De manera que no es posible usar líneas de regresión de otro laboratorio, aunque se usen las mismas técnicas de análisis. Minson y McLeod en 1972 (14) corrigieron los resultados in vitro, adicionándoles la diferencia promedio entre los resultados de la digestibilidad in vivo con la obtenida in vitro de las muestras standard. A esta di

gestibilidad in vitro corregida, le llaman digestibilidad in vivo estimada.

El análisis de los resultados del método CAI. HCl 2N resultó significativamente diferente ($P < 0.05$), comparado con el método in vivo e in vitro con digestión con pepsina por 48 horas, lo cual difiere de los resultados obtenidos por Shrivastava y Talapatra -- (16); McCarthy et al., (12); Vogtmann et al., (23); Van Keulen y Young (22) y recientemente por Thonney et al., (20) quienes llegaron a la conclusión de que las cenizas insolubles son un buen marcador para la determinación de la digestibilidad, tanto en monogástricos como en rumiantes. Lo cual significa, que aunque la técnica se llevó a cabo en base a lo señalado, pudo haber existido algún factor de variación que no se tomara en cuenta y que dió un resultado falso.

El porcentaje de recuperación de cenizas en heces fue de ---- 83.2 %, lo que difiere del resultado obtenido por Van Keulen y --- Young (22) y por Thonney et al., (20), quienes recuperaron casi el 100 % de cenizas en heces. Van Dyne y Lofgreen en 1967 (21) sugirieron que la baja recuperabilidad del marcador puede ser atribuida a una acumulación de minerales en el tracto digestivo de los rumiantes. Los bajos porcentajes de digestibilidad encontrados pueden ser atribuidos también a la baja recuperabilidad del marcador.

En cuanto a la determinación de algún patrón en la variación durante las 24 horas del día, con respecto a la excreción de cenizas y en la determinación de la digestibilidad, se llegó a la conclusión, de que el tiempo del día en que se tome la muestra de heces, no es una fuente de variación para la estimación del coeficiente de digestibilidad por el método CAI. Lo cual, concuerda con el resultado obtenido por Van Keulen y Young (22), quienes determinaron que no existe variación durante las 24 horas en la estimación de la digestibilidad. Es importante notar que la repetibilidad de la determinación fué buena a lo largo del muestreo realizado.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se realizó el presente trabajo se encontró que:

- 1.- La digestibilidad in vitro con un tiempo de digestión con pepsina de 48 horas, fue el más eficiente para el cálculo del coeficiente de digestibilidad de la materia seca, comparado con las variaciones de 12 y 24 horas en la digestión con pepsina.
- 2.- El método de las cenizas insolubles, dio resultados inferiores ($P < 0.05$) a los obtenidos con el método in vivo e in vitro (48 horas).
- 3.- No existe variación durante las 24 horas en la estimación del coeficiente de digestibilidad, por el método de cenizas ácido insolubles HCl 2N.
- 4.- La recuperación de cenizas en las muestras de heces, fue estadísticamente diferente del 100 % de recuperación teórica ($P < 0.01$).

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA

B I B L I O G R A F I A

1. A.O.A.C.: Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, 13th ed. Washington, D. C. 1980.
2. BARNES, R. F. AND LYNCH, W. G.: Two stages in vitro rumen fermentation technique. U. S. Regional Pasture Research Laboratory. University Park. Pennsylvania U.S.A. (1969).
3. COWLISHAW, S. J. AND UNSWORTH, E. F.: Factors affecting the in vitro digestibility of tropical grasses. Turrialba., 26:44-53 (1976).
4. CRAMPTON, E. W. AND HARRIS, L. E.: Applied Animal Nutrition, 2nd ed. W. H. Freeman and Company., San Francisco, p. 105-132, 1969.
5. DANIEL, W. W.: Bioestadística, Limusa., México, p. 193-241, 1980.
6. FLORES, M. A. J.: Bromatología Animal, 2da ed. Limusa., México, p. 234-236, 1980.
7. GARZA, J. D., BERNAL, M. G., GONZALES, F. y SHIMADA, A.: Ensi-

lajes de planta completa o de cañuela de maíz como fuentes de forraje para vaquillas Holstein. Téc. Pec. Méx., 39:7-12 (1980).

8. GRANT, R. J., VAN SOEST, P. J. & McDOWELL, R. E.: Influence of rumen fluid source and fermentation time on in vitro true dry matter digestibility. J. Dairy Sci., 57:1201-1205 (1974).
9. HARRIS, L. E.: Nutrition Research Technique for Domestic and Wild Animals. Animal Science Department-Utah State University. Logan, Utah, Vol 1. P. 5001-5005, 1970.
10. KOTB, A. R. AND LUCKEY, T. D.: Markers in nutrition. Nutr. Abstr. and Rev., 42:813-845 (1972).
11. MAYNARD, L. A. AND LOOSLI, J. K.: Nutrición Animal, 3ra ed. U.T.E.H.A., México, p. 362-375, 1975.
12. McCARTHY, J. F., AHERNE, F. X. AND OKAI, D. B.: The use of HCl insoluble ash as an index material for determining apparent digestibility with pigs. Can. J. Anim. Sci., 54:107-109 (1974).
13. Mc DONALD, P. AND EDWARDS, R. A.: Animal Nutrition, 2nd ed. Longman. London an New York. 1976.

14. MINSON, D. J. AND McLEOD, M. N.: The in vitro technique. Its modification for estimating digestibility of large numbers of tropical pasture samples. Division of Tropical Pastures. Technical paper no. 8. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Australia. (1972).
15. RODRIGUEZ, F.: Determinación de la digestibilidad in vivo y balance de nutrientes. En: Manual de técnicas de investigación en nutrición de rumiantes. Departamento de Nutrición Animal - INIP. p. 88-137, 1980.
16. SHRIVASTAVA, V. S. AND TALAPATRA, S. K.: Pastures studies in-uttar pradesh. II use of some natural indicators to determine the plane of nutrition of grazing animal. Indian. J. Dairy. Sci. 15:154 (1962).
17. STELL, R. G. AND TORRIE, J. H.: Principles and Procedures of Statistics. 2nd ed. Mc Graw-Hill Book Co. Inc., Toronto, Ontario, p. 172-188, 1980.
18. TEJADA, H. J.: Digestibilidad in situ e in vitro. En: Manual de técnicas de investigación en nutrición de rumiantes. Departamento de Nutrición Animal - INIP. p. 140-180, 1980.

19. TILLEY, J. M. A. AND TERRY, R. A.: A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. J. Br. Grassld. Soc., 18:104 (1963).
20. THONEY, M. L., DUHAIME, D. J., MOE, P. W. AND REID, J. T.: Acid insoluble ash and permanganate lignin as indicators to determine digestibility of cattle rations. J. Anim. Sci., 49:1112-1116 (1979).
21. VAN DYNE, G. M. AND LOFGREEN.: Comparative digestion of dry--annual range forage by cattle and sheep. J. Anim. Sci., 23:823 (1964).
22. VAN KEULEN, J. AND YOUNG, B. A.: Evaluation of acid-insoluble ash as natural marker in ruminant digestibility studies. J. Anim. Sci., 44:282-287 (1977).
23. VOGTMANN, H., PFIRTER, H. P. AND PRABUCKI, A. L.: A new method of determining metabolisability of energy and digestibility of fatty acids in broiler diets. Br. Poul. Sci., 16:531-534 (1975).