



Comparación de dos metodos *in vitro* para estimar la digestibilidad de pastos tropicales en rumiantes

Comparison of two methods to estimate the *in vitro* digestibility of tropical grasses in ruminants

Rodolfo Ruiz Posada¹,

Resumen

La digestibilidad de los pastos, es un indicador importante de su calidad ya que ofrece una muy buena aproximación de la fracción del pasto que es retenida en el tracto gastrointestinal del animal. Las técnicas licor ruminal-pepsina y pepsina celulasa son algunos de los métodos *in vitro* de mayor utilización en los laboratorios para estimar la digestibilidad *in vivo* de los forrajes. El objetivo del presente trabajo fue comparar las dos técnicas de laboratorio, utilizando para ello seis pastos tropicales. El análisis de la información se realizó a través del establecimiento de las ecuaciones de regresión que interpretaran la relación entre las dos variables (y; digestibilidad *in vivo*, x; digestibilidad *in vitro*), se tomaron los seis valores obtenidos para cada pasto *in vivo* y se aparearon con su respectivo promedio de la digestibilidad *in vitro* producto de tres repeticiones. La técnica líquido ruminal-pepsina, presento un modelo distinto para cada corrida, lo que indicaría una alta variabilidad en la técnica. Los valores absolutos entre la técnica *in vivo* (51.8) y la técnica líquido ruminal-pepsina (50.27), fueron muy similares; esto no ocurrió con los valores absolutos obtenidos con la técnica pepsina-celulasa (30.8). La técnica pepsina-celulasa fue más precisa al compararla con la técnica del licor ruminal-pepsina, al presentar un modelo más estable. Sin embargo fue menos exacta en vista de que se distancio mas del valor real (*in vivo*), y su coeficiente de determinación (R^2), fue menor con respecto a la técnica del licor ruminal.

Palabras clave

Alimento, digestibilidad, forrajes, rumiantes.

Abstract

The digestibility of pasture is an important indicator of quality. provides a very good approximation of the fraction of food that is retained in the animal's

¹ Zoot, Esp. PROCA (Grupo de Investigación en Ciencia y Producción Animal). Instituto Universitario de la Paz. Barrancabermeja. Colombia.



gastrointestinal tract. Rumen techniques pepsin and pepsin-cellulase are some of the *in vitro* methods most widely used in laboratories to predict *in vivo* digestibility of pasture. The aim of this study was to compare the two laboratory techniques using this six tropical grasses. The data analysis was done through the establishment for regression equations to interpret the relationship between the two variables (Y; *in vivo* digestibility, X; *in vitro* digestibility) took the six values obtained for each grass *in vivo* and mated with their respective average *in vitro* digestibility product of three repetitions. The rumen fluid-pepsin technique present a different model for each run which would indicate a high variability in the technique. The absolute values between the *in vivo* (51.8) technique and rumen fluid-pepsin technique were very similar (50.27). This did not happen with the absolute values achieved with pepsin-cellulase technique (30.8). The Pepsin-cellulase technique was more accurate when compared with the technique of rumen fluid-pepsin introducing a more stable. However, it was less accurate in view of distancing itself more real value (*in vivo*) and its coefficient of determination (R^2) was less compared with rumen fluid technique.

Key words

Food, digestibility, pasture, ruminants.

Introducción

Los métodos *in vivo* para determinar la digestibilidad han sido los tradicionalmente utilizados tanto en zonas templadas como tropicales para obtener la información básica requerida de los alimentos. No obstante tales métodos son costosos, tediosos y muy laboriosos ya que requieren infraestructura, animales, alimento, mano de obra y mayor tiempo con respecto a los métodos de laboratorio.

Es importante tener en cuenta que las técnicas de digestibilidad *in vivo* por recolección total de heces (DRTH) no miden la absorción como tal, sino la desaparición o bien una retención de las fracciones del alimento que ocurre en el tracto gastrointestinal (TGI) del animal. También debe considerarse que esta retención es bruta, en el sentido de que no se discrimina el segmento del TGI donde realmente ocurre tal desaparición.

El método convencional de determinación de la digestibilidad por colecta total de heces (digestibilidad *in vivo*), data desde antes del siglo XIX y permaneció por mucho tiempo como el más preciso y comúnmente utilizado para rumiantes y no rumiantes. Sin embargo por ser una técnica tan laboriosa, numerosas técnicas alternativas han sido sugeridas para predecir la digestibilidad. Navaratne (1990).



No solo la digestibilidad *in vivo* representa un medio útil para aproximarse al valor nutricional de los alimentos; una estimación de tal valor también puede hacerse a través de; características del forraje, (relación hoja-tallo o edad), análisis químicos, métodos *in vitro*, medidas físicas, análisis fecal y marcadores internos indigestibles. Minson (1990).

Dentro de la anterior clasificación, las técnicas *in vitro* han sido las más utilizadas; este grupo incluye las técnicas de solubilidad en líquido ruminal-pepsina y solubilidad en celulasa.

La técnica de solubilidad en líquido ruminal-pepsina, es también conocida como el método de Tilley y Terry, ya que éstos la patentaron en el año 1963. Esta técnica se basa inicialmente en una fase fermentativa con microorganismos contenidos en el líquido ruminal de animales canulados y luego una fase enzimática con pepsina en medio ácido, añadiendo ácido clorhídrico (HCl).

En 1973 Jones y Hayward estandarizaron el método pepsina-celulasa, utilizando una preparación de celulasa cruda comercial, en una sola fase de digestión enzimática. Luego, en el año 1975, incluyeron el pretratamiento con pepsina alcanzando a mejorar la correlación con los valores *in vivo*.

El empleo correcto de las técnicas *in vitro* o de laboratorio permite, en un tiempo relativamente corto, obtener un alto número de repeticiones o de muestras según sea el interés. Así mismo, en vista del mayor control de las condiciones, se espera que estas técnicas tengan una menor variabilidad.

Según Marshall (1997), el método Tilley y Terry ha sido el más comúnmente utilizado como método *in vitro* para predecir la digestibilidad en rumiantes y como una herramienta de selección para mejorar la calidad nutricional de los forrajes. Para Pace et al (1984), citado por Omed et al (1989), esta técnica es confiable, segura y precisa para un amplio rango de forrajes. Sin embargo su aplicación tiene la desventaja de necesitar animales canulados en el rumen para proveer el líquido ruminal.

Existen actualmente restricciones que manejan las comisiones de ética de los organismos internacionales y nacionales de investigación para el uso de animales canulados y este es otro punto a tener en cuenta.

Aunque la técnica pepsina-celulasa obvia la necesidad de utilizar animales canulados y es recomendable por eliminar variaciones entre corridas, es una técnica costosa; además puede presentar una considerable variación en la actividad enzimática de una fuente comercial a otra.



Las técnicas enzimáticas tienen la ventaja de ser completamente independientes del animal, lo cual resultaría en una menor variación, por lo que estas técnicas son relativamente fáciles de estandarizar. Marshall *et al.* (1997).

Según Ayres (1991), ambas pruebas de digestibilidad han sido ampliamente adoptadas en los laboratorios de análisis de alimentos a través del mundo. No obstante el procedimiento licor ruminal-pepsina es preferido para el análisis de muestras de forrajes de diversa morfología y genotipo, donde se presenten facilidades para manejar animales fistulados.

Está claro que todas las técnicas empleadas para valorar los alimentos tienen insuficiencias y errores, elegir la más indicada para ciertas circunstancias, con base en criterios claros es lo ideal.

La presente investigación tuvo como objetivo comparar la precisión y exactitud de las dos técnicas *in vitro* (liquido ruminal-pepsina y solubilidad en pepsina-celulosa), para estimar la digestibilidad *in vivo*, utilizando para ello seis pastos tropicales.

Materiales y métodos

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de bromatología y nutrición de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

Se utilizaron seis pastos tropicales, cosechados a diferentes edades, cada pasto fue secado para las pruebas *in vivo* y molido para las pruebas de laboratorio. Los pastos evaluados y su respectivo análisis químico se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química de los pastos evaluados.

PASTO	MS	PC	CENIZAS	EE	FDN	FDA
	%					
Brachiaria decumbens	95.75	9.8	10.7	1.5	66.3	38.4
Brachiaria mutica	96.15	11.3	13.4	1.8	63.9	38.5
Cynodon nlemfuensis	96.55	5.6	7.6	1.7	64.5	41.2
Dichanthium aristatum	96.40	7.8	9.6	1.0	74.1	43.4
Digitaria decumbens	96.35	5.9	9.9	1.3	72.7	46.8
Panicum maximum	97.05	5.6	10.5	0.8	73.3	48.3

MS: Materia seca

PC: Proteína cruda

EE: Extracto etéreo

FDN: Fibra en detergente neutro

FDA: Fibra en detergente ácido

Se utilizaron dos ovejas africanas (*Ovis aries*), machos castrados, a cada uno se le implanto una cánula en el rumen, para permitir la extracción del líquido ruminal.

A continuación se describen de manera general los procedimientos de las técnicas *in vitro* que fueron evaluadas.

Tabla 2. Resumen del procedimiento en laboratorio para las dos técnicas.

LICOR RUMINAL-PEPSINA	PEPSINA-CELULASA
<ul style="list-style-type: none"> • Pesar 0,5 g de la muestra. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar 0,5 g de la muestra.
<ul style="list-style-type: none"> • Adicionar saliva artificial 40 ml y licor ruminal 10 ml. 	<ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 20 ml de solución pepsina al 0,2% en HCl 0,1N.
<ul style="list-style-type: none"> • Incubar 48 horas a 39°C a baño maría con agitación. 	<ul style="list-style-type: none"> • Incubar por 24 horas a 40° C a baño maría con agitación.
<ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 6 ml de HCl, luego 2 ml de solución pepsina al 5%. 	<ul style="list-style-type: none"> • Filtrar solución sobrenadante y adicionar 20 ml de solución celulasa en medio buffer.
<ul style="list-style-type: none"> • Incubar durante 48 horas a 39°C a baño maría con agitación. 	<ul style="list-style-type: none"> • Incubar durante 48 horas a 40°C a baño maría con agitación.
<ul style="list-style-type: none"> • Filtrar el contenido en crisol secado y tarado previamente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Filtrar el contenido en crisol secado y tarado previamente.
<ul style="list-style-type: none"> • Secar en estufa a 105°C por 12 horas dando por finalizada la DIVMS. 	<ul style="list-style-type: none"> • Secar en estufa a 105°C por 12 horas dando por finalizada la DIVMS.
<ul style="list-style-type: none"> • Cálculos 	<ul style="list-style-type: none"> • Cálculos

En un trabajo previo realizado por Calle (2000), y publicado posteriormente (2004), se estableció la relación entre la digestibilidad *in vivo* (TRTH) e *in vitro* (pepsina-celulasa). Los valores de digestibilidad *in vivo* fueron obtenidos

en un ensayo donde se emplearon 6 ovejas africanas macho, asignados a seis tratamientos (pastos), durante seis periodos diferentes. Cada animal rotó por cada pasto hasta completar los seis pastos.

El análisis de la información del presente trabajo se realizó a través del establecimiento de ecuaciones de regresión que permitieran determinar la relación entre las dos variables (y; digestibilidad *in vivo*, x; digestibilidad *in vitro*). Se tomaron los seis valores obtenidos para cada pasto *in vivo* y se aparearon con su respectivo promedio de la digestibilidad *in vitro* producto de tres repeticiones.

Se obtuvieron dos ecuaciones para cada método *in vitro*, producto de dos corridas realizadas con el fin de determinar la exactitud y la precisión de cada técnica. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza para

comparar las ecuaciones. Se utilizó el programa Statgraphics Plus (V. 4.0 para Windows).

Resultados y discusión

En la tabla 3, se presentan los resultados expresados como porcentaje de materia seca para la digestibilidad *in vivo*, y para cada una de las técnicas.

Tabla 3. Valores de digestibilidad de la materia seca (%), *in vivo*, liquido ruminal-pepsina y pepsina-celulasa, para seis pastos tropicales.

PASTO	IN VIVO	LIQ-PEP	PEP-CEL
	%		
Brachiaria decumbens	61.1	58.36	37.85
Brachiaria mutica	55.8	54.72	36.97
Cynodon nlemfuensis	51.8	49.86	33.99
Dichanthium aristatum	51.5	50.62	28.70
Digitaria decumbens	48.9	47.13	23.02
Panicun máximo	41.6	40.92	24.29
PROMEDIO	51.8	50.27	30.80

Los valores absolutos entre la técnica *in vivo* (51.8) y la técnica liquido ruminal-pepsina (50.27), son muy similares; esto no ocurre con los valores absolutos obtenidos con la técnica pepsina-celulasa (30.8), en este último caso se presenta una diferencia de 20 unidades aproximadamente con respecto a las anteriores.

Estos resultados coinciden con los de Jones y Hayward (1973), quienes notaron que la digestibilidad por el método de la celulasa fue numéricamente unas 25 unidades por debajo de los valores *in vivo*, para muestras de pastos de baja digestibilidad.

Una observación muy similar presentaron Adegbola y Paladines (1977), donde la digestibilidad de la materia seca por el método pepsina-celulasa fue cuantitativamente unas 10 unidades por debajo de los valores *in vivo* para pastos de baja digestibilidad y de 17 a 20 unidades para pastos de alta digestibilidad.

Los bajos valores de digestibilidad en celulasa respecto a los obtenidos *in vivo* y Tilley y Terry pueden estar afectados, más por la concentración del pretratamiento que por la concentración de la celulasa. Esto parece indicar el trabajo realizado por Allison y Borzuck (1978), citados por López y Roldan (1991), quienes con el uso de un pretratamiento fuerte (pepsina en HCl 0,125N), independiente de la calidad del pasto lograron incrementar los

valores de la digestibilidad de la materia seca hasta los valores obtenidos por la técnica del liquido ruminal-pepsina.

Omed (1989), al comparar el método pepsina-celulasa, respecto al uso de dos métodos microbiales (liquido ruminal y heces), encontró que los valores de los métodos microbiales eran más cercanos a sus respectivos valores *in vivo*.

En la tabla 4, se presentan las dos ecuaciones de regresión obtenidas para las dos técnicas correspondientes a la primera corrida.

Tabla 4. Ecuaciones de regresión simple entre digestibilidad *in vitro* (x) e *in vivo* (y) para pastos tropicales por medio de dos técnicas *in vitro*.

METODO	ECUACIÓN	R ² (%)	D.S
Liquido ruminal	(1)Y= -2,32 + 1.074x	84.70	2.59
Pep-celulasa	(2)Y= 25.13 + 0.863x	61.10	4.13

R²: Coeficiente de determinación

D.S: Desviación estándar

De acuerdo a la tabla 4, el coeficiente de determinación (R²), para la ecuación 1 (técnica liquido ruminal-pepsina), indica que el 84.7% de la variación total de la digestibilidad *in vivo* esta explicada por el modelo; el resto o sea el 15.3% es la variación no explicada por la regresión. En el caso de la ecuación 2, el R² indica que el 61.1% de la variación total de la digestibilidad *in vivo* esta explicada por el modelo, el 38.9% es la variación no explicada por la regresión.

El intercepto presenta valores muy diferentes para las dos técnicas, al compararlos por medio de la ANAVA, se encontró diferencia estadísticamente significativa (p<0,01). Sin embargo debe tenerse en cuenta que el intercepto no siempre tiene una interpretación practica y algunas veces es solo un termino de ajuste que permite representar la tendencia de los datos.

El coeficiente de regresión en este caso para ambas ecuaciones muestran valores cercanos a uno (1), los valores según la ANAVA, no presentaron diferencias estadísticamente significativas (p>0,05). Esto indica que los métodos son proporcionales ya que presentan estadísticamente igual pendiente.

El mayor R² de la primera ecuación, además del bajo valor de la desviación estándar, obtenidos en el presente trabajo para la técnica del liquido ruminal pepsina con respecto a la técnica pepsina-celulasa, coincide con los reportes de trabajos realizados para forrajes de zona templada por Terry *et al* (1978),

Cerda *et al* (1989), Terramoccia *et al* (1989), también Alluzio *et al* y Antongiovanni *et al* citados por Antongiovanni y Acciaoli (1995).

Sin embargo Peña y Paladines (1979) y Navaratne (1990), contrario a los resultados obtenidos en el presente trabajo, reportan valores más altos o iguales del coeficiente de determinación, así como desviaciones estándar más bajas para la técnica pepsina-celulasa al compararla con la técnica líquido ruminal-pepsina.

Como se indicó en la metodología para establecer la exactitud de cada técnica se realizó una segunda corrida, las ecuaciones resultantes se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Ecuaciones de regresión simple entre digestibilidad *in vitro* (x) e *in vivo* (y) para pastos tropicales por medio de dos técnicas *in vitro*.

METODO	ECUACIÓN	R ² (%)	D.S
Líquido ruminal	(3)Y= 4.81 + 0.842x	77.5	3.14
Pep-celulasa	(4)Y= 22.94 + 0.904x	61.3	4.12

R²: Coeficiente de determinación

D.S: Desviación estándar

Al comparar las dos ecuaciones correspondientes a cada técnica por medio de la ANAVA, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,01$), entre interceptos ni entre pendientes en las ecuaciones correspondientes a la técnica pepsina-celulasa (2 y 4).

Si se presentó diferencia estadísticamente significativa entre interceptos pero no así entre pendientes para las ecuaciones 1 y 3 (técnica líquido ruminal-pepsina). Adicionalmente el R² para las ecuaciones 1 y 3, presenta alguna variación numérica (84.7 y 77.5), lo que indica la inestabilidad del modelo; caso que no sucede con la técnica pepsina-celulasa donde el R², es prácticamente igual para las dos corridas (61.1 y 61.3).

La técnica líquido ruminal-pepsina, presentó un modelo distinto para cada corrida, lo que indicaría una mayor variabilidad en la técnica.

Algunos de los problemas mayores en los métodos *in vitro* que emplean fluido ruminal son el número limitado de muestras por incubación (corrida) y los errores relativamente grandes dentro de y entre incubaciones. Rodríguez *et al* (2002).

Para Troelsen y Hanel (1966), citados por Minson (1990), la variación encontrada en la actividad celulolítica del licor ruminal es un problema de la técnica. Este problema causa diferencias entre semanas en los valores obtenidos de digestibilidad *in vitro* (líquido ruminal-pepsina), Dansa y Deries



(1984), citados por Minson (1990). Estos problemas pueden ser controlados usando más de un animal fistulado, estandarizando la dieta del animal donante y colocando estándares en todas las corridas. Giraldo (1996).

El método de Tilley y Terry se considera un método referente para calcular la digestibilidad en alimentos para rumiantes, el cual ha sido modificado y adaptado según el tipo de alimento a analizar, al igual que se han desarrollado y probado diferentes tampones de dilución para ajustar el pH del inóculo, Giraldo *et al* (2007).

Trabajando con dos forrajes diferentes como fuente de inóculo García y Sánchez (1988), concluyeron que la digestibilidad con licor ruminal, parece no estar afectada por la fuente del inóculo, siempre y cuando no existan grandes diferencias en la composición química entre ellos.

Algunos autores trabajando con leguminosas, mezclas de gramíneas y leguminosas, henos, ensilajes, pajas y subproductos agrícolas han encontrado una mejor confiabilidad de sus resultados con la técnica del licor ruminal que los obtenidos con la técnica pepsina-celulasa, es el caso de Terry *et al* (1978), Albuzio (1988), citado por Antongiovanni y Acciacioli (1995), Antongiovanni *et al* (1992), citados por Antongiovanni y Acciacioli (1995) y Navaratne (1990), Arce *et al* (2003).

La técnica pepsina-celulasa parece ser más sensible a la variación de las especies forrajeras, además las celulasas comercialmente disponibles varían considerablemente en su capacidad digestiva Marten y Barnes (1979).

Para el grupo de pastos evaluados en el presente trabajo la técnica pepsina-celulasa fue más precisa al presentar un modelo más estable. Sin embargo fue menos exacta en vista de que se distancio mas del valor de digestibilidad *in vivo*, y su coeficiente de determinación (R^2), fue menor con respecto a la técnica del licor ruminal.

López y Roldan (1991), consideran la validez y la aceptación del método pepsina-celulasa por su precisión en la predicción de la digestibilidad de la materia seca y también la alta repetibilidad y baja variabilidad de los resultados en el laboratorio.

Al igual que en la presente investigación, Arce *et al* (2003), al comparar los dos métodos encontraron que los valores de digestibilidad del método enzimático (pepsina-celulasa), fueron estadísticamente menores a los del método Tilley y Terry. Sin embargo, estos hallazgos podrían atribuirse, por un lado, a la riqueza del inóculo ruminal, donde actúan todo un conjunto de enzimas provenientes de los diferentes microorganismos (bacterias, protozoarios y hongos) que causan una mayor degradación de los forrajes,



mientras que el método enzimático trabaja solo con celulosa proveniente de un hongo.

Pese a su exactitud, según Giraldo *et al* (2007), y a todas las modificaciones y adaptaciones el método Tilley y Terry sigue siendo un procedimiento que consume mucho tiempo y trabajo, además cada alimento debe incubarse por separado, limitando el número de muestras a ser analizadas por corrida o tanda.

La fermentación *in vitro* de los forrajes mediante un inóculo de microorganismos ruminales presenta probablemente el mejor cálculo hecho en laboratorio sobre la digestibilidad *in vivo*. Sin embargo, los ensayos *in vitro* requieren una fuente uniforme y confiable de inóculo ruminal que a menudo es difícil de obtener. Los problemas que mayormente se presentan son: la variación en la actividad del fluido ruminal, variaciones incontrolables que se dan dentro del laboratorio y entre laboratorios, y la disponibilidad de animales ruminalmente canulados. Arce *et al* (2003).

Después de examinar la repetibilidad de los resultados obtenidos en un laboratorio y de la reproducibilidad de resultados logrados entre diferentes laboratorios, Antongiovanni y Acciacioli (1995), sugieren que dentro de los

métodos *in vitro*, la técnica enzimática empleada por Jones y Hayward es la alternativa más válida a los análisis clásicos de Tilley y Terry.

Finalmente en pastos tropicales, varios autores también han encontrado una mayor precisión de la técnica pepsina-celulosa, para predecir la digestibilidad de la materia seca *in vivo*, es el caso de Adegbola y paladines (1977), Peña y Paladines (1979), Narváez y Lazcano (1989) y Navaretne (1990).

Conclusiones

La técnica pepsina-celulosa fue más precisa al compararla con la técnica del licor ruminal-pepsina, al presentar un modelo más estable. Sin embargo fue menos exacta en vista de que se distancio mas del valor real (*in vivo*), y su coeficiente de determinación (R^2), fue menor con respecto a la técnica del licor ruminal.

La técnica pepsina-celulosa presentó bajos valores absolutos con respecto a la digestibilidad *in vivo*. Se recomienda aplicar la ecuación de regresión correspondiente cuando se utiliza esta técnica.

La mayor ventaja para la técnica pepsina celulosa en cuanto a su ejecución es obviar la necesidad de utilizar animales canulados y todo lo que ello implica, sin embargo la técnica Tilley y Terry presento un mayor coeficiente de determinación en ambas corridas, es decir más exactitud con respecto a



los valores *in vivo*, por lo cual de acuerdo a estos resultados se puede seguir considerando como un método valido para estimar la digestibilidad *in vitro* en alimentos para animales rumiantes.

Agradecimientos

Este articulo se construyó a partir de la tesis de grado titulada “Comparación de dos Métodos *in vitro* para Determinar la Digestibilidad en Pastos Tropicales”, la cual fue presentada en la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín (año 2001), para optar el titulo de Zootecnista, por Rodolfo Ruiz Posada bajo la dirección del Profesor Andrés Cuellar Garcés y se realizo gracias a la financiación de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín en el Laboratorio de Bromatología y Nutrición Animal.

Bibliografía

Adegbola A., Paladines O. 1977. Prediction of digestibility on the dry matter of tropical forages from their solubility in fungal cellulase solutions. *Journal of the science of food and agriculture*. 28 (1): 775-785.

Antongiovanni M., Acciatoli A. 1995. Accuracy of estimates of *in vivo* digestibility values by means of *in vitro* laboratory techniques. *Zootecnica e nutrizione animale*. 21(1995): 47-50.

Arce C, et al. 2003. Estudio comparativo de la digestibilidad de forrajes mediante dos métodos de laboratorio. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 14 (1): 7-12.

Ayres J. 1991. Sources of error with *in vitro* digestibility assay of pasture feeds. *Grass and Forage Science*. 46: 89-97.

Calle B. 2000. Correlación de la digestibilidad aparente *in vivo* y la digestibilidad *in vitro* en pepsina celulasa en gramíneas tropicales. Medellín. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. P 48.

Cerda A, et al. 1989. Comparative study and validation of three methods to estimate apparent digestibility of forages. *Proceedings of the XVI International Grassland Congress*. Nice, France. (1989):901-902.

García G., Sánchez D. 1985. Utilización de dos forrajes como Fuentes de inoculo en una prueba de digestibilidad *in vitro*. Medellín. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. P 65.



Giraldo, L. 1996. Manejo y utilización sostenible de pasturas. Medellín. Universidad Nacional de Colombia, p 359.

Giraldo L, et al. 2007. Comparación de dos técnicas in vitro e in situ para estimar la digestibilidad verdadera en varios forrajes tropicales. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 20 (2007): 269-279.

Jones D., Hayward M. 1973. A cellulasa digestión technique for predicting the dry matter digestibility of grasses. *Journal of the science of food and agriculture*. 24 (1973):1419-1426.

Jones D., Hayward M. 1975. The effect of pepsin pretreatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulose solutions. *Journal of the science of food and agriculture*. 26 (1975): 711-718.

López H., Roldan M. 1991. Estandarización del método de la celulasa para la determinación de la digestibilidad in vitro. Medellín. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. P 44.

Marshall D, et al. 1997. Alternative techniques for measuring nutrient digestión in ruminants. *Journal of Animal Science*. 75(1997): 2256-2276.

Marten G., Barnes R. 1979. Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzyme systems. *Workshop standardization of analytical methodology for feeds*. Ottawa. Memory p 61-71.

Minson D. 1990. Forage in ruminant nutrition. San Diego. Academic Press. P483.

Narváez V., Lazcano C. 1989. Digestibilidad in vitro de especies forrajeras tropicales. *Pasturas tropicales*. 11 (1): 13-18.

Navaratne H, et al. 1990. Comparison of four techniques for predicting digestibility of tropical feeds. *Animal feed science and technology*. 29 (1990):209-221.

Omed H. 1989. A comparison of three laboratory techniques for the estimation of the digestibility of feedstuffs for ruminants. *Journal of Agricultural science*. 113 (1989): 187-194.



Revista CITECSA
Volumen 2 numero 2 - julio 2011
ISSN: 2027-6745
<http://mvz.unipaz.edu.co/citecsa/web>
Barranca bermeja -Colombia

Peña M., Paladines O. 1979. Digestibilidad de la material seca de forrajes tropicales usando el método de solubilidad en pepsina-celulasa. *Turrialba*. 29 (3):189-194.

Rodríguez J, *et al.* (2002). Análisis estadístico de experimentos de digestibilidad *in vitro* con forrajes. *Interciencia*. 27(3):143-146.

Terramoccia S. 1989. Metodi *in vitro* mediante enzimi e liquid ruminale per la previsione della digeribilita della sostanza organic dei forraggi; confront con il método *in vivo*. *Animalli dell Istituto Sperimentale per la Zootecnia*. 22 (1989): 35-44.

Tilley J., Terry R. 1963. A two stage for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society*. 18(1963): 104-111.

Terry R. 1978. Comparison of two *in vitro* procedures using rumen liquor-pepsin or pepsin-cellulase for prediction of forage digestibility. *Journal of the British Grassland Society*. 33 (1978): 13-18.