

Estudio de la variabilidad de la técnica de estimación de consumo en pastoreo a través del marcador externo Dióxido de Titanio.

Study of the variability of intake estimation in grazing conditions using Titanium Dioxide as external marker.

Dini Y^{1*}, Ciganda V.S.², Cajarville C^{3*}

¹ Becaria Doctoral ANII.

² Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Programa de Producción y Sustentabilidad Ambiental. Ruta 50 km 11, Estación Experimental La Estanzuela, Colonia.

³ Departamento de Nutrición Animal, Facultad de Veterinaria, UdelaR.

* Autor para correspondencia: yoanadini@gmail.com

Veterinaria (Montevideo) Volumen 54 DOI: <https://doi.org/10.29155/VET.23.208.1> Recibido: 01/08/2017
N° 208 (2017) 4-9 Aceptado: 25/11/2017

Resumen

Existen numerosas técnicas que permiten la estimación de la materia seca ingerida (MSI) por animales bajo condiciones de pastoreo. Sin embargo, el comportamiento selectivo del animal incorpora una importante fuente de variabilidad que afecta la confiabilidad de los resultados obtenidos. La técnica que utiliza dióxido de titanio (TiO₂) como marcador externo ha sido reportada como una alternativa confiable en la estimación del consumo. El objetivo de este estudio fue comparar la predicción de consumo empleando la técnica de TiO₂ en condiciones de pastoreo respecto a tres ecuaciones de predicción de consumo animal reportadas para situaciones similares a la experimental. Los datos utilizados correspondieron a un experimento realizado empleando 20 vaquillonas Hereford, agrupadas en dos lotes de 10 según su peso vivo (PV), en un diseño “crossover”, realizado durante dos períodos: invierno y primavera 2013. En ambos períodos, cada lote fue asignado a dos pasturas de calidad inicial contrastante: 65,5% vs. 71,2% de digestibilidad de materia seca (DMS); 54,9% vs. 40,9% de fibra detergente neutro (FDN), y 11,6% vs 22,8 % de proteína cruda (PC). Cada período experimental consistió de 8 días de adaptación a la dieta y 5 días de medición con un suministro diario, desde el inicio, de 10 g de TiO₂ por animal. En cada período de medición se confeccionó una muestra compuesta de heces por animal a partir de su colecta diaria vía rectal y se determinó su composición química. Los resultados de MSI (kg d⁻¹) medidos para ambas pasturas utilizando la técnica de TiO₂ mostraron una mayor variabilidad que los resultados predichos por cualquiera de las tres ecuaciones. **Palabras clave:** consumo animal, marcador externo, dióxido de titanio, pastoreo. diferencial en porcinos con diarrea y enteropatía en Uruguay.

Summary

Many techniques have been developed for the estimation of dry matter intake (DMI) by animals under grazing conditions. However, the selective intake of pasture grass by cattle incorporates an important source of variability that affects the confidence of the obtained results. The technique based on the external marker titanium dioxide (TiO₂) has reported to be a reliable alternative in estimating animal intake. The objective of this study is to compare the TiO₂ technique under grazing conditions with respect to three animal intake prediction equations, which were developed under similar conditions of our experiment. The data analyzed correspond to a crossover experiment using 20 Hereford heifers, grouped into two lots of 10 according to their live weight (LW), and carried out during two periods: winter and spring 2013. In both periods, each lot was assigned to two pastures with contrasting initial quality: 65.5% vs. 71.2% dry matter digestibility (DMD); 54.9% vs. 40.9% neutral detergent fiber (NDF), and 11.6% vs. 22.8% crude protein (CP). Each experimental period consisted of 8 days of adaptation to the diet plus 5 days of measurements. From the beginning, 10 g of TiO₂ per animal were daily supplied. During each measurement period, a fecal composite sample per animal was elaborated from its daily collection per rectum, and its chemical composition was determined. The results of DMI (kg d⁻¹) measured for both pastures using the TiO₂ technique showed greater variability than the results predicted by any of the three equations.

Keywords: intake, external marker, titanium dioxide, grazing conditions.

Introducción

La determinación del consumo de materia seca (MSI) es imprescindible para conocer la cantidad de nutrientes disponibles para las funciones de mantenimiento, producción y preñez del animal (NRC, 2001). En condiciones de pastoreo, la medición directa de la ingesta de forraje de rumiantes no es simple de implementar ya que no se dispone de metodologías simples y precisas. Las estimaciones del consumo de forraje en forma indirecta con marcadores externos (suministrados por vía oral) o internos (empleando compuestos presentes en el alimento) son alternativas disponibles que permiten lograr resultados confiables. Según Owens y Hanson, 1992, un adecuado marcador no debe ser absorbido o afectado por el tracto digestivo, no debe influir en la fermentación ruminal, debe ser posible de detectarse a bajas concentraciones, debe ser inerte y no tóxico. Varios estudios han utilizado el dióxido de titanio (TiO_2) como marcador externo para la estimación de consumo en rumiantes en pastoreo (Glindemann y col., 2009; Müller y col., 2012; Sampaio y col., 2011). Esta técnica fue reportada originalmente por Short y col., 1996, en pollos, luego Titgemeyer y col., 2001, reportan el uso de TiO_2 en bovinos. De Souza y col., 2015, concluyen que el uso de TiO_2 como marcador externo es más preciso que el cromo (Cr_2O_3) por lo que recomiendan su utilización para la determinación de consumo en condiciones pastoriles. Asimismo, Titgemeyer y col., 2001, reportan que el uso de TiO_2 como marcador es una alternativa viable al uso del Cr_2O_3 ya que se trata de un aditivo de la dieta animal totalmente inocuo sobre la salud humana. Por otra parte, el periodo para lograr el equilibrio entre el consumo y la excreción del TiO_2 es más breve respecto a la utilización de otros marcadores ya que serían suficientes 5 días luego de la administración inicial para lograr este equilibrio (Glindemann y col., 2009).

En Uruguay, las mediciones de consumo de forraje en condiciones pastoriles extensivas se han realizado utilizando principalmente la metodología de oferta y rechazo de forraje (Beretta y col., 2013). Si bien a partir de esta metodología se ha generado valiosa información para el país, la misma es cuestionada por Latinga y col., 2004, debido a imprecisiones vinculadas a factores como el tamaño, número y distribución de los puntos de muestreo así como la altura de corte y el tipo de pastura.

Los modelos o ecuaciones de predicción de la MSI en rumiantes son herramientas alternativas a la medición, ampliamente utilizadas en la práctica para estimar los requerimientos nutricionales y facilitar la presupuestación de la dieta animal. Sin embargo, la precisión de estas ecuaciones depende en gran medida de la inclusión en su algoritmo de factores del animal, de la dieta, del ambiente o del manejo que puedan afectar la MSI (Fuentes-Pila y col., 1996).

El objetivo de este estudio es evaluar el comportamiento de la técnica de TiO_2 para la medición del consumo de la MSI respecto a tres ecuaciones de predicción, y cuantificar el efecto de la calidad de las pasturas sobre las determinaciones.

Materiales y métodos

Para este estudio se utilizaron los datos de un experimento realizado en la Estación Experimental de INIA La Estanzuela, Colonia (Uruguay), durante el invierno y la primavera del año 2013. Todos los procedimientos que implican animales fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA-Uruguay).

Diseño Experimental, Animales, Tratamientos y Manejo

Se emplearon 20 vaquillonas Hereford de 24 meses de edad promedio y se utilizó un diseño experimental cruzado incluyendo dos tipos de pastura y dos periodos experimentales de 13 días: ocho días de adaptación a la dieta y cinco días de medición. Los animales estuvieron permanentemente bajo condiciones de pastoreo y fueron agrupados en función del peso vivo (PV) inicial y asignados aleatoriamente ($n=10$) a cada tipo de pastura. El peso promedio de cada lote al inicio del periodo de mediciones fue de: $393,05 \pm 27,53$ y $397,65 \pm 26,47$ kg.

Los animales pastorearon dos pasturas de calidad contrastante: una pastura de alta calidad (pastura implantada, PI) compuesta principalmente por Cebadilla (*Bromus catharticus*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*); y otra de baja calidad (campo natural degradado, CND) con predominancia de gramilla (*Cynodon dactylon*) y *Paspalum* sp. El pastoreo fue realizado en franjas diarias, con una asignación inicial del 5% del PV a fin de no restringir el consumo en pastoreo. La disponibilidad inicial de forraje (medido por encima de 5 cm) se determinó en cada franja diaria mediante corte manual diario de la pastura en tres puntos elegidos al azar utilizando cuadros de $0,2 \text{ m}^2$. Las mediciones para los dos tipos de pastura se realizaron en dos momentos del año: invierno y primavera. Dentro de cada estación, se realizaron dos periodos experimentales cruzando los animales alternando las pasturas. Los datos de composición química obtenidos en dichos experimentos se presentan en el cuadro I.

Cuadro I. Composición química de las pasturas según estación del año.

	Invierno		Primavera	
	CND ¹	PI ²	CND ¹	PI ²
Disponibilidad	4149±127,87	2625,98±195,5	3215±187,50	2430,45±138,52
MS %	48,24±3,73	19,57±0,86	27,92±1,17	18,32±0,48
PC %	9,41±0,27	21,14±0,51	11,55±0,23	22,81±0,35
FDN %	70,42±0,36	42,43±0,79	54,93±1,54	40,92±0,94
FDA %	33,90±0,30	27,42±0,79	30,30±0,88	26,77±0,86
DMS %	35,05±0,55	63,27±0,62	65,52±1,06	71,18±0,14

Disponibilidad= forraje ofrecido (kg MS/ha); MS= materia seca; PC= proteína cruda; FDN= fibra detergente neutro; FDA= fibra detergente ácido; DMS= digestibilidad de la materia seca. Área Asignada: 1= 0,07 ha, 2= 0,15 ha. Los datos presentados aquí son promedio por periodo. Los valores son medias y desviaciones estándar.

Para la determinación de la composición química de las muestras de forraje las mismas se pesaron en fresco y se llevaron a estufa a 60 °C durante 48 horas. La materia seca (MS) y la proteína cruda (PC=N*6,25) se analizaron de acuerdo con AOAC, 1990, métodos ID 934.01 e ID 955.04. La fibra detergente neutro (FDN) fue analizada con amilasa estable al calor y sulfito sódico y la fibra detergente ácido (FDA) fue determinada de acuerdo a Van Soest y col., 1991. La digestibilidad in vitro (DMS) fue determinada de acuerdo con Terry y Tilley, 1964.

Determinación de la materia seca ingerida

En cada experimento la MSI (kg d⁻¹) fue determinada utilizando la técnica del TiO₂ como marcador externo (Short y col., 1996). El TiO₂ fue suministrado diariamente a razón de 10 g/animal. Dadas las condiciones extensivas en las que se realizó el trabajo, esta dosis se suministró una vez al día durante la mañana, siempre en el mismo horario, de acuerdo con Titgemeyer y col., 2001. Para asegurar una adecuada recuperación del marcador en heces y lograr la estabilización ruminal del TiO₂ (Glindemann y col., 2009) los animales realizaron un período de acostumbramiento de ocho días durante el cual se les suministró el TiO₂ en la forma descrita anteriormente. La dosificación se realizó utilizando cápsulas de gelatina de cerdo (Torpac®, Miami, USA) las cuales fueron suministradas a los animales a través de un lanza-bolo comercial. Durante el período de mediciones se colectaron diariamente las heces de cada animal vía rectal, una vez al día durante la mañana. Las mismas fueron pesadas individualmente y se llevaron a estufa a 60°C durante 48 horas para la determinación del contenido de MS. A partir de las colectas diarias, se obtuvo una muestra compuesta por animal en cada período de medición, confeccionada utilizando 2 g del total de sus heces colectadas diariamente que se mezclaron y molieron utilizando un tamiz con malla de 1 mm. La concentración de TiO₂ en heces se analizó utilizando el procedimiento descrito por Myers y col., 2004. Para ello se tomó una submuestra de heces de cada muestra compuesta por animal. La submuestra fue pesada y su materia orgánica extraída en horno de mufla durante 13 horas a 580 °C la que posteriormente fue digerida utilizando H₂SO₄ 7,4 M. Con un previo filtrado y dilución la muestra se llevó a un espectrofotómetro (Thermo, GENESYS 10S UV-Vis, USA) donde se realizó la lectura colorimétrica a 410 nm. Al mismo tiempo se elaboró una escala a partir de una solución patrón de 300 ppm de Ti obteniendo un rango de 0 a 30 ppm de Ti, la cual permitió obtener los valores de Ti en heces y la posterior estimación de la MSI (kg d⁻¹).

La producción de MS fecal (kg d⁻¹) se calculó a partir de la dosis de TiO₂ y de la concentración de TiO₂ en las heces utilizando la ecuación 1, de acuerdo con Prigge y col., 1981.

$$\text{MS fecal (kg d}^{-1}\text{)} = \text{dosis de TiO}_2 \text{ (mg d}^{-1}\text{)} / \text{concentración de TiO}_2 \text{ en heces (mg kg}^{-1}\text{)} \quad (1)$$

La MSI (kg d⁻¹) de cada animal se calculó a partir de los gramos de MS en heces excretadas y la digestibilidad (DMS) del alimento consumido (pastura o campo degradado en este caso) de

acuerdo a Corbett y Freer, 1995, ecuación 2:

$$\text{MSI (kg d}^{-1}\text{)} = \text{MS fecal (kg d}^{-1}\text{)} \times 100 / (100 - \text{DMS}) \quad (2)$$

Los datos de MSI, para invierno y primavera, obtenidos a partir de la estimación con TiO₂ fueron comparados con los valores obtenidos para cada animal y periodo de medición, a partir de tres metodologías de predicción seleccionadas. La primera metodología se basa en una ecuación del NRC, 2000, desarrollada para ganado de carne en crecimiento (ecuación 3, NRC-a) que utiliza el PV como única variable de predicción:

$$\text{MSI (kg d}^{-1}\text{)} = 1,8545 + 0,01937 * \text{Peso Vivo inicial} \quad (3)$$

La metodología de Mertens, 1994, desarrollada para ganado de carne se basa en dos ecuaciones sucesivas (ecuaciones 4 y 5) y utiliza el PV animal y el contenido de FDN en la dieta:

$$\text{FDNI (kg d}^{-1}\text{)} = 1,1 * (\text{PV kg} / 100) \quad (4)$$

$$\text{MSI (kg d}^{-1}\text{)} = \text{FDNI (kg d}^{-1}\text{)} / \text{FDN}_{\text{dieta}} \text{ kg/kg MS} \quad (5)$$

Por último, se empleó una segunda ecuación del NRC, 2000, desarrollada para vaquillonas (ecuación 6, NRC-b) que utiliza además del PV animal, las concentraciones de PC y FDA del forraje:

$$\text{MSI (kg d}^{-1}\text{)} = (0,002774 * \text{PC (\%)} - 0,000864 * \text{FDA}) * \text{PV}^{0,75} \quad (6)$$

Análisis Estadísticos

Se realizaron estudios de regresión lineal simple entre los datos de MSI observados (TiO₂) y los predichos por las ecuaciones mencionadas, mediante PROC REG de SAS (versión 9.0; SAS Institute, Cary, NC, USA). Para las diferentes pasturas, los datos de consumo se compararon por ANOVA. Se aplicó el test de Dixon, 1951, para detección de outliers, empleando el criterio

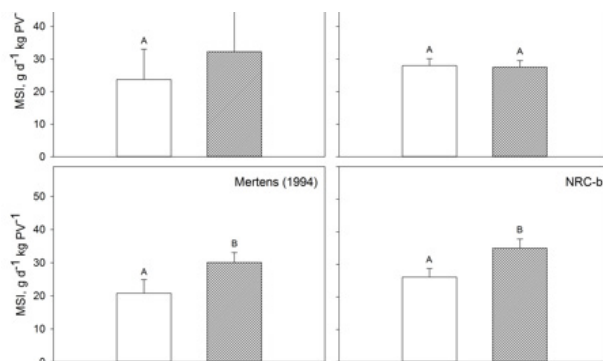


Figura 1. Relación entre la MSI observada (TiO₂) y predicha por NRC-a, por Mertens (1994) y por NRC-b para el conjunto total de datos (n=80).

de eliminación de los valores que superaran 3 desvíos estándar respecto a la media. Los resultados fueron considerados significativamente diferentes cuando P<0,05.

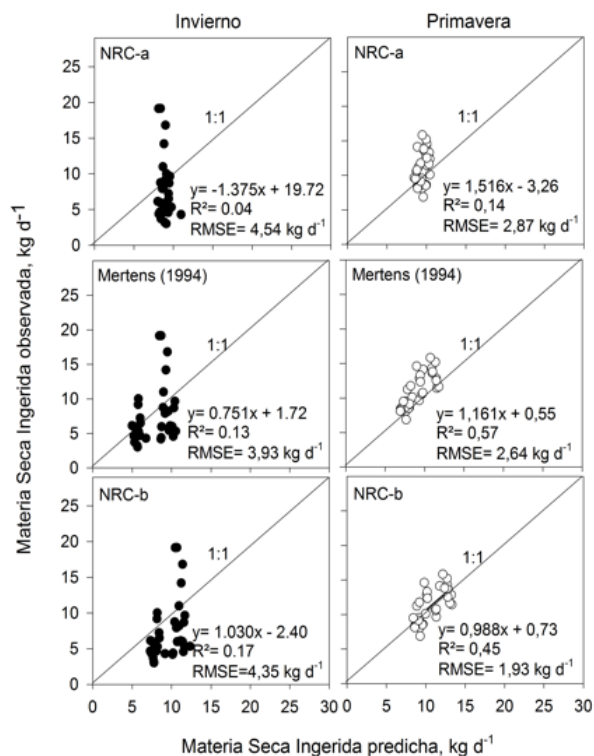


Figura 2. Relación entre la MSI observada (TiO₂) y predicha por las ecuaciones en invierno y en primavera. Las ecuaciones corresponden a NRC-a, Mertens (1994), y NRC-b.

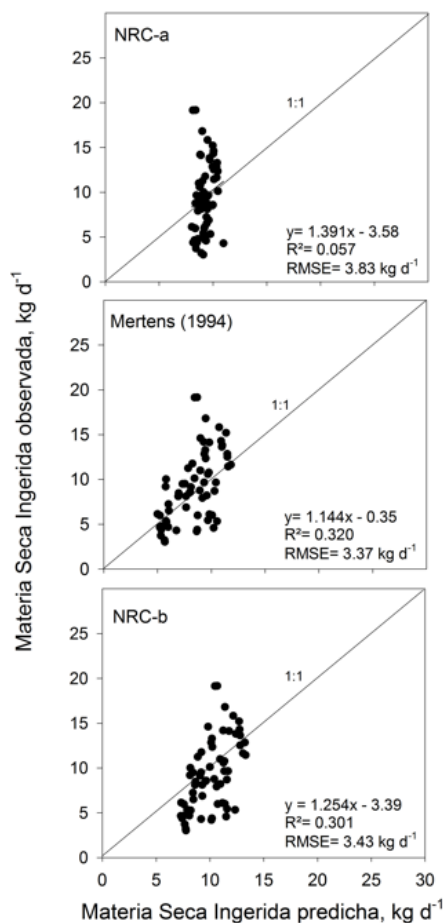


Figura 3. Variabilidad de la MSI medida por TiO₂ y predicha por NRC-a, por Mertens (1994) y por NRC-b, según tipo de pastura.

Resultados

El análisis conjunto para los dos pasturas en invierno y primavera (Figura 1) mostró que las asociaciones entre la MSI observada con TiO₂ y las estimadas por Mertens, 1994 y NRC-b fueron mayores y con menores errores de predicción que la relación obtenida utilizando los valores predichos por NRC-a.

Al separar los datos por estación (Figura 2) se observa que las asociaciones entre la MSI observada (TiO₂) y las ecuaciones de predicción de consumo fueron mayores en primavera respecto al invierno, para todos los casos. Dentro de la primavera, la mayor relación entre los valores observados y los predichos se encontró utilizando la ecuación reportada por Mertens (1994) ($R^2=0,57$), mientras que el menor error de predicción se evidenció utilizando la NRC-b (RMSE= 1,93 kg d⁻¹).

En cuanto a los valores absolutos observados con TiO₂ y los predichos, la utilización de las ecuaciones de Mertens (1994) y la NRC-b mostraron un mejor ajuste a la línea 1:1 respecto a la MSI predicha por la ecuación NRC-a. Como se desprende de las ecuaciones de regresión (Figuras 1 y 2), los valores absolutos obtenidos por la determinación con TiO₂ siempre fueron mayores a los predichos por cualquiera de las metodologías de predicción seleccionadas para este trabajo.

Los resultados obtenidos con la técnica de TiO₂, tanto en CNP como en PI (Figura 3), muestran una mayor variabilidad entre todas las observaciones que los mismos resultados predichos por cualquiera de las tres metodologías utilizadas. La MSI media observada fue significativamente inferior en CNP que en PI (23,72 ± 9,32 vs. 33,67 ± 15,05 g MSI/kg PV, respectivamente). La MSI estimada con la ecuación NRC-a no mostró diferencias significativas entre tratamientos, con la misma variabilidad entre observaciones.

Discusión

El ajuste del conjunto global de datos entre los obtenidos con la técnica de TiO₂ y predichos fue en general bajo y extremadamente bajo cuando la metodología de predicción no incluye en su algoritmo ningún atributo de las pasturas, como es el caso de la metodología NRC-a. Los ajustes mejoraron con pasturas de calidad más alta, probablemente debido a que una mejor calidad de la pastura implicó una mayor proporción de PC, menor contenido de FDN y mayor DMS (Cuadro I), componentes de la dieta que tienen un efecto marcado sobre el consumo animal. Forbes, 2007, plantea que la ingesta inadecuada de proteínas llevaría a un menor consumo por interferencias con otros nutrientes. Además, es sabido que las dietas con muy bajo aporte

proteico causan una insuficiente multiplicación de la población microbiana que termina disminuyendo el consumo (Delagarde y col., 1999). Esto podría explicar los resultados de menor consumo animal observado en CND en invierno cuando los niveles de PC fueron más bajos (media= 9,41%) y cercanos a los límites inferiores que afectan el consumo (Milford y Minson, 1966). Por otro lado, tradicionalmente se ha vinculado el consumo de forraje en rumiantes con su contenido de FDN (Van Soest, 1967). Van Soest, 1994, reporta que existe un umbral de concentración de FDN en el forraje (aproximadamente 50%) por encima del cual se genera disconfort en el animal, deprimiendo el consumo por efecto de llenado. En el presente trabajo, en CND el alto contenido de FDN, principalmente en invierno (media=70,42%), puede haber generado un efecto de este tipo, que explicaría el menor consumo observado para dicho tratamiento. A su vez, la ecuación de predicción de Mertens, 1994, que toma en cuenta la FDN además del PV animal, fue la que mostró la mayor asociación con la medición directa, aunque puede considerarse regular ($R^2=0,57$) en primavera, con niveles medios de FDN de aproximadamente 50%. Sin embargo, la asociación fue inaceptable para los forrajes en invierno ($R^2=0,13$). Para este grupo de datos se detectaron un conjunto de 4 valores de consumo más altos que lo esperable para animales de esta categoría de acuerdo con la información existente (NRC, 2000). Estos representarían para animales individuales un 5,78; 5,63; 4,53 y 3,90 % del PV (Figuras 2 y 3). Se considera que estos valores no son razonables, sobre todo considerando la baja calidad de la pastura, por lo que podrían deberse a debilidades de esta técnica de medición de consumo en pasturas de baja calidad nutricional, aunque sería necesario realizar estudios específicos para confirmar este hecho. Hay que considerar además, el hecho de que en este trabajo se realizó una única colecta diaria, lo cual podría llevar a una mayor imprecisión de las medidas. En este sentido Sampaio y col., 2011, recomiendan trabajar con dos o más colectas diarias. Por otra parte, Forbes, 2007, plantea que existe una relación positiva entre la digestibilidad del forraje y el consumo, explicado en el hecho de que una mayor degradabilidad implica una mayor tasa de pasaje y por ende un mayor consumo. Nuestros resultados obtenidos con la técnica de TiO_2 globalmente coinciden con esta premisa, ya que el mayor consumo observado fue en PI en primavera ($MSI= 12,8 \text{ kg d}^{-1}$) con la mayor DMS (71,18%), mientras que el menor consumo correspondió a CND en invierno ($MSI=5,53 \text{ kg d}^{-1}$) con una DMS=35,05%.

La asociación entre la MSI obtenida con TiO_2 y la predicha utilizando NRC-a fue en todos los casos inaceptable ($R^2=0,06$). Si bien esta ecuación ha sido reportada específicamente para vaquillonas, las diferencias estarían explicadas en que la misma utiliza en su algoritmo únicamente el PV inicial y en que ha sido desarrollada para periodos experimentales de largo plazo, lo cual no coincide con el tiempo empleado para obtener los valores observados mediante la técnica de TiO_2 . La ecuación NRC-b, también reportada en NRC, 2000, incorpora aspectos de la composición química de las dietas como lo son la PC y FDA y mostró una asociación mayor entre la MSI obtenida con la técnica de TiO_2 ($R^2=0,30$), en relación a los obtenidos con la

ecuación NRC-a.

Una adecuada medición de la MSI es capaz de captar la variabilidad existente entre animales y entre dietas. Los resultados muestran que los valores obtenidos utilizando la técnica de TiO_2 presentaron una mayor variabilidad, respecto a las ecuaciones de predicción seleccionadas. Esto estaría explicado por las diferencias en el comportamiento animal individual el cual no es tenido en cuenta en los cálculos de las ecuaciones de predicción. Los coeficientes de variación obtenidos en la determinación de la MSI con TiO_2 en CND fueron de 37% y en PI de 45%. Dichos valores son superiores a la variabilidad reportada en trabajos nacionales en bovinos de similar categoría, en los cuales se midió el consumo en forma directa (oferta-rechazo) en comederos y que fueron cercanos al 10% (Félix y col., 2017; Santana y col., 2017). En los trabajos anteriormente citados, sin embargo, la digestibilidad de los alimentos empleados, tanto forrajes como dietas compuestas, tuvo en general digestibilidades más altas y homogéneas que las empleadas en este trabajo, lo cual podría explicar también la menor variabilidad en las ingestiones. De todas maneras, no es posible a partir de estos datos dilucidar si esta gran variabilidad no es en parte debida a la realización de una única colecta diaria.

Conclusiones

La medición de consumo utilizando TiO_2 en todos los casos estimó un mayor y más variable consumo de MS que los valores predichos por las tres ecuaciones seleccionadas. En general las asociaciones fueron mayores en forrajes de primavera y cuando las ecuaciones incluyeron variables de calidad de forraje. Teniendo en cuenta la alta variabilidad de los datos, sobre todo en pasturas de menor calidad, debería considerarse la doble dosificación y colecta diaria en futuros trabajos, considerando además las posibles interferencias de dicha dosificación sobre el comportamiento animal en pastoreo.

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Cesar Pinares Patiño por su disposición frente a las frecuentes consultas realizadas, aportando su valiosa experiencia para realizar este estudio. Se agradece especialmente la participación de la Bach. Julieta Mariotta quien facilitó la realización de los trabajos de campo y laboratorio. Se agradece al Laboratorio de Suelos y Aguas de INIA La Estanzuela por la puesta a punto de la técnica para la determinación de TiO_2 .

Bibliografía

1. AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist, 15va ed., AOAC, Arlington, VA, USA.
2. Beretta V, Simeone A, Bentancur O. (2013). Manejo de la sombra asociado a la restricción del pastoreo: efecto sobre

- el comportamiento y performance estival de vacunos. *Agronomía* 17: 137-140.
3. Corbett J, Freer M. (1995). Ingestion et digestion chez les ruminants au pâturage. En: Jarrige R, Ruckebusch Y, Demarquilly C, Farce M, Journet M. (Eds.). *Nutrition des ruminants domestiques, ingestion et digestion*. Paris, France: INRA Editions, pp. 871-900.
 4. De Souza J, Batstel F, Welter K, Mendes Silva M, Fleury Costa D, Portela Santos F. (2015). Evaluation of external markers to estimate fecal excretion, intake, and digestibility in dairy cows. *Trop Anim Health Prod* 47:265-268.
 5. Delagarde R, Peyraud J, Delaby L. (1999). Influence of carbohydrate or protein supplementation on intake, behaviour and digestion in dairy cows strip-grazing low-nitrogen fertilized perennial ryegrass. *Anim* 48:81-96.
 6. Dixon W. (1951). Ratios involving extreme values. *J Ann Math Stat* 22: 68-78.
 7. Félix A, Repetto JL, Hernández N, Pérez-Ruchel A. (2017). Restricting the time of access to fresh forage reduces intake and energy balance but does not affect the digestive utilization of nutrients in beef heifers. *Anim Feed Sci Technol* 226:103-112.
 8. Forbes M. (2007). A personal view of how ruminant animals control their intake and choice of food: minimal total discomfort. *Nutr Res* 20: 132-146.
 9. Fuentes-Pila J, De Lorenzo M, Beede D, Staples C, Holter J. (1996). Evaluation of Equations Based on Animal Factors to Predict Intake of Lactating Holstein Cows. *J Dairy Sci* 79: 1562-1571.
 10. Glindemann T, Tas B, Wang C, Alvers S, Susenbeth A. (2009). Evaluation of titanium dioxide as an inert marker for estimating faecal excretion in grazing sheep. *Anim Feed Sci Technol* 152: 186-197.
 11. Latinga E, Neuteboom J, Meijs J. (2004). Sward Methods. En: Penning P (Ed.). *Herbage intake handbook*, The British Grassland Society, Reading, 2da ed., pp. 23-52.
 12. Mertens DR. (1994). *Improving intake and performance of forage-based rations* [en línea]. Madison, WI: Agricultural Research Service, USDA. Consultado 8 Jun 2017. Disponible en: <http://www.txanc.org/docs/Improving-intake-and-performances-of-forage-based-rations.pdf>
 13. Milford R, Minson D. (1966). Intake of tropical pastures species. *International Grassland Congress*. NO9, Sao Paulo, Brasil, 815-822.
 14. Müller K, Lin L, Wang C, Glindemann T, Schiborra A, Schonbach P, Wan H, Dickhoefer U, Susenbeth A. (2012). Effect of continuous v. daytime grazing on feed intake and growth of sheep grazing in a semi-arid grassland steppe. *Anim* 6:526-534.
 15. Myers K, Ludden P, Nayigihugu V, Hess B. (2004). A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *J Anim Sci* 82: 179-183.
 16. NRC (2000). National Research Council. *Nutrient Requirements of Beef Cattle*, 7a ed., Washington DC, USA, National Academy Press, 249 p.
 17. NRC (2001). National Research Council. *Nutrient requirements of dairy cattle*, 7a ed., Washington DC, USA, National Academy Press, 401 p.
 18. Owens F, Hanson C. (1992). External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *J Dairy Sci* 75: 2605-2617.
 19. Prigge E, Varga G, Vicini J, Reid R. (1981). Comparison of Ytterbium Chloride and Chromium Sesquioxide as Fecal Indicators. *J Anim Sci* 53, 1629-1633.
 20. Sampaio C, Detmann E, Valente T, Costa V, Valadares Filho S, Queiroz A. (2011). Fecal excretion patterns and short term bias of internal and external markers in a digestion assay with cattle. *R Bras de Zootec* 40: 657-665.
 21. Santana A, Cajarville C, Mendoza A, Repetto JL. (2017). Combination of legume-based herbage and total mixed ration (TMR) maintains intake and nutrient utilization of TMR and improves nitrogen utilization of herbage in heifers. *Animal* 11: 616-624.
 22. Short F, Gorton P, Wiseman J, Boorman K. (1996). Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Anim Feed Sci Technol* 59: 215-221.
 23. Terry R, Tilley J. (1964). The digestibility of the leaves and stems of perennial ryegrass, cocksfoot, timothy, tall fescue, lucerne and sainfoin, as measured by an in vitro procedure. *Grass Forage Sci* 19, 363-372.
 24. Titgemeyer E, Armendariz C, Bindel D, Greenwood R, Löest C. (2001). Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *J Anim Sci* 79: 1059-1063.
 25. Van Soest P. (1967). Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages. *J Anim Sci* 26, 119-128.
 26. Van Soest P, Robertson J, Lewis B. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74, 3583-3597.
 27. Van Soest P. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2a ed., Ithaca, NY, USA, Cornell University Press, 475 p.