

E.A.P.
149(21)
C.2



**ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

**MANUAL DE LABORATORIO
NUTRICION ANIMAL**

**Beatriz Murillo
1994**

**ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

**MANUAL DE LABORATORIO
NUTRICION ANIMAL**

**Beatriz Murillo
1994**

"Si el camino es largo y duro no te rindas, ¡lucha!,
el mundo es de aquel que se esfuerza y que
a pesar de los altos y bajos de la vida, persevera
hasta alcanzar "sus máximos sueños".

Autor anónimo
Clase 93, E A P.

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	vii
INTRODUCCION	1
Objetivos	2
Reglas básicas de seguridad	2
Bibliografía	3
CLASIFICACION DE ALIMENTO	4
Componentes de la nomenclatura internacional de alimentos	4
Ejemplo de la nomenclatura internacional	6
Bibliografía	7
MUESTREO CONSERVACION Y ENVIO DE MUESTRAS	8
Muestreo de alimentos balanceados, suplementos e ingredientes alimenticios sólidos	9
Muestreo de alimentos e ingredientes líquidos	12
Muestreo de forrajes	12
Muestreo de pastos	14
Muestreo de hierbas y arbustos	16
Muestreo de forrajes ensilados	17
Muestreo de forrajes henificados	17
Muestreo de material biológico	18
Heces y orina	18
Líquido ruminal	19
Muestreo de suelos	19
Tamaño y tipo de envase para muestras	20
PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA ANALISIS	21
Deshidratación	21
Refrigeración o congelación	22
Efecto de la temperatura sobre la composición química de la muestra	22
Uso de preservadores químicos	23
Identificación de muestras	24
TECNICAS DE PREPARACION Y ENVIO DE MUESTRAS	24
Preparación y envío de alimentos balanceados, suplementos e ingredientes alimenticios sólidos	24
Preparación y envío de forrajes	25

Preparación y envío de material biológico	25
Bibliografía	26
ANALISIS PROXIMO	27
Humedad	28
Proteína cruda	28
Extracto etéreo o grasa	28
Material mineral	28
Fibra cruda	28
Extracto libre de nitrógeno	29
Esquema de flujo del análisis proximo o proximal	30
Hojas de registro de análisis	31
Bibliografía	32
DETERMINACION DE AGUA O HUMEDAD	33
Cálculos	34
Determinación de humedad aparente	34
Formas de expresar el contenido de materia seca de los alimentos	35
DETERMINACION DE MATERIA INORGANICA (CENIZAS) Y MATERIA ORGANICA	37
Cálculos	37
DETERMINACION DE PROTEINA CRUDA (Método de Kjeldahl)	38
Reactivos	38
Digestión	38
Destilación	39
Titulación	40
Cálculos	40
DETERMINACION DE EXTRACTO ETEREO O GRASA CRUDA	42
Reactivos	42
Procedimiento	42
Cálculos	43
DETERMINACION DE FIBRA CRUDA	44
Reactivos	44
Digestión ácida	44
Digestión alcalina	44
Cálculos	45

DETERMINACION DE LA ENERGIA GRUESA O BRUTA	46
Aparatos y reactivos	46
Preparación de la muestra	46
Estandarización del calorímetro	48
Cálculos del calor de combustión de la muestra	49
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE TRIPSINA	50
Reactivos	50
Preparación de la muestra	50
Procedimiento	50
Cálculos	51
PROTEINA DIGESTIBLE EN PEPSINA	52
Reactivos	52
Procedimiento	52
Cálculos	52
PROTEINA SOLUBLE	54
Reactivos	54
Procedimiento	54
Cálculos	54
UREASA ACTIVIDAD UREASICA	55
Material	55
Procedimiento	55
Cálculos	56
DETERMINACION DE CALCIO	57
Reactivos	57
Preparación de la muestra	57
Cálculos	58
DETERMINACION FOSFORO	59
Reactivos	59
Preparación de los estándares	60
Procedimiento	60
Cálculos	61
ANALISIS DE FORRAJES Y ENSILAJES	62
Introducción	62
Ensilaje	62
Tipo de fermentación sobre la composición del ensilaje	65
Fibra dietética	66

Solubilidad de proteína	67
Bibliografía	68
DETERMINACION DE UREA EN ALIMENTOS PARA ANIMALES	70
Reactivos	70
Procedimiento	70
Cálculos	71
DETERMINACION DE FIBRA NEUTRO DETERGENTE Y CONTENIDO CELULAR	72
Principio	72
Equipo	72
Reactivos	73
Procedimiento	74
Cálculos	75
DETERMINACION DE PAREDES CELULARES (FND) EN ALIMENTOS AMLACEOS	76
Reactivos	76
Procedimiento	76
DETERMINACION DE FIBRA POR EL METODO ACIDO DETERGENTE	78
Principio	78
Reactivos	78
Procedimiento	78
Cálculos	79
DETERMINACION DE LIGNINA, CELULOSA Y SILICIO (CENIZAS INSOLUBLES) POR PERMANGANATO	81
Principio	81
Teoría del método	81
Reactivos	82
Procedimiento	83
Obtención de las fracciones: lignina, celulosa y óxido de silicio	84
Cálculos	86
NITROGENO INSOLUBLE EN DETERGENTE ACIDO	87
Importancia	87
Reactivos	87
Procedimiento	87
Cálculos	88

NITROGENO INSOLUBLE EN PEPSINA	89
Reactivos	89
Procedimiento	89
Cálculos	90
DETERMINACION DE NITROGENO AMONIACAL EN ENSILAJES	91
Principio	91
Procedimiento	91
Cálculos	91
DETERMINACION DE HUMEDAD EN ENSILAJES	92
Principio	92
Procedimiento	92
Cálculos	93
MATERIA INSOLUBLE EN AGUA CALIENTE Y SU CONTENIDO DE NITROGENO	94
Principio	94
Procedimiento	94
Cálculos	94
DETERMINACION DEL pH EN ENSILAJE FRESCO O CONGELADO	95
Principio	95
Procedimiento	95
DETERMINACION DE ACIDO LACTICO EN ENSILAJES	96
Principio	96
Reactivos	96
Procedimiento	97
Cálculos	98
DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE FORRAJES	99
Principio	99
Reactivos	99
Procedimiento	101
Preparación del inóculo	101
Procedimiento de Tilley y Terry	102
Procedimiento detergente neutro, para estimación de la digestibilidad verdadera	102
Cálculos	103

DETERMINACION DE LA DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> Y ENERGIA METABOLIZABLE POR EL METODO DE PRODUCCION DE GASES	104
Principio	104
Reactivos	104
Equipo	105
Procedimiento	106
Cálculos	108
 CALCULO DE LA DIGESTIBILIDAD APARENTE (ECUACION SUMATIVA)	 110

INDICE DE FIGURAS

1	MUESTREADORES PARA SOLIDOS	10
2	FORMA CORRECTA DE INSERTAR EL MUESTREADOR EN UN SACO	10
3	PUNTOS DE MUESTREO	11
4	FORMAS DE TOMAR MUESTRAS EN UN POTRERO	15
5	MUESTREO SECUENCIAL DE UNA PARCELA	16
6	ESQUEMA DE FLUJO DEL ANALISIS PROXIMO O PROXIMAL	30
7	HOJAS DE REGISTRO DE ANALISIS	31
8	DISTRIBUCION DE LA FIBRA EN LA DIETA	66

INTRODUCCION

El conocimiento de la composición química de los alimentos permite su utilización en una forma racional, así como, la incorporación como alimentos de productos desconocidos, o de aquellos que en condiciones naturales son tóxicos pero que mediante ciertos procesos pueden ser usados con confianza. El análisis también indica qué y cuáles requerimientos nutricionales se pueden cubrir con los alimentos, para evitar deficiencias o excesos de nutrientes, que sean perjudiciales para los animales domésticos.

El análisis químico nutricional de los alimentos es, por consiguiente, indispensable para establecer programas de alimentación adecuados, tanto para los animales como para el hombre que los alimenta.

Desde hace tiempo el hombre se ha preocupado por analizar los alimentos para conocer sus características nutritivas. Diferentes cuadros de composición de alimentos se encuentran publicados en todo el mundo (Latin American tables of feed composition, 1974; US Canadian tables of feed composition, 1969; Valor nutritivo de los alimentos para Centroamérica y Panamá 1971). Estos cuadros indican la composición proximal de los alimentos y algunos incluyen los aminoácidos, minerales, vitaminas e incluso pruebas con animales. Sin embargo, el empleo de cuadros de composición tiene limitaciones ya que se indican únicamente promedios; además, hay variaciones en la composición química debido a diferencias entre especies, localización geográfica, sistemas de recolección, procesos industriales, sistemas agrícolas y, por supuesto, adulteraciones. Todo esto origina errores que en ocasiones pueden ser importantes (Tejada, 1981). Por todo esto debe hacerse siempre uso del laboratorio como un instrumento esencial para constatar la pureza de los alimentos empleados en un determinado lugar.

Según su composición química, los alimentos se pueden clasificar en grupos diferentes; por lo tanto, los métodos para analizarlos también pueden ser característicos de un tipo de alimento. Por supuesto, hay determinaciones que son comunes a varias clases de alimentos, como la determinación de "proteína cruda" o de minerales; sin embargo, "calidad de proteína" se aplica de preferencia a concentrados proteícos como pastas o tortas de oleaginosas y harinas de carne o pescado.

En general los alimentos para animales pueden clasificarse en las siguientes categorías:

- | | |
|------------------|-----------------|
| 1.- FORRAJES | 3.- SUPLEMENTOS |
| 2.- CONCENTRADOS | 4.- ADITIVOS |

Independientemente del criterio usado para clasificarlos, hay alimentos que no caen dentro de ninguna o varias de estas categorías. Como quiera que sea, lo importante no es clasificarlos en forma rigurosa, sino conocer sus características químicas y las condiciones que afectan el valor nutritivo de cada alimento para la especie animal a la que se dedica, o al programa de alimentación que lo incluye.

Objetivos.

El Laboratorio de Nutrición Animal está diseñado para proporcionar a los estudiantes el entrenamiento necesario en el análisis de alimentos concentrados y forrajes y lo que es más importante, capacitarlos en los criterios de interpretación de resultados para que puedan utilizar eficientemente en la práctica la información que se genera en el laboratorio.

El presente manual es la recopilación de los métodos más comúnmente usados para el análisis de alimentos destinados al consumo de los animales domésticos y representa la guía para el trabajo diario en el laboratorio. Además de servir en el módulo, este documento quedará como material de referencia para cada uno de los participantes del curso.

Reglas básicas de seguridad :

- 1.- GUARDE SIEMPRE ÓRDEN Y LIMPIEZA EN EL TRABAJO.
- 2.- POR NINGUNA RAZON JUEGUE DENTRO DEL LABORATORIO. "BROMEAR" PUEDE SER PELIGROSO TRATANDOSE DE REACTIVOS CUYA COMPOSICION Y CORROSIVIDAD USTED NO CONOCE.
- 3.- DEBE TENER ESPECIAL CUIDADO EN EL MANEJO DEL MATERIAL DE VIDRIERIA Y PORCELANA CUANDO ESTA CALIENTE. SIEMPRE USE PINZAS O GUANTES DE ASBESTO PARA EVITAR QUEMADURAS.
- 4.- USE MANDIL PARA PROTEGER NO SOLO SU ROPA DE POSIBLES SALPICADURAS DE COMPUESTOS CORROSIVOS, SINO A USTED MISMO.
- 5.- NUNCA SE LIMPIE LAS MANOS EN LA ROPA. MUCHOS REACTIVOS CONTIENEN ACIDOS O SUBSTANCIAS CORROSIVAS, QUE ADEMAS DE QUEMAR LA ROPA PUEDEN LLEGAR A QUEMAR O IRRITAR LA PIEL. LAVESE Y SEQUESE CON PAPEL TOALLA.
- 6.- NO USE PAPEL TOALLA PARA SECAR ACIDOS O SUS RESPECTIVAS SOLUCIONES VERTIDAS SOBRE LAS MESAS O EL PISO. USE ESPONJAS EMBEBIDAS EN AGUA Y LIMPIE ENJUAGANDO LA ESPONJA TANTAS VECES COMO SEA NECESARIO EN EL LAVAMANOS MAS CERCANO. EL PAPEL

TOALLA SE QUEMA CON FACILIDAD Y PUEDE PRODUCIR QUEMADURAS EN LAS MANOS POR SIMPLE POROSIDAD.

- 7.- MANIPULE SIEMPRE EN LA CAMPANA EXTRACTORA, REACTIVOS Y REACCIONES QUE GENEREN VAPORES IRRITANTES O TOXICOS, HAGALO SIEMPRE EN LA CAMPANA EXTRACTORA Y UTILICE BULBOS AUTOMATICOS PARA EXTRAER CON UNA PIPETA SOLUCIONES VOLATILES TOXICAS. NUNCA HUELA DIRECTAMENTE UN FRASCO CON REACTIVOS.
- 8.- SI SE QUEMA CON ACIDO LAS MANOS O ROPA NO TIRE EL MATERIAL CON QUE ESTA TRABAJANDO. COLOQUELO SOBRE LA MESA Y LAVESE EFUSIVAMENTE LAS MANOS EN EL CHORRO MAS CERCANO. NI EL ACIDO CLORHIDRICO PURO, QUE ES EL MAS FUERTE, ES CAPAZ DE DESTRUIR TEJIDO EN ESCASOS SEGUNDOS. ¡NO SE DESEPERE! PIENSE Y ACTUE SENSATAMENTE. INFORME INMEDIATAMENTE DE LA QUEMADURA AL PROFESOR.

Bibliografía

- Mc Dowell, L.R., J.H. Conrad, J.E. Thomas and L.E. Harris. 1974. Latin America tables of feed composition. University of Florida. Gainesville, Florida, U.S.A.
- Tejada Hernández, I. 1981. Composición química de los alimentos. Panafga (89), 59.
- Unites States-Canadian Tables of Feed Composition. 1982. (3th revision) National Academy of Sciences, Washington, D.C., U.S.A.
- Flores, M., M.T. Menchú y M.Y. Lara. 1971. Valor nutritivo de los alimentos para Centroamérica y Panamá. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. Guatemala, Guatemala.

CLASIFICACION DE ALIMENTO

El consejo nacional de Investigación de los Estados Unidos (NRC) creó un programa de clasificación y nomenclatura de los alimentos que reuniera los siguientes factores:

- 1.- Un medio para describir los alimentos exactamente y en detalle.
- 2.- Permitir la formulación de raciones por computadora.
- 3.- Proveer una clasificación internacional de alimentos para animales.

Harris et al. (1968) propusieron una nomenclatura que describiera a los alimentos en forma tal, que indicara algunas de sus propiedades cualitativas. Así, el nombre internacional consiste de nueve componentes escritos en forma lineal, separando cada componente con una coma.

Componentes de la nomenclatura internacional de alimentos

- 1.- Nombre científico (género y especie).
- 2.- Variedad o clase.
- 3.- Nombre común del alimento.
- 4.- Parte de la planta, animal o subproducto.
- 5.- Proceso(s) y tratamiento(s) aplicado(s) al alimento, antes de ser consumido por los animales.
- 6.- Estado de madurez (cuando sea necesario).
- 7.- Corte o cosecha (cuando sea necesario).
- 8.- Grado o calificación de calidad.
- 9.- Clasificación.

Los alimentos del mismo origen (especie, variedad o clase) están agrupados en ocho clases:

1.- FORRAJES SECOS Y ALIMENTOS TOSCOS

FORRAJES DIFICILES DE DIGERIR.

HENOS de gramíneas y/o leguminosas

PAJAS: La parte aérea del forraje con espiga, cáscara y/o panícula.

RASTROJO: La parte aérea del forraje sin espiga, cáscara y/o panícula.

OTROS PRODUCTOS CON MAS DE 18% DE FIBRA. Esta clase incluye todos los pastos y forrajes no cultivados cortados y/o curados. Estos forrajes son bajos en energía neta por unidad de peso, generalmente debido a niveles elevados de fibra. De acuerdo a la nomenclatura internacional, los productos que en estado seco tienen más de 18% de fibra cruda, se clasifican como forrajes secos y/o alimentos toscos. En este grupo se incluyen las cascarillas como las de avena, cacahuete y algodón.

2.- **PASTURAS CULTIVADAS, PASTOS NATIVOS Y FORRAJES UTILIZADOS VERDES**

FORRAJES QUE NO HAN SIDO CORTADOS Y/O CURADOS.

Por ejemplo, todos los forrajes cortados y ofrecidos en forma verde o curados en pie, como plantas nativas en estado de latencia negativa. El término verde se usa como un término de procedencia para la mayoría de estos alimentos, aunque ellos pueden ser secados antes de ser consumidos.

3.- **ENSILAJES**

ALIMENTOS CONSERVADOS POR FERMENTACION.

Por ejemplo, maíz, sorgo, guinea, mezcla de leguminosas con gramíneas, etc.

4.- **ALIMENTOS ENERGETICOS**

ALIMENTOS CON MENOS DE 20% DE PROTEINA CRUDA Y MENOS DE 18% DE FIBRA CRUDA.

Granos de cereales (maíz, sorgo, trigo, avena, etc.)

Subproductos de molinería.

Nueces.

Raíces.

Grasas.

Melazas.

5.- **ALIMENTOS PROTEICO**

ALIMENTOS CON MAS DE 20% DE PROTEINA CRUDA Y MENOS DE 18% DE FIBRA CRUDA.

Proteínas de origen animal (harinas de carne, residuos de aves, de pescado, etc.)

Proteínas de origen vegetal (harinas de soya, algodón, cártamo, etc.)

Proteínas de origen microbiano (levaduras, algas, hongos, bacterias)

Subproductos industriales (granos secos de destilería, de cervecería)

6.- **SUPLEMENTOS MINERALES.**

7.- **SUPLEMENTOS VITAMINICOS.**

8.- **ADITIVOS.**

Preservadores de los alimentos. Moduladores de la digestión. Alteradores del metabolismo y de la salud. Modificadores del consumo. Pigmentos.

EJEMPLO DE LA NOMENCLATURA INTERNACIONAL^{1/}

Componentes del nombre	Alimento 1	Alimento 2	Alimento 3
Género (material del que proviene)	<i>Zea</i>	<i>Digitaria</i>	<i>Gossypium</i>
Especie	<i>mays</i>	<i>decumbens</i>	spp.
Variiedad o clase	indentata	----	----
Nombre común	maíz	pasto pangola	algodón
Parte consumida	parte aérea	parte aérea	semilla con algunas cascarillas.
Proceso y tratamiento al cual ha sido sometido el producto	ensilado	fresco fertilizado	extraído con disolventes y molido.
Grado de madurez	----	florecimiento tardío	----
Corte o cosecha	----	uno	----
Grado de calidad	----	----	36% de proteína cruda mínimo.
Clase	(3) Ensilaje	(2) Pastos pastos nativos forrajes suministrados verdes.	(5) Suplemento proteico
No. de referencia	3-02-912	2-10-388	5-01-632.

^{1/}Tomado de McDowell et al. (1974).

Los nombres de los alimentos quedarán entonces así:

Alimento 1 *Zea mays*, maíz, parte aérea, ensilado, (3).

Alimento 2 *Digitaria decumbens*, pangola, parte aérea, fresco, fertilizado, florecimiento tardío, primer corte, (2).

Alimento 3 *Gossypium spp*, algodón, semillas con algunas cascarillas, extraída con solventes y molida, mínimo 36% de proteína, (5).

Bibliografía

Harris, L.E., J.M. Asplund and E.W. Crampton. 1968. An international feed nomenclature and methods for summarizing and using feed data to calculate diets. Utah Agr. Exp. Sta. Bull, 479.

McDowell, L.R., J.H. Conrad, J.E. Thomas and L.E. Harris. 1974. Latin American tables of feed composition. University of Florida. Gainesville, Florida U.S.A.

MUESTREO, CONSERVACION Y ENVIO DE MUESTRAS

La química analítica comprende el análisis cualitativo y cuantitativo. El análisis cualitativo es la detección e identificación de los constituyentes de un alimento, mientras que el análisis cuantitativo es la determinación de las cantidades de esos constituyentes. En el campo de la nutrición es de gran importancia conocer los nutrientes que ingiere, excreta y metaboliza el organismo, por lo que la química analítica junto con la bioquímica y la fisiología se pueden considerar como sus piedras angulares.

En la actualidad se han desarrollado técnicas y métodos específicos, exactos y precisos para analizar los diferentes compuestos que intervienen en la bioquímica de la nutrición, los cuales se clasifican según el tamaño de la muestra empleada:

CLASIFICACION DE LOS METODOS ANALITICOS SEGUN EL TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Clase de método	Tamaño aproximado de la muestra para el análisis.
Ordinarios o macrométodos	100 - 1000 mg
Semi-Micrométodos	10 mg
Micrométodos	1 mg
Ultra-Micrométodos	1 µg
Métodos de Sub-Microgramos	0.01 µg

Tomado de Blaedel y Meloche (1966).

El analista debe escoger el método más adecuado para la determinación que se desea efectuar; sin embargo, aún el más experimentado y utilizando el método más preciso y exacto, no obtendrá resultados verdaderos si la muestra no es representativa del espécimen que se desea analizar. O sea que una muestra mal tomada invalidará el mejor análisis. De ahí la importancia que tiene el muestreo, que muchas veces se efectúa incorrectamente.

El objetivo principal de los procedimientos de muestreo es obtener una muestra de tamaño adecuado, que represente a la totalidad de la masa del espécimen de donde fue tomada para ser trabajada en el laboratorio.

El muestreo adecuado dependerá del objetivo del análisis. El muestreo se hace para controlar la calidad en la producción de un concentrado, para controlar la calidad de las materias primas, o con fines de investigación por supuesto, un muestreo adecuado dependerá también del universo que se desea para tomar muestras.

Cuando el muestreo es para control de calidad en la producción, existen métodos basados en distribuciones estadísticas específicas, cuyo número de muestras que se deben tomar se basan en ecuaciones que correlacionan ciertos parámetros como son: la tolerancia permitida en la calidad del producto, el tamaño del universo muestreado (producción/unidad de tiempo), desviación estándar prefijada, etc.

Para fines de investigación, que es el caso de los análisis en nutrición animal, es más práctico y útil un muestreo al azar. Aquí el término "azar" no significa literalmente casualidad; al contrario, "selección al azar" es un procedimiento definido y riguroso que asegura que cada parte o unidad de un universo particular tiene igual probabilidad de ser seleccionada o escogida.

El proceso universalmente aceptado de selección al azar, consiste en asignarle a cada unidad del universo un número único y designar las unidades que serán seleccionadas utilizando una tabla o un generador de números al azar. Este método presenta ciertos inconvenientes como son las limitaciones físicas cuando se dificulta asignar un número a cada unidad; algunas veces resulta costoso y en otros casos, si no se tiene idea de la distribución de las unidades en el lote, también resulta complicado.

Muestreo de alimentos balanceados, suplementos e ingredientes alimenticios sólidos.

Para muestrear este tipo de productos, es necesario utilizar instrumentos diseñados para esta tarea. Los muestreadores deben estar limpios y libres de contaminación tanto interna como externamente; los más comunes se ilustran en la figura 1; sin embargo, si no se dispone de ellos, se puede ingeniar una forma para obtener las muestras. Si se hace con cuidado, se obtienen resultados similares, aunque toma el muestreo más tiempo (Cooks y Van Rede, 1976).

INSTRUMENTOS PARA TOMAR MUESTRAS

- a) Lanza muestreadora (probador abierto)
- b) Cucharón de mano.
- c) Lanza muestreadora dividida.
- d) Muestreador cilíndrico dividido.
- e) Boquilla vertedora (probador de sacos).
- f) Muestreador para flujos continuos.
- g) Moldes o cuadrantes para cuartear.

Si el producto está envasado en bolsas o sacos cerrados, se deberá tomar de cada bulto muestreado 500 a 1000 gramos de material, el cual se extraerá de la siguiente manera: el bulto se colocará horizontalmente y luego se insertará el muestreador diagonalmente de extremo a extremo. El muestreador puede ser la lanza abierta o la boquilla vertedora (Figura 2).

El número de sacos o núcleos a muestrear dependerá del tamaño del lote. Para lotes menores de 10 unidades deberán muestrearse todos los sacos; si el lote es mayor de 11 unidades,

tome 10 sacos al azar y obtenga una muestra núcleo de cada uno. Según Cooks y Van Rede (1976), se debe muestrear no menos del 2% de los sacos cuando se trata de lotes grandes.

FIGURA 1. MUESTREADORES PARA SOLIDOS.

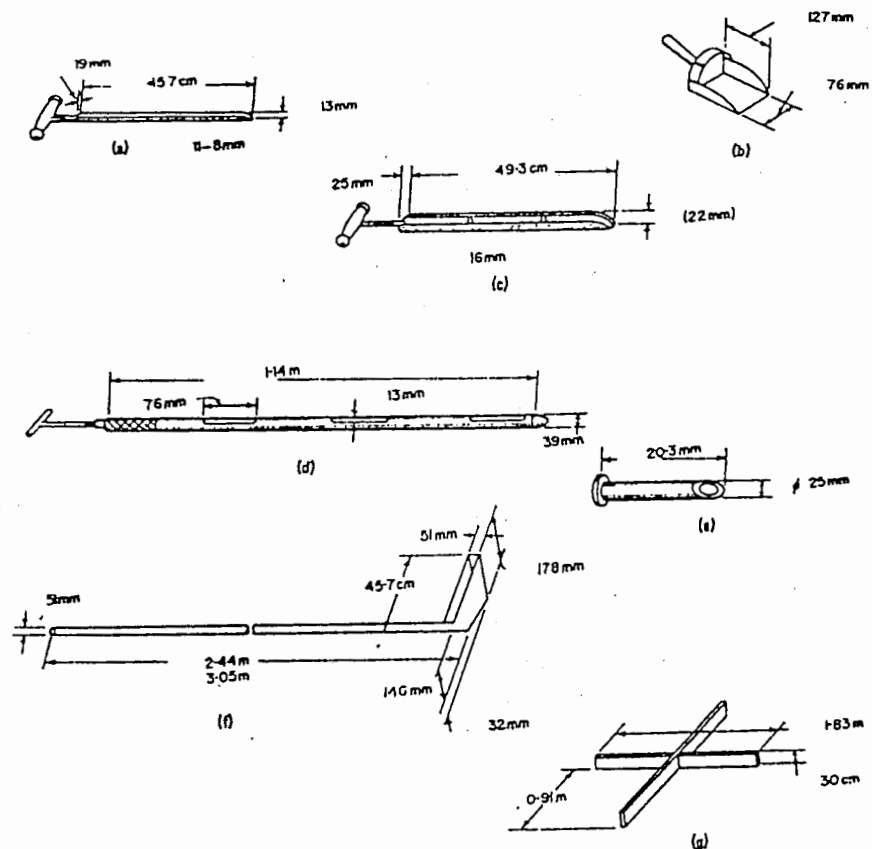
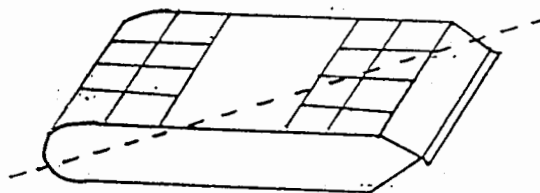
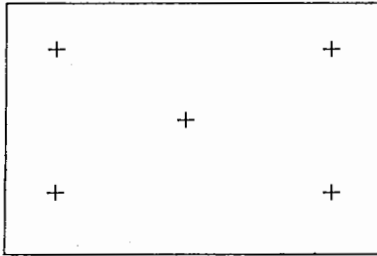


FIGURA 2. FORMA CORRECTA DE INSERTAR EL MUESTREADOR EN UN SACO.

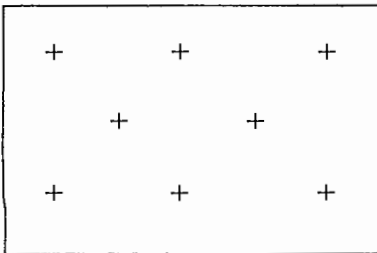


Si el producto a muestrear está a granel, ya sea en camiones, vagones de ferrocarril o en bodega, se utilizará un muestreador cilíndrico. Las muestras deben ser del mismo tamaño que las obtenidas de los sacos. Ver figura 3.

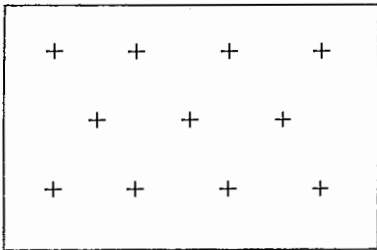
FIGURA 3. PUNTOS DE MUESTREO



Hasta 5 toneladas: 5 puntos de muestreo.



De 15 a 30 toneladas: 8 puntos de muestreo.



De 30 a 50 toneladas: 11 puntos de muestreo.

Otra forma de tomar muestras de los ingredientes a granel, es en el momento de cargar o descargar un lote, la operación se facilita, mucho ya que solo basta introducir un recipiente adecuado bajo la tolva de descarga a intervalos de tiempo, que serán proporcionales al volumen cargado o descargado.

Una vez obtenidos los núcleos que constituyen la muestra, ésta debe ser homogeneizada, ya sea en un recipiente o sobre un papel extendido; después, por medio de cuarteo, se reducirá hasta tener el tamaño adecuado para ser enviada al laboratorio.

La manipulación de la muestra debe ser lo mas rápido posible para evitar que pierda o absorba humedad, sobre todo en lugares con condiciones atmosféricas extremas. Las muestras deben ser guardadas en recipientes herméticos y etiquetadas debidamente.

La identificación de la muestra es muy importante. La etiqueta debe contener toda la información pertinente. Una forma práctica y segura de identificar la muestra, consiste en atar etiquetas impermeables marcadas con tinta indeleble; también hay que hacer uso de claves adecuadas, que quedarán asentadas en los archivos de quien envía las muestras al laboratorio.

Es importante que el recipiente en el cual se envía la muestra, aparte de ser hermético, sea resistente al manejo, ya que algunas veces se puede romper durante el envío; si se emplean bolsas de polietileno, deben cerrarse herméticamente; se pueden emplear recipientes de plástico o nalgeno con tapón de rosca, y bolsas de papel reforzadas.

Muestreo de Alimentos e Ingredientes Líquidos.

El muestreo de líquidos como melaza de caña, aceite, leche y aditivos líquidos adicionados a los ensilajes, es similar al de los ingredientes sólidos. Se empleando dispositivos especiales que tienen trampas para abrirse y llenarse a la profundidad deseada. La toma de muestras de líquidos almacenados en recipientes, además de hacerse en diferentes sitios, se hace a diferentes profundidades, o bien durante el llenado o vaciado de los tanques. Cuando se trata de materiales de elevada viscosidad, hay que calentar el recipiente para garantizar uniformidad en el muestreo.

Muestreo de Forrajes.

El muestreo de forrajes se divide en las siguientes partes:

- 1.- Forrajes frescos (pastos, herbáceas y arbustivas).
- 2.- Forrajes ensilados
- 3.- Forrajes henificados

El muestreo de forrajes en un potrero tiene que ser representativo de una gran extensión, por lo que al tomar muestras hay que abarcar la mayor área posible; este problema se reduce considerablemente cuando se trata de parcelas experimentales o de jardines de introducción.

Para tomar muestras correctamente de un forraje, es necesario conocer el objetivo de la investigación y los parámetros que se van a evaluar. En los forrajes son muchas las variables que influyen en su calidad: calidad genética, estado fenológico de la planta, tipo de suelo, condiciones atmosféricas y prácticas de manejo como sería fertilización, regadío, pastoreo, etc., entre otras. Por lo tanto, dependiendo del parámetro a medir, se definirá la forma de tomar muestras. En general es necesario indicar las condiciones de desarrollo del forraje para saber qué variables permanecen constantes y cuáles cambian. Así, el análisis efectuado pueda arrojar la mayor información posible. Cuando se toman muestras de un forraje, será ideal tener la siguiente información:

1.- MATERIAL DE QUE SE TRATA.

Nombre común o regional

Nombre científico: género, especie, variedad.

2.- ESTADO FENOLOGICO.

Estado o grado de madurez de la planta. Generalmente para clasificar el estado fenológico se recurre a la nomenclatura usada por el National Research Council (1962), que se describe a continuación:

NOMBRE	DEFINICION
Germinado	Crecimiento del embrión de la semilla después de un período de latencia.
Retoño u hoja temprana.	Estado en que la planta alcanza 1/3 de su crecimiento antes de florecer.
Inmadurez	Período entre 1/3 y 2/3 de su crecimiento antes de florecer.
Preflorecimiento	Estado en que la planta alcanza su crecimiento total antes de florecer.
Florecimiento temprano	Período cuando la planta empieza a florecer (10% de floración).
Florecimiento mediano	Período durante el cual 1/10 a 2/3 de las plantas están en flor.
Florecimiento pleno	Cuando 2/3 o más de las plantas están florecidas.
Florecimiento tardío	Cuando las flores se empiezan a secar y caer, las semillas empiezan a formarse.
Estado lechoso	Las semillas están bien formadas, pero suaves e inmaduras.
Estado masoso	Cuando las semillas tienen una consistencia dura, pero inmaduras.
Estado de madurez	Estado en el cual la planta sería cosechada para coleccionar la semilla.

Estado de sobre-madurez	Estado después de la maduración; las semillas están maduras y la planta empieza a ser deteriorada por el clima.
Latencia	Las plantas son curadas o curtidas en el tallo; las semillas han caído y el follaje ha sido atacado casi en su totalidad por los fenómenos meteorológicos.

3.- LUGAR Y FECHA DE RECOLECCION.

Estos datos son tomados con el objeto de conocer el sitio y época de desarrollo de la planta para que en el futuro se pueda correlacionar la calidad del forraje con el tipo de suelo y clima en que crece. Si se están comparando varios forrajes que crecen en un mismo sitio, es conveniente anotar el sitio en cuestión, la clasificación meteorológica y el tipo de suelo.

4.- CONDICIONES DE MANEJO DEL FORRAJE.

Dentro del area del manejo, las variables que más influyen son:

Fertilización. Tipo y calidad de fertilizante, frecuencia y método de aplicación, o bien, tiempo que ha transcurrido desde la aplicación hasta la recolección de la muestra.

Riego y otros manejos. Si es una pradera artificial, hay que especificar el tipo y frecuencia del riego, así como otros tratamientos que se le den al suelo.

Pastoreo. Especificar la carga animal, la frecuencia y tipo de rotación, etc.

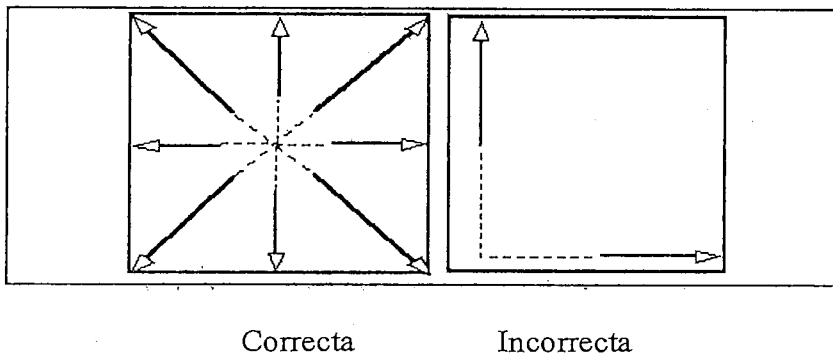
Otros factores de importancia agronómica. Prácticas como chapeo, fumigación, defoliación, control de malezas, quema, etc., definitivamente van a influir en la calidad de un forraje, pero no están dentro de los objetivos de este manual.

Muestreo de pastos.

El muestreo de pastos en un potrero dependerá de la extensión del mismo. Se deben recolectar pequeñas cantidades en diferentes zonas del terreno. Tratando de que los puntos de muestreo no queden alineados ni latitudinal ni longitudinalmente, ya que muchas veces la formación geológica o la morfología de un terreno sigue patrones de bandas y la composición del suelo o su declive influyen para que haya diferencias en el desarrollo del forraje. La manera ideal de muestrear un potrero es en forma radial: se parte primero del centro, el cual se puede marcar con un poste o mojonera. Luego se hacen las recolecciones radialmente, a distancias proporcionales a las dimensiones del potrero.

Si se desea conocer el rendimiento forrajero, es necesario medir el forraje de una determinada unidad de área. Generalmente se hace utilizando un marco cuadrado (hecho de metal o de madera) de un metro por lado, arrojándolo al azar en las direcciones radiales del potrero, como se ilustra en la figura 4. Se registra la cantidad de forraje que se obtiene de cada muestreo.

FIGURA 4. FORMA DE MUESTREAR UN POTRERO



De igual manera, cuando se desea hacer una zona de exclusión en el potrero para muestreos posteriores, se pueden colocar unas jaulas o corraletas de exclusión que van cerradas con red de alambre, o bien, se cerca la zona que se desea excluir. Para fines de alimentación sólo es necesario conocer la calidad del forraje, por lo que con sólo tomar una pequeña muestra de cada punto del potrero escogido, según el método descrito anteriormente, es suficiente.

Al coleccionar las plantas de pasto en cada punto hay que tomar uno o varios manojos de plantas, evitando seleccionarlas por tamaño u otras características. Las plantas seleccionadas al azar deben cortarse de preferencia como son arrancadas por el animal al pastorear. Aquí se presenta un problema ya que ciertos pastos, sobre todo los tropicales y otros amacollados como el guinea o el elefante, van lignificando la parte inferior al ir creciendo. Si en el manejo del potrero no se destruyen estas partes (quemándolas por ejemplo), en el centro de la macolla queda una parte verdaderamente dura que el animal jamás consume.

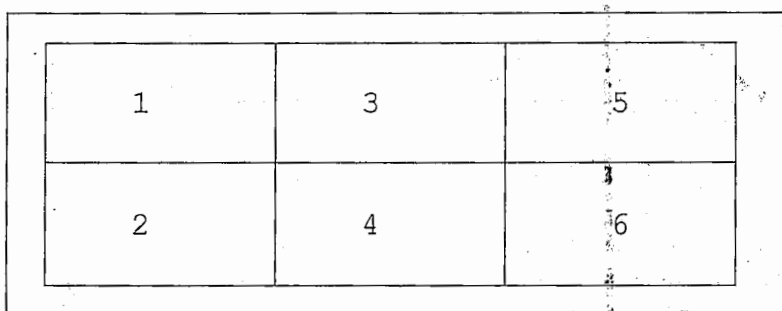
Desde el punto de vista de la alimentación animal, si se desea hacer un estudio de los nutrientes que ingiere el ganado, habrá que analizar solamente la parte que éste consume, o sea, la menos lignificada. Para estudios agronómicos o de composición forrajera en los que se desea cuantificar los nutrientes totales contenidos en la planta, habrá que incluir también en el muestreo la parte lignificada. Por regla general se acostumbra cortar un pasto a "5 cm" del suelo sin importar de que tipo de estudio se trate, a menos que el estudio determine de antemano la altura de corte.

Si se desea hacer un estudio a diferentes edades de la planta o diferentes estados fenológicos, hay que tener cuidado de no volver a cortar las mismas plantas de un muestreo

anterior, ya que no serían representativas. Generalmente un estudio de este tipo se efectúa siempre en parcelas de experimentación, por lo que una buena solución es cuadricular las parcelas, desechando las zonas perimetrales y muestreando sucesivamente diferentes cuadros, como se muestra a continuación:

En la figura 5 se ilustra como se dividiría una parcela en la que se van hacer seis recolecciones diferidas. Las primeras muestras se tomarán en el cuadro 1; después de dos semanas se tomarán muestras en el cuadro 2, y así sucesivamente, hasta completar el muestreo doce después el cuadro 6. La zona en blanco se descarta, por ser perimetral y rodeada de andadores; esta zona no es representativa.

FIGURA 5 MUESTREO SECUENCIAL DE UNA PARCELA



Dependiendo de la cantidad de muestra recolectada y del tipo de análisis que se vaya a efectuar, se hará la preparación de la misma. Si se obtuvieran varios kilos (k), conviene cuartear la muestra para reducir su tamaño. Esta operación hay que hacerla rápidamente, con el objeto de que la muestra no pierda humedad ni sufra deterioro.

Muestreo de hierbas y arbustos.

El muestreo de hierbas y arbustos es similar al de pastos en cuanto a selección de los puntos de recolección; se diferencia únicamente en lo relativo al corte de la muestra y preparación de la misma.

Cuando se trata de analizar una herbácea, leguminosa como alfalfa, siratro y otras similares, se cortarán a la misma altura que un pasto. En una planta arbustiva se cortan únicamente las partes suculentas, que son las que consume el ganado, o sea, las hojas con los tallos más tiernos como es el caso de la Leucaena, Gliricidia, etc. Tratándose de asociaciones de varias especies, como leguminosas con gramíneas, hay que cortar toda una área determinada (1 m² por ejemplo). Si se muestrea cortando manojos de material se puede cometer el error de seleccionar mayor cantidad de una que de otra y no en la proporción que realmente se encuentra en la pradera.

Muestreo de forrajes ensilados.

La obtención de una muestra representativa del contenido total de un silo es sumamente difícil, ya que durante el llenado del silo hay partes que se compactan mejor debido a mayor presión o mejor acomodo del material picado. Esto provoca que la fermentación sea diferente de una zona a otra y por lo tanto, su composición.

Si se desea muestrear el contenido total de un silo habrá que tomar las muestras utilizando sondas cilíndricas similares a las empleadas en el muestreo de suelos. Estas sondas están provistas de una broca o taladro, que horada la muestra al mismo tiempo que la arroja al exterior. Ese método tiene el inconveniente de que al perforar el centro del silo, entra aire que altera la fermentación, lo que puede dañar el ensilaje alrededor de la perforación. Una forma de minimizar el daño es rellenando el hueco con el material sobrante una vez que se ha tomado la muestra. Así se compacta de nuevo, quedando el faltante en la parte superior donde el daño será mínimo.

Si el muestreo se va haciendo conforme se va destapando el silo, habrá que tomar muestras de las diferentes capas, eliminando únicamente la superior. De cada capa se debe tomar parte del centro y parte de las zonas cercanas a las paredes.

Una vez tomada y homogeneizada, la muestra debe colocarse rápidamente en un recipiente cerrado, ya que los ensilajes contienen sustancias volátiles como alcoholes y ácidos grasos. La muestra debe compactarse lo más que se pueda para conservar las condiciones de anaerobiosis y evitar cambios en el patrón de fermentación y, por lo tanto, en su composición. Una forma práctica de lograrlo es utilizando bolsas de polietileno lo suficientemente gruesas para resistir la presión al compactar la muestra dentro de ellas.

Una vez empacadas las muestras de ensilaje, deben congelarse y permanecer en ese estado durante su transporte y hasta su análisis.

Muestreo de forrajes henificados.

El muestreo de forrajes henificados presenta el inconveniente de lo voluminoso y la poca densidad del material, pero tiene la ventaja de que las muestras no necesitan ningún tratamiento para su conservación.

HENOS EN PACAS. La forma de tomar muestras de henos empacados es similar a la utilizada para alimentos envasados en sacos. La única diferencia es que el probador tiene que ser especial para horadar la paca de forraje compactada, pero es exactamente igual en cuanto al número y selección de las pacas. Si las pacas están hacinadas a la intemperie, a la hora de tomar

muestras hay que descartar las paca exteriores. Para seleccionar las pacas al azar, se pueden numerar utilizando un sistema de tres dimensiones que sería: fila, hilera y altura; este sistema es práctico para cualquier material que esté almacenado en forma ordenada.

HENO HACINADO EN TROJES O A LA INTEMPERIE. Se toman muestras en varios puntos del almiar y a diferentes profundidades. Se tiene cuidado de no manipular mucho la muestra para evitar la caída de las hojas del material, que por estar deshidratadas son sumamente frágiles, sobre todo en henos de plantas de hoja ancha; en henos de gramíneas este problema es menor. Se debe descartar la capa superior o superficial del almiar.

Para los henos se deberá tomar una muestra mayor que en el caso de forrajes frescos, y no se cuarteará, sino que se molerá toda. Una vez molida, se homogeneiza; entonces, si se desea, se procederá a cuartear hasta tener una muestra de tamaño adecuado para su envío al laboratorio.

Muestreo de material biológico.

Para conocer los nutrientes que metaboliza el organismo hay que conocer los que ingiere, los que excreta y los que acumula. Para saber los que ingiere, basta con analizar los alimentos que consume el animal; para saber los que excreta generalmente basta con analizar las heces y la orina. Para conocer los nutrientes acumulados, se puede analizar el organismo entero o porciones de éste, a través de biopsias. Para este tipo de análisis se emplean muestras de sangre, suero, grasa o tejido que van desde pelo, huesos, músculos, hasta el animal entero.

Muestreo de heces y orina.

El objetivo de coleccionar heces y orina es para realizar estudios de digestibilidad, de balances de nitrógeno, de calidad de proteína, etc. Cada prueba tiene su metodología especial de la cual dependerá la forma de muestreo. No es la misma colección para digestibilidad utilizando marcadores que la colección total de los desechos.

La colección de orina se debe coleccionar diariamente a la misma hora durante todo el período de colección cuando se dispone de jaulas metabólicas. La orina coleccionada se mide y se toma una alícuota del 10% en volumen de la cantidad total. Como preservante a la alícuota se le agrega el 10% de su volumen, de una solución de HCl al 25%; existen otros preservantes como soluciones de HgCl_2 y $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, o de H_2SO_4 con tolueno, pero el HCl es mas eficiente y mas sencillo de preparar. Al hacer los cálculos del análisis, no hay que olvidar corregir en base al preservante agregado.

Cuando se conduce un experimento en el cual se recolectan todas las heces excretadas, ya sea con trampas en las jaulas metabólicas o arneses especiales, se debe hacer la colección diariamente y aproximadamente a la misma hora. Se deben pesar las heces y separar una parte (generalmente el 2 ó el 3% para bovinos y el 10% para ovinos), desechando el resto. Al final del período de recolección se mezclan las heces y se toma una parte (500 g aproximadamente) para su envío al laboratorio.

El uso de marcadores (Cr_2O_3 , Fe_2O_3 , etc.) y de indicadores (sílice, lignina, etc.) en las pruebas de digestibilidad tienen la ventaja de que no es necesario recolectar la totalidad de heces; sólo es suficiente una parte de lo excretado; sin embargo, hay algunas variantes en cuanto a la forma y período de colección.

Líquido ruminal.

El empleo de animales fistulados es recomendable cuando interesa hacer estudios intensivos que impliquen un muestreo frecuente del rumen. Tal es el caso de animales donadores de líquido para pruebas de digestibilidad *in vitro*. La colocación de la fistula se hace por medio quirúrgico. La especie animal donadora depende del objetivo del estudio o de la cantidad de líquido ruminal deseado. Si es un ovino, su capacidad ruminal no permite coleccionar cantidades grandes de líquido ruminal como un bovino por ejemplo. Para obtener líquido ruminal de un ovino fistulado, el tamaño de la cánula obliga a introducir una sonda a través del orificio. En el caso de un bovino con una fistula de un diámetro grande se puede fácilmente introducir con la mano un recipiente pequeño, y así tener todo el material que se necesite. Al destapar la fistula, siempre hay que quitar el material adherido a las paredes, sobre todo si el animal no ha sido alimentado con anterioridad a la toma de la muestra.

Muestreo de suelos.

Para analizar los minerales que ingieren los animales, se analizan directamente los forrajes y suplementos que consumen; sin embargo, para localizar ciertos problemas como serían las deficiencias o excesos de minerales, algunas veces hay que tomar muestras y analizar el suelo.

Para fines de nutrición, se pueden seleccionar los sitios de muestreo de la misma manera como se eligen los de forrajes. Se toman las muestras a una profundidad de 10 cm, utilizando un taladro para suelos o un muestreador cilíndrico. La muestra compuesta debe ser mezclada perfectamente deshaciendo los terrones. El tamaño de muestra que se envía al laboratorio es de aproximadamente 500 g. En el siguiente cuadro se presentan en forma condensada los tamaños de muestras para ser enviadas al laboratorio.

TAMAÑO DE MUESTRA Y TIPO DE ENVASE PARA MUESTRAS.^{1/}

TIPO DE ALIMENTO	TAMAÑO DE LA MUESTRA (g)	TIPO DE ENVASE
Alimentos balanceados, suplementos y alimentos sólidos.	100 - 250 g	Frascos de vidrio, plástico o nalgeno con tapa de rosca. Bolsas de polietileno cerradas herméticamente ¹
Alimentos líquidos.	250 - 500 ml	Frascos de vidrio, plástico o nalgeno con tapón de rosca ¹ .
Forrajes frescos, pastos, herbáceas y arbustivos.	150 - 250 g en base seca ó 500 - 1000 g en base húmeda	Bolsa de papel grueso o tela. Cuando se deshidrata, usar bolsa de polietileno o frasco de vidrio plástico o polietileno con tapón de rosca ¹ .
Forrajes henificados.	150 - 250 g	Frasco de vidrio, plástico o nalgeno con tapa de rosca. Bolsas de polietileno.
Forrajes ensilados.	500 - 1000 g en base húmeda.	Frascos de vidrio, plástico o nalgene con tapa de rosca. Bolsas dobles de polietileno grueso.
Líquido ruminal.	300 - 600 ml para ovinos, 600 - 3000 ml para bovinos.	Frascos de vidrio con tapa de rosca o tapa de hule bien asegurada.
Orina.	50 - 75 ml	Frasco de vidrio con tapa de rosca.
Heces de bovino, ovino, cerdo o ave.	150 - 250 g en base seca.	Frascos de vidrio, plástico o nalgeno con tapa de rosca . Bolsas de polietileno.

¹Cuando se van a determinar minerales es preferible usar nalgeno.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA EL ANALISIS

El tratamiento que se da a las muestras después del muestreo es tan importante como el muestreo mismo, pues si la muestra no es tratada en forma adecuada los resultados de análisis no van a ser válidos. Por ejemplo, si se va a analizar un ensilaje y se pretende cuantificar los ácidos grasos volátiles, la muestra debe conservarse congelada para evitar volatilizaciones. El uso de un frasco o una bolsa sucia o mal cerrada puede provocar un error importante en el análisis. Una muestra mal conservada no tendrá la misma composición que la que ha sido apropiadamente tratada para mantenerse inalterada hasta el análisis.

Deshidratación.

En términos generales el mejor método de conservación es la deshidratación. El agua contenida en el alimento no contribuye a su valor nutritivo y lo hace susceptible a fenómenos de descomposición por bacterias, hongos y enzimas tisulares. No siempre es posible deshidratar sin que la muestra sufra alteraciones.

Se usa el término "**DESHIDRATAcion**" cuando se elimina la humedad por medios artificiales y "**SECADO**" cuando se realiza al sol o a temperatura ambiente. El secado por baja temperatura y baja presión (LEOFILIZACION) o por extracción por solventes, son métodos que requieren equipos más especializados y generalmente tienen un costo mas alto. Cada uno tiene sus ventajas y desventajas, la selección del método dependerá no solo de las facilidades de que se disponga, sino del tipo de que se trate y del análisis que se realizará.

La temperatura elevada durante la deshidratación altera la proteína del alimento, disminuyendo su digestibilidad (Porter y Rolls, 1972) y la disponibilidad de los aminoácidos, debido a la formación de compuestos insolubles entre los aminoácidos y los azúcares por reacciones de Maillard, lo que disminuye su valor nutritivo. El contenido de algunas vitaminas como la B₁, A, D y C se disminuye. Se observan cambios en el olor y el color, registrándose obscurecimiento. En muestras con elevados contenidos de grasa es frecuente que se presente cierto tipo de enranciamiento. En forrajes se ha observado que la temperatura altera el nitrógeno insoluble en ácido detergente, por la formación de compuestos semejantes a la lignina (Van Soest, 1965).

En el secado al sol y a temperatura ambiente, la muestra se seca más lentamente y por lo tanto, sufre menos alteraciones debidas al calor. Sin embargo, dependiendo del tipo de producto de que se trate, puede haber desarrollado bacterias y hongos que lo dañarán. Tal es el caso de los tubérculos de yuca, que se ahongan cuando el secado no es rápido.

El secado a baja temperatura y baja presión (LEOFILIZACION) es probablemente el que menos daño causa a la muestra, aunque no siempre es posible aplicarlo por el tipo de equipo que

se requiere. Las características de este tipo de deshidratación son las siguientes:

- 1.- Es adecuada para todo tipo de alimento.
- 2.- El secado se realiza a temperatura y presión baja (menos de 4 mm de Hg).
- 3.- Es adecuada para deshidratar carne.
- 4.- El tiempo de secado es entre 12 y 24 horas.
- 5.- El agua se elimina por sublimación.
- 6.- El olor y color permanecen normales.
- 7.- Su costo es cinco a seis veces superior al de los métodos de deshidratación que aplican calor.

En el secado por solventes, la principal desventaja es que el producto empleado va a arrastrar no solo el agua, sino también otros compuestos solubles en él.

Refrigeración o congelación.

La refrigeración o congelación de las muestras hasta el análisis, son procedimientos aplicados con frecuencia para la conservación de las muestras. En el caso de la refrigeración, la temperatura (1-5°C) puede no ser lo suficientemente baja para prevenir deterioro por enzimas, bacterias y hongos; por lo tanto, su almacenaje deberá ser por períodos de tiempo cortos. La congelación que generalmente se realiza a (-10°C) sí permite la conservación de las muestras por períodos de tiempo mas largos, aunque no todas las muestras la resisten sin alterarse. La congelación de las muestras deberá realizarse rápidamente para que no haya cambios en la composición de los nutrimentos. Si la congelación se realiza lentamente se observan fenómenos de proteólisis y enranciamiento de grasas. Así mismo, hay pérdidas de vitaminas. Cuando la muestra va a ser conservada por congelación durante un tiempo largo, la temperatura de congelación deberá estar entre -20 y -30°C.

Efecto de la temperatura sobre la composición química de la muestra.

El efecto de la temperatura de secado de forraje sobre la digestibilidad de la proteína ha sido estudiado por Duckworth y Woodham, 1961. Ellos encontraron que temperaturas de 100°C disminuía la digestibilidad de la proteína, debido a formación de complejos no digeribles.

Van Soest (1965) encontró que la exposición de muestras de alimentos a altas temperaturas causaba un incremento en el contenido de la lignina soluble en H_2SO_4 . Georing *et al.* (1972) compararon la digestibilidad *in vitro* de forrajes y ensilajes sobrecalentados, con algunas constantes químicas como PAREDES CELULARES, FIBRA ACIDO DETERGENTE (FAD), LIGNINA EN H_2SO_4 y NITROGENO en el residuo de la FAD. Encontraron que el nitrógeno insoluble en FAD y el nitrógeno insoluble en pepsina eran muy afectados por el sobrecalentamiento. Georing *et al.* (1973) midieron como indicador del daño térmico, el nitrógeno ligado a la FND-N encontrando que el secado por arriba de los $60^\circ C$ por mas de 24 horas, ya había daño térmico, el daño es mayor cuando la humedad del forraje varía de 20 a 70%. En base a esos estudios y nuestra experiencia en el manejo de muestras, la temperatura óptima de secado para forrajes es de 58 a $60^\circ C$ por 48 a 72 horas.

Uso de preservadores químicos.

La conservación de las muestras con productos químicos es un procedimiento que se utiliza con cierta frecuencia en el laboratorio. El Comité de Aditivos de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) definen a los aditivos como "sustancias sin valor nutritivo, adicionadas a los alimentos para mejorar su apariencia, sabor, olor, textura y resistencia al almacenaje". Esta definición no considera aquellas sustancias adicionadas con valor nutritivo, como son las vitaminas y minerales.

Para la conservación de los alimentos que van a ser analizados pueden utilizarse los preservadores aceptados para alimentos y algunos otros que no lo son, siempre y cuando no afecten el análisis que se va a realizar. Los preservadores para la conservación de muestras de alimentos para animales pueden clasificarse en ácidos minerales y orgánicos, así como en sales y compuestos orgánicos diferentes.

Las concentraciones que se aplican en el caso de los aditivos permitidos son:

- 1.- Ácidos minerales: HCl , HNO_3 , H_3PO_4 y H_2SO_4 .
Solución al 5%. Agregar en la proporción de 1:10 la solución ácida a la muestra.
- 2.- Ácidos orgánicos: Ácido benzoico, ácido sórbico, ácido caprílico, ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico. (Solución al 0.1%).
- 3.- Sales derivadas de ácidos: Propionato de calcio y sodio, sorbatos de calcio y sodio, benzoato de sodio, bisulfito y metabisulfito de sodio. Estas sales generalmente se usan al 0.1%.
- 4.- Antioxidantes: Hidroxianisol butilado (BHA). Entre 0.01 y 0.02%. Hidroxitolueno butilado (BHT) no más de 0.01% de la grasa contenida.

- 5.- Dióxido de azufre o sulfito: de 200 a 300 partes por millón (ppm). El SO₂ no debe usarse en muestras en las que se va a determinar vitamina B₂ (tiamina), porque la destruye.
- 6.- Tocoferol no mas de 0.3% de la grasa.

Hay que tener presente que para la conservación correcta de las muestras, éstas deberán colocarse en el envase apropiado para el tipo de muestra, el análisis que se va a realizar, el tiempo que se va a conservar y el medio de transporte que se va a emplear. Los envases usados con mayor frecuencia son los frascos de vidrio, plástico o nalgeno con tapones de corcho, látex, plástico o baquelita a presión o de rosca, bolsas de papel o polietileno.

IDENTIFICACION DE MUESTRAS.

La identificación apropiada de las muestras es un factor muy importante para los resultados del análisis. La identificación debe ser clara y precisa y contener todos los datos que ayuden a su clasificación. Debe estar visible y escrita de manera legible sobre un material que sea resistente a la humedad. Hay que utilizar tintas indelebles, no solubles en agua para que no se borren durante el manejo y/o almacenaje. Los datos que se anoten deben incluir:

- 1.- Nombre de la muestra o claves de identificación.
- 2.- Nombre del responsable de la muestra.
- 3.- Procedencia.
- 4.- Determinaciones solicitadas.
- 5.- Fecha de la toma de muestra.

TECNICAS DE MUESTREO Y ENVIO DE MUESTRAS.

El envío de la muestra debe realizarse también de manera que la muestra llegue en perfecta condición al laboratorio. Este envío puede hacerse utilizando diferentes medios de transporte, por lo que el método de conservación y el envase deberán ser congruentes entre sí.

Preparación y envío de alimentos balanceados, suplementos e ingredientes alimenticios sólidos.

Tratándose de sólidos con menos del 10% de humedad, pueden envasarse en frascos de boca ancha de cualquier material, con un tapón apropiado. Es preferible que sea de rosca porque

es más seguro. Los frascos deben estar bien limpios y secos.

Cuando van a realizarse análisis de minerales es mejor que el envase sea de nalgeno. Pueden utilizarse también bolsas de polietileno limpias y bien cerradas. De ser posible use dos bolsas, cerrando cada una por separado.

Dado que la muestra es muy estable en las condiciones en las que está, no es necesario aplicar otro método de conservación. En el caso de que el contenido de agua sea mayor a 10% podría ser útil la deshidratación en estufa (60°C/8 horas) o secada al sol.

Para concentrados líquidos, ya que se trata de productos con alto contenido de agua, el envasado deberá hacerse en frascos con tapón de baquelita de rosca y la tapa interior apropiada para que no se deshaga con la muestra. El método de conservación en términos generales puede ser congelación, refrigeración, deshidratación o con preservadores.

Preparación y envío de forrajes.

El contenido de agua de los forrajes frescos permite que se sigan llevando a cabo procesos enzimáticos que deterioran la muestra, por lo que si es posible, hay que deshidratarlos en estufa de aire forzado (60°C/72 horas) o secarlos al sol. Cuando la muestra va a ser enviada al laboratorio y no se puede secar antes del envío, colóquela en bolsas de papel grueso o de tela bien cerradas para impedir que se salga la muestra. Si se desea conocer el contenido de agua del material fresco, se puede pesar la bolsa y el contenido al momento de enviarla. Luego se hace llegar este dato para que en el laboratorio se acabe de deshidratar y se pueda calcular la humedad de la muestra fresca. De otra manera, en el laboratorio únicamente se podrá determinar la humedad de la muestra recibida.

Nunca envíe al laboratorio muestras de forraje fresco en bolsas de polietileno ni en frascos, ya que se deteriorarán. No olvide anotar el dato de humedad cuando seque la muestra.

Cuando se trate de forrajes henificados con un contenido de humedad menor de 10%, podrán envasarse en frascos o bolsas de polietileno.

Los ensilajes deben ponerse en dos o tres bolsas juntas de polietileno grueso, bien cerradas o en frascos limpios, bien tapados con tapones de rosca. Deben congelarse inmediatamente después que se tomó la muestra. Hay que recordar que al congelar la muestra, ésta aumentará de volumen, por lo que se debe dejar el espacio apropiado. Al enviarse las muestras de ensilaje, deberán mantenerse congeladas hasta su arribo al laboratorio.

Preparación y envío de material biológico.

El análisis de orina de animales es frecuentemente realizado en el laboratorio de nutrición, por lo que la muestra deberá conservarse apropiadamente. Cuando el análisis que se va a realizar en la orina es de nitrógeno, la muestra puede conservarse acidificándola o agregándole

preservador, refrigerándola o congelándola hasta que el análisis se realice. La muestra se coloca en un frasco limpio con tapón de rosca. Agregue por litro de orina 5 ml de cualquiera de los siguientes reactivos: HCl al 50%, H₂SO₄ al 10%; o solución que contiene 17.5 g de K₂Cr₂O₇, 6.25 g de HgCl y agua para 100 ml.

La muestra de orina se conserva bien almacenada en refrigeración por varios días; si se desea almacenar por más tiempo es preferible congelarla. No olvide indicar al laboratorio la cantidad de preservador empleado.

En cuanto a las heces, dependiendo del tipo de análisis que se va a realizar, la muestra puede deshidratarse en estufa a 60°C/48 horas, liofilizarse o acidificarse con H₂SO₄. El método más común es la deshidratación. Las muestras deshidratadas deben conservarse en frascos bien tapados o en bolsas de polietileno bien cerradas, a temperatura ambiente. Cuando no se puede deshidratar la muestra de heces, hay que congelarlas entre -10 a -15°C para su almacenamiento.

Bibliografía

- Blaedel, W.J. and V.W. Meloche. 1966. Elementary quantitative analysis theory and practice. (2ndEd). Harper and Row, New York, U.S.A.
- Cooks, L.V. and Van Rede. 1976. Laboratory handbook for oil and fat analysis. (3rdEd). Academic Press, London and New York.
- Duckworth, J. and A.A. Woodham. 1961. Leaf protein concentrates effect of source of raw material and method of drying on protein value for chicks and rats. J. Sci. Fd. Agric., 12:5.
- Goering, H.K., C.H. Gordon, R.W. Hemken, D.R. Waldo, P.J. Van Soest and L.W. Smith. 1972. Analytical estimates of nitrogen digestibility in heat damaged forages. J. Dairy Sci., 55(9):1275.
- Georing, H.K., P.J. Van Soest and R.W. Hemken. 1973. Relative susceptibility of forages to heat damage as affected by moisture, temperature and pH. J. Dairy Sci., 56(1):137.
- N.R.C. 1962. Basic problems and techniques in range research. A reporter of a Joint Comittes of the American Society of Range Management and the Agricultural Board, National Academy of Sciences. National Research Council, Washington, D.C. Publication No. 890.
- Porter, J.W.G. and B.A. Rolls. 1973. Proteins in human nutrition. Academic Press, New York. U.S.A.
- Van Soest P.J. 1965. Use of detergens in the analysis of fibrous feeds. IV Determination of plan cell wall constituents. J. Ass. Off. Agr. Chem. 48:785.

ANALISIS PROXIMO

El análisis de los alimentos ha sido practicado por el hombre desde tiempos inmemoriales, los que podrían llamarse análisis organolépticos. Posteriormente los hebreos, cristianos y mahometanos introdujeron reglas con respecto al consumo de ciertos alimentos, basados principalmente en la experimentación con ellos (Jacobs, 1965).

El análisis cuantitativo de los componentes de un alimento, sin embargo, probablemente se inició hasta 1775, en Inglaterra, cuando Pearson determinó las proporciones de agua, almidón, materia fibrosa, materia extractiva y cenizas en las papas. Reconoció también la presencia de grasas, ácidos y azúcares. Entre 1840 y 1865 diferentes investigadores iniciaron los primeros estudios sistemáticos de alimentos para humanos y animales por métodos más o menos similares a los empleados actualmente (Pearson, 1970).

Un gran avance tuvo lugar en 1859-1861. Henneberg y sus colaboradores en la estación agrícola de Weende, Alemania, elaboraron los métodos para el análisis próximo o proximal de un alimento. Un análisis próximo se distingue de un último en que no determina un elemento o compuesto particular, sino que es una estimación de un cierto tipo de componentes "materia volátil" "humedad" "cenizas", materia nitrogenada, etc. (Jacobs, 1965).

Podría definirse el análisis próximo como un "esquema de análisis químico mediante el cual se determina la composición de un alimento en término de sus principales grupos de nutrientes". En otras palabras, evalúa la calidad de un alimento en función de grupos de compuestos con características fisico-químicas semejantes, pero con diferente valor nutritivo.

A pesar de las limitaciones que tiene el análisis proximal, éste ha sido por más de un siglo el punto de partida en la evaluación de un alimento, y aunque los métodos de análisis hayan cambiado, el fundamento permanece intacto. El análisis próximo consta de las siguientes determinaciones: humedad, proteína cruda, materia mineral o cenizas; grasa cruda o extracto etéreo, fibra cruda y por diferencia a 100, extracto libre de nitrógeno.

En la aplicación de los métodos para el análisis próximo debe tenerse cuidado en seguir el método lo más fielmente que se pueda a lo sugerido, ya que algunos de ellos, como la fibra cruda, son empíricos y cualquier cambio en la concentración de los reactivos o en el tiempo de digestión, va a alterar los resultados. Un incremento en la temperatura de ignición de la muestra para la determinación de cenizas o material mineral (se sugiere 550-600°C) puede provocar volatilizaciones de sales minerales y dar resultados erróneos.

¡PARA HACER CAMBIOS O MODIFICACIONES EN LOS MÉTODOS, ESTOS DEBEN SER RACIONALES Y TOMAR EN CUENTA EL EFECTO DE TAL MODIFICACION!

Humedad

El agua es un nutriente esencial que el animal necesita en cantidades relativamente grandes. Sin embargo, el agua no contribuye al valor nutritivo de un alimento, excepto en condiciones especiales de aridez. Por el contrario, diluye el contenido de nutrientes sólidos y los hace más susceptibles de sufrir fenómenos de descomposición por enzimas tisulares, bacterianas o de hongos.

Proteína cruda

Dado que el elemento característico de las proteínas es el nitrógeno, los métodos de cuantificación de proteínas se basan esencialmente en la determinación del contenido de nitrógeno, suponiendo que todo el nitrógeno está en forma de proteína. Cuando la muestra contiene nitrógeno de otras fuentes como urea, frecuentemente adicionada en raciones para rumiantes, o aminos y amidas provenientes de la descomposición de proteína, el método de Kjeldahl sobreestimaré el contenido de proteína.

Extracto etéreo o grasa

Los aceites y grasas presentes en la muestra seca se extraen para cuantificarse con un disolvente orgánico, éter etílico o de petróleo. Por este método se extraen también otras sustancias solubles en estos disolventes como ceras y pigmentos. En el caso de forrajes verdes ricos en clorofila y pigmentos, el método descrito sobreestima el contenido de grasa.

Material mineral

Es el residuo de la calcinación de la muestra, o sea, la eliminación de la materia orgánica. Nutricionalmente esta fracción es demasiado cruda y carece de importancia, ya que no indica qué minerales la componen y en qué proporción se encuentran. Sin embargo, es el punto de partida en la determinación de minerales específicos y además es necesaria para el cálculo de la materia orgánica de un alimento.

Fibra cruda

Es una mezcla heterogénea de glúcidos (celulosa y hemicelulosa) y otros materiales como lignina, esencialmente indigeribles por animales de estómago simple. Los métodos de análisis establecidos sugieren un doble digestión, con ácido sulfúrico e hidróxido de sodio, sin embargo se ha probado que la combinación de las dos digestiones disuelve hasta el 80% de la hemicelulosa, del 20-50% de la celulosa y del 50-90% de la lignina presente en la muestra, lo que subestima el contenido de la fibra cruda (Adenskög, 1977).

Extracto libre de nitrógeno

Este valor se estima por diferencia restando de 100 los porcentajes de humedad, proteína cruda, extracto etéreo, fibra cruda y materia mineral. Está constituido por almidones, azúcares solubles, pectinas, ácidos orgánicos, mucilagos y también incluye cantidades variables de celulosa y lignina. Esta forma de calcular los glúcidos aprovechables, como puede apreciarse, es sumamente deficiente ya que adiciona las deficiencias de los otros métodos de análisis, como demostraron Henneberg y Stohman (1869). Ellos revelaron que únicamente del 39 al 67% del extracto libre de nitrógeno era digerido o no recobrado, mientras Maynard (1940) apunta que ningún grupo de nutrientes que comprende hasta el 80% de los nutrientes totales en alimentos para animales debe ser determinado por diferencia.

En la figura 6 se presenta un esquema del diagrama de flujo del ANALISIS PROXIMAL. Los métodos que se describen a continuación son los "Oficiales" sugeridos por el A.O.A.C. para el análisis, con algunas modificaciones.

La forma de recolección de los resultados del análisis es diferente en cada laboratorio. Se puede usar una hoja de registro para cada muestra que al mismo tiempo, que sirve para anotar los datos durante el análisis, también se usa para llevar un archivo de resultados. Un ejemplo de una hoja de trabajo para el análisis, donde se tiene el registro de la muestra y al mismo tiempo de anotan los datos durante la ejecución del análisis y los resultados del mismo, se presenta en la figura 7.

FIGURA 6. ESQUEMA DE FLUJO DEL ANALISIS PROXIMO O PROXIMAL.

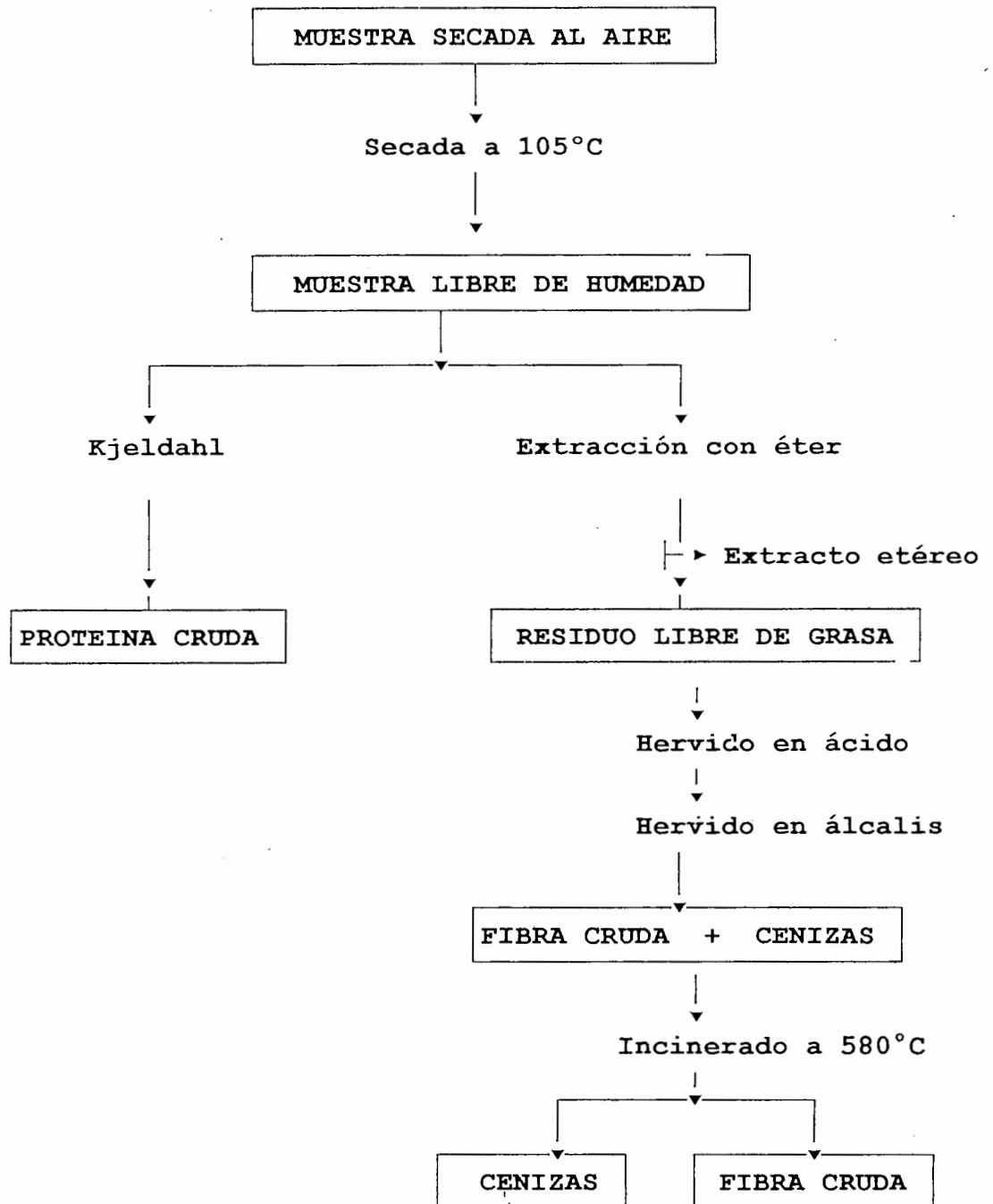


FIGURA 7. HOJAS DE REGISTRO DE ANALISIS

Muestra #	Seca ()	Origen
	Húmeda ()	
Nombre:		
Entregado por:		Tipo de análisis:
Solicitado por:		Fecha:
Analista responsable:		

DETERMINACIONES:

		Rept.1	Rept.2
Humedad	No. de crisol		
	Peso de crisol		
Base húmeda*	Peso de crisol + muestra		
	Peso de crisol + muestra seca		
	Humedad, %		
Proteína	No. del papel		
	Peso del papel		
Base seca	Peso del papel+muestra seca		
Base húmeda	ml de HCl		
	Normalidad del ácido		
	Proteína, %		
Cenizas	No. del crisol		
	Peso del crisol		
Base seca	Peso del crisol+muestra		
Base húmeda	Peso del crisol+cenizas		
	Cenizas, %		
Grasa cruda	No. del papel		
	Peso del papel		
Base seca	Peso del papel+muestra		
Base húmeda	Peso de vaso		
	Peso de vaso+grasa		
	Grasa, %		
Fibra cruda	No. del crisol		
Base seca	Peso de crisol+muestra seca		
Base húmeda	Peso del crisol+cenizas		
	Fibra cruda, %		
E.L.N.			
Base seca			
Base húmeda			

* Base húmeda o tal como recibida.

Bibliografía

- Adenskog, G. 1977. Which methods of fibre analysis "in Focus". June Tecator - Hoganas, Sweden.
- A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, (15th Ed.). Arlington, U.S.A.
- Bateman, J.V. 1970. Nutrición animal. Manual de métodos analíticos. Herrera Hnos. Sucesores, S.A., México.
- Herrera, R.S. 1980. Una modificación de la técnica para la determinación de fibra cruda en pastos, Rev. Cubana Ciec. Agric., 14:61.
- Jacobs, M.B. 1965. The chemical analysis of food and food products, (3th Ed.), D. Van Nostrand Company, Toronto, Canada.
- Maynard, L.A. 1940. Nitrogen-free extract in animal nutrition. J. Ass. Offic. Agr. Chem., 23:156.
- Pearson, D. 1970. The chemical analysis of foods. Chemical Publishing Company Inc., New York
- Van Es, A.J.H. and J.M. Van der Meer. 1980. Methods of analysis for predicting the energy and protein value of feeds for farm animals. European Association for Animal Production. Munich, Federal Republic of Germany.

DETERMINACION DE AGUA O HUMEDAD

A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th Ed.), Arlington, U.S.A.

Estos métodos determinan el agua contenida en los alimentos.

Método 1:

Seque en cápsulas de aluminio aproximadamente 2 g de muestras (hasta un peso constante) a 95-100°C en un horno, cuya presión interior no exceda de 100 mm Hg. La operación requiere unas 5 horas. Considere como humedad la pérdida de peso. El material seco puede utilizarse para la determinación de grasa cruda. Para alimentos ricos en melaza, la presión interior del horno no debe ser superior a 70 mm.

Método 2:

Es similar al método 1, pero es calentado a 100-105°C en horno a presión atmosférica durante 18 horas. El residuo también puede usarse para la determinación de grasa cruda.

Método 3:

Es similar al método 2, pero es calentado a 135°C ± 2°C, durante exactamente 2 horas. El material seco no debe usarse para la determinación de grasa cruda.

Nota:

La Asociación Europea para Producción Animal (Van Es-Van der Meer, 1980) sugiere que el contenido de agua de alimentos secos al aire se realice por secado en estufa a 103 ± 1°C durante 4 horas, y que aquellas muestras ricas en azúcares o grasas deben secarse al vacío a 80 ± 2°C durante 4 horas. En ambos casos podría ser necesario prolongar el tiempo de secado por una hora más, para asegurar que el secado fue completo.

¡ Evite errores, no sobrecargue la estufa de secado !.

Para la determinación de humedad, también se usan otros métodos como los siguientes:

- 1.- Destilación volumétrica usando TOLUENO.
- 2.- Método electrónico usando CONDUCTIVIDAD.

Cálculos para determinar el porcentaje de humedad por dos métodos.

Método A:

$$\frac{\begin{array}{r} \text{Crisol +} \\ \text{Muestra} \\ \text{Húmeda} \end{array} - \begin{array}{r} \text{Crisol +} \\ \text{Muestra} \\ \text{Seca} \end{array}}{\text{Peso de Muestra Húmeda}} \times 100 = \% \text{ Humedad.}$$

Método B:

$$\frac{\begin{array}{r} \text{Crisol +} \\ \text{Muestra} \\ \text{Seca} \end{array} - \begin{array}{r} \text{Crisol} \\ \text{Vacío} \end{array}}{\text{Peso de Muestra Húmeda}} \times 100 = \% \text{ Materia Seca.}$$

$$100 - \% \text{ de Materia Seca} = \% \text{ Humedad.}$$

$$100 - \% \text{ de Humedad} = \% \text{ de Materia Seca (MS)}$$

DETERMINACION DE HUMEDAD APARENTE

Para forrajes frescos, ensilajes, heces y alimentos con más de 10% de humedad se deben seguir los siguientes pasos:

- 1.- En bandejas de aluminio o en bolsas de papel o tela, coloque la muestra pesada después de haber tarado el recipiente.
- 2.- Coloque las muestras al horno a una temperatura NO MAYOR DE 60°C por aproximadamente 48 a 72 horas.
- 3.- Permita que la muestra, al salir del horno, entre en equilibrio con la humedad ambiente por unas 4 - 6 horas. Pésela, calcule la **HUMEDAD PARCIAL** y registre este dato (ES MUY IMPORTANTE).
- 4.- Muela la muestra en un molino de cuchillas o de martillos provisto de una zaranda de 20 Mesh, colóquela en una bolsa de polietileno, regístrela e identifíquela con su respectivo número. Las muestras de concentrados, pastos, ensilajes y heces así obtenidas, se conocerán de aquí en adelante como "**MUESTRA HUMEDA**".

FORMAS DE EXPRESAR EL CONTENIDO DE MATERIA SECA DE LOS ALIMENTOS

La composición de los alimentos puede estar expresada en una o más de las tres formas de materia seca.

- 1.- **COMO ALIMENTO.** También llamado como "BASE FRESCA". El contenido de materia seca de diferentes alimentos puede oscilar de 0 a 100%.
- 2.- **SECADO AL AIRE.** Puede ser la base actual o un "CONTENIDO ASUMIDO DE MATERIA SECA" como es el 90%. Esta base se usa para comparar la composición de alimentos que tienen diferentes contenidos de humedad. Muchos alimentos, pero no todos, son usados en un estado de "SECADO AL AIRE".
- 3.- **SECADO AL HORNO.** Se basa en el estado de 100% (MS) o sea, libre de humedad. También se emplea para comparar alimentos a diferente contenido de humedad.

Las diferentes bases se ilustran a continuación:

	Como alimento	Secado al aire	Secado al horno
% de agua	% variable	10%	0%
% proteína cruda. % extracto etéreo. % fibra cruda % E. libre de nitrógeno. % de cenizas.	Los datos siempre se dan como: materia seca. Esto es: 100 - % de agua	90%	100%

Los componente de un alimento expresados en una base pueden ser convertidos a otra, mediante el empleo de una simple relación:

$$\frac{\% \text{ de un componente de un alimento en una base}}{\% \text{ de MS del alimento sobre la misma base}} = \frac{\% \text{ del componente en el alimento en otra base}}{\% \text{ de MS del alimento en otra base}}$$

por ejemplo:

Si el alimento contiene 4% de proteína cruda en base fresca (75 % de agua), el porcentaje de proteína cruda sobre la base secado al aire (90%), se calcula de la siguiente forma:

$$100\% - 75\% = 25\% \text{ de MS en base fresca.}$$

$$\frac{4}{25} = \frac{X}{90}$$

$$25X = 360$$

$$X = 14.4 \quad (\% \text{ de proteína cruda del alimento sobre la base secado al aire}).$$

La determinación de la materia seca no siempre es tan fácil, ya que la mayoría de los tejidos vegetales frescos contienen algunos compuestos volátiles. Algunas plantas contienen grandes cantidades de aceites indispensables, terpenos, etc., que pueden perderse durante el secado, y por consiguiente, proporcionar una respuesta errónea con los procedimientos usuales. Los ensilajes y otros productos fermentados pueden contener grandes cantidades de compuestos que se evaporan fácilmente, como ácidos grasos volátiles (acético, propiónico, butírico) y amoníaco. Además, algunos azúcares se descomponen y muchas proteínas se pueden volver parcialmente insolubles. La temperatura de secado no debe exceder de 60°C.

DETERMINACION DE MATERIA INORGANICA (CENIZAS) Y MATERIA ORGANICA

A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th Ed.) Arlington, U.S.A.

Este método cuantifica la materia inorgánica total de los alimentos.

- 1.- Pese aproximadamente 2 g de muestra en un crisol de porcelana y calcine durante 3 horas en mufla precalentada a 550-600 °C.
- 2.- Enfríe el crisol en un desecador y pese rápidamente calculando el porcentaje de cenizas hasta la primera cifra decimal.

Nota:

La Asociación Europea para Producción Animal (Van Es Van-der Meer, 1980) sugiere que la calcinación se realice a 550°C por 3 horas, aumentando una hora más si no se han eliminado todas las partículas de carbón.

Evite sobrecargar la mufla y no la abra durante las 3 horas de ignición de la muestra, para evitar pérdidas de la misma.

Cálculos

$$\frac{\text{Peso del Crisol + Cenizas} - \text{Peso del Crisol vacío}}{\text{Peso Muestra (en gramos)}} \times 100 = \% \text{ de Cenizas}$$

Peso Muestra (en gramos)

$$\text{Materia Orgánica de la muestra húmeda} = 100 - \% \text{ de Cenizas}$$

$$\text{Materia Orgánica en base Materia Seca} = 100 - \frac{\% \text{ de Cenizas}}{\% \text{ de MS de la muestra}}$$

DETERMINACION DE PROTEINA CRUDA

Método de Kjeldahl

A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th Ed.) Arlington, U.S.A.

Este método determina el nitrógeno total en forma de amonio de los alimentos, sin diferenciar si proviene de proteínas, aminoácidos, aminos, amidas, glucósidos nitrogenados, glucolípidos, vitaminas del complejo "B" y ácidos nucleicos. En las condiciones en que se realiza la prueba no determina el contenido de nitrógeno en forma de nitratos o nitritos.

Reactivos

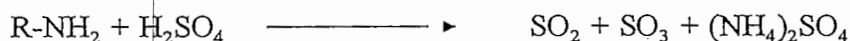
- 1.- Acido sulfúrico concentrado (93-95 %), Q.P.
- 2.- Catalizador; mezcla de K_2SO_4 o Na_2SO_4 anhidro con $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ en proporción 9:1.
- 3.- Solución de hidróxido de sodio aproximadamente al 40% (4.0 kg NaOH en 10 litros de H_2O). La densidad de la solución debe ser de 1.36.
- 4.- Zinc en gránulos o piedritas de cuarzo.
- 5.- Solución de ácido bórico al 4% (40 g de H_3BO_3 en un litro de H_2O).
- 6.- Solución 0.1 N de HCl o H_2SO_4 , titulada con Na_2CO_3 , anhidro, usando naranja de metilo como indicador.
- 7.- Solución indicadora de rojo de metilo-verde de bromocresol. Mezcle 1 parte de una solución alcohólica de rojo de metilo al 0.2% con 5 partes de una solución alcohólica de verde de bromocresol al 0.2%.

Digestión

- 1.- Pese exactamente 1.0 a 2.0 g de muestra sobre una hoja de papel filtro, doble cuidadosamente el papel e introduzca el conjunto en un matraz Kjeldahl de 500 u 800 ml.
- 2.- Añada, aproximadamente, 6 g de catalizador.
- 3.- Añada 20 ml de H_2SO_4 concentrado.

- 4.- Lleve el matraz de Kjeldahl al digestor, y caliente primeramente a temperatura moderada hasta que la formación de espuma cese y después a modo de mantener una ebullición activa hasta que la solución se clarifique. Continuar por 15-20 minutos más, después de alcanzar éste punto.
- 5.- Dejar enfriar el matraz de Kjeldahl. Puede suspenderse en este punto, dejado los matraces debidamente tapados con tapón de hule.

Reacciones químicas:



Destilación

- 1.- Coloque 50 ml de solución de ácido bórico en un matraz Erlenmeyer de boca ancha de 500 ml marcado a 225 ml. Asegúrese de que la punta del condensador se encuentre bajo la superficie del líquido en el Erlenmeyer.
- 2.- Introduzca unas 8 o 10 piedritas de cuarzo al matraz Kjeldahl.
- 3.- Adicione 300 ml de agua destilada al matraz de Kjeldahl.
- 4.- Sosteniendo el matraz Kjeldahl en posición inclinada, añada cuidadosamente una mezcla de 100 ml de solución de NaOH al 40%, a modo que resbale por las paredes y se formen dos capas.
- 5.- Conecte inmediatamente el matraz de Kjeldahl al destilador, y mezcle su contenido mediante agitación rotatoria caliente hasta que todo el NH_3 haya sido destilado (200 ml de destilado son generalmente suficientes).
- 6.- Baje el matraz Erlenmeyer de manera que el extremo del condensador quede fuera de la solución de ácido bórico y apague el sistema de calentamiento. Enjuague con agua destilada la punta del condensador.
- 7.- Haga una prueba en blanco con todos los reactivos y el papel, pero sin muestra por lo menos una vez al día y cuando se cambien reactivos.

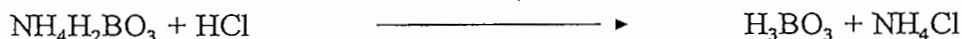
Reacciones químicas.



Titulación

- 1.- Titule con la solución 0.1 N de ácido clorhídrico o sulfúrico, el contenido del matraz Erlenmeyer, hasta el cambio de color del indicador.
- 2.- Substraiga de esta cifra el volumen de ácido estándar necesario para neutralizar el NH_3 producido por una determinación en "blanco", en la cual se usan todos los reactivos en igual cantidad y como muestra una hoja del mismo papel filtro.

Reacciones químicas.



Cálculos

$$\% \text{ N} = \frac{\text{ml ácido} \times \text{N del ácido} \times \text{Meq}_N(0.014) \times 100}{\text{peso de la muestra (en gramos)}}$$

$$\text{Proteína cruda} = \% \text{ N} \times 6.25$$

Proteína cruda en base Materia Seca:

$$\frac{\% \text{ de proteína cruda de la muestra secada al aire}}{\% \text{ de Materia Seca de la muestra secada al aire}}$$

Notas:

- 1.- La cantidad de H_2SO_4 necesaria para obtener una digestión completa de la muestra es variable y depende de la composición de la misma. Un gramo de grasa consume 12 ml y un gramo de carbohidratos 6 ml de H_2SO_4 durante la digestión.
- 2.- Para análisis de nitrógeno en orina: Tome alícuotas de 5 - 25 ml de orina. Agregue 2 ml de H_2SO_4 concentrado y evapore hasta que quede una cuarta parte de la solución. Agregue 18 ml más ácido y el catalizador. Siga la prueba como ya se indicó. No olvide, al hacer los cálculos, tener en cuenta la dilución que sufrió la muestra por la adición de los preservantes.
- 3.- La Asociación Europea de Producción Animal (1980) sugiere como catalizador el sulfato de cobre. Sostienen que el Hg y Se son muy contaminantes.

- 4.- Si se quiere determinar también nitrógeno de nitratos, deberá adicionarse un reductor durante la digestión como tiosulfato de sodio o polvo de cinc. Consulte la técnica específica.
- 5.- Cuando se usa ácido bórico durante la destilación, hay que titular los matraces inmediatamente, ya que a temperaturas superiores a 25°C suele haber pérdidas de nitrógeno.

DETERMINACION DE EXTRACTO ETereo O GRASA CRUDA

A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th Ed.) Arlington, U.S.A.

Reactivos

Eter etílico anhidro, éter de petróleo o hexano.

Procedimiento

- 1.- Extraiga en un aparato soxhlet o goldfisch aproximadamente un gramo de muestra "Secada al aire", con 30 ml de éter etílico anhidro, en un dedal de papel filtro que permita el paso rápido del disolvente.
- 2.- El tiempo de extracción puede variar desde 4 horas a velocidad de condensación de 5 a 6 gotas por segundo, hasta 16 horas, 2 a 3 gotas por segundo.
- 3.- El método del A.O.A.C. recomienda extraer por 6 horas a una velocidad de 3 a 4 gotas por segundo.
- 4.- Recupere el éter y evapore el éter residual sobre baño maría en un lugar bien ventilado; seque el vaso con todo y el residuo a 100 - 105°C durante 6 horas, enfríe y pese.

Notas:

- 1.- Grandes cantidades de componentes solubles en agua como carbohidratos, urea, ácido láctico, glicerina y otros pueden interferir con la extracción de grasa; si ése es el caso, extraiga 2 g de muestra sobre un papel filtro en un embudo con cinco porciones de 20 ml de agua antes de secar la muestra para determinar el extracto etéreo.
- 2.- Si va a determinar la grasa a heces o dietas que contienen sales de Ca o Mg probablemente haya formación de jabones, los cuales no son solubles en los mismos solventes. En tal caso, es necesario hacer una hidrólisis ácida de la muestra antes de la extracción. Debido a que la hidrólisis ácida extrae también fosfolípidos, glucolípidos y lipoproteínas, se podría hacer una primera extracción, hidrolizar y volver a extraer.
- 3.- Muestras ricas en grasa en ocasiones requieren una extracción antes de secado y una segunda extracción después.

- 4.- La Asociación Europea de Producción Animal (Van Es y Van-der Meer, 1980) sugiere el uso de éter de petróleo o de hexano, arguyendo que el éter etílico extrae otras sustancias aparte de la grasa como azúcares y pigmentos. Además, lo recomienda por razones de seguridad, ya que el punto de ebullición del éter etílico es 35°C y el del éter de petróleo y hexano es de 55 a 65°C, aunque para realizar la extracción con estos solventes se requiere mayor temperatura.

Cálculos

$$\% \text{ de Extracto etéreo} = \frac{(\text{vaso} + \text{grasa} - \text{vaso vacío}) \times 100}{\text{peso de muestra en (g)}}$$

$$\% \text{ de Extracto etéreo en base M.S.} = \frac{\% \text{ de Extracto etéreo en la muestra secada al aire}}{\% \text{ de Materia Seca de la muestra secada al aire}}$$

DETERMINACION DE FIBRA CRUDA

A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th Ed.) Arlington, U.S.A.

Este método cuantifica las sustancias resistentes a la digestión ácida y alcalina de la muestra.

Reactivos

- 1.- Solución 0.255 N de H_2SO_4 (1.25 g de H_2SO_4 /100 ml de agua).
- 2.- Solución 0.313 N de NaOH (1.25 g de NaOH/100 ml de agua libre de carbonatos).
- 3.- Alcohol metílico o etílico.

Digestión ácida

- 1.- Pese alrededor de un gramo de muestra, extraigala con éter etílico y transfírela a un vaso de precipitado de 600 ml. Si la muestra original contiene menos de 1% de grasa, la extracción se puede omitir.
- 2.- Añada, 200 ml de solución sulfúrica hirviente. Coloque inmediatamente el vaso en el digestor precalentado y hierva exactamente por 30 minutos.
- 3.- Filtre el contenido del vaso a través de un embudo que tenga tela de algodón resistente y lave con cuatro porciones de agua hirviente de 50 ml, cada uno, hasta que se neutralice el pH ácido (use papel tornasol azul). El filtrado también puede realizarse sobre embudos tipo Buchner cubiertos con un círculo de tela de alambre de malla del No. 200. Los embudos tipo Oklahoma (Labconco Corp.) o California (Nalge Co.) son adecuados.

Digestión alcalina

- 4.- Transfiera el residuo de la filtración anterior al mismo vaso de precipitado. Añada 200 ml de solución de NaOH hirviente y hervi exactamente por 30 minutos.
- 5.- Filtre el contenido del vaso como quedó indicado en el inciso (3) de la digestión ácida, lavando con una porción de 25 ml de solución sulfúrica caliente, seguida de porciones de 50 ml c/u de agua hirviente hasta neutralizar el pH alcalino (use papel tornasol rojo) y finalmente, con 25 ml de alcohol. En este paso se puede filtrar sobre papel filtro, libre de cenizas de retentividad media.

Secado y calcinación

- 6.- Seque el crisol con su contenido a 100 - 105°C durante 12 horas, enfríe en desecador y pese.
- 7.- Calcine a 580°C por 3 horas, enfríe en desecador y pese nuevamente.

Cálculos

$$\% \text{ de fibra cruda} = \frac{(\text{crisol} + \text{residuo seco}) - (\text{crisol} + \text{cenizas}) \times 100}{\text{peso de muestra (g)}}$$

Nota:

- 1.- En la literatura existen trabajos en los que se han hecho modificaciones al método de fibra cruda como son el método de Herrera (1980), que utiliza soluciones más concentradas pero con menor tiempo de digestión. El analista debe decidir el método que seguirá, y siempre debe informar el tipo de modificaciones.

EXTRACTO LIBRE DE NITROGENO (ELN)

$$\% \text{ ELN} = 100 - (\% \text{ H} + \% \text{ M.M.} + \% \text{ P.C.} + \% \text{ E.E.} + \% \text{ F.C.})$$

$$\% \text{ H} = \% \text{ Humedad}$$

$$\% \text{ M.M.} = \% \text{ Material mineral o cenizas}$$

$$\% \text{ P.C.} = \% \text{ Proteína cruda}$$

$$\% \text{ E.E.} = \% \text{ Extracto etéreo}$$

$$\% \text{ F.C.} = \% \text{ Fibra cruda}$$

DETERMINACION DE LA ENERGIA GRUESA O BRUTA

ASTM. 1974. Standards for bomb calorimetry and combustion methods. American Society for Testing and Materials. Philadelphia, Pa., U.S.A.

Con este método se determina el calor de combustión total de alimentos. La combustión se realiza bajo una atmósfera rica en oxígeno. El calor producido se mide como la diferencia en la temperatura antes y después de realizar la combustión.

Aparatos y Reactivos

- 1.- Calorímetro con bomba de oxígeno, tipo adiabático (Calorimeter Oxygen Bomb, Adiabatic type, automatic temperature control with Double Valve Bomb Parr Serial 1241, Parr Instrument Co. o equivalente).
- 2.- Calentador de agua para el calorímetro (Parr Serial 1541 - Parr Instrument Co. o equivalente).
- 3.- Prensa para pastillado (Parr Serial 2811 - Parr Instrument Co. o equivalente).
- 4.- Un tanque de oxígeno.
- 5.- Carbonato de sodio 0.072N (disuelva 3.84 de Na_2CO_3 , previamente deshidratado a $100^\circ\text{C}/2$ hrs., en un litro de agua recientemente hervida y fría).
- 6.- Solución indicadora de naranja de metilo o rojo de metilo, al 0.1% en agua.
- 7.- Acido benzoico RA, estándar para calorimetría.
- 8.- Alambre de fusión de cromo-níquel (Parr 145C10 o equivalente).

Preparación de la muestra

Muela la muestra en un molino de cuchillas con criba de 1 mm. El tamaño de la muestra debe ser tal que no contenga más de 7,000 calorías. Generalmente la muestra es de más o menos un gramo.

Haga una pastilla del alimento o de las heces y colóquela en una de las cápsulas del aparato pesadas previamente; pese la pastilla. Maneje siempre la cápsula con pinzas, nunca con las manos.

Ponga la cápsula dentro de la bomba sobre el soporte y coloque un ml de agua en el fondo de la bomba. Instale el alambre de fusión en posición correcta en los electrodos. Cierre la bomba y pásele de 25 a 35 atmósferas de oxígeno. Sitúe la bomba dentro de la cubeta que contendrá exactamente $2 \text{ kg} \pm 0.5 \text{ g}$ de agua (pese la cubeta y agrégue 2 kg de agua destilada). Ubique la cubeta en su posición en el baño de agua. Encienda el aparato para que trabajen los agitadores. Ajuste la temperatura del baño a la de la cubeta que contiene la bomba, por comparación de los termómetros respectivos. Si el calorímetro es de tipo automático, el ajuste se hace con facilidad, ya que está controlado eléctricamente.

Una vez establecida la temperatura $\pm 0.01^\circ\text{C}$ en la cubeta y en el baño, accione el mecanismo de ignición por lo menos durante 4 minutos. La combustión de la muestra provocará un aumento en la temperatura del agua de la cubeta que contiene la bomba, aproximadamente 20 segundos después de la ignición. El incremento en la temperatura será rápido al principio y más lento a medida que se empieza a estabilizar. Si se usa el calorímetro automático, el incremento en la temperatura de la cubeta es compensado inmediatamente por mecanismos eléctricos. Si el calorímetro es manual, el operador debe aumentar la temperatura del baño para igualar los termómetros. Los termómetros deben ser ajustados para evitar en lo posible errores por separación de las columnas de mercurio (el aparato automático tiene un vibrador para bajar las columnas). Después de que la temperatura de la cubeta se ha estabilizado por lo menos durante 2 minutos, lea y registre la temperatura final a un décimo de la división más pequeña en que estén graduados los termómetros (T_f).

El método en estas condiciones se reduce a los siguientes pasos:

- 1.- Acople el calorímetro y encienda el aparato para que empiecen a trabajar los agitadores de la cubeta y del baño. Ajustar la temperatura del baño a la del agua de la cubeta.
- 2.- Si el calorímetro es automático, permita que el aparato haga el ajuste fino de la temperatura. Ponga el marcador de tiempo tan pronto como se igualen los termómetros.
- 3.- A los 4 minutos, baje la columna de mercurio de los termómetros con el vibrador, registre la temperatura de la cubeta (t_i) y accione la unidad de ignición para iniciar la combustión de la muestra.
- 4.- A los 13 minutos (exactamente 9 minutos después de iniciar la ignición), ponga otra vez el vibrador a los termómetros y tome la lectura final de la temperatura (T_f). No es necesario esperar más tiempo.
- 5.- Purgue el baño de agua, abra el calorímetro, saque la cubeta, abra la bomba y realice las determinaciones para efectuar las correcciones correspondientes.

La energía bruta de una muestra es igual a la cantidad de calor liberado cuando la muestra se quema completamente en la presencia de oxígeno. En estas condiciones, el nitrógeno y el azufre son liberados como óxidos gaseosos. Bajo las condiciones que se emplean en el

calorímetro, la oxidación continúa y forma productos muy oxidados que son disueltos en el agua que existe en la bomba. Por lo tanto, es necesario hacer una corrección para las diferencias entre los calores de formación en ambos casos y para el calor de la solución (Bateman, 1970).

- 1.- Titulación del ácido. Lave con un chorro de agua destilada el interior de la bomba y la cápsula que contenía la muestra. Recoja en un vaso de precipitado de 250 ml los líquidos de lavado y agreguele unas gotas de indicador de naranjado o rojo de metilo. Titule con la solución de carbonato de sodio 0.0725N.
- 2.- Meda el alambre de fusión que no se quemó y que debe estar aún unido a los electrodos de la cápsula de la muestra. Registre los centímetros de alambre residual. Esta corrección se puede evitar si se usa alambre de platino para fusión.
- 3.- Corregir por azufre. Si el contenido de azufre de la muestra es superior a 0.1%, hay que determinarlo gravimétrica, volumétrica o nefelométricamente.

Estandarización del calorímetro

El calorímetro se estandariza con ácido benzoico (el cual es proporcionado con el aparato) o con 2,2,4 trimetilpentano (isooctano). El ácido benzoico para estandarizar calorímetros generalmente se adquiere en forma de tabletas, porque son más fáciles de manejar y se queman más lentamente que el polvo, con lo que se reducen los errores de combustión incompleta.

El término estandarización se usa aquí para conocer la respuesta del calorímetro con una muestra conocida, de la cual puede ser determinado el equivalente en energía o la capacidad de calor efectivo del sistema. El equivalente en energía (W) del calorímetro es la energía necesaria para incrementar la temperatura un grado expresado como calorías, bien sea por grado Celsius o por grado Fahrenheit.

Para estandarizar el aparato se sigue un procedimiento semejante al descrito para la prueba. Use una tableta de ácido benzoico, la cual debe pesar no menos de 0.9 g y no más de 1.25 g. Siga el procedimiento descrito para la muestra, registrando la temperatura inicial, temperatura final, los mililitros de Na_2CO_3 empleados en la titulación y los cm del alambre residual.

Calcule el equivalente en energía siguiendo la fórmula:

$$W = \frac{Hm + e^1 + e^2}{t}$$

W = Equivalente energía del calorímetro en calorías por grado centígrado o calorías por grado Fahrenheit.

H = Calor de combustión de la muestra de ácido benzoico en calorías por gramo. Generalmente es considerado como 6 318 Cal/g.

m = gramos de ácido benzoico usados en la prueba.

t = Diferencia en grados centígrados o fahrenheit entre la temperatura final e inicial.

e¹ = Corrección por calor de formación de ácido nítrico en calorías. Para Na₂CO₃ 0.0725N es generalmente considerado como 1 cal/ml.

e² = Corrección por calor de combustión del alambre de fusión en calorías: El alambre de cromo-níquel es equivalente a 2.3 cal/cm.

Cálculos del calor de combustión de la muestra

Los siguientes datos deben obtenerse para el cálculo:

Ti = Temperatura inicial de la cubeta corregida de acuerdo al factor de corrección de los termómetros (éste dato es proporcionado por el fabricante con cada termómetro).

Tf = Temperatura máxima, corregida de acuerdo al factor de corrección alcanzada después de iniciar la ignición.

C1 = Equivalente en calorías por formación de HNO₃ (ml de Na₂CO₃ 0.072 N = una cal.)

C2 = Equivalente en calorías por formación de H₂SO₄ (14 x % de azufre en la muestra x gramo de muestra).

C3 = Equivalente en calorías por el calor de combustión del alambre de fusión usado (centímetro de alambre consumido = 2.3 cal si se usó el alambre de cromo-níquel. Si se usó alambre de platino muy fino, la corrección es cero calorías.

W = Equivalente en energía del calorímetro en calorías por grado centígrado o fahrenheit.

m = Peso de la muestra en gramos.

$$H = \frac{Tf - Ti}{m}$$

H = Calor de combustión de la muestra.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE TRIPSINA

AOCS. 1980. Official and tentative methods of the American Oil Chemists Society, Champaign III, USA.

Este método determina los inhibidores de tripsina total y residual en harina de soya, aislados de proteína de soya, harina de soya integral y mezcla de maíz-soya.

Reactivos

- 1.- Solución amortiguadora tris (0.05M, pH 8.2) CaCl_2 (0.02 M). Disuelva 6.05 g de tris (hidroximetilamino metano) y 2.94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 900 ml de agua. Ajuste el pH a 8.2 y afora a 1,000 ml con agua destilada. (Sigma Chem. Co. # T-1378). Caliente a 37°C antes de usarlo.
- 2.- Disuelva 40 mg de benzoil-DL Arginina-P-nitroanilida clorhidrato (BAPA) en un mililitro de dimetil sulfóxido y diluya a 100 ml con el amortiguador de tris, prepárelo diariamente y manténgalo a 37°C para usarse (Sigma Chem. B-4875).
- 3.- Disuelva 4 mg de tripsina (cristalizada 2 x, libre de sales), en 200 ml de HCl 0.001 N. Esta solución puede guardarse en el refrigerador 2-3 semanas sin pérdida apreciable de actividad. (Sigma Chem. Co. # T-8253).
- 4.- Solución de ácido acético. Mezcle 30 ml de ácido acético glacial y 70 ml de agua.
- 5.- Solución de hidróxido de sodio 0.01 N.

Preparación de la muestra

Evite exponer la muestra a temperaturas superiores a 40°C . Muela la muestra tan fino como sea posible. Muestras con mas de 2% de grasa deben desengrasarse con éter de petróleo o hexano y elimine el disolvente a temperatura ambiente.

Procedimiento

Pese 1.0 g de muestra molida (a través de una criba de 1 mm) en un matraz de 120 ml con una barra magnética para agitación. Agregue 50 ml de NaOH 0.01N. Lentamente agite durante 3 horas a temperatura ambiente. Compruebe que el pH de la suspensión esté entre 8.4 y 10.0 (si el pH es inferior a 8.4 utilice una solución de NaOH más concentrada). Tome un ml

de la suspensión con una pipeta serológica y diluya con agua destilada de manera que la D.O. de un ml de la muestra sea entre 0.4 y 0.6 veces la D.O. (absorción) con "0" ml para reducir la desviación estándar relativa. Cuando no es posible estimar las UIT (Unidades Inhibidoras de Tripsina) deben de hacerse más de una dilución.

El factor de dilución es el volumen final dividido entre la alícuota tomada.

Prepare dos series de tubos tomando con pipeta 0.0, 0.6, 1.0, 1.4, y 1.8 ml de la suspensión diluida de la muestra; agregue agua suficiente para hacer 2 ml y mezcle bien. Adicione 2 ml de la solución de tripsina a cada tubo, mezclando bien con un agitador Vortex. Coloque los tubos en el baño de agua a 37°C. Prepare un marcador de intervalos de tiempo para 10 minutos. Observe la misma secuencia para empezar y parar la reacción a cada tubo. Agregue 5 ml de la solución BAPA, precalentada a 37°C. Mezcle en el Vortex, regrese al baño y pare la reacción a los 10 minutos exactamente, adicionando en la misma secuencia de intervalos 1 ml de la solución de ácido acético al 30% y mezcle en el Vortex. Prepare un blanco pipeteando 2 ml de la suspensión diluida en un tubo de ensaye, agregue 5 ml de la solución de BAPA y mezcle en el Vortex. Póngalo en el baño de agua por 10 minutos. Agregue un ml de la solución de ácido acético y mezcle en el Vortex. Agregue 2 ml de la solución de tripsina y mezcle. Filtre el contenido de cada tubo a través de papel filtro de alta retención (Whatmann No.3) y mida la densidad óptica a 410 nm.

Cálculos

La actividad inhibidora de tripsina se mide en unidades inhibidoras de tripsina por miligramos de muestra. Una unidad inhibidora de tripsina (UIT) se define como un incremento de 0.01 unidades de absorción a 410 nm de una mezcla de reacción de 10 ml medida en las condiciones aplicadas aquí. A la lectura (D.O) del tubo "0" se le resta la lectura obtenida en cada una de las diluciones y se divide entre el peso de la muestra para esa dilución.

$$\text{UIT/ml} = \frac{(\text{D.O. del tubo "0"}) - (\text{D.O. del tubo x del análisis}) 100}{\text{ml de la muestra diluida del tubo (x)}}$$

Calcule las UIT/ml para cada análisis. Compare estos resultados contra los ml del tubo (x) si hay una interrelación lineal extrapolar a "0" ml para obtener las UIT/ml finales. Si no es así, use el promedio de las UIT/ml obtenidas.

$$\text{UIT/g} = \text{UIT/ml} \times \text{factor de dilución} \times 50$$

NOTA: Una unidad de tripsina se define arbitrariamente como un incremento de 0.01 en la absorción (D.O.) a 410 nm por 10 ml de la mezcla bajo las condiciones usadas aquí.

PROTEINA DIGESTIBLE EN PEPSINA

A.O.A.C. 1984. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. (14th Ed.). Arlington, U.S.A.

El método es aplicable a harinas de carne, pescado, pluma, sangre y otros productos de origen animal y mide los productos resistentes a la digestión con pepsina. De la diferencia entre la proteína total y la proteína indigestible obtenemos la proteína digestible en pepsina.

Reactivos

- 1.- Solución de pepsina 0.2%. Disuelva pepsina (NF 1:10.000) en ácido clorhídrico 0.075 N (6.1 ml/lit de agua, en suficiente cantidad para las muestras por analizar). Prepare únicamente la solución que se va a usar ese día.
- 2.- Solución de pepsina al 0.0002% preparada como la anterior.

Procedimiento

Pese 1.000 g de muestra molida y desengrasada (extraída con éter en un Soxhlet o en el aparato Goldfisch durante 2 horas) en un frasco de polietileno de 200 ml con tapa de rosca. Agregue 150 ml de la solución de pepsina seleccionada, precalentada a 42-45°C. Tape los frascos y colóquelos en el agitador incubando a 45°C en posición vertical y agite durante 16 horas.

Al cabo del tiempo de agitación, filtre a través de un papel filtro del No. 1 (se puede usar algún ayuda filtro como celite o tierra de diatomeas), y lave tres veces con agua caliente. Transfiera el papel conteniendo el residuo húmedo a un matraz de Kjeldahl y determine el nitrógeno en la forma usual. Realice un blanco con papel filtro.

Cálculos

Calcule la proteína indigestible en pepsina y réstela a la proteína cruda total para obtener la proteína digestible en pepsina 0.2% ó 0.0002%.

Nota:

Para harinas de pescado, la digestibilidad en pepsina 0.2% debe ser de 70-90% de la proteína cruda total, y la digestibilidad en pepsina 0.0002% debe ser superior al 30%. Se sugiere que se determine la digestibilidad en las dos soluciones, ya que se ha observado que hay cierto error al hacerlo únicamente con la 0.2%

La AOAC sugiere un aparato para agitación por inversión de los frascos (D.E. Sims, 716 Forrest Ave. Quincy IL 62301). El agitador se mete a un horno para incubar las muestras. Una alternativa que se usa en el laboratorio es un baño maría con agitación. Se colocan los frascos con las muestras horizontalmente y se permite que los frascos rueden. De esta manera no se quedan partículas sólidas adheridas a las paredes del frasco, como sería si se colocaran los frascos verticalmente.

PROTEINA SOLUBLE

A.O.A.C. 1984. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, (14th Ed.). Arlington, U.S.A.

Este método es aplicable para suplementos proteicos para rumiantes. Se ha utilizado el contenido de proteína soluble como una medida de la asimilación del nitrógeno proteico por el animal. Si la proteína es muy soluble es degradada en el rumen y no es aprovechada por el animal directamente.

Reactivos

SOLUCION DE SALIVA ARTIFICIAL

Agua	2.00 lt
NaHCO ₃	19.60 g
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	14.00 g
KCl	1.14 g
NaCl	0.95 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.24 g
Urea	1.82 g
Glucosa	1.83 g

Procedimiento

Pese 5g de muestra molida en un matraz que contenga 50ml de la solución de saliva precalentada a 39-40°C. Incube por 4 horas con agitaciones esporádicas a esa misma temperatura. Filtre a través de un papel filtro Whatman No. 43. Lave el residuo con 20 ml de la solución de saliva y afore a 100 ml con saliva. Determine el nitrógeno por el método de Kjeldahl a una alícuota del filtrado y a la muestra original.

Cálculos

$$\% \text{ de proteína soluble} = \frac{\text{Proteína soluble} \times 100 \times \text{FD}}{\text{Proteína total}}$$

FD = Factor de dilución.

UREASA ACTIVIDAD UREASICA

Aguilera A.A. 1975. Studies on chickens seed raw and autoclaved soybean oil meal, as the sole source of protein: a comparative study on the metionine and protein requirements, limiting aminoacids, and factor influencing the nutritive properties of soybean oil meal. Thesis Ph.D., University of Illinois, Urbana Ill, U.S.A.

Objetivo

Determinar la actividad de la ureasa contenida en la pasta de soya empleada en la elaboración de alimentos balanceados.

Muestreo

La muestra deberá ser representativa. Para cada caso debe consultarse el rubro correspondiente.

Definiciones

Ureasa. Es una enzima que cataliza la hidrólisis de urea a amonio y CO_2 .

Material

Vaso de precipitado de una capacidad de 250 ml

pH-metro

Pipeta graduada de 5 ml

Baño de agua a una temperatura de 27°C

Bureta de 25 ml de capacidad

Solución de HCl 0.1N

Solución de urea (1 g en 5 ml de H_2O)

Procedimiento

Se pesa un gramo de soya y se coloca en un vaso de 250 ml, se adicionan 94 ml de agua destilada, se agita 15 minutos y se determina el pH. Se adicionan 5 ml de la solución de urea^{1/} y el vaso se coloca en el baño de agua a 27°C durante 30 minutos exactamente. Se agita ocasionalmente y se titula con el HCl hasta regresar al pH original.

Informe

El informe deberá indicar los ml de HCl gastados en un gramo de soya.

Cálculos

El criterio que se sigue en este ensayo es el siguiente:

ml de HCl 0.1 N	CALIDAD
0 - 5	Muy buena
5 - 10	Buena
10 - 15	Regular ^{2/}
15 o más	Mala

^{1/} Cuando se van a ensayar dos o más muestras, la solución de urea debe agregarse a intervalos de 5 minutos para cada problema, en tal forma que quede tiempo suficiente para titular cada muestra.

^{2/} Esta soya puede usarse en la elaboración de alimentos para aves y cerdos, suplementada con metionina; nunca se usa para ganado que incluya urea en la dieta.

DETERMINACION DE CALCIO

A.O.A.C. 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, (13th ed.). Washington D.C., U.S.A.

Este método determina el calcio de rocas fosfóricas, harina de hueso, carbonato de calcio, etc.

Reactivos

- 1.- Acido nítrico concentrado
- 2.- Acido sulfúrico concentrado
- 3.- Solución de HCl en agua (1 + 3)
- 4.- Solución de NH_4 en agua (1 + 1)
- 5.- Solución diluída de NH_4OH en agua (1 + 50)
- 6.- Solución acuosa de oxalato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, al 4.2%
- 7.- Solución 0.05 o 0.10 N de KMnO_4
- 8.- Indicador de rojo de metilo al 0.5% en etanol

Preparación de la muestra

Pese con exactitud aproximadamente 2.5 g de muestra en crisol de porcelana o sílice y calcine a 600°C durante 2 horas (el residuo de la determinación de cenizas puede usarse). Añada 40 ml HCl (1 + 3) y unas gotas de HNO_3 , caliente a ebullición, transfiera a matraz volumétrico de 100 ml, enfríe, afore con agua y mezcle.

Determinación

- 1.- Transfiera 50 ml de la solución de la muestra a un vaso de precipitado de 250 ml. Añadir 2 gotas de rojo de metilo y NH_4OH (1 + 1) gota por gota hasta alcanzar un pH de 5.6, que es indicado por un color café-naranja. Añada entonces 2 ó 3 gotas de HCl (1 + 3) a modo de que el indicador cambie al rosa (pH 2.5 - 3.0).

- 2.- Diluya aproximadamente a 150 ml, caliente a ebullición y añada lentamente y con agitación constante 10 ml de solución de oxalato de amonio. Si el indicador cambia al anaranjado o amarillo, añada HCl (1 + 3) hasta obtener el color rosado.
- 3.- Deje reposar durante la noche ó 1-2 horas en baño maría a modo que sedimente el precipitado de oxalato de calcio.
- 4.- Filtre el precipitado a través de papel filtro retentivo o filtro de vidrio poroso y lave el precipitado repetidamente con $\text{NH}_4 \text{OH}$ (1 + 50).
- 5.- Coloque el papel o crisol con el precipitado en el vaso original y añada una mezcla de 125 ml de agua y 5 ml H_2SO_4 .
- 6.- Caliente a unos 70°C y titule con la solución de KMnO_4 hasta alcanzar un color rosado. La presencia de papel puede decolorar la solución en unos cuantos segundos.
- 7.- Corrija por determinación en blanco y calcule el porcentaje de calcio.

Cálculos

$$\% \text{ Ca} = \frac{\text{ml KMO}_4 \times \text{N} \times 0.020 \times 100 \times \text{aforo}}{\text{peso de muestra (g)} \times \text{alícuota}}$$

DETERMINACION DE FOSFORO

MURPHY, J. and J. Riley. 1963. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chem. Acta 27: 31-35

La cantidad de fósforo es determinada por la reacción del fósforo con el molibdato de amonio en un medio ácido, que forman un complejo de fosfomolibdeno de color azul. La intensidad del color de la solución es proporcional a la cantidad de fósforo presente en la muestra. La determinación se realiza en el espectrofotómetro a 660 nanómetros. La lectura obtenida se compara con las obtenidas de serie de patrones de concentración conocida.

Reactivos

1.- Solución extractora de Mehlich

Extraiga con una pipeta 1.4 ml de H_2SO_4 y 8.33 ml de HCl concentrados, y dépositelos en un frasco volumétrico de 2 litros que contenga aproximadamente la mitad de agua destilada antes de agregar los ácidos. Luego complete el volumen hasta los 2 litros con agua destilada.

2.- Reactivo A

En un vaso de precipitados de 250 ml, disuelva 6 g de molibdato de amonio en aproximadamente 125 ml de agua destilada. En un frasco de un litro ponga 500 ml de H_2SO_4 5N (75 ml de H_2SO_4 concentrado en un volumen final de 500 ml). Agregue la solución de molibdato de amonio y complete el volumen final de un litro con agua destilada. Transfiera a un frasco ámbar y guarde en refrigeración.

3.- Reactivo B

Pese 0.528 g de ácido ascorbido, póngalo en un frasco volumétrico de 100 ml y agregue reactivo A hasta completar el volumen final. Este reactivo es estable por 24 horas.

4.- Solución madre de 100 ppm de fósforo

Pese 0.4393 g de KH_2PO_4 . Póngalos en un frasco volumétrico de un litro y agregue agua destilada hasta el volumen final.

5.- Prepare estándares de fósforo a partir de la solución madre en un Rango de 1-5 ppm.

Preparación de los estándares

FOSFORO ppm	SOLUCION MADRE DE P ml	MATRAZ VOLUMETRICO ml
1	1	100 ^{1/}
2	1	50
3	3	100
4	1	25
5	5	100

^{1/} El volumen final se completa con solución extractora.

Procedimiento

- 1.- Parta de una muestra de cenizas de aproximadamente 1-2 g.
- 2.- Disuelva con 10 ml de agua regia (2 HCl : 1 HNO₃).
- 3.- Transfiera completamente a un frasco volumétrico de 100 ml y complete el volumen con agua destilada, homogenice y filtre.
- 4.- Haga diluciones posteriores (si es necesario) a partir del filtrado. Completando el volumen final con solución extractora.
- 5.- Extraiga con una pipeta 5 ml de cada muestra y póngala en un tubo grande o un vaso de precipitados pequeño. Lo mismo se hace con los patrones. Para preparar el blanco se extraen con pipeta 5 ml de solución extractora.
- 6.- Agregue 15 ml de agua destilada.
- 7.- Agregue 4 ml de reactivo B.
- 8.- Deje reposar durante 20 minutos y lea en el Espectrofotómetro a 660 nm. (habiéndolo conectado previamente, por 15 minutos, para que se caliente).

Cálculos

- 1.- Con los estándares de fósforo, lea a 660 nm. Emplee como blanco un tubo al que en lugar de 5 ml de solución de muestra se le adicionan 5 ml de solución extractora; se le agregan 15 ml de agua destilada y 4 ml de reactivo "B". Con este tubo se ajusta el 100% de transmitancia (T)
- 2.- Se lee el porcentaje de transmitancia de las otras concentraciones conocidas del estándar de fósforo y se cambian las lecturas de (T%) a densidad óptica (D.O.)

$$D O = (\log 100\% \text{ de } T) - (\log \text{ del } \% \text{ de } T \text{ de las lecturas})$$

- 3.- Con los datos de D.O. del estándar de fósforo, calcule la ecuación de la recta.

$$Y = a + bx$$

$$Y = D O$$

$$a = \text{intercepto en } Y$$

$$b = \text{pendiente}$$

$$x = \text{concentración de P ([P]) en ppm}$$

- 4.- Con las lecturas de D O de las muestras, calcule la concentración de fósforo, empleando la ecuación del estándar.

$$[P] = \frac{D O - a}{b}$$

$$\% P = \frac{FD \times [P] \times 100}{\text{Peso de la muestra (g)} \times 10^6}$$

$$FD = \text{factor de dilución.}$$

ANÁLISIS DE FORRAJES Y ENSILAJES

Introducción

El examen de ingredientes para alimentación de rumiantes debe dirigirse a evaluar aquellas características que los hacen adecuados para esos animales. De esta manera determinaciones de fracciones de fibra, digestibilidad *in vivo* e *in vitro*, contenido de ácidos orgánicos volátiles, pH, etc., serán los que con mayor frecuencia se realicen.

Las pruebas que utilizan animales para la determinación del valor nutritivo de un alimento son las más idóneas, ya que evalúan factores atribuibles tanto al animal como al alimento mismo. Este procedimiento desafortunadamente es lento en su conducción, y además, tiene un costo elevado. Por esta razón se han desarrollado métodos menos costosos y más rápidos.

La pregunta de que si la digestibilidad *in vitro* debe ser usada como indicador de la digestibilidad de los alimentos para animales, fue contestada por la Asociación Europea de Producción Animal (1980). Esta institución señala que debido a que la digestión de los rumiantes es muy complicada, la digestibilidad *in vivo* de forrajes de baja calidad, aún a nivel de mantenimiento, es sobreestimada para producción. En estas condiciones el sistema *in vitro* pudiera ser más reproducible. Por otra parte, el mayor factor determinante en la digestibilidad de alimentos para animales es la fermentación de las paredes celulares por los microorganismos ruminales, y en el proceso *in vitro* se obtiene una respuesta fisiológico-química que se asemeja parcialmente a lo que ocurre en el animal.

Los requisitos de energía de los rumiantes se cubren principalmente por la absorción de ácidos grasos de cadena corta a través de la pared ruminal. Hay marcada diferencia en la proporción molecular de los diferentes ácidos grasos volátiles (AGV) principalmente acetato, propionato y butirato, los cuales se producen en el rumen por fermentación de las dietas. La relación acetato:propionato tiende a incrementarse a medida que el contenido de la fibra de la dieta se incrementa (Orskov *et al.*, 1979). Dado que la proporción de ácido acético se incrementa a medida que el contenido de la fibra en la dieta aumenta, hay también generalmente un decremento en la eficiencia de utilización de la Energía Metabolizable. Debido a que la proporción de AGV en el contenido ruminal pueden ser utilizados como un estimador de la calidad de un forraje, se deben contar con métodos rápidos y exactos para el análisis de AGV en el licor ruminal.

Ensilaje

El ensilaje de productos agrícolas ha sido una práctica ganadera conocida en Europa desde hace siglos como una medida para la conservación de alimentos para los animales durante el invierno. El ensilaje puede definirse de acuerdo con McCullough (1977) como "EL

ALIMENTO PARA ANIMALES QUE RESULTA DE LA PRESERVACION ANAEROBICA DE FORRAJES HUMEDOS O RESIDUOS AGRICOLAS POR ACIDIFICACION". Esta definición establece varios puntos esenciales:

- 1.- Es un alimento para animales.
- 2.- Confina el proceso a condiciones anaeróbicas, excluyendo las fermentaciones aeróbicas que resultan en productos de desperdicio.
- 3.- Es un proceso para la conservación de productos y subproductos agrícolas por acidificación. Este proceso puede llevarse a cabo, mediante la aplicación directa de ácidos o por la producción de los mismos durante la fermentación. Excluye a los granos con alta humedad acidificados para su conservación por considerar que siguen principios y técnicas diferentes. Los principales factores que afectan el tipo de fermentación durante el ensilaje son:
 - a) El contenido de humedad del forraje.
 - b) Capacidad amortiguadora de la masa.
 - c) Disponibilidad de carbohidratos solubles en agua.
 - d) Tipo de bacterias predominantes.
 - e) Velocidad de la fermentación.

Una fermentación ideal es aquella que presenta un mínimo de pérdidas de nutrientes, la cual deberá prepararse cuando el forraje por ensilar contenga de 28 a 34% de materia seca, de 6 a 8% de carbohidratos solubles en agua, una mínima capacidad amortiguadora, una gran población de bacterias productoras de ácido láctico y una temperatura y grado de compactación adecuada para lograr un crecimiento bacteriano inmediato (McCullough, 1977).

Los carbohidratos presentes en el material por ensilar van a ser fermentados, a través de dos rutas metabólicas.



En la fermentación homoláctica tendrá lugar una recuperación de la materia seca del 100% y de la energía de 99.3%.

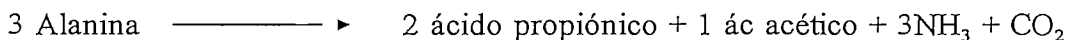
En la heteroláctica la recuperación de la materia seca es del 76% y de la energía del 98.3%.

Las pérdidas de energía en el ensilaje se incrementan cuando la velocidad de fermentación es demasiado lenta o el total de ácido producido es demasiado pequeño para evitar una fermentación por Clostridios.

Aunque esta fermentación puede conservar el ensilaje, la pérdida total de nutrientes es mayor, ya que parte del ácido láctico es convertido a butírico, lo que resulta en una pérdida de materia seca del 51% y de energía del 18%.



Otra ruta metabólica característica de una fermentación por Clostridios es la que resulta en la degradación de proteína por procesos de deaminación y oxido-reducción.



En este tipo de fermentación, además de las pérdidas obvias de nutrientes, hay un incremento en la capacidad amortiguadora debida a la producción de amoniaco, bióxido de carbono y aminoácidos libres

En un ensilaje de forraje fresco, la capacidad amortiguadora es aproximadamente igual a 3% de ácido láctico; en leguminosas ensiladas es igual a 6% de ácido láctico.

En el siguiente cuadro, se describe la influencia del tipo de fermentación sobre la composición química del ensilaje.

TIPO DE FERMENTACION SOBRE LA COMPOSICION DEL ENSILAJE¹

DETERMINACION	Tipo de fermentación		
	Láctica	Butírica	Acética
pH	3.8	4.2	4.80
Materia seca (MS), %	19.0	17.0	17.80
Capacidad amortiguadora mg/kg de MS.	1.1	ND ²	1.09
N-Proteico como % de N-Total	23.5	35.3	44.00
N-Amoniacal como % de N-Total	7.8	24.6	12.80
Acido Láctico, %	10.2	0.1	3.40
Acido Acético, %	3.6	2.4	9.70
Acido Butírico, %	0.1	3.5	0.20
CHOs ³ solubles en agua, %	1.0	0.6	0.30
Etanol, %	1.2	ND	0.80

^{1/} Adaptado de McCullough.

^{2/} No determinado

^{3/} Carbohidratos.

Se describen algunos métodos para el análisis de ensilajes, como la determinación de humedad por arrastre con disolventes inmiscibles, pH, ácido láctico, alcohol y nitrógeno amoniacal.

Humedad por arrastre con disolventes inmiscibles en agua. Este método cuantifica el contenido de agua y es especialmente útil cuando se desea distinguir entre el agua y la materia volátil como es el caso de los ensilajes, en los que hay una apreciable cantidad de ácidos orgánicos y otras sustancias volátiles. El agua contenida en los ensilajes es destilada con un disolvente no miscible, como tolueno.

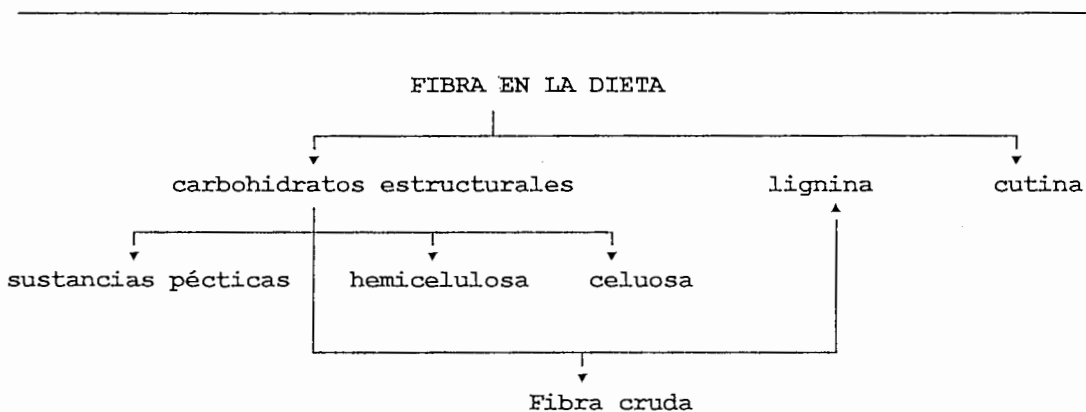
El alcohol etílico en un ensilaje es producto de la fermentación de algunas bacterias y levaduras. Es importante conocer el contenido de etanol de algunos ensilajes, ya que se ha observado que éste es un depresor del apetito (Viana *et al.*, 1978). Por lo tanto, el nivel de alcohol etílico puede estimar el consumo voluntario del ensilaje.

El nitrógeno amoniacal en un ensilaje puede provenir de Urea adicionada al ensilar o por degradación de proteína, por lo que en algunos ensilajes se cuantifica.

Fibra dietética.

En términos del valor nutritivo de un alimento para animales, la fibra cruda se entiende como una medida de la calidad del material fibroso. Químicamente está formado por celulosa, hemicelulosa y lignina (polifenol), como se muestra en la figura 8.

FIGURA 8. DISTRIBUCION DE LA FIBRA EN LA DIETA



En los años sesentas, Van Soest desarrolló unos métodos para cuantificar la fibra de los forrajes, empleando detergentes en soluciones neutra y ácida. En el primer caso se usa una solución de sulfato de Lauril sódico en amortiguador de pH neutro y al residuo le llamó "FIBRA DETERGENTE NEUTRO" (FDN) o paredes celulares (Van Soest y Wine, 1967). El pH neutro disminuyó parcialmente las pérdidas de la hemicelulosa y la lignina como es el caso del pH alto o bajo. La FDN no es fisiológica; sin embargo, se ha demostrado que corresponde con lo que se define como fibra de la dieta.

La FDN representa la matriz insoluble de la pared celular, sustancias covalentes unidas o asociadas a través de uniones hidrógeno, cristalinas u otra asociación intramolecular que las hace resistentes en asociaciones con soluciones fisiológicas. El reactivo DN no hidroliza la mayor parte de esas uniones. Las pectinas son hidrolizadas por el reactivo DN, por lo que puede decirse que la FDN no representa totalmente las paredes celulares de la planta. Sin embargo sí representa un residuo de significado nutricional, ya que retiene la matriz lignificada indisponible y las estructuras físicamente insolubles, que tienen efectos especiales en el rumen y en el tracto gastrointestinal de rumiantes y no rumiantes (Van Soest y Robertson, 1985). La FND se correlaciona mejor con ruminación, eficiencia y consumo de alimento.

El método de la fibra detergente ácida (Van Soest, 1965) determina el complejo lignocelulósico y silicio, mediante la digestión de la muestra con un detergente (Bromuro de cetil

trimetil amonio) en un amortiguador ácido. La diferencia entre las paredes celulares de FDN y FDA es una estimación de las hemicelulosas. El residuo de FDA consiste de celulosa, lignina, cutina y cenizas insolubles en ácido. El residuo de FDA se utiliza para determinar la lignina.

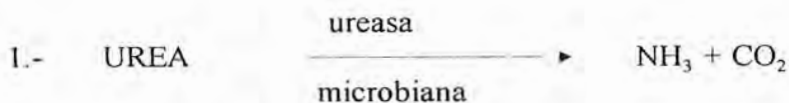
Solubilidad de proteína

La solubilidad de la proteína en alimentos para rumiantes ha sido empleada como un estimador de su valor nutritivo. En la alimentación de rumiantes una de las metas es que las bacterias ruminales reciban la máxima cantidad de nitrógeno e incrementar el paso de proteína de alta calidad, al intestino delgado del animal. Owens (1978) sugirió las siguientes determinaciones como método para medir la proteína sobrepasante del rumen y la proteína de alta calidad que alcance el intestino delgado:

- 1.- Solubilidad en diferentes amortiguadores.
Fracciones solubles, rápidamente degradables.
Fracciones insolubles, parcialmente sobrepasantes.
- 2.- Digestión en Pepsina 0.01%.
Fracción soluble, digerida en el rumen.
Fracción insoluble, sobrepasante.
- 3.- Digestión de la proteína en líquido ruminal.
Pérdida por fermentación *in vitro*, digestión en líquido ruminal.
- 4.- Fracciones celulares.
Contenido de nitrógeno celular, rápidamente degradado.
Fibra detergente neutro, velocidad de digestión variable.
Nitrógeno insoluble en FDA, indigerible.

Se ha demostrado que el amonio es el común denominador en la utilización del nitrógeno no protéico (NNP) por los rumiantes (Hungate, 1966); de esta manera, si los microorganismos del rumen no pueden degradar el compuesto en cuestión a amonio libre, éste no tiene valor como fuente de nitrógeno.

Cuando la urea es el substrato, están involucrados los siguientes pasos en su utilización completa (NRC, 1976):



- 2.- CARBOHIDRATOS (cetoácidos) $\xrightarrow[\text{microbianas}]{\text{enzimas}}$ ácidos grasos volátiles (AGV)
- 3.- $\text{NH}_3 + \text{Cetoácidos}$ $\xrightarrow[\text{microbianas}]{\text{enzimas}}$ Aminoácidos
- 4.- AMINOACIDOS $\xrightarrow[\text{microbiana}]{\text{enzimas}}$ Proteína microbiana.
- 5.- PROTEINA MICROBIANA $\xrightarrow[\text{abomaso e intestino delgado}]{\text{enzimas animales en}}$ Aminoácidos libres

6.- Aminoácidos libres son absorbidos del intestino delgado y usados por el animal.

Dependiendo de la fuente de NNP, diferentes enzimas van a ser necesarias para la hidrólisis; además, para la síntesis de aminoácidos, el tipo de Carbohidrato de la dieta va a ser importante. Bloomfield (1960) encontró que con CHOs complejos como la lignocelulosa el paso (1) es más rápido que el paso (2), lo que induce a la pérdida de amonio a través de la pared ruminal. Esto se debe a la deficiencia de azúcares disponibles rápidamente, lo que da como resultado una utilización pobre del nitrógeno de la dieta.

La urea no se adiciona únicamente con la finalidad de proporcionar NNP; en ocasiones, se adiciona con el propósito de adulteración para aumentar el nitrógeno total del alimento.

Bibliografía

- BLOOMFIELD, R.A., G.B. Gamorand and M.E. Nuhner. 1960. Kinetics of urea metabolism in sheep. *J. Anim. Sci.*, 19:1248
- HUNGATE, R.E. 1968. *The rumen and its micröbes*. Academy Press. New York. U.S.A.
- N.R.C. 1976. *Urea and other nonprotein nitrogen compounds in animal nutrition*. National Academy of Sciences, Board on Agriculture and Renewable Resources. Washington, D.C., U.S.A.

- ORSKOV, E.R., D.A. Grubb, J.S. Smith, A.J.F. Webster and W. Corrigan. 1979. Efficiency of utilization of volatile fatty acids for maintenance and energy retention by sheep. *Br. J. Nutr.*, 41:541
- OWENS, F.N. 1978. Protein solubility and ruminant nutrition. *Feedstuff*, 50 (28):23
- VAN SOEST, P.J. 1965. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds III-Study of effects of heating and drying of yield of fiber and lignin in forages. *J. Ass. Off. Agr. Chem.*, 48:785.
- VAN SOEST, P.J. and R.H. Wine. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV-Determination of plant cell-wall constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 50:50
- VAN SOEST, P.J. and J.B. Robertson. 1985. *Analysis of forages and fibrous foods*. Cornell University
- VIANA, M., A. Shimada y E.M. Calderón 1978. Manipulación de la fermentación en ensilajes de caña de azúcar y su valor alimenticio para borregos. *Tec. Pec. Méx.*, 35:48

DETERMINACION DE UREA EN ALIMENTOS PARA ANIMALES

PEARSON, D. 1970. The Chemical analysis of foods. Chemical Publishing Company Inc., New York, U.S.A.

El método cuantifica el contenido de UREA en alimentos para animales.

Reactivos

- 1.- Solución antiespumante. Disuelva 50 g de estearato de diglicerol en 375 ml de benceno, 75 ml de alcohol y 250 ml de ftalato de dibutilo (calentando si es necesario). La parafina picada es también un buen antiespumante; también se puede emplear la emulsión antiespumante B de Dow Corning Corp.
- 2.- Solución de Ureasa. Prepare una solución cada vez. Disuelva ureasa en agua en concentración tal, que 10 ml de la solución neutralizada conviertan en nitrógeno por lo menos 0.1 g de Urea pura. Determine la alcalinidad de la ureasa disolviendo 0.1 g de ureasa en 50 ml de agua y titule con HCl 0.1 N, usando rojo de metilo como indicador. Adicione la misma cantidad de HCl 0.1 N a cada 0.1 g de ureasa que se prepare. Para determinar la actividad enzimática, prepare aproximadamente 50 ml de una solución neutralizada de ureasa al 1%. Adicione diferentes cantidades de solución de ureasa a muestras de 0.1 g de urea pura. Destile el nitrógeno producido. Calcule la actividad de la solución de ureasa mediante la cantidad de ureasa necesaria para convertir a nitrógeno 0.1 g de urea adicionada.
- 3.- Solución de cloruro de calcio. Disuelva 25 g de CaCl_2 en 100 ml de agua.

Procedimiento

- 1.- Coloque 2 g de muestra en un matraz de Kjeldahl. Adicione 250 ml de agua y 10 ml de solución de ureasa. Tape bien y deje reposar durante una hora a temperatura ambiente, o 20 minutos a 40°C . Si se calentó, enfríe a temperatura ambiente. Use más solución de ureasa, si el alimento contiene más de 5% de urea (equivalente al 12% de proteína).
- 2.- Lave el tapón y el cuello del matraz con unos mililitros de agua. Adicione 2 g ó más de MgO (tipo pesado), 5 ml de solución de CaCl_2 y 3 ml de la solución antiespumante.
- 3.- Conecte el matraz de Kjeldahl al bulbo condensador, y destile 100 ml, recogiendo en 25 ml de HCl 0.1N.

- 4.- Titule con NaOH 0.1N usando rojo de metilo como indicador, o recogiendo en ácido bórico al 4% y titule con HCl 0.1N, empleando como indicador el verde de bromocresol-rojo de metilo, descrito en el método de Kjeldahl.

Cálculos

La urea contenida en la muestra, se calcula tomando en cuenta los mililitros empleados en la titulación y la actividad de la solución de ureasa.

DETERMINACION DE PAREDES CELULARES (FIBRA NEUTRO DETERGENTE) Y CONTENIDO CELULAR

VAN SOEST, P.J. and R.H. Wine 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV- Determination of plant cell wall constituents. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 50:50

Principio

El procedimiento neutro detergente para determinar los componentes de la pared celular es un método rápido para fibra total en alimentos fibrosos vegetales. Aparentemente divide la materia seca, separando los constituyentes nutricionales solubles y accesibles de aquellos que no son totalmente aprovechables o que dependen de la fermentación microbiológica para su aprovechamiento. Este método no puede aplicarse a los alimentos que tienen un contenido alto de proteína y bajo de fibra.

Equipo

- 1.- Aparato de reflujo. Utilice cualquier aparato convencional que sea adecuado para la determinación de fibra cruda. Se prefieren los vasos de Berzelius (600 ml) y los condensadores hechos de frascos redondos de 500 ml de capacidad.
- 2.- Crisoles de filtro de vidrio. Use el de tipo alto, de porosidad gruesa con placa de 40 mm de diámetro y que sea suficientemente grande para recibir de 40 a 50 ml de líquido.
- 3.- Limpieza de los crisoles. Después de mucho uso, los crisoles tienden a obstruirse con material residual que es resistente al filtrado corriente con ácido crómico. Una manera adecuada de limpiarlos es ponerlos a incinerar a 500°C y luego pasarles agua de abajo hacia arriba, en dirección opuesta a través del filtro. Cuando los crisoles se obstruyen con partículas minerales después de mucho uso, se prepara una solución caliente de 20% de KOH, 5% de etilendiamino tetracetato de sodio y se hace pasar forzada de abajo hacia arriba a través del filtro de vidrio de crisol. Se debe evitar el uso continuo de la solución alcalina, ya que tiende a erosionar el vidrio.
- 4.- Aparato de filtración. Se puede usar un matraz Kitasato con una alargadera de hule para acomodar los crisoles y así filtrar de uno en uno, o construir un aparato de filtración como lo sugiere Van Soest y Robertson (1985) o adquirir uno comercial como el "Tecator" o el Holst.

El aparato sugerido se construye con un marco de madera que tiene seis perforaciones donde se colocan seis embudos Büchner de porcelana de aproximadamente 7 cm de diámetro. En el tallo de los embudos se mete tubo de latex, los cuales se introducen en tubos de polipropileno de 3.8 mm de largo y 3.5 cm de diámetro interno. Estos se sueldan a orificios de 3.5 mm hechos en un tubo también de propileno de 3 cm

de diámetro interno. Entre tubo y tubo, debe haber 100 mm de separación. Si se usan tubos de polipropileno hay que ponerles dentro uno de vidrio, ya que colapsan con el calor.

- 5.- Los tubos de latex que están debajo de los embudos Büchner se controlan por medio de pinzas al hacer succión. Arriba de los embudos se ponen anillos de hule que permitan acomodar los crisoles. El tubo de propileno, de 3 cm de diámetro interno, está unido al marco de madera, y en sus dos extremos, está cerrado con dos tapones de hule, que tienen en el centro un tubo de polietileno de 10 cm. A uno de estos tubos de polietileno se conecta la bomba de vacío por medio de tubo de latex, poniendo una pinza para controlar el vacío y varios frascos de vidrio para atrapar los líquidos. En el otro extremo se pone un tubo de latex y otra pinza para disminuir el vacío.

Reactivos

- 1.- Solución Detergente Neutro:

REACTIVOS	POR LITRO	POR 18 LITROS
AGUA DESTILADA	1.00 lt	18.00 lt
SULFATO DE LAURIL SODICO	30.00 g	540.00 g
ACIDO ETILEN DIAMINO ^{1/} TETRACETICO (EDTA)	14.61 g	262.98 g
HIDROXIDO DE SODIO (NaOH) ^{1/}	4.00 g	72.00 g
TETRABORATO DE SODIO 10 H ₂ O (Na ₂ B ₄ O ₇ . 10 H ₂ O)	6.81 g	122.58 g
FOSFATO DISODICO ANHIDRO (Na ₂ HPO ₄)	4.56 g	82.08 g
ETILEN GLICOL MONOETIL ETER	10.00 ml	180.00 ml

^{1/} El EDTA y el NaOH se pueden sustituir por el equivalente de 18.61 g/l ó 334.98 g/18 l. de la sal sódica del etilen diamino tetracético (TITRIPLEX III, Merck 8418)

PREPARACION DEL ND

Para un litro de reactivo (ND), disuelva el NaOH en alrededor de 150 ml de H₂O y agregue el EDTA y el Na₂B₄O₇. 10 H₂O.

En otro vaso, disuelva el Na₂HPO₄ en 20 ml de H₂O y caliente.

Ponga las soluciones en un frasco un poco mayor de un litro y mézclelas mientras estén calientes. Disuelva el sulfato de lauril sódico en alrededor de 200 ml de H₂O, caliente

y agregue al frasco, que contiene los otros reactivos, por medio de un embudo que tenga en el tallo un tubo de latex de manera que éste llegue al fondo. Para evitar la espuma, agregue el etilenglicol monoetil éter y el agua restante hasta un litro y mezcle bien. Déjelo reposar por la noche y al día siguiente, mida el pH de la solución, que debe estar entre 6.9 y 7.1; si no es así, ajuste con NaOH o HCl. Hay que notar que los ingredientes se agregan a un litro de agua y que el volumen final de la solución será de 1030 ml. Para preparar 18 litros de reactivo se siguen los mismos cuidados y proporciones que para un litro.

- 2.- Acetona. Use un grado libre de color y que no deje residuo al evaporarla.
- 3.- Alfa Amilasa (Sigma A 1278) 2 g/90 ml H₂O y 10 ml etilenglicol.

Procedimiento

- 1.- Pese por diferencia aproximadamente 0.5g de muestra que haya sido molida en un tamiz de 1 mm y deposítela en un vaso de Berzelius para iniciar el reflujo.
- 2.- Agregue en el orden señalado, los siguientes reactivos: 100 ml de detergente neutro a temperatura ambiente y 2 ml de la solución de amilasa, por vaso.
- 3.- Caliente para que la solución hierva en 5 a 10 minutos y reduzca la temperatura cuando comienza la ebullición para evitar la formación de espuma. Ajuste la temperatura para que la solución hierva a un nivel constante y manténgase en reflujo por 60 minutos, tomando el tiempo desde el instante en que la solución comienza a hervir.
- 4.- Haga girar el vaso para suspender el material sólido y decante la solución con la muestra suspendida, en un crisol previamente tarado y colocado en un filtro con succión al vacío. Nunca debe adicionar el contenido del vaso a un crisol vacío al que se le está haciendo succión. Use poco vacío al principio, aumentándolo a medida que se necesite. Decante toda la muestra en el crisol, utilizando un mínimo de agua caliente (90°C), lave la muestra varias veces con agua caliente. Una vez concluido este paso, elimine el vacío, lave la muestra con acetona dos veces y déjese secar con el vacío puesto nuevamente.
- 5.- Seque los crisoles a 105°C durante toda la noche en una estufa de aire forzado y péselos aún calientes, a la mañana siguiente (la pesada debe ser rápida: menos de 30 segundos). Si no puede pesarlos en caliente, enfríe los crisoles en un desecador que contenga pentóxido de fósforo (P₂O₅) como desecante.
- 6.- El residuo de fibra recuperado se registra en términos de PAREDES CELULARES. Incinere el contenido de los crisoles a 525°C por tres horas, enfríe y pese. La pérdida de peso son las paredes celulares libres de cenizas. El uso del crisol tarado puede evitarse si se determina únicamente paredes celulares orgánicas. Las muestras de forrajes pueden

estar contaminadas con tierra y contener silicatos biológicos. La mayoría de los silicatos biológicos se disuelven con la solución detergente neutro mientras que los minerales de la tierra son insolubles.

Nota:

Si se va a determinar nitrógeno ligado a las paredes celulares se puede filtrar en papel Whatman N° 54 ó 541. Proteja la punta con un cono de metal (Fisher Scientific Catalogo No. 9-760 o equivalente) para que no se rompa el papel filtro.

Cálculos

$$\% \text{ Paredes Celulares} = \frac{(B - A) 100}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

A = Peso del crisol vacío

B = Peso del crisol + paredes celulares

Ajuste a base seca:

$$\frac{\% \text{ Paredes celulares en muestra "tal como se ofrece" X 100}}{\% \text{ Materia seca de la muestra "tal como se ofrece"}}$$

ó

$$\frac{\% \text{ Paredes celulares en muestra "parcialmente seca" X 100}}{\% \text{ Materia seca de muestra "parcialmente seca"}}$$

El porcentaje del contenido celular se calcula sustrayendo de 100 el porcentaje de paredes celulares en cada base.

$$\% \text{ Contenido Celular} = 100 - (\% \text{ Paredes Celulares})$$

DETERMINACION DE PAREDES CELULARES (FND) EN ALIMENTOS AMILACEOS

Van Soest, P.J. and J.B. Robertson. 1985. Analysis of forages and fibrous foods. Cornell University.

El procedimiento utiliza "Urea 8 M" para determinar la **FND** en alimentos ricos en almidón.

Aparatos

Los mismos indicados por Van Soest y Wine (1967).

Reactivos

- 1.- Solución Detergente-Urea. Disuelva 480 g de urea y 100 g de sulfato lauril sódico en 630 ml de agua destilada. Use un matraz de 2 litros y caliente con agitación. El volumen total es de 1,100 ml y está relativamente saturado de urea y detergente.
- 2.- Solución detergente amilasa-urea. Suspenda 2.2 g de alfa amilasa (de *B. subtilis*) en 50 ml de agua destilada. Repose por 20 minutos y filtre dentro de una probeta graduada de 100 ml. Diluya a 63 ml, transfiera a un matraz erlenmeyer de 250 ml y agregue 48 g de urea y 10 g de sulfato de lauril sódico. Caliente suavemente para disolver.
- 3.- Solución neutra amortiguadora concentrada. Prepare el amortiguador como se indicó en el procedimiento de Van Soest y Wine (1967), omitiendo el sulfato de lauril sódico e incrementando la concentración por un factor de 1.4. (26.05 g de EDTA disódico; 9.53 g de borato de sodio $10 \text{ H}_2\text{O}$; 6.386 g de Na_2HPO_4 anhidro en un litro de agua destilada).

Procedimiento

- 1.- Pese 500 mg de alimento molido, en criba de 1 mm, en un vaso Berzelius de 600 ml. Agregue 30 ml del reactivo urea-detergente y 2 ml de la solución de amilasa. Agite suavemente para mezclar. Cubra el vaso con un vidrio de reloj. Repose por lo menos tres horas o toda la noche en un lugar tibio o un tiempo suficiente para permitir la solución del almidón.
- 2.- Agregue 70 ml de la solución amortiguadora y 2 ml de la solución de amilasa. Caliente a ebullición. Filtre sobre un crisol de vidrio poroso (porosidad C) pesado previamente. Lave dos veces con agua caliente y dos con acetona. Luego aplique succión para secar. Seque a 105°C toda la noche en estufa y pese. Incinere a 525°C por tres horas. La

pérdida en peso es fibra detergente neutro.

- 3.- La determinación de FND en muestras ricas en grasa (10%) puede hacerse desengrasando la muestra previamente con alcohol absoluto u otro disolvente. Sin embargo, debe quitar el exceso de proteína usando una proteasa neutra compatible con el detergente (ICN # 101027). Una solución de la proteasa al 1% en agua destilada se agrega al reactivo para FND (1 ml de la solución del enzima por cada 100 ml del reactivo detergente neutro)

- 4.- Para muestras ricas en gomas y que son muy viscosas como el Psyllum, se trata la muestra con alcohol terbutílico antes de la determinación de la FND.

DETERMINACION DE FIBRA POR EL METODO ACIDO DETERGENTE

Van Soest, P.J. and R.H. Wine. 1968. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. J. Assoc. Off. Chem., 51: 780.

Principio

Este procedimiento permite una rápida determinación de la lignocelulosa en los alimentos. Sin embargo, en esta fracción también aparece el silicio. La diferencia entre el valor de las paredes celulares y la fibra ácido detergente, da una estimación del valor de la hemicelulosa, ya que esta diferencia también incluye una fracción de proteína adherida a las paredes celulares. El método de fibra por ácido detergente también se emplea como paso preliminar en la determinación de la lignina.

Equipo

- 1.- El mismo que se emplea la determinación de las paredes celulares (FDN).

Reactivos

- 1.- Solución ácido detergente.

REACTIVOS	POR LITRO	POR 18 LITROS
AGUA DESTILADA	1.00 lt	18.00 lt
H ₂ SO ₄ 1N (0.98 - 1.02)	49.04 g	882.72 g
BROMURO DE CETYL TRIMETIL AMONIO (CTAB)	20.00 g	360.00 g

- 2.- Acetona, grado reactivo
- 3.- Hexano, grado reactivo

Procedimiento

- 1.- Pese por diferencia aproximadamente un gramo de muestra y deposítela en un vaso Berzelius de 600 ml.

- 2.- Agregue 100 ml de solución de ácido detergente frío (se pone en el refrigerador la noche anterior). Caliente la solución para que hierva en el término de 5 a 6 minutos. Cuando se inicia la ebullición, baje el calor para evitar la formación de espuma y manténgase en reflujo por 60 minutos contados a partir del inicio de la ebullición que debe ser lenta durante todo el procedimiento.
- 3.- Filtre la solución, con poca succión, a través de un crisol previamente tarado. Con una varilla de vidrio, afloje la capa de muestra que se ha compactado en el fondo del crisol y lávela dos veces con agua caliente (90-100°C). Lave los lados del crisol de la misma manera.
- 4.- Repita igualmente el lavado con acetona hasta que desaparezca totalmente el color, desintegrado cualquier grumo que se haya formado para que el disolvente entre en contacto con todas las partículas de fibra.
- 5.- Lave las muestras con hexano mientras contiene aún acetona (el hexano se puede omitir si la formación de grumos no constituye un problema). Mantenga la muestra bajo succión hasta que se libere el hexano y séquela a 105°C por 8 horas o durante toda la noche; retírela de la estufa, y pésela en caliente; la operación de pesar debe ser muy rápida (30 seg). Si no es posible pesar en caliente, los crisoles pueden enfriarse en un desecador que contenga pentóxido de fósforo (P₂O₅) como desecante.

Cálculos

Porcentaje de fibra ácida detergente en base "parcialmente seco" o "tal como se ofrece".

$$\text{FAD}\% = \frac{[(\text{Peso del crisol} + \text{fibra g}) - (\text{Peso del crisol g})] \times 100}{\text{Peso de la muestra en g}}$$

Ajuste a base seca:

$$\frac{\% \text{ de fibra ácida detergente en muestra "tal como se ofrece"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en la muestra "tal como se ofrece"}}$$

ó

$$\frac{\% \text{ de fibra ácido detergente en muestra "parcialmente seca"} \times 100}{\% \text{ de materia seca de la muestra "parcialmente seca"}}$$

Notas:

- 1.- Tenga cuidado al lavar con agua caliente y acetona para que no se produzcan grumos. Los grumos se producen cuando la fibra húmeda se deja secar en el filtro. Hay que deshidratar con acetona para evitar el problema.
- 2.- En ocasiones algunas muestras presentan valores más altos de FDA que los de FDN. En estos casos se sugiere usar un análisis secuencial. Muestras dañadas por el calor durante el secado pueden ya no contener Hemicelulosa. Productos derivados de una reacción tipo Maillard, pueden ser parcialmente solubles en detergente neutro. Plantas que contienen niveles elevados de silicio biogénico y bajos de hemicelulosas, también pueden mostrar valores más altos de FDA que de FDN.

DETERMINACION DE LIGNINA, CELULOSA Y SILICIO (CENIZAS INSOLUBLES) POR PERMANGANATO

Goering, H.K. and P.J. Van Soest. 1975. Forage fiber analysis. Agriculture Handbook No. 379, Agricultural Research Service, United States, Department of Agriculture.

Principio

El método indirecto para la determinación de la lignina por medio del permanganato permite la determinación de la celulosa y cenizas insolubles; también la determinación de cenizas insolubles es una manera de estimar el contenido de silicio, que en muchos forrajes, es factor sobresaliente en la reducción de la digestibilidad. El método de lignina por permanganato presenta una alternativa al método del ácido sulfúrico al 72%. Considerando que cada uno tiene sus propias ventajas, la elección del método depende de las muestras que se van a analizar y el uso a que se destinen los resultados.

Las ventajas del método de permanganato sobre el método del ácido sulfúrico al 72%, pueden resumirse en los siguientes puntos:

- 1.- El procedimiento es más breve.
- 2.- Los productos son menos corrosivos y no exigen normalización.
- 3.- Los resultados están menos afectados por los daños que sufre la muestra, debido al calor de reacción, y por consiguiente, se aproxima más al verdadero valor del contenido de lignina.

Teoría del método

Los materiales que interfieren con la determinación se separan con la preparación de la fibra ácido detergente que está compuesta principalmente por lignina, celulosa y minerales insolubles. La lignina se oxida con una solución de ácido acético amortiguada con permanganato de potasio conteniendo hierro trivalente y plata monovalente como catalizadores. Los óxidos de manganeso que se depositan, se disuelven con una solución alcohólica de ácido oxálico y ácido clorhídrico, permaneciendo la celulosa y los minerales insolubles. El contenido de lignina se determina con base en la pérdida de peso de la muestra ocasionada por los tratamientos a que ha sido sometida; mientras que la celulosa se determina con base en la pérdida de peso de la muestra al ser incinerada. El residuo de cenizas consiste principalmente de silicio, y gran parte del material que no es silicato residual, puede eliminarse por medio del lavado con ácido bromhídrico concentrado.

Equipo

- 1.- El mismo que se emplea en la determinación de fibra ácido detergente.

Reactivos

- 1.- Permanganato de potasio saturado.

REACTIVOS	POR LITRO	POR 18 LITROS
AGUA DESTILADA	1.00 l	18.00 l
KMnO ₄	50.00 g	900.00 g
AgSO ₄	0.05 g	0.90 g

Nota: Mantenga la solución protegida de la luz solar directa.

- 2.- Solución amortiguadora de lignina.

REACTIVOS	POR LITRO	POR 12 LITROS
AGUA DESTILADA	100.00 ml	1.20 l
Fe(NO ₂) ₃ .9H ₂ O	6.00 g	72.00 g
AgNO ₃	0.15 g	1.80 g
ACIDO ACETICO	500.00 ml	6.00 lt
CH ₃ COOK anh.	5.00 g	60.00 g
ALCOHOL BUTIRICO TERCIARIO.	400.00 ml	4.80 l

Nota: Se disuelve el nitrato férrico nonahidratado y el nitrato de plata en 100 ml de agua destilada para preparar un litro, mientras que para 12 litros se disuelve en 1.2 l. Combine esta mezcla con el ácido acético y el acetato de potasio. Agregue el alcohol butírico terciario y mezcle la solución.

- 3.- Solución de permanganato combinada. Antes de emplearla, combine y a la vez mezcle la solución de permanganato de potasio saturada con la solución amortiguadora de lignina en la relación de 2:1 por volumen. La porción no utilizada de esta mezcla puede

mantenerse por una semana en refrigeración en ausencia de luz. Esta solución puede utilizarse si mantiene el color morado y está libre de precipitado.

4.- Solución desmineralizadora:

REACTIVOS	POR LITRO	POR 18 LITROS
ACIDO OXALICO	50.00 g	900.00 g
ETANOL al 95%	700.00 ml	12.60 lt
HCl conc. (12N)	50.00 ml	900.00 ml
AGUA DESTILADA	250.00 ml	4.50 lt

Nota: Se disuelve el ácido oxálico en el alcohol, se agrega el ácido clorhídrico concentrado y el agua destilada. Todo se mezcla muy bien.

5.- Alcohol etílico de 80%:

Para un litro, mezcle en 155 ml de agua destilada, 845 ml de alcohol etílico de 95%. Para preparar 18 litros, mezcle en 1.8 litros de agua destilada, 15.2 litros de alcohol etílico de 95%.

6.- Acido bromhídrico, grado reactivo.

7.- Acetona que no deje residuos por evaporación.

Procedimiento

- 1.- El residuo de la determinación de fibra por el método ácido detergente puede utilizarse (aplicando el peso original de la muestra). Si no se usa este residuo, se deben seguir los pasos (2), (3) y (4) que se describen a continuación:
- 2.- Pese aproximadamente un gramo de muestra que haya sido previamente molido a través de un tamiz de 1 mm. Si la muestra tuviera más de 15% de lignina, use 0.5 g.
- 3.- Coloque el crisol en un horno de incineración a 525° C por espacio de una hora o más y pese en caliente (no más de 30 seg) o coloque los crisoles en un desecador con pentóxido de fósforo.
- 4.- Prepare la fibra ácido detergente de acuerdo con el procedimiento descrito antes.

- 5.- Coloque los crisoles que contienen la fibra ácido detergente en una bandeja de vidrio de poca profundidad y que tenga aproximadamente una capa de 1 cm de espesor de agua fría. La fibra dentro de los crisoles no se debe mojar.
- 6.- Agregue a los crisoles aproximadamente 25 ml de la solución combinada de permanganato de potasio sin llenarlos demasiado. Ajuste el nivel del agua en la bandeja a manera de reducir la corriente de paso de la solución a través de los crisoles. Coloque una varilla corta de vidrio en cada crisol. Con el objeto de remover su contenido, deshaga los grumos y bañe todas las partículas que se adhieren a las paredes internas del crisol, con la solución de permanganato.
- 7.- Permita a los crisoles permanecer 90 ± 10 minutos a temperatura de 20 a 25°C y agregue, si fuera necesario, una cantidad adicional de la solución combinada de permanganato. Hay que recordar que el color morado se debe conservar constantemente.
- 8.- Traslade los crisoles al dispositivo de filtración y filtre toda la porción líquida remanente. No aplique todo el vacío. No lave la muestra. Coloque seguidamente los crisoles en bandejas limpias de vidrio o porcelana y llénelos hasta la mitad con la solución desmineralizadora. Después de transcurridos unos 5 minutos, filtre la porción líquida remanente y vuelva a llenar hasta la mitad con la misma solución. Se debe tomar la precaución de evitar el derrame debido a la producción de espuma. Repita la adición de la solución desmineralizadora por tercera vez si se nota que el filtrado del segundo tratamiento se encuentra de color café oscuro. Lave las paredes internas de los crisoles con una corriente final de la solución desmineralizadora contenida en una botella de lavado por compresión, hasta que el color de la fibra sea el blanco. El tiempo total necesario en este paso es de 20 a 30 minutos.
- 9.- Llene y lave el contenido de los crisoles con alcohol etílico de 80%; filtre y repita este lavado por dos veces consecutivas. Lave y filtre la muestra dos veces también con acetona, de igual manera que se hizo con el alcohol. Aplique vacío, hasta sequedad.

Obtención de las fracciones: Lignina, Celulosa y Oxido de silicio

- 1.- Para obtener el contenido de lignina. Seque los crisoles durante la noche a 105°C de temperatura; luego, déjelos enfriar en un desecador (use P_2O_5 como desecante) y péselos. El contenido de lignina se calcula con base en la pérdida en peso original de la fibra obtenida por el método de ácido detergente.
- 2.- Para obtener el contenido de celulosa. Incinere la muestra procedente de la determinación de lignina, a 525°C durante 3 horas; déjese enfriar en un desecador y pésela. La pérdida de peso equivale al contenido de celulosa.

- 3.- Obtención del contenido de silicio: Se puede obtener el contenido de silicio mediante la adición de suficientes gotas de ácido bromhídrico concentrado (48%) al residuo de cenizas en los crisoles, hasta que todas las partículas se hayan humedecido (no usar más de 4 ml de HBr). Deje reposar de una a dos horas. Agregue unas gotas más de HBr si se forma mucho color rojo. Succione para eliminar el exceso de ácido y lave inmediatamente con acetona (NO USE AGUA), seque e incinerar brevemente a 525°C; enfríe y pese. El óxido de silicio es la diferencia entre este peso y el peso original.

Notas:

- 1.- Los crisoles que contienen la fibra con un contenido alto de lignina, necesitarán mayor cantidad de la solución de permanganato, pero evite el uso de cantidades innecesarias.
- 2.- La aparición de un color amarillo o café es indicativo de que el permanganato se ha agotado.
- 3.- Si el crisol está lleno, filtre la solución con ayuda del vacío y agregue más solución.
- 4.- Si persiste un color amarillo después de haber tratado la fibra con la solución desmineralizadora, ello es indicativo de una remoción incompleta de la lignina. Esto ocurre únicamente en materiales con un alto contenido de lignina.
- 5.- La cutina presente en algunas cubiertas de semillas y otras plantas, no se oxida con el permanganato y por lo tanto, no aparece como parte de la fracción de lignina, ni se blanquea con los tratamientos.
- 6.- Las cubiertas de las semillas parecen como manchas o vetas de colores entre las partículas de celulosa y no deben confundirse con un proceso de oxidación incompleta.
- 7.- Un exceso en el uso y por lo consiguiente, en el paso de la solución de permanganato a través de los crisoles debe evitarse cuando se trata de muestras con un contenido bajo de lignina. Debe evitarse principalmente con los pastos tiernos o inmaturos que son rápidamente deslignificados y por lo tanto, existe el peligro de una pérdida de los carbohidratos contenidos en la celulosa, si se usa un exceso de la solución.
- 8.- Se puede obtener una disminución en el tiempo de paso de la solución a través del crisol mediante el ajuste del nivel de agua en la bandeja, regulándolo a una altura casi igual a la que tiene la solución dentro del crisol.
- 9.- Las precauciones descritas anteriormente no son necesarias al usar la solución desmineralizadora.

Cálculos

Porcentaje de lignina en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido:"

$$\frac{A - B \times 100}{C}$$

A = Peso de la fibra ácido detergente

B = Peso del residuo de la fibra, después del tratamiento con permanganato

C = Peso de la muestra antes de la determinación de fibra ácido detergente.

Porcentaje de celulosa en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$\frac{A - B \times 100}{C}$$

A = Peso del crisol + residuo de fibra por permanganato.

B = Peso del crisol + cenizas.

Porcentaje de silicio en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$\frac{A - B \times 100}{C}$$

A - B = Peso de la ceniza después del lavado con ácido bromhídrico.

Ajuste a base seca (lignina, celulosa o sílice):

- 1.- $\frac{\% \text{ analizado en muestra "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en muestra "tal como ofrecido"}}$
- 2.- $\frac{\% \text{ analizado en muestra "parcialmente seco"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en muestra parcialmente seco"}}$

NITROGENO INSOLUBLE EN DETERGENTE ACIDO

Goering, H.K. and P.J. Van Soest. 1975. Forage fiber analysis. Agriculture Handbook No. 379, Agricultural Research Service, United States, Department of Agriculture.

Importancia.

El secado del forraje a temperaturas superiores a 50°C provoca incremento en el contenido de lignina y fibra. Este incremento en la **FDA** puede deberse a la formación de lignina por medio de reacciones de obscurecimiento no enzimático (browning). Los valores para FDA y lignina pueden ser corregidos con base en el contenido de nitrógeno de la FDA. El contenido de nitrógeno de la FDA se sugiere como una prueba sensible para detectar sobrecalentamiento de alimentos.

Reactivos

- 1.- Solución de ácido detergente.
- 2.- Acetona.

Procedimiento

- 1.- Pese 2 g de muestra en un vaso adecuado para reflujo (Berzellius).
- 2.- Adicione 100 ml de la solución ácido detergente.
- 3.- Caliente la solución para que hierva de 5 - 10 minutos Cuando se inicie la ebullición, baje el calor para evitar la formación de espuma. Mantener el reflujo por 60 minutos contados a partir del inicio de la ebullición (debe ser lenta durante todo el procedimiento).
- 4.- Filtre al cabo del tiempo en un papel filtro (Whatman 541). Lave el filtrado con agua caliente hasta que esté libre de acidez y posteriormente con acetona.
- 5.- Seque a 100 - 105°C por 8 horas o toda la noche y pese. Transfiera el residuo a un matraz de Kjeldahl y determine el nitrógeno.

Cálculos

- 1.- Nitrógeno insoluble en detergente ácido (NIDA) como porcentaje de la materia seca total, como se indica a continuación:

$$\%NIDA = \frac{\text{Gramos de nitrógeno} \times 100}{\text{Peso de la muestra (en B.S.)}}$$

- 2.- Se puede expresar también como porcentaje del nitrógeno total.

$$\frac{\% \text{ NIDA}}{\% \text{ NT}} \times 100$$

NITROGENO INSOLUBLE EN PEPSINA

Goering, H.K. and P.J. Van Soest. 1975. Forage fiber analysis. Agriculture Handbook No. 379, Agricultural Research Service, United States, Department of Agriculture.

El método determina el nitrógeno del forraje que no es digerido en solución de pepsina.

Reactivos

- 1.- Acido clorhídrico 0.1 N. Agregue 17 ml de HCl 6N a un litro de agua. Valore la solución.
- 2.- Pepsina 1:10000 NF. XI

Procedimiento

- 1.- Pese 0.5 g de muestra secada al aire y molida a través de un tamiz de un milímetro de abertura.
- 2.- Coloque la muestra dentro de un matraz Erlenmeyer de 125 ml. Agregue 0.5 g de pepsina y 50 ml de HCl 0.1 N, tape y agite.
- 3.- Póngala en la estufa o en baño de agua a 39°C por 20 horas.
- 4.- Filtre sobre papel Whatman No. 4, 41 ó 541.
- 5.- Lave el residuo con agua destilada (una manera de asegurarse de que todo el nitrógeno soluble se ha eliminado, es lavar todo el ácido clorhídrico de residuo).
- 6.- Determine el nitrógeno en el residuo colocando el papel filtro y su contenido en un matraz para digestión. Determine el nitrógeno de acuerdo al método de Kjeldahl.
- 7.- Haga un blanco con otro círculo de papel filtro.

Cálculos

$$\% \text{ de N insoluble} = \frac{\text{ml HCl} \times \text{N} \times 0.014 \times 100}{\text{peso de muestra en g.}}$$

También se puede expresar como % de nitrógeno

$$\% \text{ N} = \frac{\text{N insoluble en pepsina} \times 100}{\text{N total de la muestra}}$$

DETERMINACION DE NITROGENO AMONIAL EN ENSILAJES

A.O.A.C. 1980 Official Methods of Analysis, 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C., U.S.A.

Principio

Este método determina el nitrógeno amoniacal presente en la muestra como producción de la hidrólisis de proteína o por adición de sales de amonio al ensilaje.

Procedimiento

- 1.- Colocar 10 g de muestra en un matraz de destilación de Kjeldahl.
- 2.- Adicionar 200 ml de agua destilada y un gramo de MgO libre de carbonatos (calcinar el MgO a 580°C por 2 horas, enfriar en desecador).
- 3.- Destilar 100 ml de líquido, recogiénolos en 25 ml de H₃BO₃.
- 4.- Titular con HCl 0.01 N.

Cálculos

$$\%N \text{ amoniacal} = \frac{\text{ml HCl} \times N \times 0.014 \times 100}{\text{Peso de la muestra en g}}$$

Nota

Un procedimiento útil, para moler las muestras de ensilaje fresco sin perder líquidos, es congelar con hielo seco. Para hacerlo se pasa por el molino un trozo de hielo seco antes de colocar la muestra, la cual estará congelada y además deberá mezclarse con el mismo hielo antes de la molienda.

DETERMINACION DE HUMEDAD EN ENSILAJES

Jacobs, M.B. 1965. The Chemical Analysis of Foods and Food Products. (3th ed.). D. Van Nostrand Company, Toronto.

Principio

El método determina cantidades pequeñas de agua mediante su destilación con algún disolvente no miscible en agua. Este método es de especial importancia cuando se desea distinguir entre agua y materia volátil como es el caso de los ensilajes. Como disolventes se sugieren tolueno y xileno.

Por arrastre con tolueno

Aparatos

- 1.- Trampa de Bidwell-Sterling con el brazo lateral de 10 ml graduado en 0.1 ml con la boca y la salida esmerilada 24/40 (Fischer Scientific Co. # 9-143-5).
- 2.- Refrigerante recto con las entradas esmeriladas 24/40.
- 3.- Matraz de 250 ml con la boca esmerilada 24/40.
- 4.- Parrilla eléctrica cubierta o una chaqueta de calentamiento de 380 watts.

Procedimiento

- 1.- Pese aproximadamente 10 g del ensilaje picado, fresco o congelado, y transfiera cuantitativamente a un matraz con boca esmerilada de 250 ml. Pese de preferencia en balanza analítica.
- 2.- Inmediatamente cubra la muestra con tolueno. Coloque la trampa sobre el matraz y únala al refrigerante. Llene el codo colector de la trampa con tolueno (este último paso no se requiere si al agregar tolueno para cubrir la muestra, se le añade un exceso del mismo).
- 3.- Coloque en la parrilla o la chaqueta de calentamiento y gradúela a la máxima temperatura. Conecte el refrigerante a la llave del agua y permita que el flujo sea constante.

- 4.- Destile hasta que el menisco convexo de la interfase de separación entre el agua y el tolueno permanezca constante en una de las divisiones de la escala del codo colector de la trampa, aproximadamente 30 minutos o un poco más. Espere a que se desenturbie el tolueno del tope del codo colector, antes de desconectar el aparato. Tome la lectura.

Cálculos

$$\% \text{ de H}_2\text{O} = \frac{\text{ml de agua} \times 100}{\text{peso muestra (g)}}$$

Nota:

Lave cuidadosamente la trampa con jabón y enjuáguela con algún disolvente poco polar para que arrastre algunas impurezas como grasas, que posteriormente eviten que las gotas de agua condensadas en el refrigerante caigan o resbalen libremente por las paredes del codo colector de la trampa, en las subsecuentes determinaciones. Seque la trampa de preferencia para poder usarla nuevamente.

MATERIA INSOLUBLE EN AGUA CALIENTE Y SU CONTENIDO DE NITROGENO

Goering H.K. and P.J. Van Soest. 1975. Forage fiber analysis. Agriculture Handbook No. 379, Agricultural Research Service, United States, Department of Agriculture.

Principio

Este procedimiento produce una estimación del nitrógeno proteico en forrajes. La muestra del forraje se hierva en agua, la cual precipita las proteínas haciéndolas insolubles y hace que permanezcan en las células del forraje.

Procedimiento

- 1.- Pese 2.0 g de muestra en un vaso Berzelius de 600 ml.
- 2.- Agregue 200 ml de agua destilada al vaso y hierva por una hora en el aparato de reflujo.
- 3.- Filtre a través de un papel filtro Whatman No. 541, previamente tarado, sobre un embudo de 60°. Se puede aplicar vacío para acelerar la filtración si se protege la punta del papel. Lave cuatro veces con agua caliente.
- 4.- Seque a 100°C por 16 horas y pese.
- 5.- Determine el nitrógeno por el método de Kjeldahl al residuo con todo y el papel filtro. Haga un blanco con otro círculo de papel filtro.

Cálculos

Calcule el porcentaje de materia insoluble en agua caliente (MIAC), incluyendo el nitrógeno (NIAC):

$$\%MIAC = \frac{[(\text{peso del papel filtro} + \text{residuo}) - (\text{Peso papel filtro})] \times 100}{\text{peso muestra seca (g)}}$$

$$\%NIAC = \frac{\text{g Nitrógeno}}{\text{peso muestra seca}} \times 100$$

Este nitrógeno insoluble puede utilizarse para calcular la proteína verdadera del forraje multiplicando por 6.25 (nitrógeno insoluble en agua caliente x 6.25).

DETERMINACION DEL pH EN MUESTRAS DE ENSILAJE FRESCO O CONGELADO

Gupta, M.L. and K. Pradhan. 1977. Chemical and biological evaluation of ensiled wheat straw. J. Dairy Sci., 60 (7): 1088

Principio

El método determina el pH de ensilajes. Esta determinación se realiza como un estimador del tipo de fermentación llevada a cabo durante el ensilaje.

Procedimiento

- 1.- En un vaso de precipitado, pese 10 g del material fresco o descongelado.
- 2.- Agregue 100 ml de agua destilada; déjelo reposar por 30 minutos, agitando de vez en cuando. También se puede licuar el ensilaje en la proporción de 10 g de muestra por 100 ml de agua destilada.
- 3.- Decante o filtre y determine el pH en la solución restante, utilizando un electrodo de vidrio.

DETERMINACION DE ACIDO LACTICO EN ENSILAJES

Oser, B.L. 1965. Hawk's Physiological Chemistry. (14th Ed.). McGraw Hill Book Company, The Blackston Division New York, U.S.A.

Principio

Este método determina el ácido láctico convirtiéndolo en acetaldehído, el cual es determinado por la reacción que forma con el p-hidroxidifenilo en la presencia de iones de cobre.

Reactivos

- 1.- Solución de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Se deben preparar dos soluciones, la primera al 20% (p/v) de sulfato de cobre cristalizado y la segunda al 4% (p/v).
- 2.- Acido sulfúrico puro libre de nitrógeno ya que los nitratos y nitritos interfieren con la determinación.
- 3.- Solución estándar de ácido láctico. Se prepara preferentemente de lactato de litio. Para la solución madre, disuelva 0.213 g de lactato de litio en aproximadamente 100 ml de agua en un matraz volumétrico de 1000 ml. Agregue un ml de H_2SO_4 concentrado, agite y afore con agua. Esta solución contiene un g de ácido láctico en 5 ml y es estable indefinidamente si se almacena en el refrigerador.
- 4.- Solución estándar de trabajo. Diluya 5 ml de la solución madre con agua destilada en un matraz volumétrico de 100 ml y mezcle. Esta solución contiene 0.01 mg de ácido láctico por ml y debe prepararse diariamente.
- 5.- Reactivo de p-hidroxidifenilo. Disuelva 1.5 g de p-hidroxidifenilo en 10 ml de hidróxido de sodio al 5%. Agite durante la disolución, y diluya con agua a 100 ml en un matraz volumétrico. Almacene en frasco ámbar.
- 6.- Hidróxido de calcio.

Procedimiento

- 1.- Pese 2.5 g del ensilaje recién picado en un matraz Erlenmeyer de 3.0 ls. Agregue 2.0 ls de agua destilada hirviente y 0.5 g de hidróxido de calcio. El hidróxido de calcio no necesita pesarse con exactitud.
- 2.- Filtre a través de un papel filtro de poro mediano. Tome una alícuota de 2 ml del filtrado claro y colóquela en un tubo de ensayo (120 x 10 mm). Agregue 8 ml de agua y agite. De esta solución tome con pipeta un ml, colocándolo en un matraz Erlenmeyer con tapón. Añada un ml de sulfato de cobre al 20%, 8 ml de agua y un g de hidróxido de calcio.
- 3.- En otro matraz semejante al anterior, tome con pipeta 5 ml de la solución estándar de ácido láctico, un ml de la solución de sulfato de cobre al 20%, 4 ml de agua y un g de hidróxido de calcio. Esta solución será el estándar.
- 4.- En un tercer matraz, tome con pipeta un ml de sulfato de cobre al 20%, 9 ml de agua y un g de hidróxido de calcio. Esta solución es el blanco.
- 5.- Agite en forma violenta (en un agitador mecánico) los tres matraces durante 20 minutos. Se filtran a través de papel Whatman No. 40 en tres tubos de ensayo respectivamente. Se añaden 0.05 ml de sulfato de cobre al 4% y 6 ml de ácido sulfúrico concentrado. El ácido debe agregarse desde una bureta gota a gota, agitando constantemente.
- 6.- Coloque los tubos en baño maría hirviente durante 5 minutos. En este tiempo se transforma el ácido láctico en acetaldehído.
- 7.- Enfríe los tubos a 20°C o menos y agregue un ml de la solución de p-hidroxidifenilo cuidando que no caiga sobre las paredes del tubo (agite cada tubo perfectamente). El p-hidroxidifenilo precipita en contacto con el ácido concentrado.
- 8.- Coloque los tubos en un vaso con agua a 30°C póngalo a reposar por lo menos 30 minutos. Agite los tubos para redispersar el reactivo.
- 9.- Ponga los tubos en un baño de agua hirviente por 90 segundos exactamente y enfríe los tubos a temperatura ambiente.
- 10.- Lea los tubos a 560 nm en el Espectrofotómetro usando agua como referencia.

Cálculos

$$\text{g de ácido láctico/100g} = \frac{\text{DOm} - \text{DObl} \times 0.000005 \times 100}{\text{DOes} - \text{DObl} \times 0.000025}$$

$$\text{g de ácido láctico/100g} = \frac{\text{DOm}}{\text{DOes}} \times 0.2 \times 100$$

Donde:

DOm = Densidad óptica de la muestra.

DOes = Densidad óptica del estándar.

DObl = Densidad óptica del blanco.

DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE FORRAJES

Van Soest, P.J. and J.B. Robertson. 1985. Analysis of forages and fibrous foods. Cornell University.

Principio

Los procedimientos *in vitro* están desarrollados para obtener la digestibilidad real o aparente de un forraje. La técnica está basada en las técnicas *in vitro* de Tilley y Terry con una posterior determinación de los constituyentes no digeridos de las paredes celulares para obtener la digestibilidad verdadera de la materia seca.

Materiales

- 1.- Líquido ruminal de animales fistulados que estén consumiendo un forraje alto en fibra, preferentemente un heno de buena calidad.
- 2.- Matraces Erlenmeyer de 125 ml o tubos de ensayo de nalgeno de 100 ml. Los matraces o tubos son puestos en el baño maría con agitación. Los tapones (de los matraces o tubos), son del número seis con dos perforaciones, tubo de entrada y válvula Bunsen. El tubo de entrada se cierra con varilla de vidrio.
- 3.- Baño maría con temperatura ajustada a 40°C.
- 4.- Tanque de CO₂ y sistema para burbujeo del CO₂.
- 5.- Gasa
- 6.- Lana de vidrio.
- 7.- Jeringa automática.
- 8.- Licuadora.
- 9.- Aparato para reflujo (Fibra Cruda)

Reactivos

- 1.- Trypticasa. Digerido pancreático de caseína USP.

- 2.- Sulfuro de sodio ($\text{Na}_2\text{S } 9\text{H}_2\text{O}$) RA.
- 3.- Hidróxido de sodio 1 N.
- 4.- Cisteína HCl (Baker o equivalente).
- 5.- Rezasurina 0.1% peso volumen.
- 6.- Acido clorhídrico 6 N (50%).
- 7.- Pepsina 1:10,000 o NF/XI.
- 8.- Solución amortiguadora.

AGUA DESTILADA	1.00 l
NH_4HCO_3	4.00 g
NaHCO_3	35.00 g

- 9.- Solución de macrominerales

AGUA DESTILADA	1.00 l
Na_2HPO_4 anh.	5.70 g
KH_2PO_4 anh.	6.20 g
$\text{MgSO}_4 7\text{H}_2\text{O}$	0.60 g
NaCl	2.20 g

- 10.- Solución de microminerales.

AGUA DESTILADA, cbp ^{1/} :	100.0 ml
$\text{CaCl}_2 2\text{H}_2\text{O}$	13.2 g
$\text{MnCl}_2 4\text{H}_2\text{O}$	10.0 g
$\text{CoCl}_2 6\text{H}_2\text{O}$	1.0 g
$\text{FeCl}_3 6\text{H}_2\text{O}$	8.0 g

^{1/} Cuanto baste para :

Procedimiento

- 1.- Pese 0.5 g de muestra (molida a través de una criba de 1 mm) en el matraz Erlenmeyer de 125 ml o en el tubo de nalgono de 100 ml.
- 2.- Adicione 40 ml de una solución preparada así: a 2 g de tripticasa agréguele 400 ml de agua destilada y 0.1 ml de la solución de microminerales, agite y disuelva. Añada 200 ml de la solución amortiguadora, 200 ml de la solución de macrominerales y 1.0 ml de rezasurina.
- 3.- Coloque los matraces o tubos en el baño, tápelos y ponga a burbujear CO_2 a una presión de 15 a 20 cm de agua y compruebe las válvulas Bunsen. Abra los tubos de entrada del tapón, agite con el matraz o tubo abierto y tape.
- 4.- Prepare la solución reductora como sigue: disuelva 625 mg de clorhidrato de cisteína, de 5-10 lentejas de KOH, adicione 625 mg de sulfuro de sodio y disuelva.
- 5.- Reduzca la presión del CO_2 a 3-4 cm y agregue 2 ml de la solución reductora a través del tubo de entrada con una jeringa automática, abriendo y cerrando cada tubo en turno. Agite los matraces o tubos, los cuales cambian de color rojo (oxidado) a incoloro (reducido).
- 6.- La preparación del medio y la adición de la muestra y medio a todos los matraces o tubos, la introducción de éstos en el baño de agua y la adición de la solución reductora debe hacerse antes de tomar el licor ruminal. La eliminación del oxígeno está indicado por la aparición del color amarillo de la rezasurina (sí permanece rosa es que no se eliminó el oxígeno)

Preparación del inóculo

- 1.- Recoja el contenido ruminal en un frasco de vidrio o vaso de plástico. Llene hasta el borde para eliminar el aire y cúbralo con una tapa de plástico.
- 2.- El frasco o vaso deben ponerse en un recipiente con agua a 40°C o use un frasco térmico, llénelo también hasta el borde.
- 3.- Filtre a través de gasa y lana de vidrio bajo atmósfera de CO_2 ; inocule 10 ml del filtrado a cada matraz o tubo de fermentación.
- 4.- Ajuste la presión de CO_2 a 2 cm de agua. Incube por 48 horas agitando suavemente los matraces o tubos dos veces por día durante el tiempo de incubación. La agitación excesiva puede ser contraproducente ya que puede soltar a las bacterias de los sustratos.

Al final de la fermentación se puede seguir uno de los dos siguientes procedimientos:

1.- Procedimiento de Tilley y Terry.

- a) Cuidadosamente adicione 2 ml de ácido clorhídrico 6 N a cada matraz o tubo (baja el pH a 2). Adicione 0.5 g de Pepsina (puede ser medida con una cucharilla). Agite y coloque los matraces o tubos nuevamente en el baño de agua a 40°C por 48 horas.
- b) Saque los matraces o tubos del baño y filtre sin succión, sobre papel filtro Whatman No. 4, 41, 54 ó 541. Lave el filtrado dos veces con agua caliente, llenando el embudo y drene hasta casi acabar el líquido; llene el embudo con acetona, drene y seque al aire; doble los papeles, seque en horno a 100-105°C y pese.
- c) La materia seca del papel se determina por separado en otros círculos de papel filtro. Use el factor de materia seca para calcular el peso seco de los papeles tarados empleados en la filtración.
- d) Corra simultáneamente blancos que contengan el inóculo y el medio pero no el sustrato. Como estándar se usa papel Whatman 4, 41, 54 ó 541 y un heno de digestibilidad conocida.

2.- Procedimiento detergente neutro para estimación de la digestibilidad verdadera.

- a) Quite los matraces o tubos del baño, después de la fermentación. Lave con solución detergente neutro (ver método de fibra neutro detergente) dentro de un vaso Berzellius de 600 ml, hasta hacer un volumen de 100 ml.
- b) Ponga a reflujo por una hora y filtre en un crisol Gooch, con lana de vidrio, previamente tarado. Lave dos veces con agua caliente y dos veces con acetona y succione hasta lograr sequedad.
- c) Seque en la estufa a 100-105°C y pese. No es necesario hacer blancos.

Cálculos

1.- Procedimiento de Tilley y Terry.

$$\% \text{ Digestibilidad de la MS} = \frac{100 \text{ MS muestra} - (\text{MS residuo} - \text{MS blanco})}{\text{MS muestra}}$$

$$\text{MO digerible}/100\text{g MS} = \frac{100 \text{ MO muestra} - (\text{MO residuo} - \text{MO blanco})}{\text{MS muestra}}$$

$$\% \text{ Digestibilidad MO} = \frac{100 \text{ MO muestra} - (\text{MO residuo} - \text{MO blanco})}{\text{MO muestra}}$$

MS = Materia seca

MO = Materia orgánica.

2.- Digestibilidad verdadera.

$$\% \text{ Digestibilidad verdadera MS} = \frac{[1.00 - (R - F)]}{\text{Peso muestra en base 100\% MS}}$$

$$\% \text{ Digestibilidad verdadera MO} = \frac{[1.00 - (E - M)]}{\text{Peso de MO de la muestra en base 100\% MS}}$$

R = Peso papel filtro + residuo g

F = Peso papel filtro g

E = Peso del residuo (R - F)

M = Peso del residuo después de incinerar.

DETERMINACION DE LA DIGESTIBILIDAD IN VITRO Y ENERGIA METABOLIZABLE POR EL METODO DE PRODUCCION DE GASES

Menke, K.H., L. Raab, Salewski, H. Steingass, D. Fritz and W. Schnaider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedings stuff from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. J. Agric. Sci. Camb. 93, 217-22.

Principio

Este método hace posible la estimación de la Materia Orgánica Digerible, Energía Digerible y Energía Metabolizable en alimentos para rumiantes. El método se basa en la producción de gases (CH_4 y CO_2) a partir de la incubación de forrajes y alimentos para rumiantes *in vitro*. Alimentos y forrajes de diferentes digestibilidad presenta marcadas diferencias en la cantidad de gas producido en un período de tiempo establecido (24 horas).

Reactivos

1.- Solución de microminerales (Solución A)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	13.2 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10.0 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	8.0 g
H_2O (destilada)	100.0 ml

2.- Solución Amortiguadora ruminal (Solución B)

NH_4CO_3	4.0 g
NaHCO_3	35.0 g
H_2O	1.0 l

3.- Solución de macrominerales (Solución C)

NaHPO ₄	5.7 g
KH ₂ PO ₄	6.2 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
H ₂ O (destilada)	1.0 l

4.- Solución de resazurina 0.1% (P/V)

5.- Solución reductora:

NaOH (1N)	4.0 ml
Na ₂ S 9H ₂ O	625.0 mg
H ₂ O (destilada)	95.0 ml

6.- Almidón de maíz, grado comercial.

7.- Estándar de heno, ajustado para producir 44.16 ml de gas a 400 m sobre el nivel del mar. Este estándar es proporcionado por el Instituto de Nutrición Animal, P.O. Box 700562, 7000 Stuttgart 70.

Equipo

- 1.- Fuente de contenido rumial a partir de un animal fistulado que esté consumiendo una dieta que incluya 70% de forraje.
- 2.- Equipo para extracción de licor ruminal, filtro de tela de algodón y fuente de CO₂.
- 3.- Rotor para tubos (500 mm diámetros), calentador eléctrico con termómetro ajustable a 39°C ± 0.5°C y caja para baño maría donde estará colocado el rotor y calentador.
- 4.- Motor para rotar el carrusel (con los tubos de digestibilidad) con velocidad de 1 a 2 rotaciones por minuto.
- 5.- Jeringa de vidrio con pistón externo de 36 mm de diámetro y 200 mm de longitud con volumen calibrado de 100 ml 1/1.

- 6.- Clips para tubos de silicon o latex.
- 7.- Repipeta de 50 ml calibrada en 1/1.
- 8.- Balanza analítica

Procedimiento

- 1.- Preparación de la muestra
 - a) Muela las muestras en molino de laboratorio tipo Wiley provisto de criba de 60 mallas.
 - b) Pese 200 mg de muestra e introdúzcala en la jeringa.

Nota: con forrajes de baja energía se pueden pesar hasta 500 mg de muestra.

- 2.- Preparación del medio (adiciónelo en orden)

- a) 400 ml de agua destilada
- b) 0.1 ml de sol. A
- c) 200 ml de sol. B
- d) 200 ml de sol. C
- e) 1.0 ml de sol de rezasurina
- f) 40 ml de solución reductora

Esta mezcla se prepara momentos antes de la recolección del licor, se le pasa una corriente de CO₂ y se lleva al baño de agua a 39°C.

- 3.- Extracción

- a) El licor ruminal se extrae a través de la fistula con un tubo de goma conectado a una bomba de vacío. El licor ruminal se recibe en un matraz de filtración que estará dentro de un recipiente con agua a 39°C.
- b) Filtre el licor ruminal a través de tela de algodón (empleando vacío). Rápidamente se mide para mezclarse con el medio en relación 1:2 (una parte de licor ruminal filtrado con dos partes de medio). Dentro del frasco de la repipeta, se le pasa una corriente de CO₂ y se lleva al baño a 39°C.

4.- Incubación

- a) Dentro de cada jeringa se adicionan 30 ml de mezcla (medio-licor ruminal).
- b) El aire es removido de la jeringa con mucho cuidado para evitar pérdida de muestras.
- c) Se coloca un clip de plástico para cerrar el tubo.
- d) Se lee la lectura inicial de volumen y se anota.
- e) La jeringa es colocada dentro del rotor que a su vez está dentro del baño de agua a 39°C.

Nota: A las 6 horas de incubación se hace una lectura para ver si los volúmenes no exceden de 60 ml; si ésto ocurre, registre esta lectura y con mucho cuidado, desaloje el gas para recuperar los primeros 30 ml y haga la lectura a las 24 horas de iniciado el proceso, adicionado el valor de la lectura desalojada.

5.- Estandarización:

Las diferencias en composición y actividad del licor ruminal se controlan por tres medidas paralelas.

- a) Licor ruminal + medio sin sustrato (muestra) blanco

$$V_f - V_i = b$$

- b) Licor ruminal + medio con estándar de heno (± 200 mg) para calcular la producción de gas corregida (GbH) por peso de estándar.

$$\frac{(V_f - V_i - b) 200}{\text{muestra (mg)}} = \text{GbH}$$

Nota: Puede dar una media de gas mayor o menor que 44.16 ml en 24 horas.

- c) Licor ruminal + medio con estándar de heno más almidón (± 200 mg) para calcular la producción de gas corregida (GbHA) por peso de estándar.

$$\frac{(V_f - V_i - b) 200}{\text{muestra (mg)}} = \text{GbHA}$$

Nota: puede dar una media de gas mayor o menor que 59.8 en 24 horas.

A partir de esas medias (GbH y GbHA) es posible corregir cada serie de determinaciones para los diferentes forrajes o alimentos en estudio. Por lo tanto, el factor de corrección para el heno es:

$$\frac{44.16}{\text{Gb}_H} = F_{HA}$$

y para el heno + almidón es:

$$\frac{59.8}{\text{Gb}_{HA}} = F_{HA}$$

La media de esos dos factores ($F_H + F_{HA}$) $\div 2 = F$ es usada como factor de corrección .

Cálculos

La lectura de la producción de gas del problema es corregida por el peso de la muestra (mg), y la lectura del blanco multiplicador por la media de los factores de los estándares "F".

$$\frac{[(V_f - V_i - b) 200]}{\text{muestra en mg.}} \times F = \text{Gpb}$$

El porcentaje de digestibilidad de materia orgánica (%DMO) se calcula a partir del Gpb (producción de gas corregida) y del contenido de proteína cruda del forraje o alimento en estudio, mediante la siguiente ecuación de regresión.

$$\%DMO = 0.76 \text{ Gpb} + 0.637 \%PC + 22.5$$

Asimismo, el método da la alternativa para calcular la Energía Digerible y Metabolizable, para lo cual, es necesario determinar el contenido de extracto etéreo del forraje o concentrado en cuestión. Las ecuaciones de regresión que se emplean son las siguientes:

$$ED(\text{MJ/kg}) = 0.1384 \text{ Gbp} + 0.142\% \text{ PC} + 0.111\% \text{ EE} + 2.86$$

$$EM(\text{MJ/Kg}) = 0.1456 \text{ Gbp} + 0.0767\% \text{ PC} + 0.164\% \text{ EE} + 1.2$$

Nota:

Una megacaloría (Mcal) es igual a 4.184 Mega Jule (MJ).

El coeficiente de correlación de éstas ecuaciones es de 0.97 en estudios llevados a cabo *in vivo* con ovejas.

CALCULO DE LA DIGESTIBILIDAD APARENTE (ECUACION SUMATIVA)

Con la información obtenida del análisis de los componentes de la pared celular es posible estimar con un amplio grado de seguridad ($\delta = 0.98$) la digestibilidad aparente y verdadera de una muestra de pasto o forraje para rumiantes. Para ésto debe ordenar sus datos analíticos en el siguiente cuadro, siguiendo las instrucciones que se dan a continuación:

COMPONENTE	VALOR ANALITICO	FACTOR	CANTIDAD DISPONIBLE
Contenido celular	100 - FND	0.98 ¹	Sume
Lignificación de las Paredes Celulares	FND	Por cálculo ²	Sume
Corrección de Si ³	Análisis de SiO ₂	3.0	Reste
Daño Térmico	Lignina Artificial	1.0	Reste
DMS verdadera			Sume
Pérdidas metabólicas ⁴			Reste
DMS aparente estimada			Diferencia

1. La digestibilidad del contenido celular es de 98% en promedio.
2. Determine la digestibilidad de las paredes celulares aplicando la siguiente fórmula:

$$147.3 - 78.9 \log [(lig/FAD^{1/}) 100]$$
^{1/} En caso necesario puede calcularse la Lignina y FAD corregidos por daño térmico.
3. Sólo en el caso en que las cenizas insolubles de una muestra sean mayores al 2.0%.
4. Puede estimarse para vacunos con la siguiente fórmula:

$$36.57 - 0.275 (DMS \text{ verdadera}).$$
 Para ovinos puede considerarse una pérdida promedio de 12 unidades de digestibilidad.