



## Uso de Indicadores para estimar consumo y digestibilidad de pasto. LIPE, lignina purificada y enriquecida

**R**evista  
Colombiana de  
Ciencias  
Pecuarias

*Use of parameters for estimation of forage consumption and digestibility. Purified enriched lignin, LIPE*

Norberto M Rodríguez<sup>1</sup>; Eloísa Oliveira Simões Saliba<sup>1</sup>; Roberto Guimarães-Júnior<sup>2</sup>, D Sci.

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup>EMBRAPA-CPAC, Brasil.

### Introducción

Para una completa evaluación del valor nutritivo de los alimentos, además de su composición química, los efectos de los procesos de digestión, absorción y metabolismo animal deben ser considerados. Los ensayos de digestibilidad permiten examinar la proporción de nutrientes absorbibles presentes en una ración. La digestibilidad y el consumo son dos de los principales parámetros que definen la calidad de un alimento. La digestión incompleta representa la mayor pérdida en el proceso de utilización de la energía consumida.

En la determinación de la digestibilidad de alimentos forrajeros y concentrados, varias técnicas pueden ser utilizadas. La técnica que usa indicadores (externos o internos) fue desarrollada debido a las dificultades de realizar la recolección total de las heces excretadas, especialmente en animales en pastoreo. El objetivo de esta presentación es discutir sobre la utilización de indicadores en nutrición animal, dando énfasis a la lignina purificada y enriquecida (LIPE).

### Definición y caracterización

Los indicadores son compuestos de referencia usados para monitorear aspectos químicos

y físicos de la digestión, estimar el flujo de la digesta, digestibilidad parcial o total y la producción fecal en diversas especies animales. Los indicadores minimizan la interferencia con los patrones de comportamiento animal y simplifican los procedimientos.

Un indicador debe ser inerte y no tóxico, no tener función fisiológica, no ser absorbido ni metabolizado, mezclarse bien con el alimento y permanecer uniformemente distribuido en la digesta, no influenciar secreciones intestinales, absorción o motilidad, no influenciar la microflora del tracto digestivo, poseer método específico de determinación analítica y ser barato. Ningún indicador conocido atiende todos estos criterios, mas el grado tolerable de errores difiere de acuerdo con la variable a ser medida (23).

Para que un indicador pueda ser validado, debe ser comparado con un patrón, en el caso de la digestibilidad aparente, este patrón es la recolección total de heces. Recuperación incompleta en las heces, variación en la tasa de pasaje por el rumen, muestreos poco representativos y delineamiento estadístico son los problemas principales asociados a experimentos que utilizan indicadores (35).

Los indicadores son clasificados en: internos, que son constituyentes naturales de los alimentos,

como sílice, lignina, nitrógeno fecal, cromógenos, FDN y FDA indigestibles, cenizas insolubles en ácido, N-alcanos; y externos, que son compuestos inertes como el óxido crómico, las tierras raras (Lantano, Samáριο, Cério, Ytérbio, Disprósium), la rutenio fenantrolina, el cromo mordante, utilizados para fase sólida y cobalto-EDTA, cromo-EDTA y polietilenoglicol (PEG), utilizados para fase líquida (21).

### Principios de utilización

El uso de indicadores exige su cuantificación en las heces. A medida que el alimento avanza por el tracto gastrointestinal, su concentración aumenta progresivamente debido a la remoción de otros constituyentes del alimento por digestión y absorción. El aumento en la concentración es proporcional a la digestibilidad y, esta última puede ser calculada conociéndose la concentración del indicador en la dieta (ID) y en las heces (IF) a partir de la ecuación:

$$\text{Digestibilidad (\%)} = 100 - [100 \times (\text{ID}/\text{IF})]$$

La mayor limitación de los indicadores externos es que no se comporten como las partículas del alimento, y cuando adheridos a su porción fibrosa, pueden alterar algunas características químicas y físicas. En cuanto a los indicadores internos, la mayor limitación es su recuperación variable en las heces (11). Independiente del tipo de indicador la meta es que se distribuya uniformemente, que mantenga constante la cantidad ingerida y alcance el estado de equilibrio lo más rápidamente posible.

#### *Óxido crómico*

El óxido crómico ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) fue propuesto como indicador en 1918 en estudios con vacas lecheras y desde entonces, es extensamente utilizado como indicador externo en ensayos de digestibilidad. Tiene coloración verde oscura, insoluble en agua, alcohol y acetona, más ligeramente soluble en ácidos y álcalis). Su concentración en los alimentos es baja, en torno de  $0,1\mu\text{g/g}$  (17). En estudios con rumiantes, el óxido crómico puede ser dado a través de cápsulas de gelatina, impregnado en papel de filtro o en forma de pellets (10), una o

dos veces al día, 1 a 10 gramos. La concentración del óxido crómico en las heces alcanza el estado de equilibrio alrededor de 6 a 7 días después de iniciada su administración. El cromo también puede ser empleado ligado a la pared celular, complejo denominado cromo-mordante (36). Esta técnica, conocida como dosis pulso es empleada en estudios de cinética de tránsito y consiste en la aplicación de una única dosis y subsiguiente muestreo de heces en tiempos definidos, generalmente durante seis días, caracterizando la curva de excreción del indicador en las heces (5), posteriormente ajustada por medio de modelos matemáticos no-lineares.

En extensa revisión de estudios publicados en el Journal of Animal Science entre los años 1986 a 1995 Titgemeyer (1997), computó 124 relevantes experimentos que usaron indicadores, siendo que en 90, el óxido crómico fue escogido (35). De acuerdo con el autor, esta sustancia presenta como ventajas no ser tan cara, se incorpora fácilmente a las dietas y es analizada con relativa facilidad. Pero tiene algunas limitaciones, como baja recuperación fecal, principalmente en función de la variabilidad de los resultados obtenidos debido a la metodología de análisis (7) y variación diurna de su excreción en las heces, lo que puede ser evitado dando el indicador dos veces al día (23). Algunos trabajos muestran que el óxido crómico posee una tasa de pasaje más rápida por el rumen que el material fibroso y la posibilidad de su acumulación en alguna parte del tubo digestivo (37). Efectos carcinogénicos también son citados (24). Debido a estos inconvenientes, nuevos indicadores han sido estudiados y frecuentemente substituyen el óxido crómico en estudios de digestibilidad.

#### *N-Alcanos*

Los n-alcanos son componentes naturales de la cera cuticular de vegetales, predominantemente formados por cadenas impares de 25 a 35 átomos de carbono. El uso de n-alcanos de cadena larga, fue propuesto por Mayes *et al* (1986) como método de estimativa de consumo. Su aplicación en estudios con rumiantes a pasto ha alcanzado resultados bastante alentadores (26). En substitución al óxido crómico, la técnica prevé la administración a los animales de n-alcanos sintéticos de cadena larga

con número par de carbonos, con el fin de obtener estimativas individuales de producción fecal, considerando que su concentración en las plantas es baja (< 40 mg/kg MS) o muchas veces no detectables. Concomitantemente, la digestibilidad del forraje consumido es estimada con el uso de indicadores internos, como n-alcanos con cadenas largas de número impar de carbonos, substituyendo los valores de digestibilidad *in vitro* (19). Sin embargo, para una estimativa precisa del consumo de forraje es recomendado que la concentración de alcanos naturales en la planta sea superior a 50 mg/kg MS (6). Según Burns *et al* (1994), el análisis de n-alcanos con equipamiento de cromatografía gaseosa es relativamente simple y preciso (5).

Según Dove y Mayes (1991), el uso de la técnica de indicador interno ofrece una estimativa individual de digestibilidad, con la ventaja de considerar para cada animal, su nivel de consumo, bien como otros aspectos inherentes a el propio (9). El cálculo de la digestibilidad con uso de indicador interno es hecho a través de la relación entre tenores de un indicador, natural del forraje y su concentración en las heces. La ecuación para el cálculo del consumo diario de MS por el método de doble n-alcanos es el siguiente:

$$\text{Consumo (kg MS/día)} = [(F_i/F_p) \times D_p] / [H_i - (F_i/F_p) \times H_p]$$

Donde:  $F_i$  e  $F_p$  = respectivamente, tenores de n-alcanos de cadena impar y par en las heces (mg/kg MS);  $H_i$  e  $H_p$  = respectivamente, tenores de n-alcanos de cadena impar y par en el forraje (mg/kg MS);  $D_p$  = dosis diaria de n-alcanos de cadena par (mg/día).

N-alcanos con número próximo de carbonos en la cadena poseen tasas de recuperación fecal muy semejantes, probablemente por tener comportamiento similar en el tracto digestivo (20). Esa característica es requisito fundamental para aplicación y precisión de la técnica, y también aquella que posibilita, como su principal ventaja en la estimativa del consumo, considerar la digestibilidad del forraje específica para aquel animal en estudio (26). El problema de este método es que los forrajes contienen concentraciones variables

de alcanos, pudiendo ser muy bajas en algunas gramíneas tropicales (18). En función de que el alcano  $C_{33}$  no está presente en cantidades suficientes en todas las forrajeras tropicales evaluadas, estos autores destacan que las estimativas de consumo de materia seca utilizando el par  $C_{32}/C_{33}$  en estos forrajes puede no ser adecuado. Ya en experimentos realizados por Reeves *et al*, (1996) (26) y Smit *et al*, (2005) (33), el par  $C_{32}/C_{33}$  permitió estimativas adecuadas de ingestión de materia seca para vacas en lactación en pastoreo cuando comparadas con el método de medida de producción de forraje y el cálculo del consumo a partir de las exigencias nutricionales para manutención y producción. En estos experimentos la técnica de alcanos proporcionó una estimativa directa y precisa de la ingestión individual de pasto.

Las principales limitaciones de la metodología están relacionadas con las diferentes concentraciones de n-alcanos entre las especies forrajeras, entre fracciones constituyentes de las plantas y también, para el mismo forraje *in natura* o conservado bajo forma de ensilado (19). Variaciones dentro de la misma especie en función del período del año o ciclo vegetativo de la planta también son verificadas. Smit *et al*, (2005) destacan la importancia del dosaje preciso de los alcanos sintéticos, teniendo en cuenta que una modificación en la concentración de  $C_{32}$  en el forraje puede causar una gran influencia en el cálculo de ingestión de materia seca (para cada mg de mudanza en su concentración, una alteración media de 0,5 kg de materia seca es esperada en el consumo) (33). Siendo así, la cantidad ofrecida de alcano sintético  $C_{32}$  debe ser superior a 800 mg/día.

### Fibra indigestible y cenizas insolubles

Entre los indicadores internos, la fibra indigestible, determinada con detergente neutro (FDNi) o con detergente ácido (FDAi), después de 144 horas de incubación *in vitro* o *in situ* (3) son empleadas en estudios con animales en pastoreo (25). Detmann *et al*, (2001) evaluaron diversos indicadores internos en la determinación del consumo de novillos mestizos (8). La FDNi

juntamente con la materia seca indigestible (MSi) no diferieron entre si en los resultados de consumo de materia seca, siendo recomendados para estudios con animales en pastoreo. En este experimento, la FDAi mostró resultados variables entre tratamientos, siendo en media superior a la MSi y FDNi e inferior a la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS). Los autores justificaron este hecho en función de la metodología de análisis de la FDAi, por el método secuencial, que posibilitaría la suma de errores por ser el último paso del procedimiento y destacan que resultados más satisfactorios podrían ser obtenidos por el análisis directo del residuo incubado por 144 horas. En la evaluación de la digestibilidad aparente de gramíneas del género *Cynodon*, Ítavo (2001) empleó la FDNi y FDAi como indicadores internos para medir la producción fecal y verificó diferencias significativas en los resultados entre estos indicadores, siendo que la FDAi presentó mayor estabilidad (15). Ya Lippke *et al*, (1986) afirman que la FDNi puede ser determinada con buena precisión y tiene potencial como indicador para alimentos fibrosos. Para estos autores, buena parte de la variabilidad de los resultados obtenidos con indicadores internos indigestibles puede ser atribuida a la falta de padronización del método de determinación. De acuerdo con Albertini *et al*, (2005) más estudios son necesarios con relación al tiempo de incubación, tipo de bolsas, porosidad e incubación *in vitro* e *in situ* (1), factores estos que interfieren directamente en los resultados de experimentos que utilizan esta modalidad de indicadores.

La ceniza residual de la determinación de fibra detergente ácido, conocida como CIDA y la ceniza insoluble en ácido (HCl 2N) (CIA), han sido empleadas como indicadores internos para estimar la digestibilidad de nutrientes en caprinos, bovinos y equinos con resultados satisfactorios. Sin embargo, para que la recuperación fecal no sea subestimada, el alimento debe contener cerca de 0,75% de CIA y concentración superior a 3% de CIDA en la materia seca (2). Sunvold y Cochran (1991) encontraron estimativas precisas para digestibilidad de la materia orgánica utilizando CIA en dietas basadas en heno y forraje para novillos de carne. En este trabajo, los diferentes

indicadores internos evaluados variaron en su habilidad de predecir la digestibilidad de la materia orgánica entre diferentes forrajes, implicando en la necesidad de validar la recuperación fecal de cada indicador para cada tipo específico de forraje, antes de su utilización en trabajos de pesquisa (34). Lo mismo fue observado por Berchielli *et al*, (2005) que debido a la gran variabilidad de resultados, sugieren la existencia de un indicador adecuado para cada forrajera utilizada (4).

No obstante la utilización de CIA sea menos laboriosa que la FDAi y otros indicadores internos, se recomienda cuidado al utilizar este indicador en experimentos con animales en pastoreo, debido al riesgo de ingestión casual de suelo, lo que puede superestimar los valores de cenizas en las heces. Esta suele ser una fuente importante de error cuando se usan las CIA como indicadores de digestibilidad.

#### **Lignina y lignina purificada y enriquecida (LIPE)**

La palabra lignina viene del latín "*lignum*", que significa madera. Es uno de los principales componentes de los tejidos de gimnospermas y angiospermas, presente en tejidos vasculares de vegetales. La lignina es responsable por la resistencia mecánica, y protege los tejidos contra ataque de microorganismos. Los compuestos fenólicos que componen la lignina son oriundos de dos vías metabólicas presentes en todas las plantas vascularizadas: la vía del ácido chiquímico y la vía del acetato-malonato. Químicamente, la lignina es definida como un polímero derivado de unidades fenilpropanóides denominadas  $C_6C_3$ , o simplemente unidades  $C_9$ , repetidas de forma irregular, que tienen su origen en la polimerización deshidrogenativa del alcohol coniferílico (12). La lignina ocurre naturalmente en la pared celular vegetal y es formada por tres polímeros condensados, alcoholes p-cumaril, coniferil y sinapil, que se entrecruzan en una malla compleja, resistente a la hidrólisis ácida y alcalina y a varios complejos enzimáticos, inclusive a enzimas microbianas y del tracto gastrointestinal de animales superiores (13).

La lignina ha sido utilizada como indicador interno, considerando que parece no ser digerida por

animales y presentar recuperación cuantificable en las heces. Sin embargo, trabajos demuestran que ese polímero fenólico puede ser degradado y/o tener su estructura primaria modificada después de pasar por el tracto gastrointestinal. De acuerdo con Fahey y Jung (1983) la digestibilidad de la lignina, observada en varias dietas varió de 27,9 a 53,3%, demostrando que su utilización como indicador es cuestionable (11). Van Soest (1994) cita que en gramíneas jóvenes y especies vegetales con bajas concentraciones de lignina, su menor grado de polimerización puede ocasionar una digestibilidad del orden de 20 a 40%. Recomienda el uso de la lignina como indicador en raciones con concentración superior a 5% en la materia seca (37). Otro punto importante a ser considerado es el método analítico utilizado. Giger (1985) observó variaciones en los resultados de hasta 50% dependiendo de las técnicas analíticas usadas, destacando que el desconocimiento detallado de la estructura de la lignina torna difícil la especificidad de los métodos de determinación (14). De acuerdo con Fahey y Jung (1983) la elección del método analítico puede drásticamente alterar la interpretación de las medidas de flujo de digesta y producción fecal (11). En función de las limitaciones citadas, el uso de la lignina como indicador interno debe ser visto con cautela, pues su recuperación fecal incompleta lleva a subestimar la digestibilidad de los nutrientes.

Las primeras investigaciones relacionadas con la Lignina Purificada y Enriquecida se iniciaron en el Departamento de Zootecnia de la Escola de Veterinária da UFMG en estudio envolviendo el aislamiento de ligninas de pajas molidas de residuos de cultivos de maíz y de soya, sus efectos sobre la digestibilidad de la fibra y comportamiento como indicador en rumiantes (27, 29).

Saliba *et al.*, (1999b) utilizaron los residuos de cultivos de maíz y de soya para aislar la lignina por medio de solventes orgánicos (29). Las ligninas aisladas incubadas en el rumen durante 24 horas no sufrieron alteraciones y cuando fueron observadas al microscopio electrónico de barrido no fueron identificadas bacterias o colonias de bacterias. A través de este estudio se concluyó que las ligninas

aisladas de los residuos de maíz y de soya son indigestibles. Con base en esta información y en los estudios estructurales y ultraestructurales de la lignina (27, 29) se iniciaron los estudios de evaluación de la lignina aislada como indicador externo de digestibilidad. La lignina aislada de la paja de maíz (LPM) fue usada como indicador externo en ovinos, siendo comparada con el método de recolección total de heces y otros indicadores. Con excepción de la metoxila, todos los indicadores fueron semejantes ( $p > 0.05$ ) en cuanto a la recuperación fecal. Los autores concluyeron que, a pesar que la lignina aislada del residuo de maíz es indigestible, su uso como indicador no se justifica, pues no se destacó con relación a los indicadores comúnmente utilizados.

Nuevas fuentes fueron estudiadas para aislar lignina como indicador. En 2002 se comenzó a trabajar la molécula de la lignina purificada, con el objetivo de optimizar su determinación en las heces. Saliba *et al.*, (2003a) aislaron lignina purificada de madera de *Eucalyptus* y la enriquecieron con grupos fenólicos no encontrados en la lignina de la dieta animal, dando origen a un hidroxifenilpropano modificado y enriquecido denominado LIPE<sup>®</sup>, un indicador de consumo e digestibilidad (32). El LIPE<sup>®</sup> fue inicialmente utilizado en estudio de consumo y digestibilidad comparada a la recolección total de heces en conejos. Las estimaciones de producción fecal y digestibilidad fueron realizadas con dos tratamientos, una dieta control y otra con sustitución de 8% de la dieta control por pulpa cítrica. Los resultados revelaron la eficiencia del LIPE<sup>®</sup> como indicador externo, no presentando diferencias ( $p > 0.05$ ) con relación a la recolección total y mostrando la ventaja de un corto período de adaptación. El LIPE<sup>®</sup>, fue validado con la producción total de heces en un experimento de evaluación de heno de *Tifton 85* para ovinos (30). Los resultados fueron semejantes ( $p > 0.05$ ), siendo los valores de coeficiente medio de digestibilidad de 63.23 y 64.78% y producción fecal de 365.39 y 383.07 g/día, respectivamente. Una serie de experimentos fueron conducidos para investigar el uso del LIPE<sup>®</sup> como indicador externo en tres especies animales: conejos, ovinos y porcinos.

Se comparó la digestibilidad de la materia seca, consumo voluntario y producción fecal usando el indicador y la recolección total de heces. No se observaron diferencias en parámetros estudiados. La recuperación fecal del LIPE® fue de 97.9 y 99.3% para los conejos, 95.9% en los ovinos y 102.6 y 94.6% en los porcinos, mostrando ser un indicador externo confiable para estudios de digestibilidad en estas especies (30).

LIPE® también fue probado como indicador de digestibilidad en pollos parrilleros. Saliba *et al*, (2005b) lo usaron como indicador de digestibilidad de nutrientes de algunos alimentos para pollos, comparándolo con óxido crómico y con la recolección fecal total (31). LIPE® mostró ser un buen indicador para esta categoría animal, pues las estimaciones de energía metabolizable fueron semejantes ( $p>0.05$ ) a las obtenidas con la recolección total de excretas. Oliveira *et al*. (2005) compararon LIPE® y óxido crómico (OC) para estimar excreción fecal y consumo de bovinos Nelore en pasturas de *Brachiaria brizantha* CV. Marandu, comparando diferentes períodos de adaptación para los dos indicadores, tres (OCC e LIPEC) y siete días (OCL y LIPEL) (22). El consumo estimado de materia seca fue de 2.12, 2.09, 2.16, y 2.10% del peso vivo, para los tratamientos OCC, LIPEC, OCL y LIPEL, respectivamente, sin diferencias estadísticas significativas ( $p>0.05$ ). Comeron (2005) (INTA Rafaela – comunicación personal), en un experimento realizado con vacas lecheras alimentadas a base de heno de alfalfa no observó diferencias entre la producción total de heces recogidas y la prevista por el LIPE.

A pesar de estos estudios, no había informaciones en cuanto a la caracterización y comportamiento estructural del polímero del LIPE® después de pasar por el tracto digestivo de los animales. Saliba *et al*, (2004) utilizando resonancia nuclear magnética y productos de oxidación con nitrobenzoceno, caracterizaron la composición estructural del LIPE® antes y después de su pasaje por el tracto-gastrointestinal de ovinos y verificaron que en las heces había espectros idénticos a los del LIPE®. Por lo tanto, el indicador pasó por el tracto gastrointestinal sin ser digerido

ni absorbido, siendo totalmente recuperado en las heces (28). A través de microscopía electrónica de barrido pudo ser observada la integridad ultra estructural del polímero recuperado y que el LIPE® se asemeja a las ligninas de maderas duras. Estos estudios revelaron que la lignina purificada y enriquecida presenta propiedades físico-químicas bastante estables y una gran consistencia químico-estructural, mostrando-se inalterada en el trayecto gastrointestinal, siendo totalmente recuperada en las heces. Estudios recientes en número todavía limitado, muestran que la lignina-Klason como indicador interno en resultados optimistas de consumo y digestibilidad.

### **Recomendaciones prácticas sobre el uso del LIPE®**

El LIPE® es un hidroxifenilpropano modificado y enriquecido. Se trata de un indicador de digestibilidad y consumo, desarrollado especialmente para investigación. Su presentación comercial es en cápsulas de 100, 250 ó 500 mg, en cajas de 100 cápsulas o en forma de jarabe con concentración de 10000 mg/100 ml, en recipientes de 100 ml. El período de adaptación para que su excreción sea uniforme es de 48 horas. El período experimental para recolección de heces es satisfactorio con tres (aves) a cinco (otras especies) días. Una cápsula por día y una muestra fecal diaria. La técnica analítica para cuantificación del indicador en las heces es por espectroscopía de infrarrojo, técnica rápida, sensible, barata con muy simple y rápida preparación de la muestra.

### **Consideraciones finales**

El uso de indicadores en nutrición animal representa un avance en la comprensión del proceso digestivo, siendo cada vez más utilizados en substitución al tradicional método de recolección total de heces. La elección de un indicador debe ser primariamente basada en su tasa de recuperación fecal. El LIPE® es un indicador externo de digestibilidad que está demostrando excelentes resultados en estudios con diferentes especies animales, siendo sugerido como una opción de indicador para uso en nutrición animal.

## Referencias

- Albertini TZ, Rezende LHG, Souza ARDL, *et al.* Indicadores internos na determinação da produção de matéria seca fecal em bovinos: matéria seca, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido indigestíveis. In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 42, 2005, Goiânia – GO. Anais, Goiânia: SBZ, 2005 (CD-ROM).
- Araújo KV, Lima JAF, Fialho ET, Miyagi ES. Comparação dos indicadores internos com métodos de coleta total para determinar a digestibilidade dos nutrientes de dietas mistas em eqüinos. *Ciênc Agrotec* 2000; 24:1041-1048.
- Berchielli TT, Andrade P, Furlan CL. Avaliação de indicadores internos em ensaios de digestibilidade. *Rev Soc Bras Zootec* 2000; 29:830-833.
- Berchielli TT, Oliveira SG, Carrilho ENVM, *et al.* Comparação de indicadores para estimativas de produção fecal e de fluxo de digesta em bovinos. *Rev Bras Zootec* 2005; 34: 987-996.
- Burns JC, Pond KR, Fisher DS. Measurement of forage intake. In: Fahey Jr. GC. Forage quality, evaluation, and utilization. Lincoln: University of Nebraska; 1994. p.494-531.
- Casson T, Rowe JB, Thorn CW, Harris D. The use of natural n-alkanes in medic and clover as indigestible markers. *Proc Australian Soc Anim Prod* 1990; 18:462.
- Curran MK, Leader JD, Weston EW. A note on the use of chromic oxide incorporated in a feed to estimate faecal output in ruminants. *Anim Prod* 1967; 9:561-564.
- Detmann E, Paulino MF, Zervoudakis JT, *et al.* Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços suplementados a pasto. *Rev Brás Zootec* 2001; 30:1600-1609.
- Dove H, Mayes RW. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: a review. *Aust J Agric Res* 1991; 42: 913-952.
- Elam C J, Reynolds PJ; Davis RE, *et al.* Digestibility Studies by means of chromic oxide lignin and total collection techniques with sheep. *J Anim Sci* 1962; 21:189-192.
- Fahey GC Jr., Jung HG. Lignin as a marker in digestion studies: a review. *J Anim Sci* 1983; 57:220-225.
- Fengel D, Wegener G. Wood, chemistry, ultrastructure, reactions. New York: Waster & Grugter, 1984. 613p.
- Fukushima RS, Hatfield DR. Composição fenólica de ligninas dioxano determinadas pela reação oxidativa com o nitrobenzeno. *Pesq Agropec Bras* 2003; 38: 373-378.
- Giger S. Revue sur les méthodes de dosage de la lignine utilices en alimentation animale. 1985; 34: 85-122.
- Ítavo LCV. Consumo, digestibilidade e eficiência microbiana de novilhos alimentados com dietas contendo vários níveis de concentrado, utilizando diferentes indicadores e períodos de coleta. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 100p. Tese (Doutorado em Zootecnia).
- Jung HG, Fahey GC Jr. Nutritional implications of phenolic monomers and lignin: a review. *J Anim Sci* 1983; 57:206-219.
- Kotb AR, Luckey TD. Markers in nutrition. *Nutr Abstr Rev* 1972; 42:813-845.
- Laredo MA, Simpson GD, Minson DJ, Orpin CG. The potential for using n-alkanes in tropical forages as a marker for the determination of dry matter intake by grazing ruminants. *J Agric Sci* 191; 117:355-361.
- Lopes FCF, Rodriguez NM, Aroeira LJM. Uso dos n-alcenos em estimativas de consumo de ruminantes sob pastejo. *Vet Notícias* 2001; 7:165-175.
- Mayes RW, Lamb CS, Colgrove PM. The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake. *J Agric Sci* 1986; 107:161-170.
- Moore JE, Sollenberger LE. Techniques to predict pasture intake. In: International symposium on animal production under grazing, 1997, Viçosa. Anais. Viçosa: UFV, 1997. p.81-96.
- Oliveira LOF, Saliba EOS, Borges I, *et al.* Concentração de óxido crômico e LIPE® nas fezes de bovinos em pastagem de *Brachiaria brizantha* utilizadas na estimativa de consumo. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 42, 2005. Goiânia, GO. Anais Goiânia: SBZ, 2005 (CD-ROM).
- Owens FN, Hanson CF. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *J Dairy Sci* 1992; 75:2605-2617.
- Peddie J, Dejar WA, Gilbert AB, Waddington D. The use of titanium dioxide for determining apparent digestibility in mature domestic fowls (*Gallus domesticus*). *J Agric Sci* 1982; 99:233-263.
- Penning PD, Johnson RH. The use of internal markers to estimate herbage digestibility and intake. 2. Indigestible acid detergent fiber. *J Agric Sci* 1983; 100:133-138.
- Reeves M, Fulkerson WJ, Kellaway RC, Dove HA. Comparison of three techniques to determine the herbage intake of dairy cows grazing kikuyu Pennisetum clandestinum pasture. *Aust J Exp Agric* 1996; 36:23-30.
- Saliba EOS. Caracterização Química e microscópica das ligninas dos resíduos agrícolas de milho e de soja expostas à degradação ruminal e seu efeito sobre a digestibilidade dos carboidratos estruturais. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1998. 251p. Tese (Doutorado em Ciência Animal).
- Saliba EOS, Piló-Veloso D, Rodriguez NM, *et al.* Structural characterization of lignin from *Eucalyptus Grandis* before and after exposure to the gastrointestinal tract of ruminants. In: 8º Simpósio mundial de ligninas, 2004, São Carlos: Anais, São Carlos, 2004.

29. Saliba EOS, Rodríguez NM, Gonçalves LC, Fernández PCC. Effect of corn and soybean lignin residues submitted to the ruminal fermentation on structural carbohydrates digestibility. Arq Brás Méd Vet Zootec 1999; 51:85-88.b
30. Saliba EOS, Rodríguez NM, Piló-Veloso D, *et al.* Utilization of purified lignin extracted from *Eucalyptus grandis* (PELI), used as an external marker in digestibility trials in various animal species. In: World conference on animal production, IX, Porto Alegre: Proceedings... Porto Alegre-RS, 2003.c
31. Saliba EOS, Vasconcellos CHF, Veloso JAF, *et al.* LIPE®, CR<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e coleta total de excretas para determinação da digestibilidade em frangos de corte. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 42, 2005, Goiânia. Anais. Goiânia - Go:SBZ, 2005 (CD-ROM).b
32. Saliba EOS, Pereira RAN, Ferreira WM, *et al.* Lignin from *Eucalyptus Grandis* as indicator for rabbits in digestibility trials. Trop Subtrop Agroecosystems 2003; 3:1-3.a (Special volume).
33. Smith LW. A review of the use of intrinsically <sup>14</sup>C and rare earth-labeled neutral detergent fiber to estimate particle digestion and passage. J Anim Sci 1989; 67:2123-2128.
34. Sunvold GD, Cochran RC. Technical note: evaluation of acid detergent lignin, alkaline peroxide lignin, acid insoluble ash, as internal markers for prediction of alfalfa, bromegrass, and prairie hay digestibility by beef steers. J Anim Sci 1991; 69:4951-4955.
35. Titgemeyer EC. Design and interpretation of nutrient digestion studies. J Anim Sci 2001; 75: 2235-2247.
36. Úden P, Colucci PE, Van Soest PJ. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. J Sci Food Agric 1980; 31:625-632.
37. Van Soest PJ. Nutritional ecology of the ruminant. 2 ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.