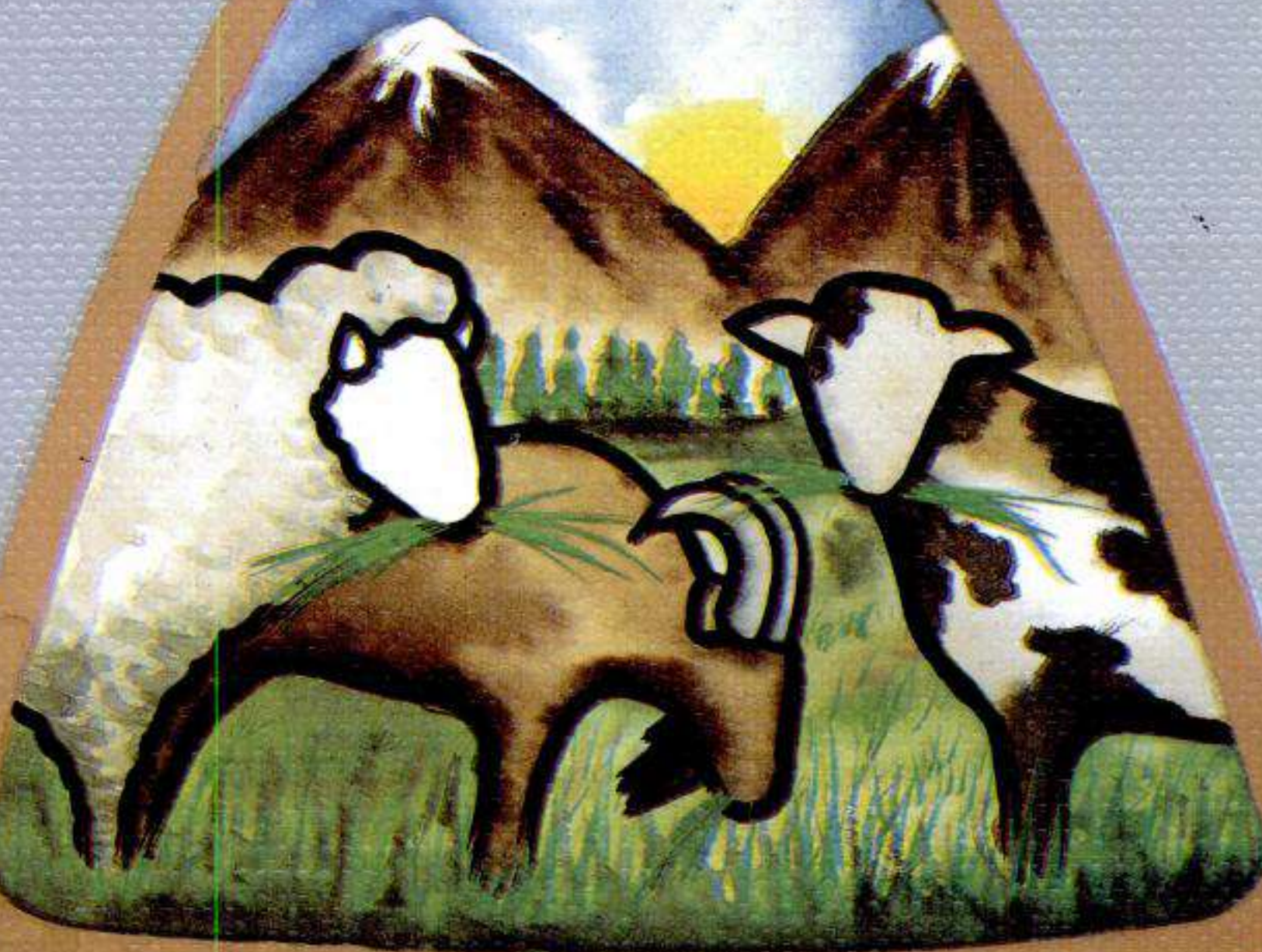


# nutrición de rumiantes

Guía metodológica  
de investigación



ALPA

RISPAL

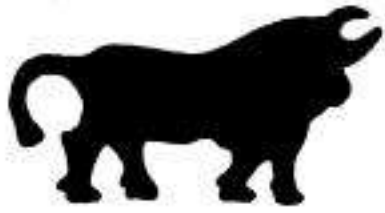


1970

C 1211A 636.1075142 R 4346u 1990

CP

ISBN 92-9039162-6



**ALPA**



# NUTRICION DE RUMIANTES: GUIA METODOLOGICA DE INVESTIGACION

Editores:  
Manuel E. Ruiz  
Arnoldo Ruiz

San José, Costa Rica  
1990



Copyrighted material

© para esta 1a. edición, IICA–RISPAL, 1990.

1a. edición:

Prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin autorización de RISPAL y del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

Las ideas y planteamientos contenidos en los artículos firmados son propios del autor y no representan necesariamente el criterio del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.

Diseño de cubierta	Olga Sarmiento
Composición de texto, arte, montaje e impresión	Imprenta y Litografía Ambar S.A.
Impresión de portada	Servicios Gráficos Omega S.A.
Encuadernación	Imprenta del IICA
Editores de la obra	Manuel E. Ruiz, Arnoldo Ruiz

IICA

L51 Nutrición de rumiantes: guía metodológica de investigación / editado por Manuel E. Ruiz, Arnoldo Ruiz. – San José, C.R. : Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura : Red de Investigación en Sistemas de Producción Animal en Latinoamérica, 1990. xiii, 344 p. ; 23 cm.

ISBN 92-9039162-6

1. Rumiantes – Nutrición – Métodos de investigación. 2. Forraje – Métodos de investigación. I. Ruiz, Manuel E. ed. II. Ruiz, Arnoldo, ed. III. Red de Investigación en Sistemas de Producción Animal en Latinoamérica. IV. IICA. V. Título.

AGRIS  
L51



DEWEY  
636.2085072

IICA  
#2.495  
1990

## INDICE GENERAL

<u>DEDICATORIA.....</u>	<u>V</u>
<u>PROLOGO.....</u>	<u>IX</u>
<u>PARTICIPANTES.....</u>	<u>XI</u>
<u>ORGANIZACION DE LA REUNION.....</u>	<u>XIII</u>
<b><u>CAPITULO I. MUESTREO Y ANALISIS QUIMICO.....</u></b>	<b><u>1</u></b>
<u>Determinación de carbohidratos no estructurales. <i>Gastón Pichard y José Antonio Alcalde</i>.....</u>	<u>3</u>
<u>Aspectos críticos de las metodologías de evaluación nutritiva de árboles y arbustos forrajeros. <i>Rolain Borel</i>.....</u>	<u>21</u>
<u>Metodología de investigación en nutrición mineral de rumiantes. <i>Oswaldo Rosero</i>.....</u>	<u>33</u>
<u>Determinación del nitrógeno en los alimentos. <i>María Kass</i>.....</u>	<u>49</u>
<u>Recomendaciones sobre muestreo y análisis químico. <i>Gastón Pichard, Oswaldo Rosero, María Kass, Félix Ojeda</i>.....</u>	<u>59</u>
<u>Discusión de las recomendaciones del Grupo de Trabajo N° 1...</u>	<u>79</u>
<b><u>CAPITULO II. ANALISIS BIOLOGICO Y TASA DE DIGESTION.....</u></b>	<b><u>87</u></b>
<u>Metodología para estimar la dinámica de digestión en rumiantes. <i>Carlos E. Lascano y Roberto Quiroz</i>.....</u>	<u>89</u>



<u>Utilización de la técnica de digestión <i>in situ</i> para la caracterización de forrajes. <i>Francisco Romero</i>.....</u>	105
<u>Medición de las tasas de degradación ruminal en alimentos. <i>Danilo A. Pezo</i>.....</u>	115
<u>Recomendaciones sobre la utilización de los métodos <i>in vitro</i>, <i>in situ</i> y enzimático en el estudio de la digestión de alimentos. <i>Diego González, Manuel E. Ruiz, Francisco Romero, Danilo Pezo</i>.....</u>	127
<u>Discusión de las recomendaciones del Grupo de Trabajo N° 2...</u>	141
<b><u>CAPITULO III. CONSUMO Y DIGESTION <i>IN VITRO</i>.....</u></b>	<b>147</b>
<u>Metodología para medir consumo bajo pastoreo. <i>Carlos E. Lascano</i>.....</u>	149
<u>Recomendaciones sobre metodología para la medición de consumo y digestibilidad <i>in vivo</i>, <i>Carlos E. Lascano, Rolain Borel, Roberto Quiroz, José Zorrilla, Carlos Chaves, Claudio Wernli</i>...</u>	159
<u>Discusión de las recomendaciones del Grupo de Trabajo N° 3...</u>	169
<b><u>CAPITULO IV. CONSERVACION DE FORRAJES.....</u></b>	<b>177</b>
<u>Metodología para investigaciones sobre conservación y utilización de ensilajes. <i>Claudio Wernli y Félix Ojeda</i>.....</u>	179
<u>Recomendaciones sobre metodología de investigación en conservación de forrajes. <i>Claudio Wernli, Diego González, María Kass, Félix Ojeda</i>.....</u>	233
<u>Discusión de las recomendaciones del Grupo de Trabajo N° 4...</u>	239
<b><u>CAPITULO V. SISTEMAS DE ALIMENTACION.....</u></b>	<b>247</b>
<u>Desarrollo de sistemas de alimentación: Marco conceptual. <i>Manuel E. Ruiz</i>.....</u>	249
<u>Metodologías para la investigación en la relación reproducción-nutrición. <i>Richard Taylor y Carlos Chaves</i>.....</u>	259

<u>Metodología para ensayos de producción: Crecimiento y engorde. <i>Manuel E. Ruiz</i>.....</u>	<u>269</u>
<u>Diseños experimentales en la nutrición del ganado lechero. <i>Charles J. Wilcox y Harold H. Van Horn</i>.....</u>	<u>289</u>
<u>Recomendaciones sobre sistemas de alimentación. <i>Manuel E. Ruiz, Oswaldo Rosero, Charles Wilcox, Danilo Pezo, Carlos Chaves y Richard Taylor</i>.....</u>	<u>299</u>
<u>Discusión de las recomendaciones del Grupo de Trabajo N° 5...</u>	<u>311</u>
<b><u>CAPITULO VI. EXPERIMENTACION EN FINCAS.....</u></b>	<b><u>315</u></b>
<u>Propuesta metodológica para la investigación pecuaria en fincas de productores. <i>José Zorrilla Ríos</i>.....</u>	<u>317</u>
<u>Recomendaciones sobre aspectos relacionados con la experimentación en fincas. <i>Francisco Romero, Carlos Lascano, Gastón Pichard, Roberto Quiroz, José Zorrilla, Rolain Borel</i>.....</u>	<u>327</u>
<u>Discusión de las recomendaciones del Grupo de Trabajo N° 6...</u>	<u>341</u>

## DEDICATORIA

A



Dr. RODRIGO PARRA RODRIGUEZ

(El Teco)

13 de marzo de 1939 - 26 de febrero de 1988

Después de un paréntesis de cuatro años volví a encontrarme con Rodrigo Parra, en junio de 1987, en una reunión sobre nutrición de rumiantes en el trópico, organizada por el Institute National de Recherches Agronomiques en Guadalupe. La intensidad de nuestra amistad y relación profesional condujo a compartir varias horas en que intercambiamos información técnica y hablamos de planes para el futuro. Recuerdo que me impactó su

V



intención de jubilarse al adquirir ese derecho a fines de 1988. El impacto fue debido a una primera y justificada conclusión: Rodrigo no continuaría bregando en la investigación y enseñanza de la nutrición animal, con lo que el avance del desarrollo tecnológico en este campo se vería afectado, así como las oportunidades de seguir encontrándonos en reuniones técnicas. Sin embargo, Rodrigo disipó rápidamente esos temores al manifestar que, a pesar de su proyectado retiro, él continuaría laborando en la investigación y enseñanza de la nutrición animal, aunque con algo menos de sacrificios personales.

Otro tema cubierto con Rodrigo en Guadalupe fue la realización de un evento futuro: La Reunión de Trabajo sobre Estandarización de Metodología de Investigación en Nutrición de Rumiantes, cuyos resultados se presentan en esta publicación. Rodrigo era uno de los científicos invitados y su responsabilidad tocaba los tópicos sobre Preparación y Almacenamiento de Muestras, Métodos de Determinación de la Materia Seca, Determinación y Fraccionamiento del Nitrógeno en los Alimentos y Determinación de los Componentes Fibrosos del Alimento.

Por la diversidad y complejidad de los tópicos, fue natural que la conversación tocara los matices de su eventual presentación y del producto deseado. Nuevamente llevados por su entusiasmo y desafíos de esa próxima reunión, nos enfrascamos en discusiones que, en sí, fueron de gran provecho para mí y para la orientación de la reunión. El tratamiento que Rodrigo hacía de cada uno de los tópicos exigió que buscáramos asientos contiguos en el pequeño avión que nos llevó de regreso a Trinidad. En este punto, él continuó hacia Venezuela mientras que yo continuaba a Guyana.

El relato anterior tiene como objetivo el ilustrar cuatro características de Rodrigo, que perdurarán en la mente de quienes tuvimos la suerte de conocerlo: En primer lugar, su calor humano, gran amistad y sencillez, que hacían que uno se sintiera como si hubiera sido un compañero desde la infancia...o un hermano. Otra característica fue su profesionalismo y deseo de tratar cada tema con el mayor detalle posible, ligando sus hallazgos con otros de la investigación mundial e identificando nuevos aspectos a dilucidar. Entremezclado con este profesionalismo, siempre fue evidente su entusiasmo contagioso, que ofrecía un contrapeso a la seriedad de los temas y que hacía que las discusiones con él fueran tan amenas y prolongadas. Finalmente, quisiera ilustrar una cuarta característica de Rodrigo: Su pensamiento siempre puesto en el futuro, en el qué y cómo hacer investigación más adelante. En uno de los informes anuales del Instituto de Producción Animal (Universidad Central de Venezuela), Rodrigo escribía en un párrafo introductorio lo siguiente: "Una vez más me toca escribir la presen-

tación....con satisfacción, al pensar que nos encaminamos a desarrollar una actividad cada vez más comprometida con las necesidades del país". En otro, al dar la bienvenida a nuevos colegas señalaba: "para todos ellos nuestras palabras de bienvenida y estímulo, ante la expectativa de su contribución futura". Y, en otro más, al referirse a las investigaciones de los estudiantes de posgrado y pregrado indicaba: "Esa contribución es palpable en términos cualitativos y cuantitativos, y habrá de serla aún mayor en el futuro por venir".

Rodrigo veía en su futuro la participación en la Reunión de Trabajo sobre Estandarización de la Metodología de Investigación en Nutrición de Rumiantes. Originalmente esta reunión se había programado para febrero de 1988, cuando llegaron noticias a principios de ese mes, de que no se encontraba bien de salud, pero que en términos de tres semanas más ya estaría recuperado. Por considerarlo como elemento clave para el éxito del evento, se pospuso éste hasta principios de marzo. Su condición empeoró y en un telex que él enviara a RISPAL el 18 de febrero indicaba: "Problemas de salud se han complicado, terminé 20 días de hospitalización. Recuperación de hepatitis larga y lenta. No puedo comprometerme a asistencia o preparación del trabajo. Esta situación me deprime. Nuevamente excusas por los inconvenientes causados. Les deseo todo éxito. Abrazos de su amigo".

Rodrigo Parra, conocido como "el Teco", nació en Urachiche, Estado de Yaracuy, Venezuela, el 13 de marzo de 1939 y falleció en Caracas el 26 de febrero de 1988. Le sobreviven su distinguida esposa Sra. Ornella La Rocca de Parra y sus hijos Eduardo, Ricardo y Samantha.

Sus estudios primarios y secundarios los efectuó en el Colegio San Ignacio, en Caracas, terminándolos en 1956. Desde 1956 hasta 1959 cursó estudios en la Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Agronomía. Posteriormente continuó estudios en la Universidad de California, donde obtuvo en 1962 el título de Bachelor of Science y luego en 1964, el de Master of Science en Ciencia Animal. Más tarde, bajo la orientación del Dr. Peter Van Soest, llevó a cabo sus estudios de doctorado en la Universidad de Cornell, Nueva York, quedando pendiente la presentación de su disertación. Su afán por fortalecer sus conocimientos lo llevó, en 1969, a tomar un curso en nutrición de rumiantes en el Rowett Research Institute, Aberdeen, Escocia, y otro en 1976, sobre el uso de radioisótopos en nutrición animal, en la Universidad Agraria La Molina, en Lima, Perú.

Después de un breve período como nutricionista investigador en el Ministerio de Agricultura y Cría (enero a agosto de 1964), el Teco ingresó a la UCV como Profesor e Investigador en octubre de 1964 y allí permaneció por el resto de sus días.

Durante su vida profesional Rodrigo recibió muchas distinciones, tan numerosas que su mención detallada ocuparía demasiado espacio y quizás atentaría contra el espíritu personal de esta dedicatoria. Por otro lado, el haberlo conocido permitió intuir que él estaba particularmente orgulloso de haber creado los estudios de posgrado en Producción Animal en las Facultades de Agronomía y Veterinaria de la UCV, de haber sido el Director del Instituto de Producción Animal de 1978 a 1984, de haber fundado las Jornadas Técnicas de dicho Instituto, de haber dirigido innumerables tesis de pregrado y postgrado en nutrición y alimentación de rumiantes, y de haber representado a su Universidad en muchos eventos nacionales e internacionales, tanto de carácter técnico como científico. Justamente, se resalta que él era un amigo de Turrialba, donde estuvo en tres oportunidades: en 1977 como profesor en el Curso Intensivo de Postgrado en Nutrición de Rumiantes, en 1978 también como profesor en otro curso intensivo sobre pastos tropicales y, en 1983 como profesor en el Curso Intensivo de Postgrado en Nutrición de Rumiantes en el Trópico.

Su espíritu colaborador lo llevó a hacerse miembro de varias organizaciones profesionales, que se mencionan a continuación: Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA), Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia, Asociación Venezolana de Nutrición, Asociación Venezolana de Producción Animal y British Society of Animal Production. De 1979 a 1981, Rodrigo ocupó el cargo de Secretario-Tesorero de ALPA.

El legado de Rodrigo, para sus familiares y amigos, fue su conjunto de cualidades personales, algunas de las cuales se mencionaron al inicio de esta dedicatoria. Para los amigos profesionales y otros que no tuvieron el privilegio de conocerlo, su legado lo constituye la formación de tantos profesionales venezolanos y extranjeros, y su obra escrita. Alrededor de 40 artículos o capítulos aparecen en revistas científicas y libros, además de unas 50 comunicaciones a congresos, reuniones y simposios. Muy conocido entre los nutricionistas fue su interés en forrajes de baja calidad, en la *Canavalia ensiformis* y en el chigüire (*Hydrochoerus hydrochaeris*).

El Instituto de Producción Animal y el Departamento de Zootecnia de la Facultad de Agronomía, UCV, decretaron tres días de duelo por la irreparable pérdida de Rodrigo. Los participantes de la Reunión de Trabajo sobre Estandarización de Metodologías de Investigación en Nutrición de Rumiantes, resolvimos dedicar a su memoria la Reunión y el documento que se produjera. Su entusiasmo y espíritu de colaboración nos sirvió de guía a los que en la Reunión participamos, y su recuerdo perdurará en todos los que tuvimos la suerte de conocerlo.

Manuel E. Ruiz  
Secretario Ejecutivo de RISPAL

## PROLOGO

Durante la X Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA), realizada en Acapulco, México, en 1986, se efectuó una mesa redonda con el propósito de discutir aspectos metodológicos de la investigación en nutrición animal.

Entre las recomendaciones del grupo, constituido por 26 científicos socios de ALPA, se destacó la necesidad de uniformizar metodologías y parámetros de evaluación en la investigación en nutrición animal, con el propósito de hacer un uso más eficiente de los pocos recursos disponibles y además facilitar la interpretación y extrapolación de resultados. Para ello, se solicitó el apoyo de ALPA en la organización de una reunión de trabajo, cuyo objetivo fuese el sentar las bases para la uniformización de esta metodología de investigación y la publicación de una guía metodológica. La iniciativa fue tomada con gran beneplácito por la plenaria y la Junta Directiva de ALPA.

En su plan de trabajo para 1987, el entonces Presidente de ALPA, Dr. Armando Cardozo, incluyó la realiza-

ción de una reunión de trabajo sobre Estandarización de Metodología de Investigación en Nutrición Animal. Sin embargo, no fue posible efectuarla como resultado de la dificultad para conseguir financiación específica.

En razón de la importancia del tema para los proyectos que conforman la Red de Investigación en Sistemas de Producción Animal de Latinoamérica (RISPAL), el Dr. Manuel E. Ruiz, Secretario Ejecutivo de RISPAL, incluyó dentro de la programación de actividades de la Red para 1987 la realización de dicha reunión, combinando recursos de los Convenios CATIE/CIID e IICA/CIID, ambos parte constitutiva de RISPAL. Durante la VII Reunión Anual de RISPAL, efectuada en Lima, Perú, en marzo de 1987, el Directorio de RISPAL aprobó la ejecución de la mencionada reunión.

En seguimiento a lo anterior, en abril de 1987 se conformó un grupo de tarea con el fin de definir los temas a tratar y los posibles participantes en la reunión. Luego de tres reuniones, el grupo logró su cometido, y decidió cir-

cunscribir la reunión a rumiantes, por considerar el tema original (Nutrición Animal) de extremada amplitud para ser tratado en una reunión de una semana. En adelante, la organización de la reunión fue responsabilidad de la Secretaría Ejecutiva de RISPAL.

Luego de haber sido pospuesta en dos ocasiones, la Reunión se realizó en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en marzo de 1988. La estrategia seguida consistió en invitar a profesionales de reconocido liderazgo en su campo, cuyo compromiso fue el de elaborar documentos base con propuestas metodológicas acerca de temas específicos y presentarlos a los participantes. Luego de las presentaciones, los participantes se dividieron en grupos de trabajo, de acuerdo a su especialidad e interés, con el fin de discutir las propuestas presentadas y producir las recomendaciones metodológicas.

Esta Guía Metodológica es producto del esfuerzo y dedicación desinteresada de los participantes en la Reunión. La secuencia en que se presentan los diferentes temas, así como los tópicos específicos que dentro de cada tema se consideran, no representan pasos a seguir en un programa de investigación. Las metodologías presentadas en las diferentes secciones de este documento son aquellas consideradas como más deseables y, en ningún momento se pretende que sean consideradas como las únicas alternativas válidas. De hecho, el dinamismo típico del conocimiento tecnológico y la constante generación de

nuevos métodos de análisis, hacen imposible el calificar un método más allá de deseable. Una ilustración de este hecho es que, en las secciones de discusión de las recomendaciones de los grupos de trabajo, se añaden otras de gran valor. Por ello, se solicita al lector que no sólo se consideren los documentos base y los de recomendaciones, sino que también se analice con cuidado las discusiones. La selección de la metodología específica a ser utilizada en un experimento dado debe ser función de los objetivos del experimento y de la responsabilidad del grupo de investigadores involucrados, por lo que la constante capacitación en nuevos métodos de investigación es requisito primordial.

Se espera con esta Guía Metodológica aportar consideraciones y criterios que faciliten la labor de los científicos latinoamericanos que trabajan en Nutrición de Rumiantes y, que a su vez, permita el establecimiento de procedimientos de investigación y análisis más sólidos y uniformes, con lo que se facilitaría la interpretación y el intercambio de información entre los diferentes grupos de investigadores. Sin embargo, debe considerarse que, si bien es cierto que la solidez en los trabajos de investigación y la facilidad de interpretación y de extrapolación de los resultados obtenidos, son metas importantes de lograr, la razón que justifica este esfuerzo es la necesidad de mejorar los sistemas de producción animal en nuestro medio, principalmente aquellos de los estratos más marginados.

## PARTICIPANTES

- Rolain Borel, Ph.D.      Consultor privado  
Apartado 222-1001  
San José, Costa Rica
- Carlos Chaves, Ph.D      Centro Agronómico Tropical de Investigación  
y Enseñanza (CATIE)  
Apartado 74-7170 Turrialba  
Cartago, Costa Rica
- Diego González, Ph.D      Escuela Centroamericana de Ganadería  
Apartado 7 Atenas  
Costa Rica
- María Kass, Ph.D.      Centro Agronómico Tropical de Investigación  
y Enseñanza (CATIE)  
Apartado 74-7170 Turrialba  
Cartago, Costa Rica
- Carlos Lascano, Ph.D      Centro Internacional de Agricultura  
Tropical (CIAT)  
Apartado Aéreo G7-13  
Cali, Colombia
- Félix Ojeda, Ph.D.      Estación Experimental de Pastos y  
Forrajes "Indio Hatuey"  
Central "España Republicana"  
Matanzas, Cuba
- Danilo Pezo, Ph.D.      Centro Agronómico Tropical de Investigación  
y Enseñanza (CATIE)  
Apartado 74-7170 Turrialba  
Cartago, Costa Rica
- Gastón Pichard, Ph.D      Pontificia Universidad Católica de Chile  
Casilla 6177  
Santiago, Chile

- Roberto Quiroz, Ph.D                      Proyecto PISA  
Casilla 388  
Puno, Perú
- Francisco Romero, Ph.D.                  Centro Agronómico Tropical de Investigación  
y Enseñaza (CATIE)  
Apartado 74-7170 Turrialba  
Cartago, Costa Rica
- Oswaldo Rosero, Ph.D                      Universidad del Zulia  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Apartado 526 Maracaibo,  
Edo. Zulia, Venezuela
- Manuel E. Ruiz, Ph.D.                      Instituto Interamericano de Cooperación  
para la Agricultura (IICA)  
Apartado 55-2200 Coronado  
San José, Costa Rica
- Richard Taylor, Ph.D.                      Centro Agronómico Tropical de Investigación  
y Enseñaza (CATIE)  
Apartado 74-7170 Turrialba  
Cartago, Costa Rica
- Arturo Vargas, Mag.Sc.                    Centro Agronómico Tropical de Investigación  
y Enseñaza (CATIE)  
Apartado 74-7170 Turrialba  
Cartago, Costa Rica
- José Zorrilla, Ph. D.                      Department of Animal Science  
Oklahoma State University  
Stillwater, Oklahoma. 32611  
U.S.A.
- Claudio Wernli, Ph.D.                      Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
Universidad de Chile  
Casilla 439-3  
Santiago, Chile
- Charles J. Wilcox, Ph. D.                  Dairy Science Department  
University of Florida  
Gainesville, Florida. 32611  
U.S.A.

## ORGANIZACION DE LA REUNION

- Auspicio:** Principalmente de ALPA y RISPAL, esta última con recursos del CIID e IICA. El CATIE apoyó tanto con recursos técnicos como financieros.
- Sede:** Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica.
- Fecha:** 7-12 de marzo de 1988.
- Organizadores:** Dr. Manuel E. Ruiz, Secretario Ejecutivo de RISPAL, IICA  
Dr. Danilo Pezo, Nutricionista, CATIE

Se encargó a un grupo de nutricionistas, de reconocida trayectoria en el campo, la preparación de documentos sobre diversos tópicos relacionados con la investigación en Nutrición de Rumiantes, en los cuales se resaltasen proposiciones metodológicas de investigación y su justificación. Dichos documentos sirvieron como base para la discusión de los grupos de trabajo, y las recomendaciones de éstos se discutieron en plenaria. Así mismo, se identificaron aspectos o

áreas en los que se requiere generar o perfeccionar la metodología de investigación.

Los participantes se distribuyeron en seis grupos de trabajo, cuyos tópicos fueron: 1) Muestreo y análisis químico; 2) Análisis biológico y tasa de digestión; 3) Consumo y digestibilidad *in vivo*; 4) Conservación de forrajes; 5) Sistemas de alimentación; 6) Experimentación en fincas.



# CAPITULO I

## MUESTREO Y ANALISIS QUIMICO

### GRUPO DE TRABAJO No. 1

Dra. María Kass  
Dr. Félix Ojeda  
Dr. Gastón Pichard  
Dr. Oswaldo Rosero

# DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS NO ESTRUCTURALES

*Gastón Pichard<sup>1</sup> y José Antonio Alcalde<sup>2</sup>*

## 1. Introducción

Las plantas contienen carbohidratos en diferentes estados de polimerización, que van desde monosacáridos hasta polímeros de alto peso molecular, como el almidón, la celulosa, la hemicelulosa y la pectina. Los últimos tres están integrados en la matriz de la pared celular y por lo tanto se les ha denominado carbohidratos estructurales. Son causantes de la fibrosidad del alimento, no están disponibles para el metabolismo energético de la planta, son insolubles en agua, y poseen una fermentabilidad potencial lenta y limitada. La pectina constituye una excepción ya que es completamente fermentable en el rumen.

Los demás carbohidratos, que no forman parte de la pared celular se denominan carbohidratos no estruc-

turales (CNE). Son compuestos activos en el metabolismo de la planta, se almacenan en órganos de reserva y están constituidos principalmente por azúcares libres, almidón y fructanos. Este grupo de carbohidratos posee un potencial de fermentación rápida y total en el rumen, al igual que en el proceso de fermentación del ensilaje. En la planta, este grupo constituye la reserva energética para su metabolismo y crecimiento. Diversos carbohidratos componen este grupo, cuyas características de configuración son diferentes, principalmente por su grado de polimerización, por presentar anillos furanosos o piranosos, por los tipos de enlace ( $\alpha$ 1-4,  $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 2-6), por la linealidad de la macromolécula y grado de ramificación en el carbón 6. Estas características modifican la solubilidad y susceptibilidad a hidrólisis de los carbohidratos y, en consecuencia, explican la necesidad de utilizar

---

<sup>1</sup>Ph. D. Coordinador Proyecto Universidad Católica de Chile/CIID, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

<sup>2</sup>Ing. Agr. Investigador, Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

metodologías analíticas adecuadas para describir la composición del sustrato. La complejidad analítica puede llegar a ser muy alta, pero desde el punto de vista de utilización en el tracto digestivo de los rumiantes, el comportamiento de los diferentes CNE es bastante similar, existiendo principalmente diferencias en su velocidad de degradación.

Para describir la fracción de CNE, comúnmente se han utilizado otros términos como carbohidratos solubles en agua y carbohidratos disponibles totales. En el primer caso esto es un error, ya que los carbohidratos solubles en agua excluyen aquella parte del almidón no soluble en agua (amilopectina). Sólo en algunas especies gramíneas, donde el contenido de amilopectina es insignificante, ambas fracciones coinciden, pero éste no es el caso general. Por otra parte, el término carbohidratos disponibles totales es confuso, ya que en la planta esta fracción coincide con los CNE, pero para el animal parte de los carbohidratos estructurales también son disponibles. En este sentido, el término CNE es más apropiado y menos confuso para agrónomos y fisiólogos vegetales. A pesar de no ser sinónimo, el término carbohidratos solubles en agua puede ser de gran utilidad, especialmente en el estudio del ensilaje, debido a que éstos carbohidratos son los fermentados en mayor grado. ¿En qué medida es este supuesto cierto? No existe suficiente información al respecto, pero hasta el momento, parece ser un buen indicador del potencial de fermentación rápida.

La determinación de los CNE en el tracto digestivo de los rumiantes se complica porque en la digesta aparecen productos de la degradación microbial de los carbohidratos estructurales, al igual que carbohidratos de su propia síntesis y secreciones endógenas del animal, que fácilmente se pueden confundir con los de la dieta. Los estudios de degradación del almidón frecuentemente encuentran este problema.

Los métodos analíticos para carbohidratos se basan en sus características de solubilidad en agua o solventes, y su susceptibilidad a hidrólisis ácida, alcalina o enzimática, con la determinación posterior de los monómeros resultantes.

Este trabajo está dirigido a la investigación en las áreas de nutrición y de manejo y utilización de praderas y cultivos forrajeros. En consecuencia, se propone un sistema de fraccionamiento de CNE de acuerdo a su degradabilidad microbiana en el rumiante y en el ensilaje, así como una metodología para su determinación en tejidos de la planta. A su vez, se entregan antecedentes para una mejor comprensión de la metodología analítica y así evitar errores en la determinación de este tipo de carbohidratos.

## **2. Fundamentos para la metodología analítica**

Las gramíneas de origen templado acumulan fructosanos como principal carbohidrato de reserva, mientras

que las de origen tropical y las leguminosas lo hacen como almidón. El contenido de fructosanos en éstas últimas es nulo, en cambio las gramíneas templadas también acumulan una cierta cantidad de almidón. Generalmente, el almidón almacenado por las plantas es predominantemente amilopectina. Sólo en el tejido vegetativo de algunas especies de gramíneas tropicales (maíz y sorgo) la amilosa predomina sobre la amilopectina.

De los azúcares libres presentes en las plantas forrajeras, la glucosa, la fructosa y la sacarosa constituyen casi la totalidad, y la glucosa y la fructosa casi la totalidad de los azúcares reductores libres. Otros azúcares libres como maltosa, melobiosa, rafinosa y estaquiosa ocurren sólo en cantidades muy bajas. La glucosa y la fructosa son los principales monosacáridos presentes en las plantas, pero en cantidades siempre bajas (1 a 3%) comparadas con la sacarosa que puede constituir la mayor fracción de los carbohidratos de reserva, con niveles de 2 a 8% (Cuadro 1).

Los componentes monoméricos de los CNE son casi totalmente glucosa y fructosa (Cuadro 3). La galactosa se encuentra en muy bajas cantidades, provenientes de oligosacáridos como melobiosa, rafinosa y estaquiosa. Las pentosas como arabinosa y xilosa, al igual que galactosa y manosa, se encuentran como polímeros en hemicelulosa y pectina.

En el Cuadro 2 se han resumido las características de solubilidad en agua y en etanol para los carbohidratos más frecuentemente encontrados en los alimentos de origen vegetal, de donde se puede sugerir cuál método de extracción es más adecuado para un determinado sustrato, o bien, cuáles son las principales limitaciones e interferencias que se pueden encontrar. Así por ejemplo, se observa que la extracción acuosa es aplicable para obtener azúcares y fructosanos, pero sólo extrae parcialmente el almidón, por lo que su aplicabilidad debe ser considerada en función del nivel y tipo de almidón presente en el forraje. La extracción con etanol 80% es eficaz para obtener los azúcares libres, pero

**Cuadro 1. Contenido de CNE en las plantas.**

Componentes	Gramíneas tropicales	Gramíneas templadas	Granos cereales	Leguminosas
Azúcares	5	10	trazas	5 - 15
Almidón	1 - 5	1 - 6	80	1 - 7
Fructuosanos	0	1 - 25	0	0

Fuente: Van Soest (1982) y Smith (1973a).

contaminados con leván de bajo peso molecular (PM). La concentración crítica de etanol para separar azúcares libres de fructosanos es difusa, ya que a medida que su concentración aumenta los fructosanos se hacen menos solubles, pero los azúcares libres también. Para gramíneas que acumulan leván de alto PM (*Dactylis*, *Poa*, *Phleum*, *Agrostis*, *Phalaris*, etc.) la concentración de etanol más recomendable para separar azúcares libres de

fructosanos es 85%, mientras que para gramíneas que acumulan leván de bajo PM (*Bromus*, *Festuca*, *Lolium*, *Agropyron*, *Hordeum*, etc.) un 90% es más recomendable (Smith y Groteleuschen, 1966). Por otro lado, a menor PM de los fructosanos mayor es su solubilidad en etanol, por lo que es posible extraerlos de menor a mayor PM en concentraciones cada vez menores de etanol.

**Cuadro 2. Solubilidad en agua y en etanol de los principales carbohidratos no estructurales.**

Carbohidrato	Solubilidad			
	Agua		Etanol	
	25°C	60°C	80%	90%
<b>Azúcares libres</b>				
Glucosa (C <sub>6</sub> ) <sup>1</sup>	Sol.	Sol.+	Sol.	Sol.-
Fructosa (C <sub>6</sub> ) <sup>1</sup>	Sol.	Sol.+	Sol.	Sol.-
Sucrosa (C <sub>12</sub> )	Sol.	Sol.+	Sol.	Sol.-
Maltosa (C <sub>12</sub> ) <sup>1</sup>	Sol.	Sol.+	Sol.	Sol.-
<b>Almidones</b>				
Amilosa (50-20 000xC <sub>6</sub> )	Sol.	Sol.+	Insol.	Insol.
Amilopectina (2000-220 000xC <sub>6</sub> )	Insol.	Insol.	Insol.	Insol.
<b>Fructosanos</b>				
Leván (bajo PM) <sup>2</sup>	Sol.+	Sol.+	Sol.+	Insol.
Leván (alto PM)	Sol.+	Sol.+	Insol.	Insol.
Inulina (PM 5 000)	Sol.	Sol.+	Insol.	Insol.

<sup>1</sup>Azúcares reductores; + = mayor solubilidad, - = menor solubilidad.

<sup>2</sup>Peso molecular.

Para la extracción del almidón tanto el agua como las soluciones etílicas son ineficaces. Más aún, se observan solubilizaciones parciales (aproximadamente 20% de la amilopectina en agua caliente, por ejemplo) que no son posibles de integrar en métodos analíticos cuantitativos. El uso de ácidos para la hidrólisis de almidones es igualmente inconveniente porque no se consigue su hidrólisis total y solubilizan carbohidratos estructurales que interfieren en los resultados. Concentraciones 2 N de  $H_2SO_4$  o superiores hidrolizan hemicelulosa, liberando galactosa, arabinosa y xilosa, lo que es un inconveniente al determinar CNE totales (Groteleuschen y Smith, 1967). Sólo el tratamiento enzimático de la muestra es capaz de extraer completamente el almidón, sin los inconvenientes que presenta la hidrólisis ácida.

La takadiastasa es una preparación enzimática obtenida de *Rhizopus* sp. con actividad  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa, oligo 1-6 glucosidasa, invertasa,

maltasa y, posiblemente, melibiasa (Groteleuschen y Smith, 1967). La incubación con sólo esta enzima permite hidrolizar los disacáridos, trisacáridos y almidones produciendo monómeros de glucosa y fructosa. Los fructosanos no son atacados por la takadistasa, pero su tratamiento con ácido débil (0.005 N  $H_2SO_4$  por 60 min. a 99°C) permite su conversión total a fructosa. En consecuencia, la hidrólisis enzimática y ácida convierten los CNE a glucosa y fructosa (Cuadro 3).

La medición de monómeros totales (glucosa y fructosa), puede realizarse por varios métodos, pudiendo citarse la determinación de hexosas totales, la determinación de azúcares reductores, la cromatografía y la determinación individual por métodos enzimáticos.

La determinación de hexosas totales puede realizarse por el método de la antrona (Dische, 1955; Bailey, 1958) o por el fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Debido a su reacción vio-

**Cuadro 3. Constituyentes monoméricos y agentes hidrolíticos para el análisis de carbohidratos no estructurales**

CNE	Agente hidrolítico	Producto final
<b>Azúcares Libres</b>		
Glucosa	-	Glucosa
Fructosa	-	Fructosa
Sacarosa	Acido débil o invertasa	Glucosa + Fructosa
Maltosa	Maltasa o ácido	Glucosa
Almidones	Amiloglucosidasa	Glucosa
Fructosanos	Acido débil	Glucosa + Fructosa

lenta y a un cierto grado de no especificidad, estos métodos pueden tener imprecisiones a menos que el extracto esté libre de impurezas.

Los principales métodos usados para la determinación de azúcares reductores se basan en la reducción de cobre con titulación. Ellos son el Shaeffer-Somogyi (Smith, 1969) y el Munson-Walker (AOAC, 1984). El método Nelson-Somogyi también se basa en la reducción de cobre pero usa espectro-fotometría (Nelson, 1944). Otros métodos se basan en la reducción de ferrocianuro (FCN) o PAH-BAH (ácido p-hidroxibenzoico hidrazina) incorporados en sistemas auto-analíticos (Trent y Christiansen, 1986). De los métodos clásicos el de Shaeffer-Somogyi es el más recomendado por ser sencillo, fácilmente duplicable y porque los métodos colorimétricos presentan interferencias en su lectura por sustancias contaminantes (Smith, 1969). Debe considerarse que los azúcares reductores tienen distinto poder reductor y que para obtener una estimación sin errores es necesario conocer la proporción de éstos (Smith, 1981, citado por Trent y Christiansen, 1986). Por cromatografía en papel es posible estimar su proporción y así comparar la medición con el patrón correcto. En general se hace caso omiso de este hecho y se utiliza como patrón una solución de glucosa o fructosa, según cuál sea más abundante en la muestra.

En la actualidad existen otros métodos para la determinación de monosacáridos y otros azúcares, como

los cromatográficos y los enzimáticos. Los cromatográficos presentan claras ventajas, pero requieren equipo especial, y serán tratados más adelante en este documento. Los métodos enzimáticos son una alternativa sencilla, de alta precisión y generalmente de rápida ejecución; sin embargo, cada compuesto debe determinarse individualmente. Actualmente existen preparaciones enzimáticas para la determinación de carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos (Boehringer, 1984). Entre los que interesan para la determinación de CNE figuran la glucosa, la fructosa, la sacarosa, la maltosa y el almidón. La glucosa se determina por glucosa-deshidrogenasa, con la posterior determinación de  $\text{NADH}_2$  por espectrofotometría. La fructosa se determina por isomerización a glucosa y glucosa-hidrogenasa, restando el contenido de glucosa original. La sacarosa se determina por tratamiento con invertasa y posterior medición de glucosa y fructosa. La maltosa se determina por maltasa y el almidón por amilo-glucosidasa, con la posterior determinación en ambos casos de glucosa por glucosa-deshidrogenasa.

En consecuencia, basándose en la solubilidad diferencial en etanol de las distintas fracciones, en la especificidad de hidrólisis de la takadiastasa y en la hidrólisis de fructosanos con ácido débil, es posible reducir cada fracción a sus componentes monoméricos y su posterior determinación. Sin embargo, desde el punto de vista de la nutrición, esta información puede ser innecesaria y posiblemente sea más lógico englobar en un sólo grupo a

todos los CNE, cuya fermentabilidad es rápida y elevada, y por otro lado un grupo de fermentación más lenta. Este último puede ser relevante en caso de dietas con alto contenido de almidón, cuyo escape a la fermentación ruminal y utilización global en el animal puede ser importante. Esta separación también tiene sentido en materiales a ensilar, donde la presencia de carbohidratos rápidamente fermentables es necesaria para conseguir un buen ensilado. La degradabilidad de estos carbohidratos no es similar para todos los carbohidratos agrupados de acuerdo a su estructura química. Por ejemplo, los distintos tipos de almidón y fructosanos tienen distintas velocidades de degradación, e incluso la molécula de amilopectina tiene zonas rápidamente degradables y otras de degradación más lenta. Por esta razón, la separación de CNE de acuerdo a su degradabilidad debe seguir más bien las características de solubilización y facilidad de ataque enzimático, en vez de las de estructura química, sin importar que carbohidratos pertenecientes a un mismo grupo químico, o que partes de un mismo carbohidrato, queden separadas en distintos grupos. Desde el punto de vista nutricional, el análisis metodológico debe simular la degradación de estos compuestos.

### **3. Propuesta para determinar carbohidratos no estructurales totales y sus fracciones en la planta**

Los CNE totales y sus fracciones (azúcares libres, almidón y fructosanos) pueden determinarse con una

metodología analítica sencilla. En la Figura 1 se presenta un esquema de dicha metodología, basada en la de Weinmann (Marais, 1969), modificada por Smith (1969). Primero se gelatiniza el almidón de la muestra en agua, por 1 ó 2 minutos en baño de agua hirviendo. Luego se incuba con takadiastasa a pH 4.5 por 44 h a 37°C. Se filtra, se desproteíniza el extracto con acetato de plomo y se centrifuga. En seguida, se trata el sobrenadante con ácido débil ( $0.005 \text{ NH}_2\text{SO}_4$ ) por 60 minutos en baño de agua hirviendo, se neutraliza con NaOH y se miden azúcares reductores por el método de Shaeffer-Somogyi. Estos azúcares reductores corresponden a monómeros de todos los CNE presentes en la muestra. Si se desea conocer glucosa y fructosa por separado, se mide glucosa por glucosa-oxidasa en el sobrenadante después de la hidrólisis ácida, y se estima fructosa como la diferencia entre glucosa y azúcares reductores totales. También, se puede determinar la glucosa y la fructosa por medios enzimáticos (Boehringer, 1984).

Para medir azúcares libres (Figura 2) se realiza una extracción de estos con una solución de etanol, al 85% para gramíneas que acumulan fructosanos de alto PM o 90% para las que los acumulan de bajo PM. En el caso de especies que no acumulan fructosanos (leguminosas, gramíneas tropicales y subtropicales) es suficiente usar soluciones de etanol al 80 u 85% (Groteleuschen y Smith, 1967). Luego se evapora el etanol de la solución y se trata con ácido débil ( $0.005$



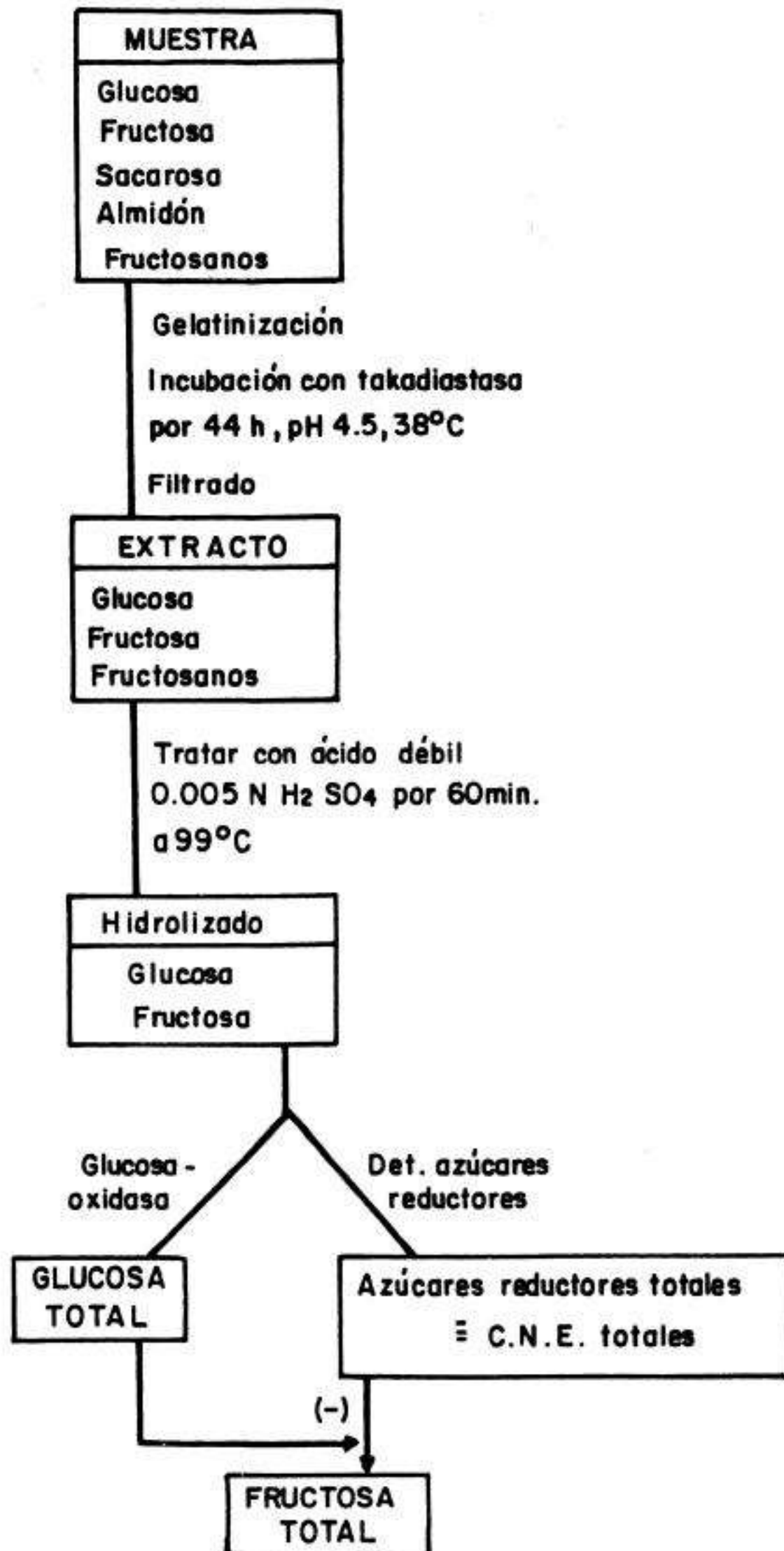
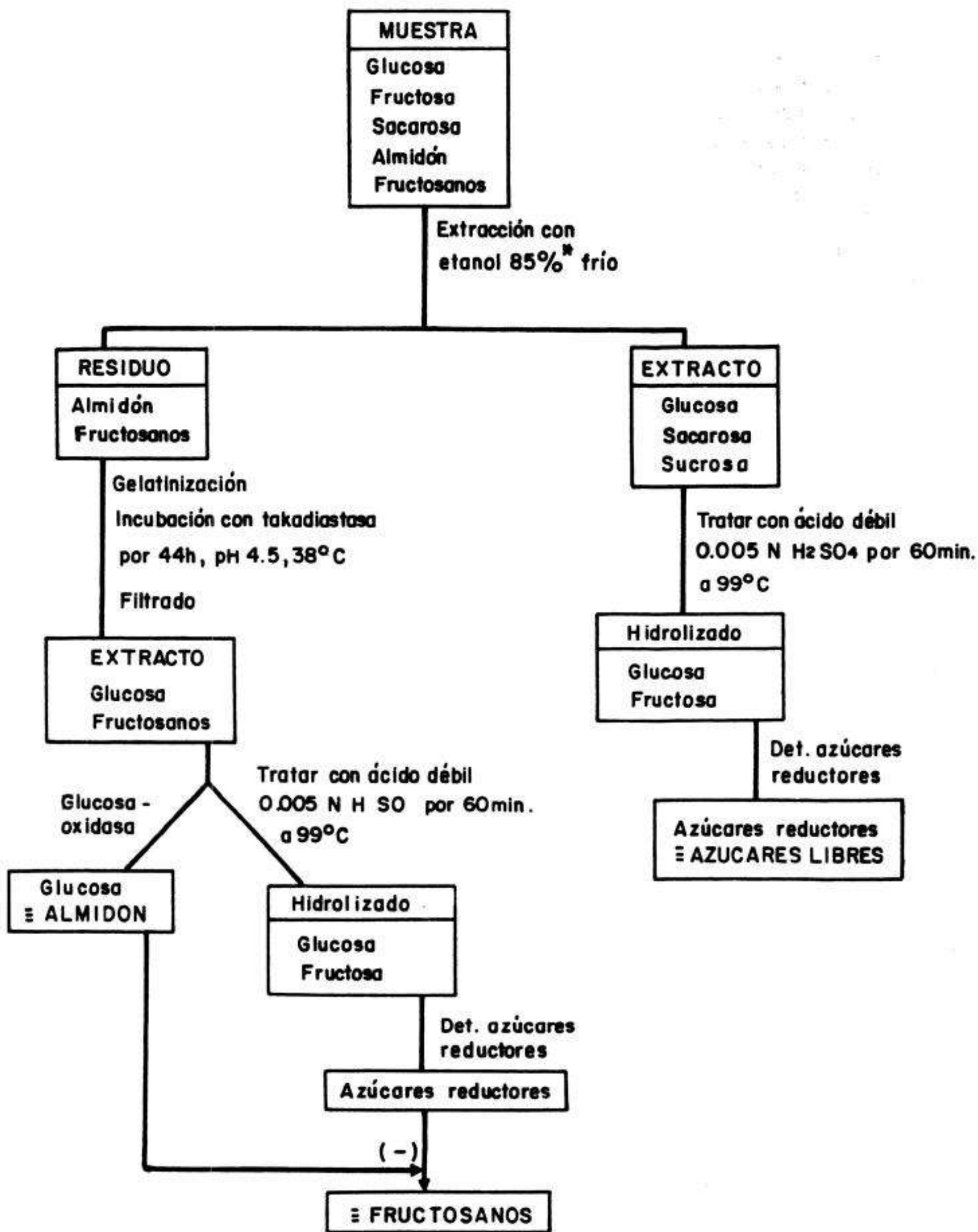


Fig. 1 Determinación de carbohidratos no estructurales totales en tejidos vegetales



\* En especies que acumulan fructosanos de bajo peso molecular usar 90% etanol

Fig. 2 Determinación de azúcares libres, almidón y fructosanos en tejidos vegetales

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 60 minutos a 90°C) para hidrolizar azúcares no reductores (sacarosa). La evaporación del alcohol evita reacciones con el ácido. Finalmente se determina el poder reductor (método Shaeffer-Somogyi). Alternativamente, se pueden determinar glucosa, fructosa y sacarosa (y maltosa) enzimáticamente.

La determinación de almidón se realiza incubando el residuo con taka-diastasa (Figura 2). El residuo debe secarse para evitar la inactivación de la enzima por el etanol, se gelatiniza en agua hirviendo y se procede con la incubación anteriormente indicada. Luego se filtra y desproteiniza el extracto para finalmente medir la glucosa liberada en la hidrólisis usando glucosa-oxidasa o glucosa-deshidrogenasa. En seguida se trata el filtrado con ácido débil para hidrolizar los fructosanos y se determinan azúcares reductores. La estimación de fructosanos en la muestra se realiza restando a los azúcares reductores la glucosa hidrolizada del almidón. Para una determinación más precisa de fructosanos, se pueden determinar enzimáticamente la glucosa y fructosa liberadas por la hidrólisis con ácido débil. Este método no posee la misma precisión que el análisis de los productos de hidrólisis por cromatografía, pero permite una estimación aceptable.

#### **4. Propuesta para determinar carbohidratos no estructurales en ensilajes, alimentos, digesta y fecas de rumiantes**

Como se indicara anteriormente, un fraccionamiento de acuerdo a la degradabilidad de los CNE tiene más

sentido en la nutrición de rumiantes y la elaboración de ensilajes, que una agrupación por composición química. Los CNE pueden dividirse en un grupo de degradación rápida, otro de degradación lenta y otro de no degradables. En el Cuadro 4 se propone una caracterización de los distintos tipos de carbohidratos según su facilidad relativa de degradación.

En el grupo de degradabilidad rápida se encuentran la totalidad de los azúcares libres y fructosanos de bajo PM, la mayor parte de la amilosa y fructosanos de alto PM, y una pequeña proporción de la amilopectina, correspondiente a zonas de la molécula de mayor facilidad de ataque enzimático y de mayor solubilidad. En el grupo de degradabilidad más lenta se encuentra la mayor parte de la amilopectina, y una pequeña proporción de amilosa y fructosanos de alto PM, que por su tamaño molecular, sus enlaces y distribución espacial, presencia de puentes de hidrógeno y fuerzas intermoleculares presentan una solubilización e hidrólisis enzimática más lentas. Entre los no degradables se encuentran, por ejemplo, la manoheptulosa y la D-glicero-manoctulosa presentes en la alfalfa (Rendig *et al.*, 1964). Estos y otros azúcares no degradables por los rumiantes se encuentran en cantidades trazas y no tienen mayor impacto.

La solubilidad de los carbohidratos generalmente guarda una relación estrecha con la facilidad de ataque enzimático y su rapidez de fermentación. Probablemente en la prác-

**Cuadro 4. Degradabilidad relativa de los carbohidratos no estructurales en el rumen y en los ensilajes.**

Carbohidrato	Degradabilidad	
	Rápida	Lenta
Azúcares libres	****	-
Almidón		
Amilosa	***	*
Amilopectina	*	***
Fructosanos		
Bajo PM <sup>1</sup>	****	-
Bajo PM	***	*

<sup>1</sup>Peso Molecular

tica, la forma más sencilla de separar estos grupos es por solubilización en agua fría. Esta metodología, basada en la de Smith (1971), se esquematiza en la Figura 3 y separa los CNE en dos grandes grupos: los solubles y los insolubles en agua, que corresponden a aquellos cuya degradabilidad relativa sería rápida y lenta, respectivamente. Consiste en agitar la muestra en agua destilada durante 1 hora a temperatura ambiente y filtrar. El extracto se incuba con takadiastasa, como ya se ha indicado. El hidrolizado se desproteíniza, centrifuga y filtra, tratando luego con ácido débil para hidrolizar fructosanos. Finalmente se mide el poder reductor y se obtiene el valor de CNE solubles en agua como azúcares reductores. La glucosa y la fructosa también podrían determinarse enzimáticamente (Boehringer, 1984).

Los CNE insolubles en agua se determinan incubando el residuo con takadiastasa. Para esto, se agrega

agua al residuo, se hace hervir por unos minutos para gelatinizar el almidón, se incuba con takadiastasa, se filtra y se desproteíniza. Luego se trata con ácido débil para hidrolizar fructosanos de alto PM no extraídos por el agua, y finalmente se mide el poder reductor, o glucosa y fructosa, para obtener el valor de CNE insolubles en agua.

#### a. Aplicaciones e interferencias

La metodología antes descrita puede aplicarse sin inconvenientes para el análisis de CNE en la mayoría de los alimentos, forrajes y ensilajes, cualquiera sea su contenido de almidón, fructosanos y azúcares libres. Sin embargo, algunos alimentos, como pulpas de frutas, pueden contener cantidades considerables de alcoholes azúcares como manitol y sorbitol, que son reductores (Piccaglia y Galletti, 1988). En este caso, el análisis cromatográfico

tográfico o la determinación enzimática con preparaciones específicas son de gran ayuda.

En la digesta y fecas aparecen carbohidratos provenientes de la actividad microbiana y de secreciones endógenas del animal. La acción de los microorganismos sobre los carbohidratos estructurales libera hexosas (glucosa, galactosa, manosa, etc.) y pentosas (xilosa, arabinosa, etc.), las que se suman a las de su propia síntesis (ramnosa, ribosa, manosa, glucosa y galactosa) y los de degradación de mucus. El mayor aporte microbiano a los CNE de la dieta lo constituyen los  $\alpha$ -dextranos, polímeros  $\alpha$ -glucosa con probable participación de galactosa (McAllan y Smith, 1974), que constituyen polisacáridos de reserva. Mientras el resto de los azúcares microbianos permanece relativamente constante, los  $\alpha$ -dextranos presentan gran variación. La cantidad y solubilidad del nitrógeno y las fuentes de energía en la dieta, afectan la tasa de síntesis microbiana y la acumulación de carbohidratos en los microbios, (Pichard, 1977). Además, existe una fuerte variación según el contenido de carbohidratos en la dieta y el tiempo post alimentación. Con concentrados en la dieta su acumulación es mayor, alcanzando un máximo 4 a 6 horas después de la ingestión (McAllan y Smith, 1974). Cuando el contenido de almidón en la dieta es bajo, como en el caso de forrajes, el  $\alpha$ -dextrano puede constituir una alta proporción del  $\alpha$ -dextrano en la dieta, llevando a una subestimación de su digestibilidad. En terneros alimentados con cereales y

forraje, se ha estimado el aporte de  $\alpha$ -dextranos de origen microbiano en el duodeno en alrededor de 100 g/día. La digestibilidad de estos polímeros se ha estimado en un 65%, lo que implica una aparición considerable en las heces. Además de estos  $\alpha$ -dextranos, otros polisacáridos aportados por glicoproteínas del mucus pueden interferir en la determinación de CNE en la digesta y fecas. Estas contienen ácido siálico, aminoazúcares, galactosa, manosa y fucosa (Van T'Klooster y Gaillard, 1976).

La determinación de azúcares libres y fructosanos residuales de la dieta en la digesta y fecas no tiene sentido, ya que los de la dieta se degradan rápidamente. Los carbohidratos de origen microbiano y de degradación de carbohidratos estructurales poseen una complejidad mayor que los de la dieta, por lo que es necesario recurrir a técnicas cromatográficas. La determinación de almidón en la digesta y fecas puede realizarse por incubación con takadiastasa y la medición de glucosa por glucosa-oxidasa o glucosa-deshidrogenasa, separando previamente los microorganismos de la muestra, para evitar sobreestimaciones.

## **5. Obtención y tratamiento de la muestra**

### **a. Muestreo de plantas**

Los niveles y composición de carbohidratos no estructurales varían en los forrajes a lo largo del día, de uno a

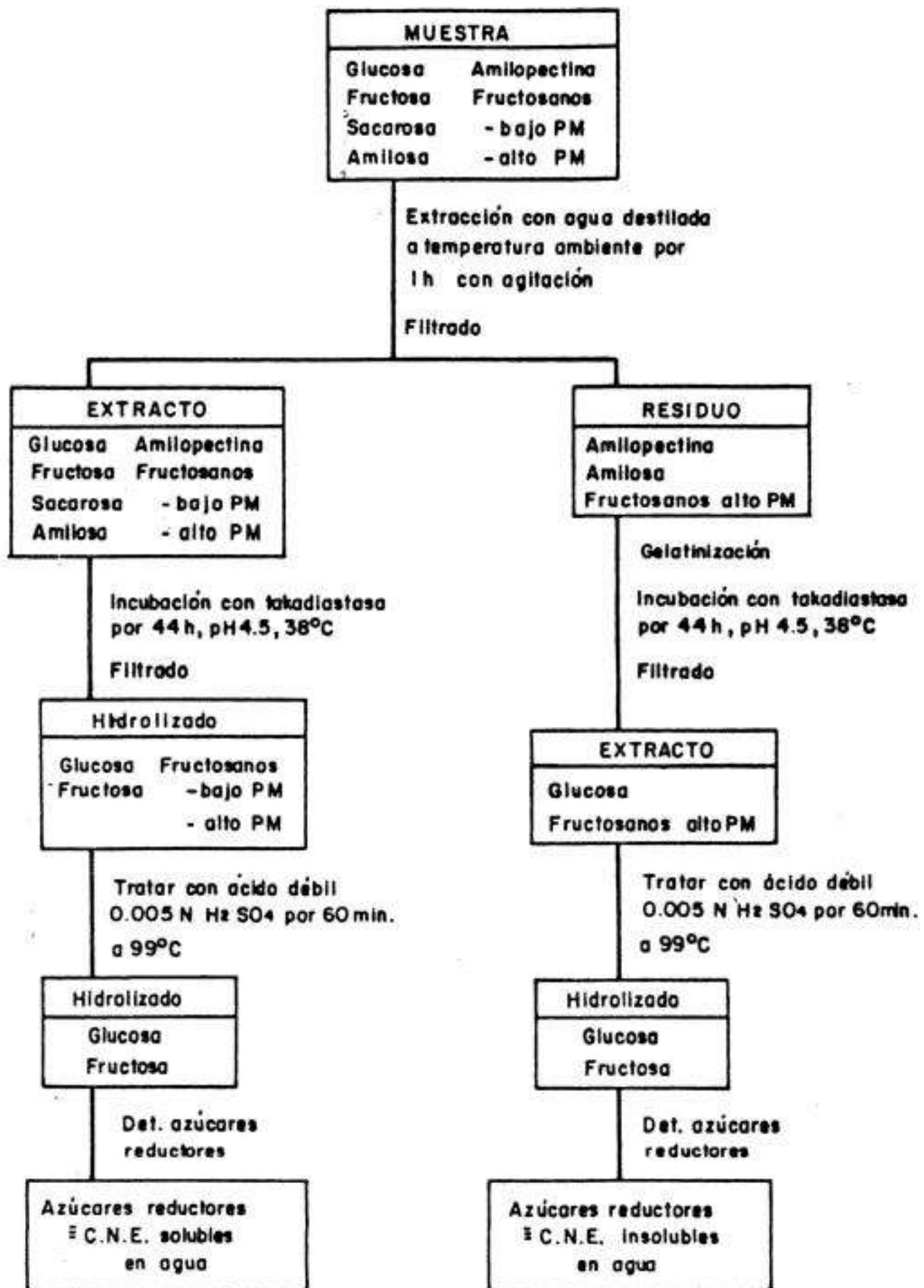


Fig. 3 Esquema analítico para la determinación de carbohidratos solubles e insolubles en agua

otro día, de una a otra estación, en diferentes órganos de la planta y, por supuesto, en diferentes plantas. La inestabilidad en estos compuestos es mucho mayor que en los niveles de proteína, de fibra o de minerales, y se debe a su relación estrecha con la tasa de fotosíntesis, la tasa respiratoria y los procesos de translocación en la planta. Por lo tanto, la obtención de muestras en la pradera debe planificarse para permitir las comparaciones o estudios que se desean hacer.

#### **b. Secado y almacenamiento de muestras**

Una vez cosechadas las muestras deben someterse rápidamente a un tratamiento que inactive los sistemas enzimáticos de la planta. Para esto la muestra puede ser inmersa en alcohol hirviendo, sometida a calentamiento o congelada. El calentamiento rápido o la inmersión en alcohol hirviendo son los más efectivos para detener la actividad enzimática en los tejidos (Collins y Shorland, 1945). Ambos tratamientos desnaturalizan las proteínas, sin embargo, el alcohol solubiliza carbohidratos, lo que puede significar una complicación para el análisis.

Idealmente la muestra debe analizarse en fresco, en el menor tiempo posible. Si esto no fuera posible, debe secarse para su almacenamiento, tratando de minimizar este período. El secado puede realizarse con estufa de aire forzado o por liofilización. Las pérdidas durante el secado son menores con liofilización que con calenta-

miento; sin embargo, la primera produce un aumento en la solubilidad de la amilopectina por alteración de su estructura (Smith, 1973b), lo que puede inducir a errores en la determinación de la solubilidad de carbohidratos. Por ello, no es recomendable cuando interesa separar los CNE de acuerdo a su solubilidad. Otra alternativa sería almacenar las muestras frescas en alcohol, previa desnaturalización de enzimas en alcohol hirviendo. Las pérdidas en el almacenaje con este método son mínimas y se evitan las pérdidas que ocurren durante el secado, sin embargo, la solubilización de carbohidratos en alcohol puede ser un inconveniente, por lo que es aplicable sólo cuando se determinan CNE totales y no sus fracciones

Las pérdidas de carbohidratos que ocurren durante el secado pueden ser termoquímicas, enzimáticas o por respiración. Bajo los 50°C ocurren pérdidas enzimáticas y por respiración, y sobre los 80°C ocurren las termoquímicas. El secado en estufa con aire forzado a una temperatura constante de 70°C es comúnmente usado; sin embargo, las pérdidas enzimáticas son mayores respecto a un calentamiento previo a 100°C por un período breve (Raguse y Smith, 1965). El calentamiento a 100°C por un período corto (1 a 2 h), seguido de temperaturas de 60-70°C, hasta completar el secado, siempre con aire forzado, es más recomendable (Smith, 1973b). Debe tenerse especial cuidado con materiales de secado rápido como hojas y brotes, en que la exposición a temperaturas de 100°C, cuando se está al-

canzando, el secado pueden traducirse en fuertes pérdidas (Smith, 1969).

El almacenaje debe realizarse en envases sellados inmediatamente luego de terminado el secado. Las pérdidas en el almacenaje aumentan por la temperatura, el nivel de humedad y la duración del período. La liofilización sólo inactiva las enzimas, por lo que es recomendable almacenar las muestras liofilizadas en congelación, y por períodos breves, especialmente si el secado no es total.

Previo a su análisis, las muestras deben molerse finamente para facilitar la solubilización y el ataque enzimático de los carbohidratos.

### **c. Tratamiento de muestras de digesta, fecas y ensilaje**

El muestreo de digesta debe realizarse cuidadosamente, ya que, dependiendo del lugar de donde se extraiga la muestra, las variaciones pueden ser importantes. Normalmente, la determinación post ruminal de carbohidratos se realiza extrayendo digesta del duodeno. Posiblemente la extracción a la salida del rumen sea la más adecuada, ya que la hidrólisis ácida de carbohidratos en el abomaso puede interferir con los resultados. Además de esto, la digesta puede presentar variaciones en su contenido de carbohidratos, según el tiempo transcurrido después de la ingestión de alimento. La obtención de las muestras debe realizarse cuidadosamente para evitar errores y permitir comparaciones válidas.

En el tratamiento de muestras de digesta, fecas y ensilajes, puede haber pérdidas de compuestos volátiles, produciéndose errores en la determinación de la materia seca, si el secado se realiza en estufa. El análisis de estas muestras puede seguir los mismos métodos indicados para tejidos vegetales, previa determinación del contenido de materia seca por destilación con tolueno, siempre que adicionalmente no se desee determinar sustancias volátiles en el análisis. Si ésto fuera así, sería necesario usar la cromatografía.

## **6. Métodos cromatográficos**

Existen varias técnicas cromatográficas para determinar cuantitativamente varios carbohidratos en forma simultánea. Las más importantes son la cromatografía en fase gaseosa de alta resolución (CGAR), la cromatografía de capa fina (CCF) y la cromatografía líquida de alta presión (CLAP). La CGAR requiere la derivación del sustrato con trimetilsilil o acetato, antes de la separación, lo que produce anomerizaciones que en algunos casos pueden dificultar la identificación y recuperación de los azúcares. Su resolución es alta pero, dado su alto costo en equipo y funcionamiento, se recomienda sólo para el análisis de muestras con carbohidratos desconocidos (Piccaglia y Galletti, 1988)

La CCF se basa en la migración diferencial de los azúcares con solventes en placas de sílica gel, celulo-



sa, NH<sub>2</sub>-propil sílica, o de intercambio iónico. Después de la separación de los productos en la placa, se derivan para medirlos por fluorescencia, índice de absorción o detección ultravioleta. Este método es muy sencillo cuando sólo se quiere estimar su concentración, comparándola con patrones conocidos. Sin embargo, para una cuantificación real se requiere de equipo extra de alto costo, que consiste en un sistema "scanner" que permite detectar y cuantificar los distintos azúcares a través de un barrido sobre la placa.

La CLAP se adecúa más al análisis rutinario, y en corto tiempo produce información completa de los carbohidratos presentes. La identificación y cuantificación de los productos se realiza por el índice de refracción o por detección ultravioleta y tiempo de retención. Mientras que la detección ultravioleta es más sensible para ácidos orgánicos, el índice de refracción es más sensible para azúcares. Existe un cierto grado de interferencia entre glucosa, galactosa, manitol y sorbitol, entre ácido butírico y etanol, y entre xilosa y arabinosa, por tener tiempos de retención similares. Es posible hacer una derivación post columna por bombeo diferencial de reactivos al salir los productos de la columna, y así obtener una determinación más precisa y sin interferencias.

También se ha usado la resonancia nuclear magnética. Su costo en equipo y mantención es mayor que para la CLAP, requiriendo de mues-

tras más grandes y, la determinación demora más (Tamate y Bradbury, 1985)

## 7. Referencias

- AOAC. 1984. Official methods of analysis. Ed. by S. Williams. Arlington, Virginia, EE.UU., Association of Official Analytical Chemists. p. 56.
- BAILEY, R.W. 1958. Reaction of pentoses with anthrone. *Biochemistry Journal* 68:669.
- BOEHRINGER. 1984. Methods of enzymatic food analysis. Boehringer, Mannheim G.m.b.H., West Germany. 79 p.
- COLLINS, F.D.; SHORLAND, F.B. 1945. Investigations of methods of preservation of grass. *New Zealand Journal of Science and Technology* 26:372.
- DISCHE, Z. 1955. New color reactions for the determination of sugars in polysaccharides. *In* Methods of biochemical analysis. v. 2. Ed. by D. Glick. New York, EE.UU., Interscience Publishers. p. 313.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350.

- GROTELEUSCHEN, R.D.; SMITH, D. 1967. Determination and identification of nonstructural carbohydrates removed from grass and legume tissue by various sulfuric acid concentrations, takadiastase and water. *Agriculture and Food Chemistry* 15:1048.
- LINDAHL, I.; DAVIS, R.E.; SHEPHERD, W.O. 1949. The application of the total available carbohydrate method to the study of carbohydrate reserves of switch cane (*Arundinaria tecta*). *Plant Physiology* 24:285.
- MacALLAN, A.B.; SMITH, R.H. 1974. Carbohydrate metabolism in the ruminant: Bacterial carbohydrates formed in the rumen and their contribution to digesta entering the duodenum. *British Journal of Nutrition* 31:77.
- MARAIS, J.P. 1969. The Weinmann method for the determination of total available carbohydrates in plant material containing starch. *Agroplanta* 1:47
- NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153:375.
- PICCAGLIA, R.; GALLETI, G.C. 1988. Sugar and sugar alcohol determination in feedstuffs by HRGC, HPLC and enzymatic analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 45:203.
- PICHARD, G. 1977. Forage evaluation: Continuous and batch *in vitro* rumen fermentations. Ph. D. Thesis. Ithaca, New York, EE. UU. Cornell University. 319 p.
- RAGUSE, C. A.; SMITH, D. 1965. Carbohydrate content in alfalfa herbage as influenced by method of drying. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 13:307.
- RENDIG, V.V.; McCOMB, E.A.; HU, C.L. 1964. Some nonfermentable free sugars in the leaf petiole fraction of alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 12:421.
- SMITH, D.; GROTELEUSCHEN, R.D. 1966. Carbohydrates in grasses. I. Sugar and fructosan composition of the stem bases of several northern-adapted grasses at seed maturity. *Crop Science* 6: 263.
- \_\_\_\_\_. 1969. Removing and analyzing total nonstructural carbohydrates from plant tissue. Research Division, College of Agriculture and Life Science. Research Report 41. University of Wisconsin. 17 p.
- \_\_\_\_\_. 1971. Efficiency of water for extraction of total nonstructural carbohydrates from plant tissue. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 22:445.
- \_\_\_\_\_. 1973a. The nonstructural carbohydrates. *In Chemistry and Biochemistry of Herbage*. v. 1. Ed.

by Butler, Bailey. New York, EE.UU., Academic Press. p. 106.

\_\_\_\_\_. 1973b. Influence of drying and storage conditions on nonstructural carbohydrate analysis of herbage tissue - A review. *Journal of the British Grassland Society* 28:129.

TAMATE, J.; BRADBURY, J.H. 1985. Determination of sugars in tropical root crops using <sup>13</sup>C NMR spectroscopy: Comparison with HPLC method. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36:1291.

TRENT, J.D.; CHRISTIANSEN, S. 1986. Determination of nons-

structural carbohydrates in forage tissue by p-hydroxybenzoic acid hydrazide flow-injection analysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 34: 1033.

VAN SOEST, P.J. 1982. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 1 Ed. Corvallis, Oregon, EE.UU., O & B Books. 374 p.

VAN T'KLOOSTER, A.T.; GAILLARD, B.D.E. 1976. Digestion of carbohydrates in the intestine of cows. *In Carbohydrate research in plant and animals*. Landbouwhogeschool, Wageningen, The Netherlands. *Miscellaneous papers* 12. p. 79.

# ASPECTOS CRITICOS DE LAS METODOLOGIAS DE EVALUACION NUTRITIVA DE ARBOLES Y ARBUSTOS FORRAJEROS

*Rolain Borel<sup>1</sup>*

## 1. Introducción

El interés de los investigadores por utilizar árboles y arbustos como fuente potencial de forraje para el ganado ha incrementado recientemente. De hecho, el tremendo desarrollo de la *Leucaena* en Asia es un logro importante de programas de investigación en esa especie que, a la vez, ha motivado a otros grupos a iniciar trabajos similares en otras especies.

Es preciso reconocer que, en la actualidad, una inmensa variedad de árboles y arbustos juegan un papel importante, y a veces esencial, en los sistemas tradicionales de alimentación animal. Así, en el Sahel, en la costa del Pacífico de América Central y en el trópico árido de América Latina (noreste de Brasil, norte de Chile, costa del Perú, norte de México, etc.) los arbustos y árboles aportan la mayor parte de la dieta de ciertas especies

(especialmente cabras) o al menos aseguran su sobrevivencia (Le Houérou, 1980c).

En el caso del trópico húmedo de América Central, Amazonas, sureste de Asia (no en Africa por la mosca tsé tsé), los árboles y arbustos también existen en los sistemas de producción, pero su papel en la alimentación animal es menor, a no ser por la alimentación intensiva cerca de las casas (Torres, 1983). Sin embargo, existen varios programas de investigación dirigidos a incrementar el papel de los árboles en los sistemas futuros.

En esta revisión se hará énfasis en aspectos relacionados con la evaluación nutritiva de árboles y arbustos, dejando de lado todos aquellos aspectos que son comunes con las metodologías de evaluación nutricional de recursos más tradicionales.

---

<sup>1</sup> Ph. D., Agrostólogo, Consultor para la Universidad de la Paz, San José, Costa Rica.

## 2. Temas típicos de investigación

Para situar mejor el ámbito de este trabajo, se indican a continuación algunos de los temas de investigación más frecuentes, a los cuales las metodologías discutidas se refieren:

- Caracterización de la dieta del ganado en pastoreo y en ramoneo libre ("free ranging").
- Búsqueda y caracterización de nuevas especies.
- Evaluación de nuevos componentes en sistemas de alimentación animal.
- Sustitución de concentrados por forrajes de mayor disponibilidad o menor costo.

## 3. Metodología general

Cuando se trata de la evaluación nutritiva del forraje de arbustos y árboles, ésta no se puede dissociar del valor nutritivo de los diferentes componentes de las plantas, de su disponibilidad y accesibilidad en el tiempo, ni de la presencia simultánea de otros alimentos en el sistema. Por esta razón hay cuatro aspectos que deben investigarse en forma relacionada:

- Potencial de producción
- Consumo y preferencia
- Valor nutritivo y digestibilidad

- Adaptación ecológica y capacidad de regeneración.

Cada uno de estos aspectos por sí mismo no puede aportar una solución satisfactoria a los problemas de la producción (Le Houérou, 1980a). El potencial de producción debe dar información sobre la capacidad de carga o bien la cantidad de animales que pueden alimentarse con el recurso. La preferencia relativa y el consumo se cuentan entre los elementos más limitantes para la introducción de nuevas especies en los sistemas de alimentación animal, o para el manejo eficiente de los recursos existentes. El valor nutritivo real (determinado en el animal mismo) y la digestibilidad dan información sobre la utilización de estos materiales por el animal. Por ende, la información sobre la adaptación y la regeneración natural (para muchos investigadores este aspecto ya no pertenece a la evaluación nutritiva), permite estimar la persistencia del sistema, o sea su mantenimiento en el tiempo. Le Houérou (1980b) sugiere que estos cuatro aspectos se estudien en forma paralela.

Por otra parte, Benavides (1983) propone una evaluación de tipo secuencial, que incluye la mayoría de aspectos antes indicados: hacer un inventario de las especies presentes y utilizadas en alguna forma por el ganado, medir su consumo y al mismo tiempo determinar su productividad, o al menos su capacidad de rebrote después del corte, en plantaciones existentes (por ejemplo cercas vivas), determinar su efecto en el producto

animal y, eventualmente, investigar la respuesta de los árboles y arbustos de mayor potencial a factores de manejo agronómico o silvicultural.

No existe una respuesta definitiva para todos los casos, pero ya que los árboles y arbustos constituyen un componente perenne de los sistemas y son de relativamente lento desarrollo inicial, es esencial que un programa de investigación que los incluye tenga una metodología a largo plazo bien definida y completa.

Por otra parte, salvo en casos excepcionales (alimentación de las cabras), los arbustos y árboles son sólo un componente más de la dieta consumida por los animales, lo que explica la relativa complejidad de la investigación con estas especies.

#### 4. Metodologías específicas

Se revisan a continuación las principales variables que deben considerarse en el estudio de especies arbóreas o arbustivas, sea como tratamientos experimentales, covariables y criterios de estratificación o bien como variables de respuesta.

<b>Variables independientes</b>	<b>Variables de respuesta</b>
- Procedencia	- Fenología
- Sitio	- Masa forrajera (y otros productos)

- Individuos
- Disponibilidad para animales
- Partes de planta
- Productividad
- Edad
- Palatabilidad relativa
- Composición química
- Consumo
- Producción animal

#### a. Procedencia

En general, los árboles y arbustos no se han sometido a una selección genética, de tal manera que, dentro de cualquier especie, se observa una variación considerable. Los técnicos forestales han tratado de reducir o controlar esta variación al comparar diferentes procedencias de cada especie a evaluar. Hay fuertes evidencias de que para las características forrajeras de los árboles y arbustos se debe esperar la misma variación (María Kass, comunicación personal). Esta variación es tal que puede significar que la utilización de una procedencia es perfectamente factible para un sistema de alimentación dado, mientras que otra procedencia no sería adecuada. Las consecuencias prácticas (y financieras) de un error de esta naturaleza serían muy graves. Es preciso mencionar que se han encontrado diferencias entre procedencias que distaban pocos kilómetros entre sí.

Para la evaluación nutritiva de árboles y arbustos se pueden tomar cualquiera de las siguientes precauciones:

- En caso de tener suficientes recursos: evaluar diferentes procedencias de cada especie.
- Frente a limitaciones de recursos, lo mínimo sería documentar, con toda precisión, el sitio de procedencia del material evaluado (ver instrucciones específicas sobre identificación de rodales semilleros de Salazar y Boshier, 1989), y preferiblemente dejar marcados los árboles de los cuales se sacó la semilla gámica o vegetativa.
- No se debe usar material de varias procedencias dentro de un mismo tratamiento, ya que ello puede invalidar algunas comparaciones (Rodríguez *et al.*, 1987).

## **b. Sitio**

Cuando se trata de evaluar el potencial de una especie en una región, con base en poblaciones existentes (cercas vivas, árboles y arbustos en potreros, etc.), se incrementa el problema de las diferencias entre procedencias con la variación entre sitios. La experiencia de proyectos en marcha indica que variaciones de 100% en productividad entre sitios de una misma región no son excepcionales. Como consecuencia es preferible reducir el número de repeticiones dentro de sitios, e incluir un alto

número de sitios en una región, de tal modo que se pueda evaluar no sólo el potencial, sino también el riesgo de obtener rendimientos significativamente diferentes al potencial regional estimado (CATIE, 1987).

## **c. Individuos**

Como consecuencia de la alta variabilidad en poblaciones que nunca han sido seleccionadas, se observa una gran variabilidad entre individuos de un mismo tratamiento, aún cuando se trate de estratificar la población por diámetro a la altura del pecho (DAP), diámetro de la copa, altura, diámetro de la base del tronco (cuando hay múltiples ramificaciones, como es el caso de los arbustos) o suma del diámetro de las ramas principales.

En cuanto al número de individuos a considerar en experimentos o mediciones en poblaciones existentes, se recomienda no menos de 10 individuos (o muestras) por tratamiento o estrato y por repetición, hasta un máximo de 30-40 individuos sin contar los bordes.

## **d. Partes de planta**

Existen, por supuesto, grandes diferencias en el rendimiento y composición química de las diferentes partes de los árboles y arbustos. Es usual separar los diferentes componentes en:

- Hojas (a veces separadas entre peciolo y hojuelas)
- Tallos tiernos.
- Tallos gruesos o lignificados, sepa-

rados de los anteriores por criterios de diámetro o por criterios de color de la corteza, de acuerdo al grado de lignificación (primaria o secundaria). A veces se separa la corteza de los tallos.

- Semillas.

Los criterios de separación de tallos son evidentemente insuficientes, ya que ramas de un mismo diámetro pueden encontrarse en niveles muy diferentes de lignificación, de acuerdo con la velocidad de crecimiento, la edad de los materiales y probablemente la época del año. En cuanto a los criterios de color, éstos son subjetivos y dependen probablemente de la procedencia de los materiales.

Por otra parte, se han detectado grandes diferencias en calidad de hojas de acuerdo con su posición en la rama (topófisis) (Benavides, 1983). Incluso, bajo presiones fortísimas de pastoreo, las cabras han evitado consumir las hojas basales de *Erythrina poeppigiana*, cuando además de éstas sólo quedaban tallos lignificados por consumir (Borel, datos no publicados).

Es indispensable, por lo tanto, uniformizar los criterios de separación para cada especie, a fin de permitir comparaciones válidas entre trabajos. En especial, se requiere fijar criterios de separación entre los tipos de tallos y entre el tipo o posición de hojas (Bille, 1980).

En condiciones de pastoreo o ramoneo, se hace aún más difícil el muestreo y la separación de los tejidos

efectivamente consumidos. Harrington y Wilson (1980) han sugerido comparar las ramitas comidas y aquellas no comidas, cortando ramas intactas al mismo nivel donde ha ocurrido consumo (mismo diámetro), y analizar por diferencia.

### e. Edad

Al igual que para otros forrajes, la edad de los rebrotes afecta la productividad y la calidad del forraje de árboles y arbustos; por lo tanto, esta debe documentarse lo más exactamente posible. Para experimentos de alimentación, la edad de los rebrotes debe mantenerse constante durante todo el período experimental. Esto se logra por medio de cortes previos escalonados. La edad utilizada ha sido entre los 80 días (Vargas *et al.*, 1987) y 120 días (Vargas, 1988).

### f. Fenología

Se recomienda el registro del estado fenológico de los árboles y arbustos cuando se caracterizan poblaciones naturales. Como los estados fenológicos varían también entre individuos, las observaciones deben hacerse sobre una muestra de la población de cada especie, estratificada por clases diamétricas ( $n = 10$  dentro de cada clase) (Grouzis y Sicot, 1980). Grouzis y Sicot (1980) han propuesto una lista de estados fenológicos y recomiendan un intervalo de 10 días entre observaciones.



### **g. Masa forrajera y otros productos**

Para la determinación de la masa forrajera hay que reconocer dos situaciones distintas: cuando los árboles y arbustos son cosechados y el forraje es presentado a los animales en confinamiento, o cuando los animales tienen acceso directo a los árboles durante el pastoreo. La primera situación no presenta problemas metodológicos diferentes a los de pastos de corte o cultivos forrajeros. Bajo pastoreo, y más aún en situaciones donde hay una variedad de especies mezcladas, sólo se pueden utilizar sistemas de muestreo no-destructivo o sistemas de muestreo doble.

En todos los casos se requiere un muestreo previo para determinar las clases diamétricas de cada especie presente. Dentro de cada clase se hace un muestreo destructivo (corte y pesaje de todos los componentes, submuestreo para análisis). Se debe proceder por una serie de relaciones indirectas:

- Pesar las hojas en una muestra de ramas secundarias.
- Determinar el número de ramas secundarias por rama primaria (esto se puede hacer en fotografías de árboles representativos de cada clase diamétrica).
- Determinar el número de ramas primarias en relación al diámetro del tronco (Bille, 1980).
- Otro método consiste en fotografiar y cortar para medir la biomasa de 1/10 de la muestra. Los otros ár-

boles se evalúan al ojo tomando las fotos como referencia (error = menos de 10%) (Pellew, 1980).

Por la cantidad misma de relaciones indirectas que han de sacarse, la precisión de la determinación de biomasa es mucho menor que para pasturas (Le Houérou, 1980b).

Para la cuantificación de otros productos (leña, madera, etc.) existen estándares ya desarrollados (CATIE, 1987; Béliard, 1986).

### **h. Disponibilidad para animales**

La masa total o productividad total de los árboles y arbustos tiene poco sentido en la evaluación de su potencial para alimentar animales (Bille, 1980). De mucho más interés es la masa disponible o accesible al pastoreo o ramoneo de los animales (Rutherford, 1979). Esta se encuentra en principio por debajo de los 2 m de altura, dependiendo de la especie y de la ramificación del árbol. El límite de acceso (2 m) reduce el forraje disponible a sólo 5 a 25% de la disponibilidad total de un árbol de 5 m. También se deben tener en cuenta sólo aquellos componentes de la planta que son realmente ramoneados, aunque en la actualidad falta definir cuáles son esos componentes (Bille, 1980). Los tipos de productos ramoneados pueden variar durante el año, de acuerdo con su palatabilidad relativa. Por lo tanto, la medición de la masa disponible debe ser de carácter dinámico.

Una de las opciones propuestas consiste en realizar mediciones quincenales o mensuales de hojas disponibles en arbustos completos o ramas representativas de árboles, estratificando por clases diamétricas (Hiernaux, 1980). Otros han tomado la disponibilidad total dentro de un rango especificado de altura, sin preocuparse por la palatabilidad de las especies ni de sus componentes. El resultado es obviamente una sobreestimación de la masa disponible (Pellew, 1980).

Para especies decíduas, y por supuesto para la determinación de la masa de frutos, se deben cuantificar los productos que caen al suelo en las diferentes épocas del año (ver discusión sobre fenología).

### **i. Productividad**

La determinación de la tasa fotosintética sería el mejor método para determinar productividad, pero no es práctico (Bille, 1980). Igual que en el caso de la medición de la disponibilidad, se recurren a métodos más o menos destructivos: cuantificación de la caída de hojas, destrucción de algunos individuos y la determinación de relaciones alométricas en mediciones sucesivas. En todo caso, la precisión es muy baja. Como opción se ha propuesto marcar ramas y pesarlas después de un tiempo, junto con un muestreo de la población de ramas (Pellew, 1980).

### **j. Palatabilidad relativa**

Por palatabilidad relativa se entiende la proporción de la dieta total que es aportada por cada una de las especies presentes en una mezcla. La palatabilidad relativa varía con la especie y su estado fenológico (Hiernaux, 1980). Así mismo, se han observado diferencias en palatabilidad entre animales que conocen el ambiente y consumen de una variedad de plantas, y otros que no están familiarizados y limitan su selección de especies.

Para la medición de la palatabilidad, la observación directa de la selección de especies por algunos animales es un método preferible a las fistulas esofágicas. Esto debido a que el período de muestreo es largo para permitir la selección adecuada, lo que causa mucha contaminación de la muestra esofágica. Por otra parte, el método de observación microscópica del contenido ruminal o fecal es totalmente adecuado, pero requiere un entrenamiento muy largo de los técnicos (Harrington y Wilson, 1980). Bajo condiciones de ramoneo libre se han utilizado con éxito observaciones cada 10 min en dos animales, 12 horas al día, una vez por semana, durante 6 semanas (Carew *et al.*, 1980).

### **k. Composición química**

Para el forraje de árboles y arbustos se ha obtenido en general una baja relación entre la digestibilidad *in vitro* (DIV) y el consumo voluntario.

Esta baja relación se explica por la presencia de una serie de productos (terpentinas, aceites volátiles, resinas, taninos) que tienen un efecto adverso sobre el consumo. Se da también el caso de algunos árboles de baja digestibilidad que tienen un alto consumo voluntario (Harrington y Wilson, 1980). La DIV puede ser un buen indicador del consumo para ciertas especies y muy malo para otras.

La energía metabolizable de estos forrajes no puede estimarse con factores constantes, por las altas pérdidas de aceites en la orina (Harrington y Wilson, 1980). La fibra cruda no tiene ninguna relación con el consumo (Harrington y Wilson, 1980). Carew *et al.* (1980) menciona la falta de relación entre la PC y la preferencia de los animales por ciertos árboles y arbustos, mientras que la fibra detergente neutro tiene una relación un poco mejor, al igual que la DIV.

Romeo (1984) y Cheeke y Raharjo (1987) indican por otra parte, que algunos aminoácidos no proteicos tóxicos, así como alcaloides y la cumarina pueden ser los causantes del bajo consumo y la pobre utilización de los forrajes de árboles y arbustos y, por lo tanto, de las bajas relaciones entre DIV y consumo.

Es un hecho establecido que las diferentes fracciones de nitrógeno (N) en el forraje de árboles y arbustos sigue un patrón diferente al de forrajes tradicionales del trópico. Una parte importante del N se encuentra en forma no proteica o de proteínas

muy solubles. También una proporción importante del N puede encontrarse ligada a los complejos lignocelulosa y a las paredes celulares (Vargas, 1988).

Otro hecho apenas descrito para algunos de los árboles y arbustos más comunes, pero de importancia en una multitud de géneros y familias, es la capacidad de reacción de estas plantas a la destrucción de sus tejidos (ataque de insectos, corte, pastoreo, etc.), con cambios sustanciales en la concentración de algunos compuestos químicos (taninos y alcaloides entre otros). Si estos cambios se presentan en los árboles y arbustos de uso potencial, deben ser detectados por medio de mediciones dinámicas, particularmente para las especies que hasta el presente no se han utilizado intensivamente como forraje. En efecto, se podrían seleccionar hoy especies que parecen tener bajos contenidos de sustancias anticualitativas, pero mañana podrían mostrar, después de cortes repetidos, contenidos inapropiados para una producción animal eficiente.

La identificación de compuestos químicos y ensayos biológicos, que se puedan relacionar estrechamente con el consumo y la utilización del forraje de árboles y arbustos está muy atrasada, y debe ser una de las prioridades de la investigación.

## L. Consumo

A la fecha se han observado grandes diferencias en el consumo de las mismas especies en condiciones apa-

rentemente similares. Las inconsistencias son tales que para una misma especie hay informes de rechazo total o casi total por los animales, mientras que otros informes indican consumos muy satisfactorios.

Cuando se ofrece el forraje de árboles y arbustos a animales en confinamiento, puede llegarse a subestimar la importancia de la selección y, por lo tanto, no ofrecer las cantidades necesarias para un consumo alto. Se han observado rechazos de 40% del forraje, aún a niveles muy bajos de oferta (Vargas, 1988). Por otra parte, el período de acostumbramiento de los animales a una nueva especie puede ser considerablemente más largo (¿más de un mes?) que para otros forrajes.

En condiciones de pastoreo, el consumo de forraje de árboles y arbustos sólo puede determinarse con cierta precisión cuando los árboles y arbustos constituyen el principal componente de la dieta (Harrington y Wilson, 1980).

El tiempo de pastoreo de cada especie puede ser una medida relativa de consumo cuando las disponibilidades de masa forrajera son similares, no así cuando hay diferencias significativas en disponibilidad (Hiernaux, 1980). Una estimación muy cruda del consumo puede hacerse al medir diferencias entre ramas con y sin pastoreo (Pellew, 1980).

Harrington y Wilson (1980) sugieren que la necesidad de evaluar el nivel de consumo varía según la

situación en que uno se encuentra. Cuando se pretende evaluar el papel potencial de una nueva especie, para ser establecida como plantación pura (tipo "banco de proteína"), se debe estimar el nivel máximo de consumo de esa especie. Por otra parte, en condiciones de pastoreo extensivo, donde existe variedad de especies mezcladas, es más importante determinar la palatabilidad relativa de cada especie.

### **m. Producción animal**

La única evaluación válida de la producción animal es la comparación de sistemas de alimentación con y sin ramoneo, o con y sin acceso al forraje de árboles y arbustos. Esto es a menudo poco posible, a no ser en las últimas etapas de evaluación de estos nuevos forrajes.

### **5. Necesidades de investigación de tipo metodológico**

Le Houérou (1980b) indica que existe bastante información sobre las especies utilizadas, su ecología, sus requerimientos, palatabilidad relativa con otras especies, su composición química y valor nutritivo teórico. Sin embargo, falta información sobre productividad, valor nutritivo real y su utilización por los animales. En general, faltan también procedimientos estandarizados de análisis de productos anticualitativos y tóxicos, faltando incluso por identificar aquellos realmente limitantes.

## 6. Referencias

- BELIARD, C. 1986. Producción de biomasa en cercas vivas. *In* Sistemas Agroforestales. Principios y aplicaciones en los trópicos. San José, Costa Rica. OTS-CATIE. p. 408.
- BENAVIDES, J. 1983. Investigación en árboles forrajeros. *In* Curso Corto Intensivo sobre Técnicas Agroforestales Tradicionales. Contribuciones de los participantes. Turrialba, Costa Rica, 8-18 de noviembre de 1983. CATIE. p. irr.
- BILLE, J.C. 1980. Measuring the primary palatable production of browse plants. *In* Browse in Africa. Ed. by H.N. Le Houérou. Addis Ababa, Ethiopia. International Livestock Centre for Africa. p. 185.
- CAREW, B.A.R.; MOSI, A.K.; MDA, A.U.; SEGBUNCK, G.N. 1980. The potential of browse plants in the nutrition of small ruminants in the humid forest and derived savanna zones of Nigeria. *In* Browse in Africa. Ed. by H.N. Le Houérou. Addis Ababa, Ethiopia. International Livestock Centre for Africa. p. 307.
- CATIE. 1987. II informe técnico del proyecto de sistemas silvopastoriles. Proyecto CATIE/CIID. Turrialba, Costa Rica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y enseñanza. 124 P.
- CHEEKE, P.R.; RAHARJO, Y.C. 1987. Evaluation of *Gliricidia sepium* forage and leaf meal as feedstuffs for rabbits and chickens. *In* *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp: Management and improvement. Ed. by D. Withington, Nancy Clover, J.L. Brewbaker. Proceedings of a workshop held at CATIE, Turrialba, Costa Rica, June, 1987. Nitrogen Fixing Tree Association. Special Publication 87-01. p.1193.
- GROUZIS, M; SICOT, M. 1980. A method for the fenological study of browse populations in the Sahel: The influence of some ecological factors. *In* Browse in Africa. Ed. by H.N. Le Houérou. Addis Ababa, Ethiopia. International Livestock Centre for Africa. p. 233.
- HARRINGTON, G.N.; WILSON, A.D. 1980. Methods for measuring secondary production from browse. *In* Browse in Africa. Ed. by H.N. Le Houérou. Addis Ababa, Ethiopia. International Livestock Centre for Africa. p. 255.
- HIERNAUX, P. 1980. Inventory of the browse potential of bush trees and shrubs of an area in the Sahel in Mali. *In* Browse in Africa. Ed. by H.N. Le Houérou. Addis Ababa, Ethiopia. International Livestock Centre for Africa. p. 197.
- LE HOUEROU, H.N. 1980a. Browse in Northern Africa. *In* Browse in Africa. Ed. by H.N. Le Houérou. Addis Ababa, Ethiopia. International Livestock Centre for Africa. p. 55.
- LE HOUEROU, H.N. 1980b. Chemical composition and nutritive value of browse in West Africa. *In*

- Browse in Africa. Ed. by H.N. Le Houérou. Addis Ababa, Ethiopia. International Livestock Centre for Africa. p. 261.
- LE HOUÉROU, H.N. 1980c. The role of browse in the management of natural grazing lands. *In* Browse in Africa. Ed. by H.N. Le Houérou. Addis Ababa, Ethiopia. International Livestock Centre for Africa. p. 3.
- PELLEW, R.A. 1980. The production and consumption of Acacia and its potential for animal protein production. *In* Browse in Africa. Ed. by H.N. Le Houérou. Addis Ababa, Ethiopia. International Livestock Centre for Africa. p. 223.
- RODRIGUEZ, Z.; BENAVIDES, J.E.; CHAVES, C.; SANCHEZ, G.A. 1987. Producción de leche de cabras estabuladas alimentadas con forraje de Madero Negro (*Gliricidia sepium*) y Poró (*Erythrina poeppigiana*), suplementadas con plátano Pelipita (*Musa* sp. cv. pelipita). *In* *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp: Management and improvement. Ed. by D. Withington, Nancy Clover, J.L. Brewbaker. Proceedings of a workshop held at CATIE, Turrialba, Costa Rica, June, 1987. Nitrogen Fixing Tree Association. Special Publication 87-01. p. 212.
- ROMEO, R.T. 1984. Insecticidal amino acids in leaves of Calliandra. *Biochemical Systems Ecology* 12:293.
- RUTHERFORD, M.C. 1979. Plant-based techniques for determining available browse and browse utilization: A review. *Botanical Review* 45:203.
- SALAZAR, R.; BOSHIER, D. 1989. Establecimiento y manejo de rodales semilleros. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica. En prensa.
- TORRES, F. 1983. Role of woody perennials in animal husbandry. *Agroforestry Systems* 1:131.
- VARGAS, H.; PABLO, G.; ELVIRA, S. 1987. Composición química, digestibilidad y consumo de *Leucaena leucocephala*, Madre Cacao (*Gliricidia* sp.) y Caulote (*Guasuma ulmifolia*). *In* *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp: Management and improvement. Ed. by D. Withington, Nancy Clover, J.L. Brewbaker. Proceedings of a workshop held at CATIE, Turrialba, Costa Rica, June, 1987. Nitrogen Fixing Tree Association. Special Publication 87-01. p. 255.
- VARGAS, A. 1988. Evaluación del forraje de Poró (*Erythrina cocleata*) como suplemento proteico para terneros en pastoreo. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 89 p.

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

# METODOLOGIA DE INVESTIGACION EN NUTRICION MINERAL DE RUMIANTES

*Oswaldo Rosero*<sup>1</sup>

## 1. Introducción

Una de las limitaciones más importantes en la producción del ganado en los países tropicales es la desnutrición. La insuficiencia de energía y/o proteína frecuentemente son causas de una producción animal subóptima; sin embargo, numerosos investigadores han observado que el ganado algunas veces se desmejora a pesar de una provisión adecuada de alimentos. Los desbalances de minerales, sean éstos por deficiencias o excesos en los suelos y/o forrajes, pueden también ser causantes de la baja producción y problemas reproductivos de los rumiantes en pastoreo de las regiones tropicales.

Los rumiantes, al igual que otros animales, deben recibir todos los nutrientes esenciales en cantidades óptimas para mantener su salud, cre-

cer y reproducirse a su máximo potencial. Los principales signos clínicos de deficiencias de minerales son: enfermedades de extenuación, pérdida y despigmentación del pelo, desórdenes de la piel, aborto no infeccioso, anemia, diarrea, pérdida del apetito, tetania, anormalidades de los huesos, pica y baja fertilidad.

Es de vital importancia considerar el valor de la suplementación mineral, particularmente en rumiantes que se alimentan de pastos y forrajes tropicales. Sin embargo, la sola suplementación mineral en animales con deficiencias de proteína o energía, no ayudará a aumentar el crecimiento.

En 1937, Maynard citaba en su texto "Animal Nutrition" sólo 11 elementos comprobados esenciales en la dieta, muchos de ellos "descubiertos recientemente" como esenciales: cal-

---

<sup>1</sup> Ph. D., Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.



cio (Ca), fósforo (P), sodio (Na), cloro (Cl), azufre (S), magnesio (Mg), hierro (Fe), yodo (I), manganeso (Mn), cobre (Cu) y zinc (Zn). También decía que “el cobalto (Co) parece ser esencial de acuerdo a trabajos recientes”, y mencionaba que en la práctica, “la mayoría de ellos (otros elementos) son suplidos en tal abundancia en las raciones comunes, que no es necesario considerarlos”.

Durante las últimas décadas, numerosos investigadores han trabajado en la definición de las diferentes funciones bioquímicas y metabólicas de los minerales. Underwood (1979) menciona cinco aspectos en que los logros obtenidos han tenido gran significancia nutricional:

- El descubrimiento de los denominados “nuevos” elementos trazas.
- El modo de acción de estos elementos trazas en relación con cambios clínicos y patológicos en el animal.
- La interrelación entre la forma química del elemento y su disponibilidad biológica.
- Las interacciones entre los elementos trazas.
- Los factores que afectan los requisitos mínimos y niveles máximos de tolerancia en el animal.

Al respecto, se han identificado como mínimo 15 minerales considerados esenciales para los rumiantes. De ellos hay siete macroelementos

(Ca, P, potasio (K), Na, Cl, Mg y S) y ocho microelementos (Co, Cu, I, Fe, Mn, molibdeno (Mo), selenio (Se) y (Zn). Un elemento mineral es considerado esencial si su deficiencia en la dieta es capaz de producir daño funcional y/o estructural. La incorporación del nutriente puro en la dieta deficitaria, debe corregir inmediatamente los signos de deficiencia y restaurar la salud normal del animal.

Se ha encontrado que elementos trazas como cromo (Cr), níquel (Ni), silicio (Si), estaño (Sn) y vanadio (V) son esenciales para una o más especies de animales de laboratorio, con base en estudios de crecimiento de animales que consumieron dietas purificadas, bajo condiciones ambientales controladas. Sin embargo, hasta la fecha no se ha encontrado significancia práctica de ninguno de estos minerales en la alimentación de rumiantes.

Muchos de los minerales considerados esenciales pueden tener efectos tóxicos cuando se suministran en grandes cantidades, como por ejemplo: Cu, Co, I, Mn, Mo, Se y Zn. De igual manera, algunos elementos como el aluminio (Al), arsénico (As), cadmio (Cd), plomo (Pb) y mercurio (Hg) son considerados tóxicos.

En general, la mayor parte de los elementos trazas funcionan como constituyentes o como activadores de enzimas, y son indispensables en cantidades mínimas para mantener diferentes funciones metabólicas en el organismo del animal.

## 2. Uso de radioisótopos en estudios de nutrición mineral

Se han conducido numerosos estudios, usando técnicas modernas de análisis, en países tropicales para evaluar los elementos minerales en los suelos, plantas y tejidos animales (McDowell *et al.*, 1986). En estudios agronómicos se utilizan isótopos para medir la translocación de elementos minerales del suelo a la planta y para observar la estabilidad durante los procesos de análisis. El  $\text{Se}^{75}$  se usa para determinar la pérdida de este elemento en forrajes durante el almacenamiento e incineración a diferentes temperaturas.

El uso de radioisótopos es común en la investigación en nutrición de rumiantes, principalmente en estudios de metabolismo mineral, y ha hecho posible el comprender mejor la función dinámica de los minerales, lo que a su vez ha permitido determinar mejor los requerimientos y las regulaciones homeostáticas en el animal.

La factibilidad de usar radioisótopos en investigación y diagnóstico depende de la vida media, facilidad de detección, disponibilidad, costo y número de isótopos disponibles para cada elemento. Existen muchos isótopos adecuados para la mayor parte de los minerales, excepto para el Mg y el Cu. La vida media del  $\text{Mg}^{28}$  (21.3 h),  $\text{Cu}^{64}$  (12.8 h) y el  $\text{Cu}^{67}$  (61.1 h) es corta para experimentos nutricionales en rumiantes (Field, 1984).

En la determinación de deficiencias o excesos de minerales, los análisis cuantitativos de los diferentes elementos son indispensables. La técnica de activación de neutrones es un método deseable para el análisis de minerales en un gran número de muestras. Este método no es destructivo, puede determinar cantidades extremadamente pequeñas de cualquier elemento, y un gran número de elementos en la misma muestra. La única operación requerida es la radiación de neutrones en un reactor y la medición de la actividad en un medidor adecuado. Un buen ejemplo de ello es el análisis de Se, donde las muestras y estándares son activados con neutrones de  $1 \times 10^{13} \text{ n} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Se requiere un tiempo de 8 a 12 semanas para que la radiación disminuya, y el Se ( $\text{Se}^{75}$ ), que tiene una vida media de 120 días, es contado en un analizador multicanal.

En la cuantificación del consumo voluntario de minerales en rumiantes se utiliza el  $\text{P}^{32}$ . En esta técnica hay que distinguir entre el P de origen salival y el P de la muestra de pasto obtenida de animales con fístula esofágica. La absorción verdadera de un elemento mineral es un parámetro fundamental en estudios nutricionales y requiere del uso de radioisótopos para medir la excreción endógena y fecal, que puede ser independiente del consumo mineral o variar con él. La excreción endógena fecal de los diferentes minerales no es constante pero debe medirse para algunos minerales como el P. La tasa de absorción, retención y excreción de un elemento de-

pende del estatus del animal. Así, la deficiencia de un mineral puede establecerse en base a la absorción, retención y excreción del isótopo particular.

Kirchgessner y Schwarz (1976) indican tres formas de utilizar radioisótopos en el diagnóstico de deficiencias de minerales: 1) Determinación de la absorción intestinal de un radioisótopo administrado oralmente, con la medición de actividad en la sangre; 2) Determinación de la retención de una dosis administrada parenteralmente; 3) Determinación de la excreción fecal endógena de una dosis administrada parenteralmente.

En el estudio de desórdenes metabólicos nutricionales, como la hipomagnesemia y la hipocalcemia del ganado lechero, se han utilizado isótopos como  $\text{Ca}^{45}$  y  $\text{Mg}^{28}$ . Finalmente, los radioisótopos se han utilizado también en investigaciones para determinar las diferentes interacciones y antagonismos entre minerales, que pueden producir deficiencias o toxicidades en los rumiantes.

### **3. Métodos para la determinación de minerales**

Existen numerosos procedimientos y técnicas apropiadas para analizar minerales en diferentes tejidos vegetales y animales. El método de espectrofotometría de absorción atómica es el más utilizado en la determinación de la mayoría de los

minerales macros y trazas, y el procedimiento colorimétrico para el análisis de P. Adicionalmente, se pueden utilizar métodos basados en el uso de la absorción atómica sin llama (horno de grafito), particularmente en la determinación de Co y Mo.

Los análisis en huesos, suero sanguíneo (o plasma) y preparaciones de biopsia de hígado, son más frecuentes en la determinación de deficiencias y toxicidades minerales. Para una descripción detallada de las diferentes metodologías analíticas se recomienda el manual "Métodos de Análisis de Minerales para Tejidos de Plantas y Animales" (Fick *et al.*, 1979).

### **4. Recolección y procesamiento de muestras**

La determinación cuantitativa del contenido de un mineral específico requiere de un buen procedimiento de muestreo, una adecuada identificación y preparación de la muestra, y la aplicación de técnicas analíticas apropiadas. Aunque el análisis sea exacto, los valores obtenidos no pueden ser mejores que la muestra recolectada. Entre los factores importantes en la recolección de muestras se incluyen el obtener una muestra representativa, evitar la contaminación e identificar la muestra en forma adecuada. Cada muestra debe relacionarse a una área específica, finca o animal. Los errores por contaminación

siempre causan problemas y pueden ocurrir en cada paso hasta que se ha completado el análisis. Recipientes sucios, instrumentos que no son de acero inoxidable y la exposición al aire son las principales fuentes de contaminación en muestras de tejido animal, mientras que las más importantes fuentes de contaminación en forrajes son el suelo, polvo atmosférico y el procedimiento de recolección y molienda.

### **a. Muestreo de sangre**

La contaminación proveniente de los recipientes usados en el muestreo de sangre y de tejidos se puede minimizar remojando los recipientes durante la noche en agua que contenga detergente de bajo contenido de fosfatos. Los envases (incluyendo las tapas) deben cepillarse y enjuagarse tres veces con una solución de HCl al 10% y tres veces con agua desionizada. Las muestras de sangre pueden contaminarse con los anticoagulantes, las aguas y las jeringas usadas para su recolección. Se recomienda el uso de jeringas desechables y de agujas de acero inoxidable. El tapón usado en el sistema de recolección de sangre mediante el "vacutainer" puede ser una fuente de contaminación de zinc. Esto puede evitarse no usando el tapón, sino agujas de sangrado tipo California junto con "parafilm". Las muestras de tejidos pueden recolectarse con más seguridad mediante la disección con tijeras o cuchillos de acero inoxidable.

Se pueden obtener muestras representativas de sangre por punción yugular, punción de la cola con aguja y jeringa o se pueden tomar en el matadero al momento que se corta el cuello del animal. Se recomienda el uso de agujas número 18 o más grandes para prevenir la hemólisis. La recolección de sangre de cada animal puede variar de 10 a 50 ml. Las muestras pueden almacenarse en refrigeración por varios días o por un período más largo si se congelan. En estudios sobre la concentración de minerales en el plasma o suero, la sangre entera no debe refrigerarse ni congelarse. Por lo tanto, es necesario separar el plasma o suero tan pronto sea posible después de que se tome la muestra de sangre. Las muestras de suero y plasma desproteinizadas son más estables y pueden mantenerse a temperatura ambiente de 2 a 4 semanas. Si se prevee un período más largo (mayor de 4 semanas) entre la recolección y el análisis de las muestras, éstas pueden ser congeladas.

Se ha observado en muchas ocasiones, que la concentración de algunos minerales en la sangre, particularmente de P, son mayores que las esperadas. Las concentraciones de P están afectadas por el consumo reciente de este elemento. Así, es posible encontrar niveles altos de P en la sangre de animales con deficiencias de P que han sido transferidos recientemente a dietas altas en ese elemento. Cuando se encuentren niveles de P orgánico muy altos, en contraposición a concentraciones bajas en los forrajes, se debe considerar un posible

aumento debido al manejo previo del animal y/o a los procedimientos de recolección y procesamiento de la muestra. Cuando el animal ha sido excitado, sometido a ejercicio o privado de agua antes de recolectar la muestra, es posible que los niveles de P inorgánico en la sangre se eleven. Bajo condiciones de campo es difícil evitar el ejercicio, pero se debe reducir al mínimo la excitación del animal.

Durante la recolección, la hemólisis severa elevará el contenido de P en el suero o plasma. También es importante la temperatura y el tiempo antes de la separación del suero o el plasma. Mientras más largo sea el tiempo transcurrido entre la recolección y la separación del suero o plasma, más altos serán los valores de proteínas y, consecuentemente de P inorgánico. Obviamente, las temperaturas altas de los trópicos aumentarán la reacción. Dayrell *et al.* (1973) indican que las concentraciones de P inorgánico se elevan significativamente cuando el suero ha sido separado después de que la sangre ha permanecido a temperatura ambiente por más de 3 horas. El mejor procedimiento es el de poner las muestras de sangre en refrigeración o en agua helada, y separar el plasma o suero tan pronto como sea posible. Bajo algunas condiciones se justifica un centrifugador portátil.

**(1) Obtención de plasma.** Para obtener plasma, el tubo o recipiente de recolección debe contener un anticoagulante. Tan pronto como se tome la sangre, ésta se debe mezclar suave-

mente con el anticoagulante invirtiendo el tubo varias veces hasta lograr una mezcla completa. Los anticoagulantes se pueden usar en las siguientes concentraciones: heparina, 2 mg/ml de sangre; citrato sódico y citrato de litio, 5 mg/ml de sangre; oxalatos sódico, potásico y de litio, de 1 a 2 mg/ml de sangre. El anticoagulante a ser usado no debe causar hemólisis o contaminar la muestra con elementos minerales que se desean analizar. Por ejemplo, el citrato sódico y los oxalatos de potasio y sodio no se deben usar si se va a analizar Na o K en plasma. Las células rojas del ganado son relativamente frágiles y hay evidencia que ocurre cierta hemólisis cuando se usa heparina. El citrato de litio (20% p/v; 0.1 ml/10 ml de sangre) ha dado buenos resultados y puede ser un anticoagulante adecuado en el análisis de minerales en plasma.

Para obtener plasma las muestras deben centrifugarse por 15 a 20 minutos de 2 000 a 2 500 rpm, aproximadamente. Se deben centrifugar dentro de las 24 horas después de la recolección o dentro de las primeras horas si no hay refrigeración. El plasma se remueve con una pipeta, teniendo cuidado de no aspirar o revolver las células, y se transfiere a un recipiente limpio.

**(2) Obtención de suero.** La recolección de suero es apropiada en aquellas áreas donde no se puede centrifugar y refrigerar la muestra dentro de las 24 horas después de su colección. En el caso de que las muestras se tomen con aguja, se recomien-

da el uso de agujas "California" tamaño 15 y tubos de ensayo o tubos al vacío de 20 ml. Los tubos al vacío comerciales (vacutainers), no se recomiendan para análisis de Zn, pues los tapones de hule son fuente de contaminación. Se recolecta de 10 a 15 ml de sangre de cada animal, en tubos de ensayo recubiertos con silicón. Luego de obtenida la muestra, se permite que coagule, y tan pronto se forme suficiente suero, lo que generalmente toma 8 o más horas, se transfiere a otro recipiente. El suero se puede transferir utilizando una pipeta de vidrio tipo "pasteur" con bulbo de goteo de 1 ml de volumen. Se debe tener el cuidado de introducir la pipeta en el tubo de tal manera que no se aspire el coágulo o se dañe la membrana de células rojas. Para el análisis de macroelementos, se debe desproteínizar 1 ml de suero tan pronto se disponga del equipo necesario. El suero restante se puede refrigerar o congelar para la determinación de microelementos por espectrofotometría de absorción atómica. Las muestras de suero que se toman en el campo deben conservarse frías en hielo o refrigeradas hasta que se lleven al laboratorio. El suero de color rosado indica hemólisis y no es adecuado para el análisis de minerales, pues los valores de Fe, Zn, Mg y K pueden presentarse muy altos.

**(3) Precipitación de proteínas en plasma y suero.** Se debe utilizar una solución libre de proteínas para el análisis de P por el método de Fiske-Subbarow (1925) o Harris & Popat (1954). Un buen procedimiento para precipitación de las proteínas séricas y plasmáticas es el siguiente:

- a) Verter 9 ml de ácido tricloracético (TCA) al 10% (p/v) en un tubo de ensayo.
- b) Agitar la muestra y mediante pipeteo añadir a los 9 ml de TCA 1 ml de suero o plasma.
- c) Mezclar (tapado) por un minuto con un agitador vortex. Dejar en reposo por lo menos 10 minutos y centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm. Decantar el sobrenadante si se desea guardar por un período prolongado.

El sobrenadante representa una dilución de 1 en 10 de la muestra original. Los estándares se deben diluir con TCA en la misma manera.

## **b. Muestreo de hígado**

Para la obtención de muestras mediante biopsia de hígado en bovinos se recomienda la técnica reportada por Chapman *et al.* (1963). Para la obtención de muestras de animales sacrificados se sugiere el siguiente procedimiento: Para prevenir la contaminación de la muestra de hígado, ésta se debe colectar tan pronto se corte el abdomen del animal. Se debe hacer el esfuerzo por no tocar la parte del hígado a ser utilizada. Se deben usar guantes de plástico, cuando sea posible, y cortar de 50 a 100 g (tamaño de un puño) del lóbulo derecho del hígado, con unas tijeras o un cuchillo de acero inoxidable. La muestra de hígado fresco se puede congelar en

una bolsa de plástico o se puede poner en botellas de polietileno con formaldehído al 10%. No se deben utilizar áreas de hígado infestadas con parásitos.

### c. Muestreo de huesos

A veces se usa la composición mineral de los huesos para detectar el estado mineral de los animales. El estatus mineral del animal puede detectarse más correctamente en el esqueleto axial y las costillas. Benzie *et al.* (1959) indican que la reabsorción y rehabilitación de minerales ocurre más rápidamente en el esqueleto axial y las costillas de la oveja que en los huesos largos. Sin embargo, Blincoe *et al.* (1973) no encontraron diferencias en las concentraciones de Ca y Mg en la vértebra caudal, la costilla derecha o el fémur. Little (1972) ha descrito una técnica quirúrgica para la obtención de muestras de las costillas del ganado por biopsia.

Se pueden obtener muestras de los huesos de la cola con un cuchillo o sierra de carne durante el destace, removiendo dos vértebras caudales de la parte próxima al tronco. En ovinos y caprinos, se puede tomar el hueso metacarpus (hueso largo de la extremidad anterior que une al casco). Las muestras de hueso se pueden conservar congeladas o en recipientes con formaldehído al 10% hasta que se preparen para análisis.

### d. Muestreo de forrajes

En general, las muestras de forraje deben tomarse dos veces por año por finca, durante el período final de la estación lluviosa.

(1) **Procedimiento de muestreo.** Antes de tomar las muestras, se debe observar cuidadosamente a los animales en pastoreo y recolectar en las áreas donde éstos comen. En ocasiones es necesario seguir al animal en el potrero y coleccionar las muestras con la mano para que representen lo que el animal consume. Se selecciona al azar diez o más sitios, dependiendo del tamaño del potrero. Luego se combinan las muestras tomadas de diferentes sitios en una sola muestra que pese aproximadamente 400 g de materia fresca. Cuando existan grandes diferencias entre sitios de muestreo (tipo de suelo más vegetación) se deben muestrear individualmente para establecer el porcentaje de cada una de las especies principales. Se deben tomar muestras separadas de las especies más importantes. Se debe anotar la altura de corte y ésta debe representar la altura a que el animal pastorea. Se recomienda el uso de guantes plásticos y tijeras de acero inoxidable. Las muestras se pueden depositar en bolsas de tela para secarlas inmediatamente al aire o se pueden mantener en bolsas de plástico siempre y cuando se sequen al horno pocas horas después de colectadas.

(2) **Secado.** El secamiento del forraje fresco se hace en un horno de aire forzado a una temperatura entre

45° y 60 °C. El secado debe realizarse en poco tiempo (en 8 horas o a lo sumo toda la noche). Se recomienda utilizar bolsas de tela en vez de bolsas de papel. Una vez que las muestras ya están secas secadas, se permite que lleguen a un equilibrio con la humedad ambiental por un período de 48 horas. No se debe mantener las muestras en un cuarto hermético durante el período de equilibrio. Las muestras deben tener 88% o más de materia seca.

### **(3) Molienda y submuestreo.**

Al moler la muestra se puede contaminar con ciertos minerales trazas (Cu, Mn, Se y Zn). Por ejemplo, si se va a analizar Cu, el contenido de este elemento se puede triplicar si se muele la muestra en un molino Wiley con cribas de bronce. Las mejores formas de moler muestras incluyendo el uso de un molino limpio con cribas de acero inoxidable, la utilización de mortero y mango, y el cortado fino del forraje con cuchillo o tijeras de acero inoxidable. Las muestras que se han secado al aire o que están parcialmente secas deben molerse por primera vez a través de una criba de 4 mm. La parte del material que quedó en el molino se debe mezclar con la parte molida en una bolsa grande de plástico, mezclando con movimientos rotatorios (la bolsa debe tener aproximadamente 1/3 de material molido y 2/3 de aire), se toma una submuestra y se muele de nuevo a través de una criba de 1 mm.

**(4) Almacenamiento.** Se coloca aproximadamente 30 g de material molido a través de la criba de 1 mm en

una bolsa de plástico (bolsas Whirl-Pack) y se sella herméticamente para prevenir los cambios de humedad en el laboratorio durante los análisis. En el caso de que se anticipe trabajo analítico adicional, y como precaución contra la pérdida accidental de la muestra, es recomendable almacenar aproximadamente 300 g del material molido en forma gruesa, en un recipiente a prueba de insectos y gases. Es necesario asegurarse que la muestra contenga por lo menos 88% de materia seca. También se pueden incluir bolas de nafta en el recipiente si fuese necesario evitar insectos o moho.

## **5. Diagnóstico de deficiencias y desbalances minerales**

Los desórdenes de nutrición mineral van desde deficiencias minerales agudas o toxicidades caracterizadas por signos clínicos y cambios patológicos bien marcados, hasta una mala condición general o un crecimiento y una producción inferior. Estas últimas condiciones tienen gran importancia porque afectan áreas vastas y a un gran número de animales, además de que pueden confundirse con deficiencias de energía, proteína y varios tipos de parasitismo (Underwood, 1977).

Los signos clínicos de deficiencias minerales, los exámenes patológicos y bioquímicos, así como los análisis de agua, suelos, plantas y tejidos animales, han sido utilizados con diferente grado de éxito para establecer deficiencias o excesos de minerales. El



método más confiable para confirmar deficiencias minerales es la respuesta obtenida con la suplementación de minerales específicos. Sin embargo, tales estudios son costosos en cuanto a tiempo y recursos si son realizados adecuadamente. La mayoría de los desequilibrios minerales, especialmente en condiciones marginales, no presentan manifestaciones patológicas de falta o exceso de un mineral específico, por lo que muchas veces es necesario realizar análisis químicos y ensayos biológicos para identificarlos (McDowell *et al.*, 1984).

Los análisis para determinar las formas minerales disponibles en el suelo puede proveer indicios de deficiencias en el ganado, pero a menudo son difíciles de interpretar y son poco confiables. Datos de Brasil, Bolivia y Florida indican que las correlaciones entre el contenido mineral de suelos, plantas y tejidos animales son altamente variables entre localizaciones y frecuentemente bajas o inexistentes. Las correlaciones típicas entre minerales en forrajes y suelos reportadas en Brasil fueron: Fe = 0.12, Mn = -0.12, Zn = 0.30 (Conrad *et al.*, 1980).

Las desventajas de los análisis forrajeros para evaluar la suficiencia mineral para el ganado en pastoreo incluyen: 1) Incertidumbre de que las muestras sean representativas de lo que el ganado consume; 2) Dificultad para estimar el consumo de forrajes; 3) Variaciones en la disponibilidad de alimentos en el forraje; 4) Posibilidad de que las muestras estén contami-

nadas con suelo. A pesar de ello, los análisis de forrajes son preferibles a los de suelos.

El análisis de tejidos y fluidos animales han mostrado mayor precisión en la evaluación del aporte mineral de la dieta total (forraje, agua, etc.) a los requisitos del ganado. La concentración de minerales en tejidos y fluidos animales, además de las concentraciones de enzimas, metabolitos o compuestos orgánicos específicos con los cuales el mineral considerado está funcionalmente asociado, son indicadores importantes del estado mineral. El tejido hepático es especialmente útil para evaluar el estado del animal en relación con Co, Cu, Mn y Se. La sangre entera y el suero o plasma sanguíneo generalmente se utilizan para estudios de nutrición animal. Concentraciones que estén significativa y consistentemente por encima o debajo de las concentraciones o rangos "normales" (Cuadro 1) son evidencia sugestiva pero no conclusiva de un exceso o deficiencia mineral en la dieta.

Debido a limitaciones serias del P en la sangre y suero como indicadores del estado de este mineral, el análisis más recomendado es el nivel de P en el hueso. La validez de los análisis en tejidos y fluidos animales está en función de las condiciones de muestreo y procesamiento, discutidas previamente.

Dado que muchos factores causan variaciones en el contenido mineral del pelo, es poco probable que los

**Cuadro 1. Diagnóstico de deficiencias o toxicidades de minerales específicos en el ganado vacuno.**

Elemento	Requisito del animal			Tejido	Nivel crítico <sup>c</sup>
	Vaca de leche <sup>a</sup>	Vacuno de carne <sup>b</sup>	Ovino		
<b>Deficiencia</b>					
Calcio, %	0.54	0.18-0.53	0.21-0.52	Hueso (sin grasa) Ceniza de hueso Plasma	24.5 % 37.6% 8 mg/100 ml
Magnesio, %	0.20	0.05-0.25	0.04-0.08	Suero Orina	1-2 mg/100 ml 2-10 mg/100 ml
Fósforo, %	0.38	0.18-0.37	0.16-0.37	Hueso (sin grasa) Ceniza de hueso Plasma	11.5% 17.6% 4.5 mg/100 ml
Potasio, %	0.80	0.50-0.70	0.50		
Sodio, %	0.18	0.06-0.10	0.04-0.10	Saliva	100-200 mg/ml
Azufre, %	0.20	0.08-0.15	0.14-0.26		
Cobalto, ppm	0.10	0.07-0.10	0.10	Hígado	0.05-0.07 ppm
Cobre, ppm	10	4-10	5	Hígado Suero	25-75 ppm 0.65 µg/ml
Yodo, ppm	0.50	0.20-2.00	0.10-0.80	Leche	300 µg/día
Hierro	50	20	30-50	Hemoglobina Transferrina	10 g/100 ml 13-15% sat.
Manganeso, ppm	40	20	20-40	Hígado	6 ppm
Selenio, ppm	0.10	0.20	0.1	Hígado Suero Pelo o lana	0.25 ppm 0.03 µg/ml 0.25 ppm
Zinc, ppm	40	20-40	35-50	Suero	0.6-0.8 µg/ml
<b>Toxicidad</b>					
Cobre, ppm	80	115	8-25	Hígado	700 ppm
Flúor, ppm	30	30-100 <sup>d</sup>	60-200	Hueso	
Manganeso, ppm	1000	150		Pelo	
Molibdeno, ppm	6	6 <sup>d</sup>	5-20	Hígado	
Selenio, ppm	5	5	2.0	Hígado Pelo	
Zinc, ppm	500	500	1000		

Las siguientes determinaciones son técnicas de diagnóstico muy sensitivas: Vitamina B<sub>12</sub> para Co; tiroxina libre para I; ceruloplasmina para Cu y peroxidasa glutatiónica para Se.

Las concentraciones de algunos minerales en el suelo que sugieren deficiencia son: Ca=0.35 meq/100 g, K=0.15 meq/100 g, Mg=0.07 meq/100 g, P=10 ppm, Cu=0.6 ppm, Mn=19 ppm y Zn=2 ppm.

<sup>a</sup> Recomendaciones para vacas lactantes (500 Kg) dando entre 17 y 23 kg de leche (NRC, 1978).

<sup>b</sup> Recomendaciones para etapas de crecimiento y engorde de novillos y novillas (NRC, 1976).

<sup>c</sup> Datos en base seca, tomados de McDowell (1976), McDowell *et al.* (1983) y Mtimuni (1982).

<sup>d</sup> NRC (1980).

análisis de pelo sean indicadores precisos del estado mineral del animal (Combs *et al.*, 1982). Las concentraciones de Ca, P y Cu en el pelo no son afectadas por el consumo de estos minerales. Sin embargo, los contenidos de Zn y Se pueden reflejar el consumo de estos elementos en la dieta. Si se analiza el pelo, hay que tener cuidado de comparar los valores con los de animales control que sean de similar raza, sexo, semental, color y temporada. El pelaje nuevo y la contaminación ambiental son fuentes importantes de variación.

A causa de la complejidad y costo de los análisis de minerales, es importante seleccionar y analizar un número mínimo de plantas y tejidos animales que sean los mejores indicadores del estado mineral del animal.

### **6. Técnicas de mapeo para la determinación de deficiencias y toxicidades minerales**

Las deficiencias o toxicidades del ganado en pastoreo pueden predecirse mediante el uso de una técnica sistemática de encuestas y mapeos o por un reconocimiento regional. Los niveles de Se y Co analizados en forrajes de los Estados Unidos han sido relacionados con enfermedades que responden a la suplementación de Se y Co. Se han llevado a cabo técnicas similares de mapeo para Co y P en Brasil y para Se en Venezuela. Egan (1975) logró identificar, mediante el muestreo y análisis de sedimentos del cause de

ríos, zonas con deficiencias no sospechadas, tales como deficiencia de Cu inducida por exceso de Mo en ganado ovino y bovino, deficiencia en Mn en ganado bovino y deficiencia de Co en ganado ovino. Se han identificado deficiencias de Co y/o Cu en rumiantes en pastoreo en regiones de Brasil, como resultado de bajas concentraciones hepáticas de estos elementos (Tokarnia y Döbereiner, 1973). Deficiencias de P fueron también establecidas en Venezuela y Panamá, teniendo como base bajos niveles de P en suero sanguíneo.

Desde 1974, la Universidad de Florida ha tenido un convenio de cooperación en la investigación mineral con instituciones en América Latina, Africa y el Sudeste de Asia. El propósito de esta investigación ha sido el de identificar deficiencias o excesos de minerales para el ganado en pastoreo, mediante el uso de una técnica sistemática de mapeo, que se basa en el análisis de plantas y tejidos animales, y en observar la respuesta biológica a la suplementación con minerales (McDowell *et al.*, 1984).

### **7. Disponibilidad biológica de diferentes fuentes de fósforo**

La disponibilidad biológica o valor biológico (VB) del P en los ingredientes de la dieta es muy variable, y depende de múltiples factores para las diferentes especies animales. Algunos de estos factores son el tipo de alimento usado, forma química del elemento, la relación Ca:P, edad del ani-

mal, sexo, niveles de energía y grasa, medio ambiente, hormonas, enfermedades, parásitos, niveles de proteína y de microelementos, interacciones con otros minerales y nutrientes, la naturaleza física de las fuentes de P y otros ingredientes en la dieta, tipo de procesamiento, tamaño de partículas y muchos más.

La estructura química de la molécula de fosfato es probablemente el factor más importante en la disponibilidad del P. Las moléculas de fosfato ocurren ya sea en la forma -Ortho- o enlazadas por átomos de oxígeno compartido. Estas estructuras múltiples, denominadas fosfatos condensados, pueden existir como dos moléculas o como polímeros de muchas moléculas. Los piro-fosfatos son dos moléculas enlazadas, mientras que los meta-fosfatos son moléculas con anillos o estructuras cíclicas. Los efectos de las diferentes estructuras sobre el VB de las distintas fuentes de P están bien explicados en la literatura. La evidencia indica que el fosfato debería estar en la forma -Ortho- para ser absorbido y utilizado.

El VB de las fuentes inorgánicas de P (fosfatos) se ha determinado mayormente mediante su comparación con una fuente "standard" a la que se le ha dado arbitrariamente un valor de disponibilidad. Los criterios de respuesta han sido múltiples y variados, pero la mayoría de trabajos han usado % cenizas en hueso como la medida más sensitiva, particularmente en estudios con pollos. El uso de este tipo de ensayos comparativos

superó muchos de los problemas asociados con la determinación de disponibilidad verdadera o absoluta, siendo su ventaja principal el que los resultados pueden ser aplicados ampliamente. Una buena fuente de fosfato siempre es buena y una mala fuente siempre es mala, bajo todas las condiciones.

Por supuesto, el animal obtiene el P no sólo de las fuentes inorgánicas sino también de los ingredientes del alimento, sean ellos de origen animal o vegetal. Esta contribución es generalmente de más del 50% del P total de la dieta. La disponibilidad de P en los ingredientes de origen vegetal ha sido investigada por muchos años. La principal fuente de P en la mayoría de estos ingredientes es el fitato. La molécula de fitato es principalmente ácido hexafosfórico inositol o ácido fítico. Es de conocimiento general que, tal como se encuentra en granos y semillas, dos moléculas de ácido fítico están enlazadas a través de enlaces catiónicos, principalmente Mg y K, pero también en menores cantidades con Ca y otros cationes divalentes menores. El ácido fítico es una fuente relativamente rica en P, pero desafortunadamente la mayoría de éste no está biológicamente disponible. Los animales adultos tienen una mayor habilidad para utilizar fitatos que los animales jóvenes, como resultado de una mayor secreción de la enzima fitasa en el tracto gastrointestinal. La fitasa hidroliza el P del fitato, haciéndolo disponible para el animal.

En resumen, el concepto de disponibilidad biológica es un concepto utilizable cuando es debidamente entendido. Se pueden presentar confusiones si se le considera como disponibilidad absoluta, pues en realidad representa disponibilidad relativa para obtener suplementación mineral apropiada de todas las especies animales (Underwood, 1981).

### 8. Referencias

- BENZIE, D.; BOYNE, A. W.; DALGARDO, A. C.; DUCKWORTH, J.; HILL, R. 1959. Studies of the skeleton of sheep. III. Relationship between phosphorus intake and resorption and repair of the skeleton in pregnancy and lactation. *Journal of Agricultural Science* 52:1.
- BLINCOE, C.; PESPPERANCE, A. L.; BOHMAN, V. R. 1973. Bone magnesium, calcium and strontium concentration in range cattle. *Journal of Animal Science* 36:971.
- CHAPMAN, H. L.; COX, D. H.; HAINES C.H.; DAVIS, G.K. 1963. Evaluation of the liver biopsy technique for mineral nutrition studies with beef cattle. *Journal of Animal Science* 22:733.
- COMBS, D.K.; GOODRICH, R.D.; MEISKE, J.C. 1982. Mineral concentration in hair as indicators of mineral status. A review. *Journal of Animal Science* 54:391.
- CONRAD, H.H.; SOUSA, J.C.; MENDES, M.O.; BLUE, W.G.; McDOWELL, L.R. 1980. Iron, manganese, sodium and zinc interrelationships in a tropical soil, plant and animal system. In IV World Conference on Animal Production. Ed. by L.S. Verde, A. Fernández. Buenos Aires, Argentina. p. 48.
- DAYRELL, M.S.; LOPES, H.O.S.; SAMPAIO, I.B.M.; DOBEREINER. 1973. Factors a serem considerados na interpretação de valores analíticos do fosforo inorgânico no soro sanguíneo dos bovinos. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira, Série Veterinária* 8:43.
- EGAN, A.R. 1975. The diagnosis of trace element deficiencies in the grazing ruminant. In *Trace elements in Soil-Plant-Animal Systems*. New York, EE.UU., Academic Press. p. 371.
- FIELD, A.C. 1984. Mineral and metabolic disorders of livestock with reference to copper, cobalt and phosphorus. *Nuclear Techniques in Tropical Animal Diseases and Nutritional Disorders*. Viena, International, Atomic Energy Agency. 37 p.
- FICK, K.R.; McDOWELL, L.R.; MILES, P.H.; WILKINSON, N.S.; FUNK, J.D.; CONRAD, J.H. 1979.

Métodos de análisis de minerales para tejidos de plantas y animales. Gainesville, Florida, EE.UU, Departamento de Ciencia Animal. Universidad de Florida. 35 p.

FISKE, C.H.; SUBBAROW, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* 66:375.

HARRIS, W.D.; POPAT, P. 1954. Determination of the phosphorus content of lipids. *American Oil Chemistry Society Journal* 31:124.

KIRCHGESSNER, M.; SCHWARZ, J.J. 1976. Trace element deficiency and its diagnosis by radioisotope injection. *Nuclear Techniques in Animal Production and Health. Proceedings of an International Symposium, Viena, 1976.* International Atomic Energy Agency. 81 p.

LITTLE, D.A. 1972. Bone biopsy in cattle and sheep for studies of phosphorus status. *Australian Veterinary Journal* 48:668.

McDOWELL, L.R. 1976. Mineral deficiencies and toxicities and their effect on beef production in developing countries. *In beef Cattle Production in Developing Countries.* Ed. by A.J. Smith. Edinburg, Scotland. University of Edinburg. Centre for Tropical Veterinary Medicine. p. 216.

\_\_\_\_\_; CONRAD, J.H.; ELLIS, G.L. 1983. Mineral deficiencies and their diagnosis. *In Herbivore*

*Nutrition in the Subtropics and Tropics.* Ed. by F.M.C. Gilchrist, R.I. Mackie. Craighall, South Africa, Science Press. p. 241.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; LOOSLI, J.K. 1984. Minerals for grazing ruminants in tropical regions. Gainesville, Florida, EE.UU., Department of Animal Science, Center for Tropical Agriculture y US Agency for International Development. 86 p.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. 1986. Ruminant mineral deficiencies. Radioisotopic and other techniques of detection. *Nuclear and Related Techniques for Improving Productivity of Indigenous Animals in Harsh Environments.* Vienna. International Atomic Energy Agency. 23 p.

NRC. 1976. Nutrient requirements of beef cattle. 4 ed. National Research Council. Washington, D.C., National Academy Press. 89 p.

\_\_\_\_\_. 1978. Nutrient requirements of dairy cattle. 5 ed. National Research Council. Washington, D.C., National Academy Press. 108 p.

\_\_\_\_\_. 1980. Nutrients requirements of beef cattle. 5 ed. National Research Council. Washington, D. C., National Academy Press. 97 p.

MTIMUNI, J.P. 1982. Identification of mineral deficiencies in soil, plant and animal tissues as constrains to

cattle production in Malawi. Ph. D. Thesis, Gainesville, Florida. University of Florida. 214 p.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. 1973. Diseases caused by mineral deficiencies in cattle raised under range conditions in Brasil. A review. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Serie Veterinaria 8 (suplemento): 1.

UNDERWOOD, E.J. 1977. Trace Elements in Human and Animal

Nutrition. 4 ed. New York, EE.UU., Academic Press. 429 p.

UNDERWOOD, E.J. 1979. The current status of trace element nutrition: An overview. The 2nd Annual International Mineral Conference. p. 1.

UNDERWOOD, E.J. 1981. The Mineral Nutrition of Livestock. 2 ed. Farnham Royal, England, Commonwealth Agricultural Bureaux. 180 p.

# DETERMINACION DEL NITROGENO EN LOS ALIMENTOS

*María L. Kass<sup>1</sup>*

## **1. Formas del nitrógeno en el alimento**

El nitrógeno (N) en los alimentos puede dividirse en dos grupos principales: proteína verdadera (PV) y nitrógeno no proteico (NNP) soluble, obviando los ácidos nucleicos y otras formas de NNP (Van Soest *et al.*, 1980). En los forrajes el contenido de ácidos nucleicos es insignificante, pero los productos fermentados, ricos en microorganismos, pueden contener cantidades apreciables de estos componentes.

En general, las plantas contienen cerca de 80% de PV, compuesta por las proteínas de las hojas y tallos, y las de reserva de las semillas. La proteína de las hojas se encuentran en el citoplasma y cloroplastos. Estas proteínas son de alto valor biológico, pero muchas veces se les estima un valor

menor debido a la tradición de expresar la proteína cruda (PC) como el contenido de N x 6.25, olvidando las diferentes formas de N en las plantas (Van Soest, 1982). Las proteínas citoplasmáticas y cloroplasmáticas están en forma soluble en el contenido celular y son muy sensibles al calor y a cambios en el pH. Como ejemplo, se puede citar la baja solubilidad de estas proteínas en los henos. También en las hojas, se encuentra la extensina de las membranas celulares, que es menos soluble y recuperada en los análisis de pared celular (Goering y Van Soest, 1970).

Los concentrados proteicos de origen vegetal son generalmente derivados de semillas de plantas oleaginosas, que contienen proteínas de alta solubilidad (globulinas y albúminas) y muy propensas a la desnaturalización por calor y por los solventes a que son sometidas en la extracción del aceite

---

<sup>1</sup> Ph.D., Nutricionista, Area de Ganadería Tropical, CATIE Turrialba, Costa Rica



(Van Soest, 1982). La calidad nutritiva de estas proteínas puede mejorarse con los tratamientos mencionados, debido a una reducción en su solubilidad y tasa de degradación en el rumen, favoreciendo el escape de proteínas intactas y la mejor utilización del amoníaco en la síntesis microbiana (Beever *et al.*, 1976).

En forrajes verdes la fracción de NNP soluble está compuesta básicamente de amino ácidos no esenciales, pero en ensilajes y henos éstos pueden ser sustituidos por amoníaco y aminos. En forrajes fertilizados con N el contenido de NNP aumenta debido a aumentos en amino ácidos libres y nitratos.

## 2. Fraccionamiento del nitrógeno

La cantidad y composición de N contenido en los forrajes es variable (Crooker *et al.*, 1978) al igual que su localización en el tejido vegetal (Pichard y Van Soest, 1977). Con base en esto es que se hizo el planteamiento de la hipótesis que la utilización del N en el rumiante está afectada por esta variabilidad (Wohlt *et al.*, 1973; Sniffen, 1974) y que algunas propiedades físicas y químicas pueden relacionarse con su valor alimenticio (Little *et al.*, 1963).

Desde el punto de vista de la nutrición de los rumiantes, los compuestos nitrogenados pueden dividirse en fracciones cuyo comportamiento se asocia a determinados procesos

ruminales o postruminales, que determinan su utilización. Es así que se propuso un sistema de fraccionamiento (Pichard y Van Soest, 1977) cuya base conceptual es la degradabilidad de los compuestos nitrogenados, distinguiéndose tres fracciones: Fracción I o A, soluble y rápidamente degradable en el rumen, compuesta por PV y NNP (nitratos, amino ácidos, ácidos nucleicos, aminos); Fracción II o B, constituida por PV y NNP insolubles pero que son parcialmente degradados en el rumen y disponibles al animal; Fracción III o C, que representa el complejo lignina-N, no disponible para el animal.

El concepto de fraccionamiento ha permitido desarrollar métodos que establecen constantes de degradación del N en sus diferentes fracciones (Crawford *et al.*, 1978; Orskov y McDonald, 1979; Mahadevan *et al.*, 1980; Sniffen, 1980). La determinación de estas fracciones, de acuerdo a sus características cinéticas, presenta algunos problemas metodológicos, relacionados especialmente con el tipo de agente utilizado (solventes químicos, microorganismos ruminales, enzimas proteolíticas aisladas). La mayoría de los métodos se basan en un criterio de solubilidad, debido a la simplicidad de su determinación y al hecho de que ella tiene una alta correlación con la liberación de amoníaco (Ciszuk y Eriksson, 1973; Sniffen, 1974; Crooker *et al.*, 1978; Sniffen *et al.*, 1979; Russell *et al.*, 1981).

El problema fundamental de la determinación de solubilidad con solventes químicos es asegurar su

solidez biológica. Existe una amplia variación en la cantidad y tipo de proteínas extraídas por diferentes solventes, resultando en valores distintos de solubilidad para los mismos alimentos (Smith *et al.*, 1959; Little *et al.*, 1963; Waldo y Goering, 1979; Krishnamoorthy *et al.*, 1983). El solvente de elección es el líquido ruminal esterilizado en autoclave, al cual se le ha agregado un regulador de pH (Varga y Hoover, 1983); sin embargo, a pH neutro las proteínas de los forrajes son relativamente insolubles, solubilizándose mayormente el NNP (Pichard y Van Soest, 1977). Otras desventajas de este solvente son su composición variable, la dificultad de obtención y el filtrado (Wohlt *et al.*, 1980). El uso de solventes minerales como cloruro de sodio, Burroughs, bicarbonato-fosfato, saliva artificial y borato-fosfato, dan resultados comparables con los del licor ruminal.

Krishnamoorthy *et al.* (1982) indican que el borato-fosfato puede ser el solvente preferido por su estabilidad durante el almacenamiento, aunque el de Pichard y Van Soest (1977) le supera en simplicidad. También señalan que el bicarbonato-fosfato es fácil de preparar y presenta resultados altamente correlacionados con los del licor ruminal esterilizado ( $r = 0.93$ ), comparándose favorablemente con correlaciones de 0.92 obtenidas con el borato-fosfato.

La solubilidad no es sinónimo de degradabilidad; ambos están independientemente relacionados con as-

pectos de la estructura proteica como, por ejemplo, los enlaces disulfidos (Miller, 1982). De hecho, la correlación entre la solubilidad del N en solventes minerales y el N sobrepasante explica menos de un tercio de la variabilidad total (Owens, 1978). Sin embargo, las proteínas solubles, por sus características propias de solubilidad, son más lábiles frente a los sistemas enzimáticos y, por lo tanto, su degradabilidad potencial es muy alta.

Prácticamente todo el N soluble en solventes minerales, contenido en forrajes, ensilajes y henos, es NNP, con apenas un 5% de PV soluble; pero ciertos alimentos concentrados son fuentes importantes de esta última fracción (Mahadevan *et al.*, 1980). La PV soluble se determina por precipitación con ácido tungsténico (Lowry *et al.*, 1951), luego de una extracción con solventes minerales.

Las proteínas solubilizadas en solventes minerales (Fracción A) son las únicas que contribuyen al incremento de N soluble ruminal que se observa postingesta. Aquí contribuye también, y en forma muy importante, la Fracción B<sub>1</sub>, compuesta por proteínas y compuestos nitrogenados insolubles en soluciones minerales, pero que son degradados rápidamente en el rumen (Pichard y Van Soest, 1977). Nutricionalmente, el comportamiento y la utilización de las Fracciones A y B<sub>1</sub> en el rumen no difieren. A este respecto, es interesante señalar que en los ensilajes la Fracción B<sub>1</sub> prácticamente no existe, pues ha pasado a ser parte de la Fracción A, debido a la actividad proteolítica en el silo.

La fracción B<sub>2</sub> representa aquella que es insoluble en solventes minerales y que, en presencia de enzimas proteolíticas (ruminales u otras), presenta una degradación lenta. Esta fracción puede escapar a la hidrólisis ruminal, dependiendo de los tiempos de retención o niveles de consumo. Orskov y McDonald (1979) han propuesto un modelo para calcular la probabilidad de escape ruminal de esta fracción proteica.

El N no disponible (Fracción C) se estima como N insoluble en detergente ácido (NIDA), y está compuesto por productos de la reacción Maillard, proteínas condensadas con taninos, así como N lignificado. Los productos de Maillard pueden contribuir grandemente a la fracción no disponible, principalmente en alimentos sometidos a tratamientos con calor, y en ensilajes con alto contenido de materia seca (Goering, 1976; Sniffen *et al.*, 1979).

### **3. Determinación de la proteína cruda - Método Kjeldahl**

La determinación del N total por el método de Kjeldahl es un procedimiento bien conocido, por lo que no se discutirá en detalle. Consiste en el tratamiento de una muestra de peso conocido con ácido sulfúrico concentrado en ebullición, al cual se le ha agregado K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para subir el punto de ebullición de la mezcla en digestión. La adición de un catalizador (cobre, mercurio o selenio) se hace para facili-

tar la oxidación de la muestra. El N de la muestra se convierte en amoniaco, el cual permanece en solución en forma de sulfato de amonio. El amonio es liberado mediante la alcalinización de la muestra, seguido por una destilación. El amonio se colecta en un ácido débil estandarizado y titulado con un ácido fuerte estandarizado.

### **4. Métodos para determinar la solubilidad del nitrógeno**

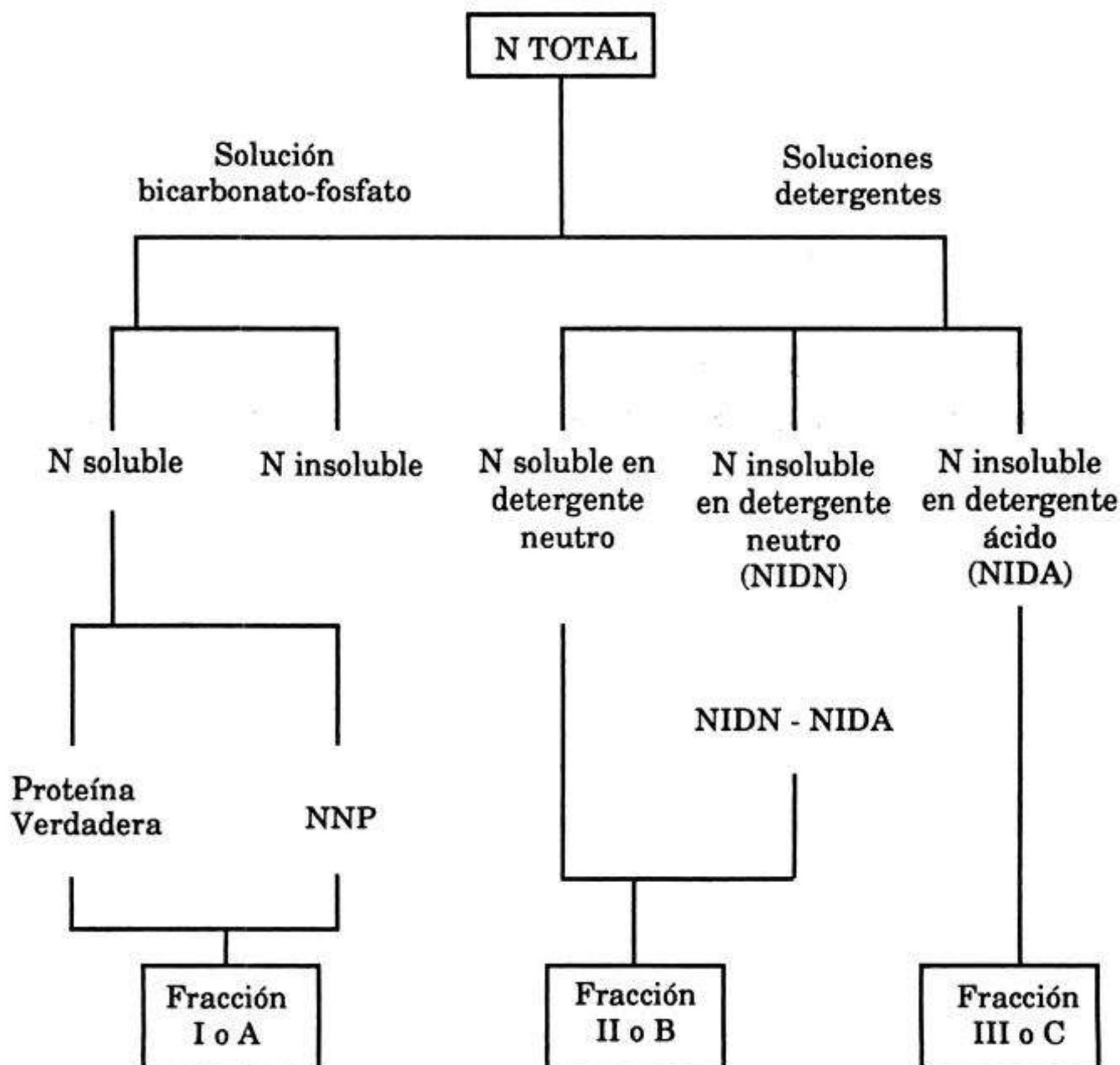
Aunque se reconoce la importancia de medir la solubilidad de la proteína, este campo de estudio es todavía confuso por la falta de métodos estandarizados. Los métodos como N insoluble en detergente ácido y digestibilidad en pepsina son muy buenos para medir el N no disponible y tienen buena correlación con los valores de digestibilidad *in vivo*. Sin embargo, estos métodos no miden la proteína insoluble que es potencialmente digerible.

Los métodos que miden la solubilidad del N en varias soluciones acuosas pueden clasificarse en aquellos que esencialmente separan el NNP soluble de la proteína total, y los que separan la PV real. La confusión entre NNP y proteína soluble es un problema de los métodos de solubilidad. Los métodos que precipitan las proteínas, como el uso de ácido tricloroacético y el ácido tungsténico, separan el NNP de la PV. Otros, como la extracción con agua caliente, producen resultados semejantes, pues las

proteínas de las hojas son coaguladas por el calor y solamente el NNP permanece disuelto. Las extracciones en frío, con "buffers", simulando el licor ruminal, disuelven muy poco de la PV de los forrajes y ensilajes. Por otro lado, la extracción de forrajes con agua fría disuelve hasta 50% de la proteína citoplasmática. La solubilidad aumenta como resultado de agitar y/o

macerar la muestra. El N de los alimentos puede fraccionarse según el esquema que se presenta en la Figura 1.

Los procedimientos analíticos sugeridos para la determinación de la solubilidad del N (Krishnamoorthy *et al.*, 1982), de la PV soluble (Lowry *et al.*, 1951) y de la solubilización de la



**Fig. 1. Fraccionamiento del nitrógeno en los alimentos**  
(Krishnamoorthy *et al.*, 1982)

PV (Pichard y Van Soest, 1977) se presentan en los anexos I, II y III, respectivamente.

## 5. Referencias

- BEEVER, D.E.; THOMSON D.J.; CAMMELL, S.B. 1976. The digestion of frozen and dried grass by sheep. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 86:443.
- CISZUK, P; ERIKSSON, S. 1973. Ammonia formation in the rumen of sheep fed on grass, clover or lucerne preserved in various ways. *Swedish Journal of Agricultural Research* 3:13.
- CRAWFORD, R.J.; HOOVER, W.H.; SNIFFEN, C.J.; CROOKER, B.A. 1978. Degradation of feedstuff nitrogen in the rumen *vs.* nitrogen solubility in three solvents. *Journal of Animal Science* 46:1968.
- CROOKER, B.A.; SNIFFEN, C.J.; HOOVER, W.H.; JOHNSON, L.L. 1978. Solvents for soluble nitrogen measurements in feedstuffs. *Journal of Dairy Science* 61:437.
- GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. 1970. Forage fiber analysis. Beltsville, Maryland, EE.UU., U.S. Department of Agriculture. Handbook No. 379. 20 p.
- \_\_\_\_\_. 1976. A laboratory assessment on the frequency of over-heating in commercial dehydrated alfalfa samples. *Journal of Animal Science* 43:869.
- KRISHNAMOORTHY, U.; MUSCATO, T.V.; SNIFFEN, C.J.; VAN SOEST, P.J. 1982. Nitrogen fractions in selected feedstuffs. *Journal of Dairy Science* 65:217.
- \_\_\_\_\_.; SNIFFEN, C.J.; STEIN, M.D.; VAN SOEST, P.J. 1983. Evaluation of a mathematical model of rumen proteolysis to estimate the rumen-undegraded nitrogen content of feedstuffs. *British Journal of Nutrition* 50:555.
- LITTLE, C.O.; BURROUGHS, W.; WOODS, W. 1963. Nutritional significance of soluble nitrogen in dietary proteins for ruminants. *Journal of Animal Science* 22:358.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265.
- MAHADEVAN, S.; ERFLE, J.D.; SAUER, F. 1980. Degradation of soluble and insoluble proteins by *Bacteroides amylophilus* protease and by rumen microorganisms. *Journal of Animal Science* 50:723.
- MILLER, E.L. 1982. Methods of assessing proteins for ruminants, including laboratory methods. *In* Protein contribution of feedstuffs for ruminants: Application to feedstuff formulation. Ed. by E.L.

- Miller, I.H. Pike, A.S.H. Van Ess. England, Butterworth Scientific. p.18.
- ORSKOV, E.R.; McDONALD, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 92:499.
- OWENS, F.N. 1978. Protein solubility and ruminant nutrition. *Feedstuffs* 50(28):23.
- PICHARD, G.; VAN SOEST, P.J. 1977. Protein solubility of ruminant feeds. *In Proceedings of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*. Ithaca, New York, EE.UU., Department of Animal Science, Cornell University. p. 91.
- RUSSELL, J.B.; BOTTJE, W.G.; COTTA, M.A. 1981. Degradation of protein by mixed cultures of rumen bacteria: Identification of *Streptococcus bovis* as an actively proteolytic bacterium. *Journal of Animal Science* 55:242.
- SMITH, C.R.; EARLE, F.R.; WOLFF, I.A. 1959. Comparison of solubility characteristics of selected seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 7:133.
- SNIFFEN, C.J. 1974. Nitrogen utilization as related to soluble NPN and protein in feeds. *In Proceedings of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*. Buffalo, New York, EE.UU., Department of Animal Science, Cornell University. p. 12.
- \_\_\_\_\_.; HOOVER, W.H.; JUNKINS, L.L.; CROOKER, B.A.; MACGREGOR, C.A. 1979. The soluble protein concept and its value in ruminant feeding. *Feedstuffs* 52(20):25.
- \_\_\_\_\_. 1980. Variation in protein and soluble carbohydrates composition of various feedstuffs. *In Proceedings of the Cornell Nutrition Conference*. Ithaca, New York, EE.UU., Department of Animal Science, Cornell University. p. 119.
- VAN SOEST, P.J.; SNIFFEN, C.J.; MERTENS, D.R.; FOX, D.G.; ROBINSON, P.H.; KRISHNA-MOORTHY, U. 1980. A net protein system for cattle: The rumen submodel for nitrogen. *Proceedings of an International Symposium at Oklahoma State University*. Ed. by F.N. Owens. Stillwater, Oklahoma, EE.UU., Oklahoma State University. p. 265.
- VAN SOEST, P.J. 1982. *Nutritional ecology of the ruminant*. Corvallis, Oregon, EE.UU., O&B Books, Inc. p. 230.
- VARGA, C.A.; HOOVER, W.H. 1983. Rate and extent of neutral detergent fiber degradation of feedstuffs *in situ*. *Journal of Dairy Science* 66:2109.

WALDO, D.R.; GOERING, H.K.  
1979. Insolubility of proteins in  
ruminant feeds by four methods.  
Journal of Animal Science 49:1560.

WOHLT, J.E.; SNIFFEN, C.J.;  
HOOVER, W.H. 1980.  
Measurements of protein solubility  
in common feedstuffs. Journal of  
Dairy Science 56:1052.

## ANEXO I

### Determinación de la solubilidad del nitrógeno

#### 1. Equipo y materiales

- Balanza analítica
- "Beaker" de 100 ml
- Varilla de vidrio
- Papel filtro presecado y pesado
- Sistema de filtro al vacío
- Desecador

#### 2. Reactivos y soluciones

Solución "buffer" de borato-fosfato (12.20 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$  + 8.91 g de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$  por litro de agua destilada).

#### 3. Procedimiento

- Determine el porcentaje de proteína cruda en la muestra por Kjeldahl.
- Pese alrededor de 2 g de forraje (0.5 g para leguminosas o concentrados proteicos) y colóquelos en un "beaker" de 100 ml. Corra un papel filtro como blanco.
- Agregue 25 ml de la solución "buffer". Agite con una varilla de

vidrio (no la retire aún).

- Agregue otros 25 ml del "buffer" y deje la solución en reposo por 1 hora a temperatura ambiente. Al cabo de 1 hora, agite nuevamente con la varilla de vidrio.
- Filtre con papel filtro. Lave el residuo, paredes del "beaker" y varilla de vidrio con 50 ml del "buffer". Repita el lavado con aproximadamente 150 ml de agua destilada.
- Seque el residuo en el papel filtro a 60°C durante 12 horas. El peso de los papeles filtro debe determinarse con anterioridad.
- Tome una muestra del residuo seco y determine su contenido de proteína cruda.

#### 4. Cálculos

Proteína soluble = proteína original - [proteína residual - proteína del blanco].

## ANEXO II

### Determinación de la proteína verdadera soluble

Este método es una combinación de dos reacciones químicas: la reacción del reactivo fenólico con los residuos de tirosina de la proteína, y la formación de un complejo proteína-cobre de color azul, debido a la presencia de cadenas péptidas.

#### 1. Equipo y materiales

- Balanza analítica
- Centrífuga
- Agitador mecánico
- Espectrofotómetro
- Línea de vacío
- Pipetas
- Tubos de ensayo (15x150 mm)
- Pipeta Pasteur

#### 2. Soluciones y reactivos

Reactivo A: 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 0.1 N de NaOH.

Reactivo B: 0.5% de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en 1% de tartrato de sodio o de potasio.

Reactivo C: 50 ml del Reactivo A + 1 ml del Reactivo B (preparar diariamente).

Reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma Chemical Co.) diluido 1.0 N (preparar diariamente).

Albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co., A-4503) como estandar.

#### 3. Procedimiento

- Tome una alícuota de 3 ml de la solución de N extraído con borato-fosfato (Anexo I) en un tubo de ensayo.
- Agregue 1 ml de ácido tricloroacético al 24% y mezcle con un agitador mecánico.
- Centrifugue a 300 rpm durante 45 minutos.
- Aspire cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta Pasteur conectada a una línea de vacío.
- Agregue al residuo 3 ml del Reactivo C y 0.3 ml del Reactivo Folin-Ciocalteu.
- Deje reposar por 45 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad.
- Lea las muestras y una curva estándar con el espectrofotómetro a 600  $\mu\text{m}$ .



## ANEXO III

### Determinación de la solubilización de la proteína verdadera

La estimación de la solubilización de la PV depende de la determinación previa de las Fracciones A (NNP o N soluble - Anexo II) y C (N no disponible - NIDA - método de detergentes). La proteína residual disponible (PRD) se calcula por:

$$\text{PRD} = \text{N total} - (\text{Fracción A} + \text{Fracción C})$$

#### 1. Soluciones y reactivos

Solución borato-fosfato (Anexo II)

Solución de proteasa (30 mg/ml): Disuelva 30 mg de proteasa tipo V (1.1 unidades/mg proteína, Sigma Chemical Co.) en la solución de borato-fosfato (pH 8) y completar el volumen a 1000 ml. Filtrar en papel Whatman # 54 y refrigerar.

#### 2. Procedimiento

- Pese de 0.5 a 1 g de muestra en un Erlenmeyer de 125 ml. Agregue 40 ml de la solución de borato-fosfato y deje reposar por 1 hora en baño maría a 39° C.
- Agregue 10 ml de la solución de proteasa a intervalos de 1 a 2 minutos entre muestras y cubra los Erlenmeyers con tapones de hule. Incube nuevamente en baño maría y agite intermitentemente.
- Retire los Erlenmeyers a los siguientes tiempos de incubación: 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 20, 26, 38 y 48 horas. Filtre de inmediato, lavando el residuo con 300 ml de agua destilada.
- Determine el N residual disponible por Kjeldahl y grafique los datos en papel semilogarítmico. Analice de acuerdo a Shipley y Clark (1972)<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Shipley, R.A.; Clark, R.E. 1972. Tracer methods for *in vivo* kinetics: Theory and applications. New York, EE.UU., Academic Press.

## RECOMENDACIONES SOBRE MUESTRO Y ANALISIS QUIMICO

*Gastón Pichard<sup>2</sup>, Oswaldo Rosero, María Kass, Felix Ojeda*

### **1. Muestro de alimentos**

Debe recordarse que la representatividad de cualquier análisis es función directa de la calidad del muestreo, el cual puede involucrar mayor grado de incertidumbre y error que cualquiera de los análisis que se desee realizar. El error de muestreo tiende a aumentar conforme aumenta la heterogeneidad y el volumen o cantidad de material a muestrear, y con la relación volumen/cantidad de muestra tomada. Algunas precauciones que permiten aumentar la representatividad de la muestra obtenida se presentan en los párrafos siguientes.

#### **a. Alimentos secos**

Los concentrados y suplementos secos deben muestrearse por lote de producción o por lote recibido. Si el material se recibe a granel, se toman seis muestras de 0.5 kg por cada cinco toneladas de alimento. Por otro lado, si el alimento se recibe en bolsas, debe considerarse la posibilidad de segregación de partículas dentro de la bolsa. Los sacos deben muestrearse en forma diagonal (cinco a seis muestras), pudiéndose utilizar muestreadores cilíndricos o cónicos (Tejada, 1985). En lo posible, se recomienda muestrear todos los sacos; sin embargo, si su número lo hace impo-

---

<sup>1</sup> Las consideraciones que en este documento se presentan se refieren al muestreo y análisis químico de recursos alimenticios no conservados como ensilaje. Para evaluación de ensilajes se refiere al lector al trabajo de Wernli y Ojeda, y a las recomendaciones del Grupo de Trabajo No. 4, ambos contenidos en esta Guía Metodológica.

<sup>2</sup> Coordinador del grupo de trabajo.

sible, se recomienda muestrear un mínimo de 2% de ellos (Tejada, 1985). El deterioro del material durante el período experimental debe controlarse, especialmente en el caso de mezclas minerales que tienden a ser muy higroscópicas (Van Soest y Robertson, 1985).

Se recomienda el uso de barrenos para muestreo de pacas o fardos de heno. Si el objetivo del trabajo es determinar la calidad del material producido, el muestreo debe realizarse al completar el proceso de producción. En pruebas de consumo y producción el muestreo debe realizarse cuando el material se suministra a los animales, pues puede sufrir deterioro con el tiempo. En cualquier caso, se debe determinar una proporción fija de fardos a muestrear, que puede variar entre 10 y 20%, y el peso combinado de todas las muestras tomadas debe ser como mínimo 2 kg (Van Soest y Robertson, 1985).

### **b. Muestreo de alimentos húmedos**

El muestreo de este tipo de recursos está sujeto a un mayor grado de error que el de alimentos secos, por lo que el proceso requiere de mayor atención. Para el muestreo de forraje bajo pastoreo, se recomienda considerar los lineamientos discutidos por Mendoza y Lascano (1985) y Lascano *et al.* (1985).

Cuando el muestreo se realiza en lugares alejados del laboratorio, es recomendable colocar el material en

bolsas herméticas de nylon o polietileno, las que deben colocarse en cajas isotérmicas con hielo seco o cualquier otra mezcla refrigerante (hielo, alcohol y sal común)

## **2. Manejo y conservación de muestras**

El objetivo de la preparación de muestras es convertir la muestra primaria a una forma estable, uniforme, y que facilite la obtención de muestras representativas para el análisis. En general, las muestras pueden sufrir cambios en su composición como resultado de diferentes factores: a) Pérdida selectiva de alguno de sus componentes, b) Contaminación y c) Reacciones químicas o físicas durante el secado, la molienda y el período de almacenamiento. Por lo tanto, la preparación de la muestra para análisis es tan importante como el muestreo (Van Soest y Robertson, 1985).

Las muestras de concentrados y de suplementos son relativamente fáciles de preparar, pues su contenido de humedad es bajo y generalmente no requieren de molienda. Dependiendo de los objetivos del trabajo, una vez tomadas pueden ser mezcladas y submuestreadas para obtener una muestra compuesta. Para ello se puede hacer uso de divisores o se esparce el material mezclado sobre un papel, guardando sólo las porciones de áreas pre-seleccionadas.

Las muestras húmedas presentan mayores problemas. No existe un método de preparación que satisfaga todas las condiciones. El analista debe definir qué procesamiento dará a las muestras en función de los análisis que se deseen realizar. En general, las muestras se pueden almacenar secas o congeladas. Cada una de estas alternativas tiene sus ventajas y desventajas, que a continuación se discuten muy brevemente. Para una discusión más detallada del proceso de preparación de muestras en función del análisis a realizar consúltese la publicación de Van Soest y Robertson (1985).

#### **a. Secado de la muestra**

El secar la muestra puede tener como objetivo el determinar su contenido de MS, o simplemente disminuir su contenido de agua hasta el punto en que se pueda almacenar sin que sufra cambios en su composición. Si el objetivo es la simple reducción del contenido de humedad, se debe considerar qué tipo de análisis se quiere realizar posteriormente, antes de aplicar un método de secado. También debe indicarse que esta eliminación preliminar del agua debe ser considerada al momento de expresar los resultados de análisis posteriores.

El secado de muestras en estufa, a temperaturas superiores a los 65°C afecta la composición química del material, como resultado de pérdidas parciales de componentes volátiles (ácidos grasos, amoníaco, alcoholes), desnaturalización de las proteínas y

formación de productos Maillard (Van Soest y Robertson, 1985). Es por ello que se recomienda que la muestra se seque con una temperatura inicial de 100°C durante 1-2 h, reduciéndose luego la temperatura a 65°C hasta alcanzar un peso constante (Van Soest y Robertson, 1985).

Se ha propuesto la liofilización como un método alternativo para el secado de muestras. Si bien es el método más adecuado para evitar daños por calentamiento, no evita las pérdidas de productos volátiles, principalmente de amoníaco. Además, en ocasiones se presentan dificultades en la eliminación total del agua, sobre todo con muestras pastosas, pudiéndose sobreestimar el contenido de MS.

Una vez secada, la totalidad de la muestra debe molerse y submuestrearse en la misma forma que se indicara en la preparación de muestras secas. Dado que las muestras secas pueden absorber humedad del ambiente, se recomienda dejar que éstas se estabilicen (exponerlas a temperatura y humedad ambiental) por un período de 24 h, debiéndose posteriormente determinar el contenido real de MS absoluta (100°C) para corregir los resultados de los diferentes análisis. Idealmente, deben almacenarse en frascos de vidrio de boca ancha que puedan cerrarse fuertemente. También se pueden usar botellas plásticas y bolsas de polietileno. En todo caso, no se debe llenar más de dos tercios del recipiente, pues ello dificulta la mezcla del material (Van Soest y Robertson, 1985).

## b. Congelamiento de muestras

Algunos análisis, particularmente aquellos relacionados con el nitrógeno (N) y su partición de acuerdo a su degradabilidad en el rumen, es preferible hacerlos en el material fresco. En estos casos, la congelación de muestras es una buena alternativa de almacenamiento. Sin embargo, deben considerarse los siguientes puntos:

- Las bolsas de polietileno no son impermeables y, en consecuencia, se produce una pérdida de humedad durante el período en que las muestras están congeladas.
- La congelación tiene poco efecto sobre el contenido total de N y de energía.
- Puede resultar en incrementos menores de fibra y ceniza, y una pequeña reducción en el N soluble. El mayor efecto lo tiene sobre los carbohidratos no estructurales, incrementando los azúcares reductores (glucosa) y reduciendo los no reductores.
- La actividad enzimática en el material se detiene temporalmente por la congelación. Solamente las temperaturas altas inactivan los sistemas enzimáticos. Debe indicarse que los carbohidratos solubles, la proteínas, las vitaminas y los pigmentos son los compuestos más sensibles a reacciones enzimáticas.

## c. Molienda de muestras

La reducción del tamaño de partícula de las muestras tiene como fin el facilitar la obtención de muestras representativas para análisis y aumentar el área de exposición a los reactivos. Los métodos más comunes para moler muestras incluyen el uso de molinos de cuchilla y tamiz, licuadoras y máquinas para moler carne. El uso de molinos es común en la molienda de materiales secos. Mucha de la literatura sugiere moler las muestras a través de un tamiz de 1 mm. Sin embargo, muchos forrajes son difíciles de moler en un solo paso, produciéndose un calentamiento excesivo del material. Por ello se recomienda molerlos en forma secuencial a través de tamices de diferente tamaño. Cuando se trate de concentrados o suplementos minerales no es necesario molerlos. En el caso de forrajes, una molienda final con un tamiz de 2 mm es adecuada. Durante la molienda, debe molerse la totalidad de la muestra primaria. Se debe recojer todo el material (también el que queda dentro del molino) en la bolsa recolectora, mezclar bien y proceder a obtener el material que se utilizará en los análisis.

El uso de licuadoras y molinos para carne es más común en la molienda de materiales húmedos, pues el molino de cuchillas resulta en problemas de calentamiento excesivo, a menos que se agregue hielo seco. Las licuadoras funcionan bastante bien, especialmente si el material está congelado y se agrega hielo seco. El pro-

blema con este método es que tienen poca capacidad para moler muestras grandes. Los molinos para carne producen mucho calentamiento cuando se muelen materiales muy fibrosos, además que tienden a extraer los líquidos contenidos en el material. El uso de materiales congelados puede solventar parcialmente esta situación; sin embargo, el proceso es lento y tedioso por la limpieza de la máquina entre muestras.

No todos los laboratorios cuentan con las facilidades para procesar muestras con métodos sofisticados, pero se debe tener en consideración que hay muchos experimentos en los cuales no se requiere una alta precisión en la determinación de MS, por lo que puede tolerarse cierto grado de alteración en el proceso de preparación de muestras. En el manejo de muestras húmedas, el orden descendiente de preferencia es congelación y molienda de muestras húmedas, liofilización y molienda, secado a 65°C y molienda.

### **3. Pesaje en el proceso de análisis**

La precisión de cualquier análisis gravimétrico es función directa de la precisión del pesaje. Dado que el peso de los recipientes puede afectarse por la temperatura a que se encuentren y, consecuentemente, por el agua adsorbida, es necesario estandarizar dicha influencia (Van Soest y Robertson, 1985). Tradicionalmente esto se ha logrado con el uso de desecadores y materiales desecantes; sin embargo,

muchos materiales, principalmente de tipo celulósico, compiten con los desecantes gracias a su alta capacidad higroscópica, por lo que Van Soest y Robertson (1985) recomiendan el pesaje en caliente sobre el uso de desecadores, especialmente en análisis de fibra. Para ello, recomiendan el uso de una balanza analítica con una precisión de 0.1 mg. La balanza debe colocarse junto al horno de secado, de tal manera que el analista pueda abrir el horno, sacar muestras, cerrar y pesar con un mínimo de movimiento. El horno debe tener la capacidad de mantener 100°C a pesar del continuo abrir y cerrar de su puerta, operación que se debe lograr con una sola mano. Ya que los recipientes se pesan tal y como salen del horno (100°C), se produce una transferencia de calor de las muestras a la balanza, lo que tiende a distorsionar los pesajes iniciales (pesos menores que los reales). Para evitar esto, se recomienda "calentar la balanza" pesando varios recipientes vacíos (8-10) antes de iniciar el pesaje de las muestras. Con los pesajes subsecuentes se tiende a establecer un equilibrio entre el calentamiento que se produce durante el pesaje de una muestra y el enfriamiento que ocurre entre pesajes. El colocar un plato de teflón sobre el plato de la balanza reduce la cantidad de calor que se transfiere al instrumento.

### **4. Determinación de la materia seca**

Los resultados de los análisis químicos realizados en las muestras se deben expresar con base en la MS

absoluta. Sin embargo, la determinación exacta de la MS es difícil de lograr, pues algunos líquidos están asociados a estructuras moleculares muy complejas, además de que no existe un método que sea 100% exacto en la determinación de MS. Es por ello que muchas veces se opta por expresar los resultados con base en la MS al aire. El empleo de esta última forma de expresar los resultados se justifica sólo cuando no se dispone de los medios necesarios para determinar MS absoluta. Bateman (1970) indica que las diferencias entre estas formas de expresar MS son elevadas (5% cuando la humedad relativa es menor a 45%, 15-20% cuando la humedad es superior a 70%).

La determinación del contenido de humedad puede hacerse por métodos directos o indirectos. Los primeros involucran la extracción del agua mediante reacción con un compuesto químico, mientras que los segundos se basan en las diferencias de peso que se producen como resultado de exponer el material a un proceso de deshidratación (calor).

En muchas ocasiones, el mismo material usado en la determinación de MS es utilizado en otros análisis, por lo que deben tomarse en cuenta las consideraciones presentadas en la sección sobre secado de muestras.

#### **a. Determinación de la MS con estufa**

Entre los métodos de determinación indirecta de la MS se encuentran los de deshidratación en estufa de

aire forzado. Involucran la deshidratación del material (2 g) a temperaturas que varían de 70°C a 100°C hasta alcanzar peso constante (Tejada, 1985). Similar a lo anterior, se han sugerido temperaturas de 100°C a 110°C, 135°C y 103°C durante 18, 2 y 4 h, respectivamente (Tejada, 1985; Van Es y Van der Meer, 1980). Una modificación de estos métodos involucra la utilización de estufas con vacío (-100 mm de Hg), reduciendo el tiempo de permanencia en la estufa a 5 h (Bateman, 1970). Van Soest y Robertson (1985) señalan que no existe un método que se pueda generalizar y, dado que la determinación de MS por exposición al calor es un método ampliamente utilizado, recomiendan el siguiente procedimiento: Pesar 1-3 g en un recipiente previamente tarado (platos de aluminio, crisoles de "pyrex" o porcelana). Secar el material a 100°C durante 2 h y luego colcarlo en un desecador con  $P_2O_5$  a enfriar. El método funcionará adecuadamente si no se sobrecarga la estufa con muestras y si no se abre durante el período de secado, aunque está sujeto a las pérdidas de sustancias volátiles anteriormente indicadas. Cualquier material secado a 100°C no es apto para análisis posteriores (excepto cenizas), por lo que esta práctica debe descartarse (Van Soest y Robertson, 1985).

#### **b. Destilación con tolueno**

El método más difundido (aunque no el más recomendable) para la determinación directa de agua es el de destilación con tolueno. A pesar de

que sus resultados son más precisos que los del método de secado en estufa, también tiende a sobreestimar el contenido de agua como resultado del arrastre de sustancias volátiles (ácidos grasos, sales de amoníaco, etanol y aminas volátiles). Se han desarrollado procedimientos para corregir por el aporte de ácidos grasos volátiles; sin embargo, los resultados no han sido muy satisfactorios dada la complejidad y variabilidad de las sustancias contaminantes, encontrándose que en el mejor de los casos la corrección sólo corrige un 50% de la contaminación (Van Soest y Robertson, 1985). Otras razones por las que este método no es muy recomendable se encuentran en el riesgo físico del analista, no sólo por lo inflamable de los gases producidos (el riesgo se reduce con el uso de campanas extractoras) sino también por las propiedades cancerígenas del tolueno.

### c. Secado con acetona

Es muy adecuado para la preparación de material cuando se va a hacer análisis de lignina y de otros componentes de fibra y pared celular. Se realiza con el siguiente procedimiento (Van Soest y Robertson, 1985):

- Se pesa 100 g de muestra húmeda en un Erlenmeyer de boca ancha y se agrega 400 ml de acetona grado reactivo. Se mezcla bien y se deja reposar por 1 h, mezclando ocasionalmente. La extracción de forrajes con acetona puede hacerse con una licuadora.

- Se mezcla y vierte el contenido en un embudo Buchner de 10 cm previamente pesado. Se deja sedimentar la mezcla y se aplica vacío para eliminar la acetona.
- Se utiliza otros 400 ml de acetona para sacar el material remanente en el Erlenmeyer y para lavar el que se encuentra en el embudo. Una sola lavada es suficiente, y no es necesario el extraer todos los pigmentos.
- Se seca el material por succión y se coloca en un horno a 40 °C durante 4 h. Se pesa el embudo más su contenido y se calcula el rendimiento de material seco. El material se guarda en un recipiente que pueda ser tapado fuertemente.
- Para obtener el valor equivalente a MS por horno, se multiplican los valores de MS obtenidos con acetona por el siguiente factor de corrección:

$$FC = \frac{\text{MS en la muestra húmeda}}{\text{Rendimiento obtenido por acetona}}$$

### d. Otros métodos

Se han propuesto otros métodos para la determinación directa del agua, como el de Hood *et al.* (1971) y método Karl Fischer (Van Soest y Robertson, 1985). Las determinaciones obtenidas con estos métodos son más precisas, pero requieren contar con un titulador automático.



### e. Consideraciones en casos específicos

El secado de heces (sujeto a alteraciones y pérdidas de N) se puede realizar en estufa a 65°C. Dada la naturaleza pastosa de las heces de bovinos, es necesario desmenuzarlas antes de introducirlas en la estufa, para evitar reacciones provocadas por la temperatura y la humedad, como consecuencia del encostramiento superficial de las mismas. Las heces de animales que las eliminan en forma de "pellets" deben desmenuzarse.

La determinación de sólidos en la orina frecuentemente se realiza por liofilización, pero ello puede resultar en pérdidas importantes de N. Otra posibilidad es la de utilizar un hidrómetro especial y expresar el contenido de sólidos, en relación al agua destilada, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Sólidos en orina, g/ml} = \text{gravedad específica de orina} - 1$$

Los productos azucarados como las mieles de caña o remolacha, siropes etc., tienden a formar espuma y a desbordarse de los recipientes cuando se secan en estufa. Por otra parte, algunos compuestos se descomponen con el calor, introduciendo errores en el análisis. Lo más adecuado es deshidratar al vacío (-100 mm Hg) y a temperaturas no mayores de 80°C, empleando arena sílice como dispersante para proporcionar mayor superficie de exposición (Van Es y Van der Meer, 1980).

Para determinar los sólidos presentes en la leche se parte de una evaporación controlada en cápsulas de porcelana y, posteriormente, se introducen las muestras en una estufa a 35-36°C hasta que alcancen un peso constante (AOAC, 1965). Dada la alta higroscopicidad de los sólidos lácteos, se deben pesar en caliente o, en su defecto, enfriar en un desecador con un agente deshumectante fuerte en el menor tiempo posible.

En los últimos años han incrementado los estudios relacionados con el uso de raíces y tubérculos. Se debe tener especial cuidado con estos recursos por la posible contaminación con tierra. En estos casos (y en todos aquellos en que se sospeche contaminación con suelo) es preferible trabajar con base en la materia orgánica.

Los tallos de banano o plátano, y cualquier otro subproducto de alto contenido de humedad y de débil constitución, pueden cortarse en trozos en forma manual, preferentemente en sentido longitudinal. Una vez obtenida una muestra representativa, se pueden picar en una picadora estacionaria, recolectando la totalidad de la muestra en un recipiente sin perforaciones. Luego el material se homogeniza, tomando muestras de 200 a 300 g para secarlas a temperaturas menores a los 65°C hasta alcanzar peso constante.

### 5. Determinación de cenizas

La determinación de cenizas tiene como objetivos el determinar el contenido de materia orgánica y el prepa-

rar la muestra para la extracción de minerales y otros compuestos inorgánicos. El método recomendado es paralelo al de determinación de MS, con la excepción de que se usan temperaturas altas. Se recomienda la aplicación del siguiente procedimiento (Van Soest y Robertson, 1985):

- Se pesa 2-3 g de muestra en un recipiente "pyrex" prepesado. La numeración de los recipientes debe hacerse gravada pues la mayoría de los marcadores no resisten las temperaturas altas.
- Se colocan los recipientes dentro de la mufla, lo más lejos posible de la puerta, pues ésta tiende a mantener una temperatura menor.
- Se incinera por un mínimo de 8 h a 550°C (de noche). Se apaga la mufla y se deja enfriar a 250°C.
- Se sacan los crisoles y se colocan en una bandeja con fondo de asbesto o de cerámica porosa de baja conductividad (para evitar que los recipientes se quiebren como resultado del calor). Se coloca la bandeja en un horno a 100°C y se deja que las muestras se equilibren por 30 minutos. El pesaje se hace en caliente.

La incineración de muestras es también parte integral en la determinación de la ceniza ácido insoluble (CAI). Esta fracción ha despertado mucho interés en los últimos años por su posible uso como marcador interno en pruebas de balance nutricional

(Van Keulen y Young, 1978; Thoney *et al.* 1979). La CAI representa, en teoría, la fracción de minerales que es inerte o no disponible para el animal, siendo también un paso intermedio en la determinación de sílice (Van Soest y Robertson, 1985). Incluye los silicatos o sílices opalinas de origen vegetal y minerales provenientes del suelo (contaminación).

Según Van Soest y Robertson (1985), los procedimientos para determinar CAI se pueden dividir en dos, con base en la secuencia de tratamiento de la muestra. En uno, la muestra se incinera, se trata con ácido y se pesa el residuo insoluble; los métodos originales de Kolthoff y Sandell (1947), Shivastra y Talapatra (1962) y Van Keulen y Young (1978) son de este tipo. El otro grupo se caracteriza por una digestión inicial con ácido, seguida por una filtración y, finalmente, una incineración; los métodos para la determinación de la ceniza insoluble en detergente ácido y sílice, y el método de Vogtman *et al.* (1974) son de este último tipo.

No existe información suficiente que permita decidir cuál de todos los métodos propuestos es el más adecuado, por lo que ésta es un área que requiere de más investigación. A continuación se presenta un procedimiento recomendado por Van Soest y Robertson (1985) que tiene una adecuada retención de sílice y que sería de fácil implementación en cualquier laboratorio:

Se prepara la fibra detergente ácido usando 1 g de muestra. Se filtra en un crisol "pyrex" de 50 ml pre-

viamente pesado. Se incinera a 500°C hasta que la muestra esté libre de carbón. Se enfría y se pesa. Luego se agrega HBr al 48% gota a gota, hasta mojar completamente el residuo. No se debe usar más de 4 ml de ácido. Se deja reposar por 1-2 h. Se agrega más gotas de ácido si se forma mucha coloración rojiza. Se elimina el exceso de ácido por succión y se lava una vez con acetona. No se debe utilizar agua. Se seca y se incinera brevemente a 500°C. Se deja enfriar y se pesa. La sílice se calcula como la diferencia entre este peso y el peso original del crisol.

## 6. Determinación del nitrógeno en los alimentos

El nivel de proteína cruda total en los alimentos se obtiene multiplicando el contenido total de N en el alimento por el factor 6.25, cosa que no toma en cuenta la estructura química de las proteínas. Para la determinación del N total en los alimentos, el método de Kjeldahl ha mostrado ser el más adecuado. El gran defecto de esta medición es que no considera que ciertos compuestos nitrogenados no están disponibles y el animal no puede utilizarlos. Esta fracción de N no disponible ocurre naturalmente en muchos forrajes, siendo más elevada en leguminosas que en gramíneas, pudiendo ser muy elevada en plantas ricas en taninos. Por otro lado, esta fracción de N puede aumentarse artificialmente mediante procesamientos que involucran calentamiento.

La disponibilidad del N puede evaluarse en diferentes niveles. Algunos compuestos nitrogenados son refractores en el sistema ruminal pero se solubilizan en el abomaso, como sería el caso de complejos tanino-proteína débiles y de peso molecular mediano a intermedio. La medición del N no disponible puede realizarse en varias formas de acuerdo con los objetivos del nutricionista. Una vez determinada la fracción de N no disponible, es posible calcular la fracción disponible por diferencia con el N total. Los siguientes métodos permiten determinar la fracción no disponible de N, resultando en valores decrecientes en el mismo orden:

- N residual luego de una incubación *in situ* con bolsa de nylon por 48 h (Orskov *et al.*, 1980).
- N residual luego de una incubación con una proteasa bacteriana a pH neutro por 48 h (Pichard, 1977).
- N residual después de un tratamiento con pepsina y HCl (AOAC, 1965).
- N ligado a la lignocelulosa (Goering y Van Soest, 1970).

Existen circunstancias en las que se puede requerir información sobre la cinética de hidrólisis de los compuestos nitrogenados potencialmente aprovechables, ya sea para promover el escape de amino ácidos intactos, para evitar deficiencias de N en la actividad de los microbios del rumen, o bien para evitar los problemas derivados de la acumulación excesiva de N amoniacal en el rumen.

La identificación y medición de las diversas fracciones proteicas, así como la determinación de sus características de solubilización, reviste cierto grado de complejidad tanto desde el punto de vista conceptual como metodológico. Sin embargo, para el nutricionista reviste mucha importancia el fraccionar el N de los alimentos de acuerdo a su disponibilidad para el animal. Desde este punto de vista, tiene mayor significancia conocer la fracción de N rápidamente disponible, que contribuye a la formación rápida de amoníaco, que conocer sólo la fracción de N soluble.

Las técnicas tradicionales de medición de N soluble en soluciones minerales o minerales-buffer son efectivas para estimar el N soluble, pero omiten la cuantificación de una fracción de N que, siendo insoluble, es muy lábil en presencia de las proteasas del rumen y, por ende, convertido en amoníaco. Para la determinación del N rápidamente disponible se sugiere como técnica la incubación por 60 min. del material en presencia de una enzima proteolítica de amplio espectro. El filtrado posterior contendría la sumatoria del N soluble y el N insoluble cuya susceptibilidad a hidrólisis ruminal es muy alta y rápida. Alternativamente se puede realizar una incubación *in situ* con bolsa de nylon por 1-2 h.

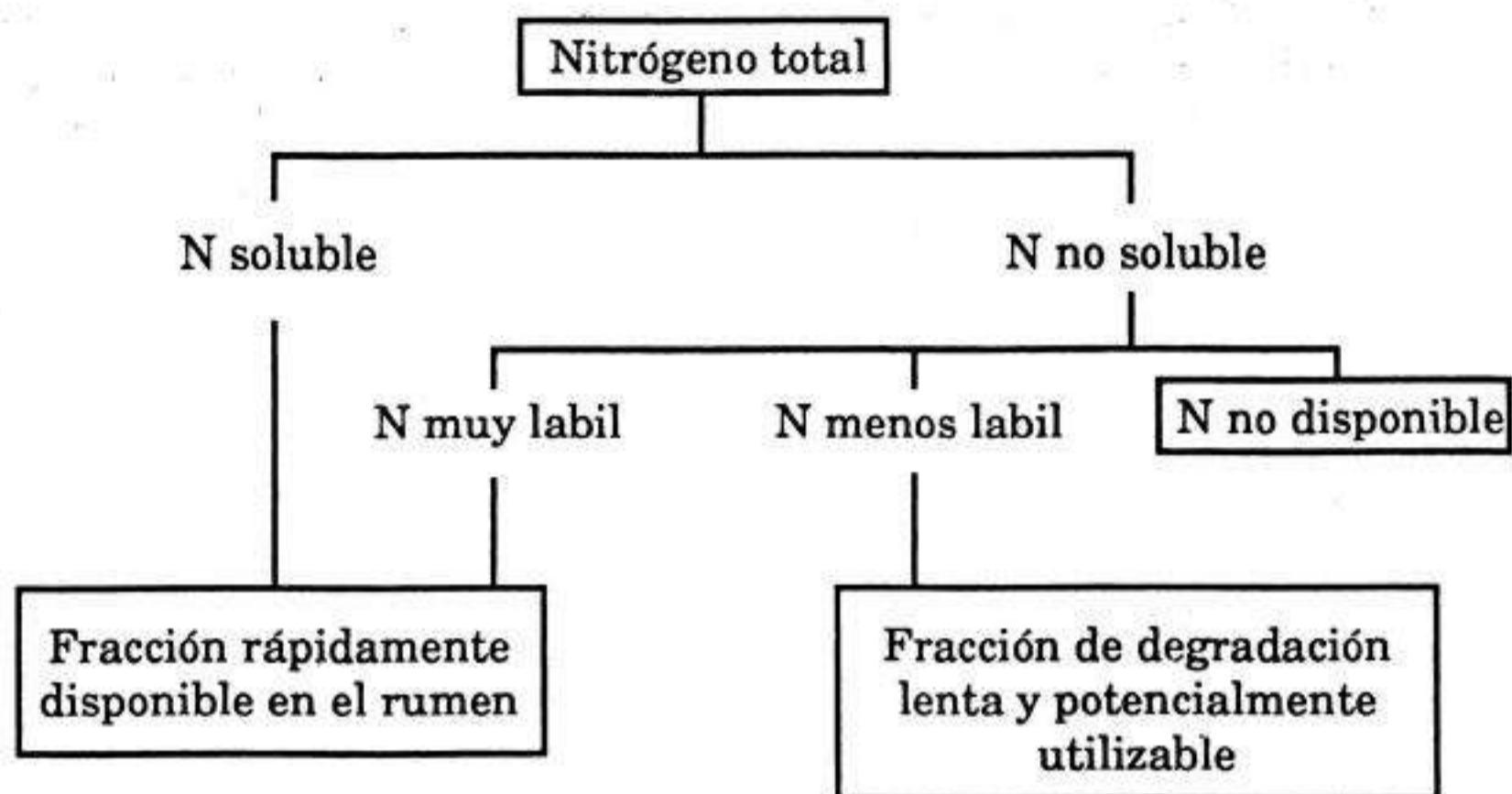
En consecuencia, desde el punto de vista de la disponibilidad y cinética del N, se propone el siguiente modelo gráfico de fraccionamiento, que distingue tres fracciones diferentes, con claro significado nutricional.

Otra alternativa es el fraccionamiento propuesto en el documento de Kass (ver su contribución en este mismo capítulo) y los procedimientos en él presentados.

## 7. Determinación de fibra

Los primeros intentos por analizar fibra en los alimentos fueron realizados por Einhof (1806). Su método consistía en la maceración del material en agua, seguida por una filtración con tela, lo que producía valores muy parecidos a los obtenidos por el método de análisis con detergente neutro (Goering y Van Soest, 1970). Posteriormente se desarrolló la determinación de fibra cruda en la Estación Experimental de Weende en Alemania, basada en la extracción secuencial del material con soluciones ácidas y alcalinas. A pesar de que técnica y científicamente la fibra cruda no define ninguna fracción fibrosa de valor nutritivo, este método todavía se utiliza en muchos laboratorios de nutrición.

Todos los análisis modernos de fibra tienen como objetivo reemplazar la fibra cruda del Análisis Proximal (Weende). A pesar del enfoque avanzado de los métodos modernos, no se ha podido definir una metodología específica para el análisis de fibra, quizás por falta de una mejor definición de la misma, pues históricamente la fibra se ha definido en función del método utilizado en su determinación (Van Soest y Robertson, 1985).



**Fig. 1. Una alternativa para el fraccionamiento del N de acuerdo a su disponibilidad.**

### a. Análisis de fibra con detergentes

Aún cuando sacrifica algunos detalles de precisión en relación con la estructura de la pared celular, se recomienda el análisis de fibra con detergentes. Este método se encuentra entre los más utilizados por los laboratorios de nutrición. Fue desarrollado por Van Soest (Van Soest 1963; Van Soest y Wine, 1967 y 1968; Goering y Van Soest, 1970) en Beltsville, Maryland, EE.UU., con el objetivo inicial de evaluar forrajes para rumiantes, aunque también se ha utilizado en la determinación de fibra en dietas para monogástricos y humanos.

El método se basa en la capacidad de los detergentes para solubilizar proteínas y evitar así su interferencia en el aislamiento de la fibra. El aná-

lisis se realiza mediante dos extracciones; la primera, con detergente neutro, determina la fibra insoluble o total (FDN); mientras que la segunda, con detergente ácido, aísla la lignina, la hemicelulosa insoluble, y otros componentes indigeribles (FDA), mediante la solubilización de la hemicelulosa y la proteína de la pared celular. En el Cuadro 1 se presenta un esquema del fraccionamiento con detergentes.

### b. Limitaciones y problemas del análisis con detergente neutro

La extracción con detergente neutro (DN) no es hidrolítica por lo que recobra la matriz insoluble de la pared celular de la planta. El residuo contiene los principales componentes de la pared celular (celulosa, hemicelulosa

**Cuadro 1. Esquema básico del análisis con detergentes.**

Fracción	Reactivo	Tratamiento	Productos
Contenido Celular	—	Calculado como 100 - FDN	Lípidos, azúcares, ácidos orgánicos, almidones, proteína soluble, ácidos nucleicos, pectina
FDN	Solución detergente neutro	Hervir por 1 h	Pared celular y sin pectinas
FDA	Solución detergente ácido	Hervir por 1 h	Lignocelulosa y minerales insolubles
Hemicelulosa	—	Calculada como FDN - FDA	
Celulosa	—	Incineración del residuo de lignina permanganato	Celulosa (pérdida de peso por incinerar)
Lignina	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 72%	Tratar FDA 3 h, 20° C	Lignina cruda
	KMnO <sub>4</sub> a pH 3.0	Tratar FDA 1 1/2 h, 20° C	Lignina (pérdida de peso por oxidación)
Cutina	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 72%	Tratar residuo de lignina permanganato	Residuo es cutina
Sílice	HBr 48%	Tratar ceniza 1 h, 25° C	Residuo es SiO <sub>2</sub>

Fuente: Van Soest (1982).

y lignina), así como proteína y nitrógeno fijado a la pared celular. Las pectinas (componente de la pared celular) son extraídas, lo que aunado a su alta disponibilidad es evidencia de la ausencia de enlaces covalentes con la matriz lignificada. Otros componentes de la pared celular que se extraen parcialmente por el DN son la sílice y algunos taninos. Entre las sustancias contaminantes en la FDN (que no son parte de la pared celular)

se encuentran el almidón, sustancias queratinizadas, minerales del suelo, proteínas afectadas por la reacción de Maillard y las que han sido precipitadas con taninos (Van Soest, 1982). La contaminación con almidón puede eliminarse mediante tratamiento simultáneo con amilasa.

Un aspecto crítico en la determinación de FDN o FDA es el tiempo de reflujo. El método claramente indi-

ca reflujos de 60 minutos a partir del momento en que la muestra comienza a hervir, lo que debe controlarse con la mayor precisión posible. Tiempos mayores de reflujo pueden resultar en la formación de productos de Maillard, llevando a una sobreestimación de ambos parámetros.

El problema principal en la generación de un método general de análisis de fibra es la diversidad de recursos o alimentos. Es por ello que se han desarrollado muchas modificaciones para adecuar la extracción con ND a diferentes recursos. Para mayor información sobre estas modificaciones se sugiere la publicación de Van Soest y Robertson (1985).

Una de las dificultades que más comúnmente se encuentra al determinar FDN es la filtración de las muestras, que puede ser resultado de fallas en el aparato de filtrado o en la técnica usada, alta viscosidad del material debido a la presencia de almidón u otros materiales, muestras muy finamente molidas o crisoles sucios.

A pesar de que el almidón se solubiliza a 100°C, conforme el material se enfría el almidón se gelatiniza, lo que dificulta el filtrado. La adición de una amilasa al inicio del proceso de extracción y/o durante el filtrado ayuda a subsanar la situación (Robertson y Van Soest, 1981). Las gomas y pectinas también dificultan la filtración; sin embargo, no responden a tratamientos enzimáticos por lo que debe recurrirse a alguna de las modificaciones presentadas por Van Soest y Robertson (1985).

El procedimiento convencional para la determinación de la pared celular incluye el uso de sulfito de sodio, para agilizar la solubilización de la proteína. A pesar de que su uso ya no se recomienda por la pérdida de lignina que puede acarrear, su inclusión en la extracción de muestras contaminadas con pelo (por ejemplo, las heces) es la única forma de obviar los problemas de filtrado (Van Soest y Robertson, 1985).

Altos niveles de proteína en las muestras pueden acarrear problemas de filtrado. El uso de un filtro Lab-conco<sup>R</sup> que remueva los complejos proteína-detergente antes del filtrado puede ayudar. También se ha sugerido aumentar el tiempo de reflujo a 2 h, pero el calentamiento excesivo puede resultar en la formación de productos de Maillard, por lo que no se recomiendan tiempos de reflujo mayores a 1 h. El uso de enzimas proteolíticas (por ejemplo, ICN Pharmaceuticals, Cat No. 101027) compatibles con detergentes ha tenido éxito en el análisis de vegetales ricos en proteína (Van Soest y Robertson, 1985).

Los detergentes son capaces de tolerar las grasas siempre y cuando no se forme una segunda fase. El exceso de grasa resulta en la separación del aceite y el agua en dos fases. Ya que los detergentes son solubles en aceite, su poder de solubilización de las proteínas en agua se inhibe ante excesos de grasa, resultando en sobreestimaciones de FDN. La relación de 100 ml de solución DN por 0.5 g de

muestra es capaz de tolerar niveles de hasta 10% de grasa en la MS. Materiales con niveles superiores deben preextraerse, obviando los pasos de secamiento en la determinación del extracto etéreo, para evitar la formación de nuevos polímeros.

La técnica de filtración debe vigilarse cuidadosamente. El manejo adecuado del filtrado involucra la protección del plato de filtrado del crisol, evitando el atascamiento con partículas finas y los excesos de vacío. Por otro lado, el inicio del filtrado debe realizarse con poco vacío hasta que la mayor parte del líquido contenido se haya eliminado. La cantidad de vacío puede aumentarse durante el lavado de la muestra con agua caliente (90-100°C). El proceso debe realizarse en forma rápida, evitando el enfriamiento de la muestra.

Cuando la filtración con crisoles se hace lenta, sin motivo aparente, es posible que el plato de filtrado esté atascado. Para limpiarlo, elimine el vacío y saque el crisol del aparato de filtrado. Coloque nuevamente el crisol sobre el aparato presionando fuertemente hacia abajo. Esto creará una presión positiva que levantará las partículas finas que obstruyen los poros del plato de filtración. Periódicamente los crisoles deben lavarse con agua destilada y su plato de filtración debe limpiarse de partículas adheridas mediante succión en sentido contrario a la aplicada durante el filtrado. Dependiendo del contenido de ceniza insoluble en ácido de las muestras, estas pueden atascar el

plato de filtración y, dado que estos residuos son insolubles en ácido, deben removerse con una solución caústica fuerte, como la que abajo se presenta. Este proceso no debe aplicarse más de lo necesario pues corroe el plato de filtración y reduce la vida útil del crisol. La preparación de la solución es la siguiente:

Agua destilada	2000 ml
EDTA (sal disódica)	10 g
Fosfato trisódico anhidro	100 g
Hidróxido de potasio (85%)	400 g

### **c. Limitaciones y problemas del análisis con detergente ácido**

La extracción de materiales con detergente ácido (DA) se desarrolló con el propósito de aislar el complejo ligno-celulosa y como un paso intermedio en la determinación de lignina. Posteriormente, se encontró que el DA también aísla la sílice biogénica y el nitrógeno no disponible a causa de la reacción de Maillard. El residuo de la extracción con DA está más altamente correlacionado con la digestibilidad que cualquiera de las otras formas de expresar la fibra; sin embargo, la relación es meramente estadística, pues no cuenta con una base teórica. La asociación de la FDA con otros parámetros de calidad nutritiva (como consumo y eficiencia) no es tan alta como la de la FDN (Van Soest, 1982).

Otro uso de la FDA es en la partición grosera de la pared celular insoluble en DN, en hemicelulosa y ligno-



celulosa. Aunque la diferencia aritmética entre la FDN y la FDA puede ser satisfactoria en algunos casos, debe recordarse que acarrea los errores de la determinación de ambas y, además, contiene errores por la recuperación de sustancias como pectina precipitadas, sílice y taninos solubles, que son solubilizados en diferente grado por el DN y no por el DA. Algunos autores sugieren el uso de extracciones secuenciales (Figura 2) con el fin de obtener una ligno-celulosa más pura; sin embargo, esto sacrifica la recuperación de sílice biogénica y de algunos productos de Maillard que son solubles en DN. En todo caso, la determinación precisa de la hemicelulosa requeriría del análisis de azúcares para distinguir la fracción de pentosas (Van Soest y Robertson, 1985).

Uno de los problemas encontrados al lavar la FDA con agua y acetona es la formación de grumos que se producen cuando se deja secar la fibra húmeda en el filtro. La aplicación rápida de acetona eliminará el problema. Esto es importante en la determinación secuencial de lignina, pues los grumos evitan una adecuada extracción de la fibra (Van Soest y Robertson, 1985).

En ocasiones, los valores de FDA son mayores que los de FDN. Esta situación es más indicativa de problemas con la muestra y no tanto de la determinación. Un caso interesante es el de la pulpa de cítricos, que muestran valores casi idénticos de FDN y FDA, como resultado de su bajo contenido de hemicelulosa. Materiales muy

dañados por la reacción de Maillard pueden contener poca o ninguna hemicelulosa y los productos Maillard pueden ser parcialmente solubles en DN como resultado de no haberse completado la reacción de polimerización. Otro caso de contenidos mayores de FDA es el de materiales altos en sílice biogénica y bajos en hemicelulosa (*Equisetum*). Esta sílice se recupera en la FDA y no en la FDN. Otra causa de valores anómalos de FDA es la precipitación en medio ácido de sustancias orgánicas que se solubilizan en medio neutro (taninos, ácido algínico presente en algas pardas grandes, taninos). Cuando se sospeche de sustancias contaminantes se sugiere realizar una extracción secuencial que se ajuste a las características de dichas sustancias.

## 8. Análisis de minerales

En su documento, Rosero hace una excelente revisión sobre muestreo, manejo de muestras y análisis de minerales (ver su contribución en este mismo capítulo). Por consiguiente, se refiere al lector a dicho documento para una discusión detallada al respecto.

Algunas veces, la determinación de las formas disponibles de minerales en el suelo proporcionan pautas acerca de posibles deficiencias o excesos de minerales, pero, frecuentemente, la correlación entre el contenido mineral de los suelos con los con-

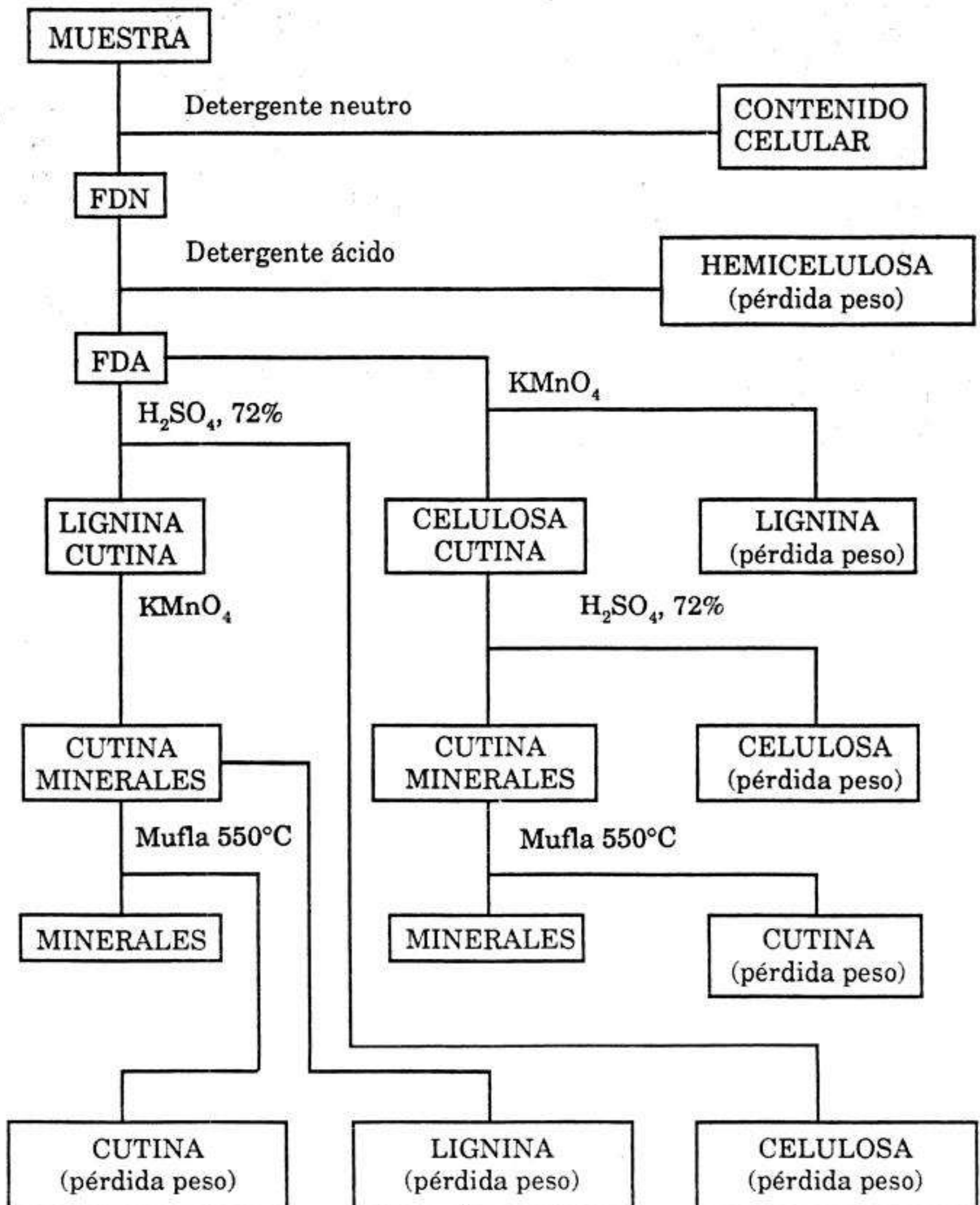


Fig. 2 Flujo del análisis secuencial con detergentes (Van Soest y Robertson, 1985).

## G. PICHARD

Sin haber probado la calidad de muestreo posterior, nuestra experiencia moliendo a 2 mm es excelente. Los duplicados que hacemos para análisis, como proteína, fibra y digestibilidad resultan excelentes. Ahora bien, hemos investigado el efecto del tamaño de molienda sobre los constituyentes y digestibilidad, encontrando que el disminuir el tamaño del tamiz (3, 2 ó 1 mm), resulta en contenidos decrecientes de pared celular, afecta selectivamente las proporciones de celulosa, hemicelulosa y lignina (en diferente grado) y, en el mismo orden, mejora la digestibilidad *in vitro*. Debido a esa alteración sufrida por la pared celular, nos ha parecido deseable usar un tamaño de partícula lo más grande posible, siempre y cuando permita un muestreo que sea eficiente desde el punto de vista de representatividad y repetibilidad. En último término, lo más importante es que no se altere las características estructurales originales en la fibra que se va a analizar. Desde el punto de vista práctico, la molienda con tamiz de 1 mm tapa los filtros con excesiva frecuencia, lo cual dificulta seriamente las determinaciones de fibra, de digestibilidad y cualquier otro proceso que requiera de filtración.

## C. LASCANO

Quiero insistir en el tamaño de molienda. Me parece muy interesante la experiencia en Chile, pero con forrajes tropicales estamos hablando

de plantas sumamente variables en composición, en hoja, en tallo, en material muerto. Cuando se piensa en 0.5 g para un análisis de digestibilidad *in vitro* es muy importante poder hacer un submuestreo adecuado. Me preocupa que con materiales tan variables, con dos duplicados (que es lo normalmente usado) podamos tener repetibilidad en nuestros análisis. Sugeriría que dentro de las recomendaciones se incluya este punto como un área de investigación y que se evalúe con especies tropicales de diferentes tipos, para finalmente llegar a una recomendación más sólida.

## G. PICHARD

Me parece muy acertada la recomendación del Dr. Lascano y creo que habría que agregar el investigar sobre el efecto del tamaño de muestra, porque con la tendencia a usar sistemas micro, en los cuales se utiliza menos de 500 mg el muestreo podría ser realmente crítico. Nuestra experiencia ha sido exitosa con forrajes de climas templados y con muestras de 0.5 a 1 g.

## R. QUIROZ

El grupo está recomendando el fraccionamiento de pared celular propuesto por Van Soest, y entre los limitantes de este fraccionamiento están los factores que afectan la calidad, como lo es la lignina. Me preocupa el hecho de que a pesar de la importancia de la lignina, no hay una definición química de este polímero y, por ende,

su análisis rutinario es gravimétrico. Esto implica que cualquier compuesto aromático, que sea insoluble en detergente ácido incrementará la proporción de lignina. Sugiero que además de los análisis gravimétricos se hagan análisis de productos de oxidación de la pared celular con nitrobenzeno. Las relaciones molares de los tres productos principales de dicha oxidación, p-hidroxi-benzaldehído, vanilina y siringaldehído así como la proporción de lignina gravimétrica, proveen mayor información cualitativa y cuantitativa del tipo de lignina en el forraje.

#### D. PEZO

Ese aspecto que menciona el Dr. Quiroz es importante. Informaciones recientes en términos de los componentes de lignina y de hemicelulosa muestran la magnitud del problema que enfrentamos, y a los que se pueden enfrentar quienes utilizan todo el esquema de fraccionamiento de Van Soest. Hay en él fracciones que no están definidas químicamente, como el caso de la lignina, que mencionaba el Dr. Quiroz, y el de la hemicelulosa. Cualquier error en la determinación de pared celular y de fibra detergente ácido afectaría la determinación de celulosa. Me preocupa que si, como grupo, hacemos una recomendación de que el esquema de fraccionamiento a ser empleado debe ser el de Van Soest, y pensamos en la utilidad que va a generar esa información, muchos van a dedicar (como hice yo) varios años analizando una gama amplia de forrajes con este esquema y, al final,

cuando estudiamos las relaciones de éstas fracciones con parámetros como consumo o digestibilidad, enfrentamos grandes frustraciones. No es sino en trabajos recientes, donde se están analizando los monómeros componentes de la hemicelulosa y la lignina, que encontramos más luces para poder explicar muchas de las incógnitas que teníamos en el pasado, cuando partíamos solamente de lignina permanganato o lignina ácido sulfúrico o de hemicelulosa estimada por el método de Van Soest.

#### G. PICHARD

Considero muy válidos los comentarios de los Drs. Quiroz y Pezo, pero creo que es importante fijar cuáles son los objetivos, cómo se va a utilizar dicha información y a qué tipo de estudios se va a aplicar. Hay un diagrama de flujo en vías de publicación por Van Soest, en el cuál se rescata mucho de los errores que posiblemente cometería una persona que no tenga experiencia. En él hay mención explícita a la presencia de factores contaminantes como cutina, sílice, taninos y minerales, que pueden alterar los resultados. Cuando se aplican las correcciones necesarias, de acuerdo a los pasos y a la secuencia del sistema Van Soest, me parece que la frecuencia de error es mucho más baja. Por otra parte, hay que destacar que es un método coherente que permite fraccionar toda la pared celular en celulosa, hemicelulosa y lignina, y corregir por las contaminaciones que tiene. Quisiera proponer al grupo que se reconozca su

amplia aplicabilidad para estudios de nutrición, haciendo la salvedad que ustedes señalan.

### **C. LASCANO**

Indiscutiblemente el método Van Soest ha sido un gran avance en relación al método Weende. Sin embargo, nuestra experiencia es que con forrajes tropicales los valores de fibra detergente no explican gran cosa y, para mí, un método analítico tiene que tener alguna utilidad en predicción, en poder ayudar a seleccionar una especie sobre otra, etc. Si bien conceptualmente el método de Van Soest es muy adecuado, me pregunto si no debemos en esta Guía Metodológica hacer un análisis serio sobre sus limitaciones, y quizás sugerir la necesidad de afinarlo un poco más, mirando en detalle qué componentes de la pared celular son los que realmente están afectando la calidad de forrajes. El método funciona muy bien cuando uno tiene una especie y cambia, dentro de esa especie, madurez; pero cuando se empieza a comparar entre especies existen problemas.

### **R. QUIROZ**

Concuerdo con el Dr. Pichard en que al extraer estos polímeros suceden cambios estructurales. Sin embargo, el hacer su caracterización da mucho más información que solamente hacer el análisis gravimétrico, como lo propone Van Soest en su esquema.

En nuestra experiencia, con el aislamiento y caracterización de la lignina con resonancia magnética nuclear (Carbono 13), hemos obtenido información adicional que nos ha ayudado a explicar muchos fenómenos y parámetros en forrajes, tanto de clima templado como sub-tropical. Para llegar a identificar y cuantificar estos monómeros o componentes de lignina, existen análisis sencillos asequibles a cualquier laboratorio. En el caso de los carbohidratos estructurales, ya se están usando fracciones (como la xilosa) como una característica para la selección de germoplasma forrajero, porque esta explica gran parte de la variabilidad que existe en la digestibilidad de algunas especies tropicales.

### **J. ZORRILLA**

Considerando el alto costo de estos análisis químicos, quisiera proponer al grupo el considerar metodologías de análisis que describan las características físicas de los alimentos relacionadas con el valor nutritivo de estos. He tenido experiencia en el desarrollo de un método en el que se determina la fragilidad del material (*Journal of Animal Science* 60(3):814), propiedad relacionada con la reducción del tamaño de partícula del forraje y su efecto en consumo voluntario y digestión. Esta estimación es tremendamente práctica y económica. Estoy seguro que con la experiencia de los participantes se podrían identificar alternativas metodológicas de este tipo que, además de su valor científico,

serían más factibles de implementar en nuestras condiciones, por su sencillez y economía. Está lo de humectación de partícula, densidad, etc. Estoy convencido de la existencia de características físicas en los alimentos que nos pueden ayudar a interpretar diferencias nutritivas, mucho más fáciles y económicas de implementar, que toda esta historia de fracciones de fibras.

### **G. PICHARD**

Quiero adherirme a lo señalado por los Drs. Zorrilla y Lascano, indicando que hemos estudiado la voluminosidad de la dieta, medida bajo diferentes condiciones de hidratación, con resultados muy relevantes, por lo que propongo estudiar el tema y, en el futuro, proponer algunas metodologías estandarizadas.

### **F. OJEDA**

Quisiera indicar que estamos retomando el índice de fibrosidad propuesto por Chenost, en 1966, para predecir el contenido de fibra cruda de los forrajes. En un trabajo presentado por el Dr. C. Paul, en el XV Congreso de Japón en 1985, se demostró la factibilidad del método y que ya se había solucionado el problema fundamental de esta técnica, que consiste en cómo evitar las grandes fluctuaciones en el consumo energético que ocurren cuando se introduce la muestra para ser molida. Es precisamente esa energía consumida la que determina el

índice de fibrosidad. Actualmente existen sistemas automatizados y computarizados que permiten introducir la muestra de forma homogénea con resultados satisfactorios. Considero que sería interesante medir este índice de fibrosidad para los pastos tropicales.

### **C. WERNLI**

Durante la década del 50, Balch desarrolló un índice para la caracterización nutricional de cualquier forraje, basado en la reacción del animal frente al forraje determinado. Denominado como valor "RO", corresponde a la cantidad de tiempo que destina el animal a masticar el forraje, durante los procesos de ingestión y rumia, y estaría en relación directa con los componentes estructurales, su proporción dentro de la materia seca y sus características. Hasta donde sé, no ha sido utilizado ampliamente pero lo dejo como una inquietud.

### **C. LASCANO**

El tema de compuestos nitrogenados fue tratado en relación a un fraccionamiento del nitrógeno, y me parece muy bien; pero me pregunto si no se debe incluir dentro de este tema alguna metodología sobre estimación de proteína sobrepasante, que en ruminantes tiene gran importancia. Sugeriría que es importante tener una

discusión sobre metodología para medir o estimar el nitrógeno potencialmente no degradable en el rumen.

### **G. PICHARD**

En el documento preparado por la Dra. Kass hay varios análisis alternativos para fracciones que son de gran importancia. Ahora, la posibilidad de medir nitrógeno, o proteína, que escapa a la fermentación ruminal, no lo enfocamos. Personalmente me parece muy interesante.

### **J. ZORRILLA**

Quisiera apoyar la propuesta del Dr. Lascano en cuanto a la estimación del nivel de resistencia a la degradación ruminal de la fracción proteica. Quizás más interesante sería complementar estas determinaciones con respuestas de producción. Creo que el conocimiento de la incubación *in situ* de la proteína, aunado a algún estimado de su tasa de pasaje, contribuirían a un mejor conocimiento de los procesos digestivos en los rumiantes.

### **R. QUIROZ**

En algunos trabajos que estamos realizando para evaluar la fracción sobrepasante de nitrógeno en kudzú, hemos comparado estimaciones de los requerimientos de nitrógeno sobrepasante en vacas lecheras producción con valores obtenidos mediante la combinación de datos generados con la

técnica de incubación *in situ* y asumiendo valores probables de tasa de pasaje. Hemos encontrado una alta concordancia entre ellos, por lo que también creo que se debe incluir este tipo de metodologías en la Guía Metodológica.

### **G. PICHARD**

En relación con el fraccionamiento de las proteínas, nuestra posición ha sido que se distinga la fracción indisponible (Fracción C) de aquella rápidamente soluble en el rumen (Fracción A). Las tasas de degradación de las Fracciones A y C son conocidas, faltando sólo por estudiar la tasa de degradación de la Fracción B. El tamaño de las tres Fracciones se obtendría a través del mismo fraccionamiento propuesto.

### **F. ROMERO**

Pienso que debemos incluir los estudios *in situ* para tener una mejor caracterización de estas fracciones. Ahora bien, me preocupa la necesidad de parar rápidamente la actividad enzimática en el material a evaluar, y cuál sería el efecto del manejo previo de las muestras de forraje (secado, congelación, transporte, etc.) sobre los resultados de los estudios *in situ*. Este tipo de cosas son realmente importantes para investigadores que están empezando a utilizar esta técnica. Quisiera saber si el grupo consideró este tema, o los errores asociados con los diferentes métodos de toma de muestras.

## **G. PICHARD**

Nuestro documento hizo mención expresa a ese problema. Indicamos que son los carbohidratos solubles, las proteínas, las vitaminas y pigmentos los que son más sensibles a las reacciones enzimáticas que ocurren con posterioridad al corte. Cuando el análisis involucra la determinación de esas fracciones se hace crítico el recoger la muestra recién cortada y ponerla en cajas, idealmente con hielo seco y en condiciones de oscuridad. Igualmente, dependiendo de cuáles son las determinaciones que se van a hacer, recomendamos ser más o menos rigurosos en la estabilización del material recién cortado.

## **O. ROSERO**

En relación a la pregunta del Dr. Romero, en la colección de muestras para análisis de minerales, particularmente en forrajes, suelo y tejidos animales (hígado, hueso, etc.), deben tomarse precauciones más específicas que para otras fracciones nutricionales. Los pastos deben ser cortados con tijeras de acero inoxidable para evitar contaminación con hierro. En la molienda debe evitarse las contaminaciones con elementos trazas, principalmente manganeso, hierro, cobre, etc.; para ello, las cuchillas de los molinos deben también ser de acero inoxidable. Incluso, el lavado de materiales de laboratorio es diferente, con el uso de ácidos y detergentes libres de contaminantes (cationes y aniones o metales pesados), para evitar la contaminación de las muestras.

## **D. PEZO**

Con relación a las determinaciones de materia seca, me llamó la atención que no se mencionó nada respecto a la posibilidad del uso de hornos de microondas. En la revisión de técnicas para la determinación de materia seca, ¿qué se indica respecto a la factibilidad de uso de esta técnica?

## **F. OJEDA**

Este método, al igual que otros no fueron incluidos en el documento. Nuestra intención fue la de discutir los más comúnmente usados. Sin embargo, considero que es un planteamiento muy interesante, acerca del cual se ha hecho poca investigación.

## **C. LASCANO**

En ese mismo sentido, quisiera traer a consideración una metodología que está hoy en boga y que consiste en el uso de espectrometría con rayos infrarrojos. Todos los días se perfeccionan los equipos y pienso que tiene potencial para el análisis químico de diferentes fracciones.

## **J. ZORRILLA**

Un comentario en cuanto a la determinación de humedad en ensilajes y las deficiencias de hacer un secado en horno, por las pérdidas de nutrientes volátiles. En estudios en donde el criterio principal de evaluación nutritiva de los ensilajes es la respuesta productiva animal, y cons-



cientes de la magnitud requerida para que las diferencias en este tipo de respuestas alcancen significancia estadística (son comparativamente mucho más grandes), me pregunto si el insistir en un refinamiento analítico a nivel de laboratorio, entre la precisión que nos pueda dar la determinación por calor o por arrastre con tolueno, tiene el mismo peso específico que cuando el estudio es puramente a nivel de laboratorio.

### **C. WERNLI**

Quisiera hacer la observación de que este tema va a ser tratado en detalle cuando se discuta sobre forrajes conservados, no sólo a este respecto, sino también la importancia de la variación en su proporción con distintos alimentos. De manera que yo sugeriría que lo analizáramos en esa oportunidad.

### **M.E. RUIZ**

Dr. Rosero, usted mencionó que se estaba recomendando el uso de agua bidestilada para todas las determinaciones minerales. Si está hablando del uso del espectrofotómetro de llama, ¿por qué no se recomienda el uso de agua desionizada?

### **O. ROSERO**

Cuando se usan métodos espectrofotométricos para el análisis de elementos trazas debe usarse agua desionizada, para evitar una posible contaminación. En el caso de elementos macro, como sodio y potasio, es suficiente el agua destilada o bides-

tilada. En nuestro laboratorio en Maracaibo, donde los suelos son muy ferrosos, utilizamos agua desionizada. Para el caso de fósforo y calcio es suficiente el uso de agua bides-

### **J. ZORRILLA**

Dr. Rosero, ¿que nos puede decir de la estimación de azufre? Entiendo que es difícil de realizar, por lo que me gustaría saber si hay algún avance en este sentido.

### **O. ROSERO**

No tenemos experiencia alguna con azufre. La mayor parte de los trabajos indican el uso de espectrofotometría de llama, horno de grafito o métodos de colorimetría.

### **C. LASCANO**

El fósforo no se puede determinar directamente en la extrusa, pero los australianos han desarrollado una técnica, mediante la cual sí pueden estimar el fósforo en la dieta. Creo que sería conveniente incluir en la Guía Metodológica alguna discusión sobre limitaciones de análisis de minerales en dietas y en extrusas, y las alternativas metodológicas que hay particularmente para el fósforo.

### **R. QUIROZ**

Dentro de los análisis que también se tendría que incluir en la Guía Metodológica están los análisis de marcadores, tanto de elementos metálicos como otros.

## CAPITULO II

### ANALISIS BIOLOGICO Y TASA DE DIGESTION

GRUPO DE TRABAJO No. 2

Dr. Diego González  
Dr. Danilo Pezo  
Dr. Francisco Romero  
Dr. Manuel E. Ruiz

# METODOLOGIA PARA ESTIMAR LA DINAMICA DE LA DIGESTION EN RUMIANTES

*Carlos Lascano<sup>1</sup> y Roberto Quiroz<sup>2</sup>*

## 1. Introducción

Variaciones en la capacidad digestiva y en la tasa de pasaje de residuos no digeridos tienen grandes implicaciones en la nutrición de rumiantes que consumen dietas de relativa baja digestibilidad, como son los forrajes tropicales. Es así como el flujo y eficiencia de utilización de los nutrientes, por el rumiante, están en gran medida determinados por la capacidad o volumen del tracto digestivo y por las tasas de digestión y pasaje de las partículas sólidas no digeridas. Durante los últimos veinte años ha existido gran interés por desarrollar metodologías apropiadas para cuantificar la dinámica de los procesos digestivos en rumiantes. En este trabajo se resumen técnicas que se han empleado para estimar la tasa de

pasaje o tiempo de retención en el rumen y se presentan modelos conceptuales sobre flujo de digesta, su aplicación y limitaciones en estudios de nutrición animal.

## 2. Métodos para estimar la tasa de pasaje

Se han utilizado para estimar el tiempo de retención o tasa de pasaje de forrajes por el tracto digestivo del rumiante. A continuación se describen estos métodos, dando énfasis a sus posibles limitaciones.

### a. Estimación directa

Una forma directa de estimar el tiempo de retención de residuos no digeridos en rumiantes es mediante el

<sup>1</sup> Ph.D., Científico Principal, Programa de Pastos Tropicales, CIAT, Cali, Colombia.

<sup>2</sup> Ph.D., Nutricionista, IDIAP, David, Panamá.

pesaje de la cantidad de digesta en el retículo-rumen. Para tal fin, animales estabulados son alimentados cada 12 ó 24 horas y después de un tiempo dado, desde la última ración, se pesa y analiza el contenido del retículo-rumen, bien sea sacrificando los animales, o extrayendo el contenido a través de fistulas ruminales (Meyer *et al.*, 1959; Campling *et al.*, 1961; Reid, 1965). Este método es muy laborioso y sus resultados difíciles de interpretar, debido a la presencia de residuos de alimentos diferentes al que se está evaluando y a posibles diferencias en tiempos de retención de fracciones químicas.

Alternativamente, Minson (1966) propuso un método en el cual, el contenido ruminal se mantiene en estado estable (cantidad que entra proporcional a la que sale), suministrando el alimento en forma continua (cada hora). Con este método se elimina la variación diurna en la tasa de excreción y composición de las heces (Minson y Cowper, 1966). La alimentación continua se logra mediante un alimentador automático situado sobre las jaulas de metabolismo, donde se alojan animales fistulados al rumen. El alimento se suministra durante siete días y luego se procede a vaciar la totalidad del contenido del retículo-rumen, el cual, luego de pesado, es muestreado para determinar los porcentajes de materia seca (MS), materia orgánica (MO) y fibra. Posteriormente, se devuelve el contenido ruminal al animal correspondiente. Las muestras para la determinación de nitrógeno se mezclan en una licuadora

de alta velocidad.

Para calcular el tiempo de retención de una fracción química determinada (por ejemplo, MS, MO, fibra detergente neutro, nitrógeno), se utiliza la siguiente relación:

Tiempo de retención, h =

$$\frac{\text{Componente en retículo-rumen, g}}{\text{Ingestión del componente, g/h}}$$

El método descrito se ha usado para estudiar factores que afectan el consumo y la dinámica de la digestión en rumiantes, en función de diversas variables como nivel de oferta de forraje (Minson, 1966), forma física del forraje (Minson, 1967), hojas y tallos de gramíneas (Laredo y Minson, 1973), hojas y tallos de leguminosas (Hendricksen *et al.*, 1981) y especie animal (Poppi *et al.*, 1980).

Algunas desventajas asociadas con esta metodología de estimación del tiempo de retención son:

- Las estimaciones son aparentes, dado que algunas fracciones químicas pueden absorberse en la pared ruminal ruminal.
- El recíproco del tiempo de retención es la suma de la tasa de pasaje ( $k_p$ ) y la tasa de digestión ( $k_d$ ), no pudiendo obtenerse un estimado independiente de la tasa de pasaje.
- Su uso se ve limitado a estudios con animales en confinamiento y, por ende, los resultados pudieran

no ser aplicables a animales en pastoreo.

#### **b. Estimación indirecta con marcadores**

La ingestión o introducción de marcadores externos en una sola dosis al retículo-rumen permite cuantificar la tasa de pasaje de los alimentos en el rumiante. La estimación indirecta de las tasas de pasaje de la fase líquida o sólida se puede realizar mediante el uso de marcadores solubles en agua (fase líquida) o que se adhieran a partículas del alimento (fase sólida).

Los marcadores que se emplean en estudios sobre la dinámica de digestión deben ser totalmente recuperables, y no se deben separar de la fracción marcada. Se reconoce que no existe ningún marcador que satisfaga todos los requerimientos enunciados, sobre todo en lo que respecta a marcadores de fase sólida.

Algunos de los marcadores de fase líquida que se han utilizado en estudios de tasa de pasaje son: 1) Polietilenglicol (PEG) (Hyden, 1955), cuyas limitaciones son que puede precipitarse con taninos (muy comunes en algunas leguminosas tropicales), carencia de un método exacto para su análisis (Kolb y Luckey, 1972) y su recuperación no es total (95%) ya que una fracción puede ser absorbida; 2) Quelatos de cromo o cobalto (Cr-EDTA, Co-EDTA) (Downes y McDonald, 1964; Uden *et al.*, 1980), cuyas limitaciones son que su recu-

peración no es total (5-10% de absorción), y que pequeñas cantidades pueden adherirse a la fracción sólida de la digesta en el rumen.

En la literatura se encuentra información sobre el uso de una serie de marcadores para la fase sólida (Ellis *et al.*, 1980). Entre los primeros marcadores empleados se encuentran las partículas teñidas (Balch, 1950). Sin embargo, su uso no es recomendado, ya que las estimaciones de tasa de pasaje pueden verse afectadas por la dificultad de detectar y cuantificar partículas muy finas en las heces (Ellis y Huston, 1967). Posterior a los trabajos con partículas teñidas se propuso el uso de tierras raras o lantánidos (por ejemplo, Cerio (Ce), Iterbio (Yb), Praseodimio (Pr), Erblio) para marcar la fase sólida, dada su capacidad de adherirse firmemente a las partículas de alimento bajo estudio (Kyker, 1962; Ellis, 1968; Ellis y Huston, 1968; Huston y Ellis, 1968). Estos elementos pueden utilizarse en su forma estable o radioactivos (por ejemplo,  $^{144}\text{Ce}$ ,  $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{144}\text{Pr}$ ). Entre ellos, el Yb es tal vez el marcador que más se ha utilizado en estudios de tasas de pasaje en rumiantes (Ellis *et al.*, 1979a; Teeter *et al.*, 1984); este elemento forma complejos con partículas sólidas y, por lo tanto, sigue un flujo similar al de los residuos no digeridos en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, puede emigrar a otras partículas de alimento y deprimir la digestibilidad de la MS o fibra (Mader *et al.*, 1984; Teeter *et al.*, 1984). La depresión en digestibilidad está determinada por la concentración del

marcador en el alimento. Concentraciones mayores a 625  $\mu\text{g}$  Yb/g MS no han afectado la digestibilidad de la MS ni de la fibra, mientras que concentraciones mayores (5 a 10 mg/g MS) si lo han hecho (Coleman *et al.*, 1984). Se ha demostrado que otras tierras raras, como el Ce, el Samario y el Lantano, también pueden migrar de una partícula a otra (Hartnell y Satter, 1979; Combs *et al.*, 1984). Para disminuir la migración del marcador a otras partículas, se ha sugerido que, en el caso del Yb, se sumerja el alimento a marcar en una solución con el marcador y luego se lave el material para remover aquella porción del marcador que no esté fuertemente ligada a las partículas (Mader *et al.*, 1984; Teeter *et al.*, 1984).

Otro marcador que ha sido utilizado es la fibra tratada con cromo (Cr) (Uden *et al.*, 1980). Con esta técnica se trata con Cr la pared celular del forraje en estudio, lográndose poca migración del marcador pero aumenta la densidad de las partículas así tratadas; esto está acompañado por una reducción drástica en la digestibilidad *in vitro*, lo cual puede resultar en una sobreestimación del tiempo total de retención de la digesta en el tracto (Ehle *et al.*, 1984; Mader *et al.*, 1984). Sin embargo, este problema puede minimizarse disminuyendo la cantidad de Cr que se añade a la muestra (Pond *et al.*, 1986).

**(1) Administración de marcadores.** La administración de marcadores de la fase sólida (por ejemplo, 2

g de Yb/100 kg peso vivo) o de la fase líquida (por ejemplo, 80-100 mg de Cr/100 kg peso vivo) se puede hacer en forma directa al rumen de animales fistulados. Con animales no fistulados, se puede pesar el marcador en su forma estable en cápsulas de gelatina, las cuales se administran oralmente al animal (Miller y Bryne, 1970); Miller *et al.*, 1971), o puede inyectarse al rumen (Guzmán, 1983). Sin embargo, una desventaja de estos dos últimos métodos, en la dosificación de marcadores para la fase sólida, es que se marcan partículas en el rumen con diferente grado de digestión y tamaño, lo cual puede afectar la estimación del tiempo de retención del alimento no digerido en el tracto digestivo. Por lo tanto, se recomienda aplicar el marcador directamente al alimento, sumergiéndolo en una solución con capacidad de saturación mínima de 50%, seguido por un lavado repetido de la muestra, con agua destilada, para remover el marcador no ligado a las partículas (Teeter *et al.*, 1984). El tiempo de remojo del material con la solución que contiene al marcador puede ser de 12 horas para forrajes y 24 horas para alimentos altos en proteína. Una vez marcado, el alimento se seca y se suministra al animal vía oral, como parte de la dieta, en cápsulas de gelatina o a través de la fístula ruminal (Ellis y Huston, 1968; Hartnell y Satter, 1979; Pond *et al.*, 1986; Teeter *et al.*, 1984).

En estudios donde el interés sea determinar la tasa de pasaje de la fibra, se debe marcar la fibra detergen-

te neutro (FDN) de la planta entera (hojas y tallos). Para obtener la FDN debe utilizarse una solución detergente sin agente quelatante (EDTA), o una solución saturada de detergente comercial, para evitar la remoción posterior del marcador aplicado a las partículas (Coleman *et al.*, 1984).

## (2) Análisis de marcadores

La determinación de las tierras raras se puede realizar mediante absorción atómica (Kniseley *et al.*, 1969), por reactivación de neutrones (Ellis, 1968), por emisión atómica (Grofum y Williams, 1973a; Lascano, 1979) o por espectroscopía visible/ultra-violeta.

Para determinar tierras raras en su forma estable, se calcinan de 1 a 2 g de muestra a 500°C, y se extrae el marcador para posterior lectura por absorción atómica, utilizando una llama de óxido nitroso-acetileno (Kniseley *et al.*, 1969). Para extraer el marcador se puede utilizar una solución (30 ml) de 75% de H<sub>2</sub>O y 25% ácido (2 volúmenes de HNO<sub>3</sub> + 1 volumen de HCl, concentrados), durante 12 h sin aplicación de calor (Lascano, 1979). Alternativamente, el marcador puede extraerse en muestras de 0.2 g, utilizando una solución (20 ml) 0.5 M de EDTA con un pH de 6.5, ajustado con NH<sub>4</sub>OH concentrado, y adicionando 0.5 g/l de KCl para evitar ionización (Hart y Polan, 1984). En todos los casos se recomienda que se preparen estándares, con matrices comunes a las muestras que van a analizarse, para corregir la inter-

ferencia que causan otros metales en la lectura del Yb y de otras tierras raras (Schrenk, 1971).

La calcinación de las muestras que contienen Cr no es recomendable ya que las altas temperaturas inducen la formación de óxidos de Cr, que son insolubles en todo tipo de ácidos minerales, lo que se traduce en recuperaciones variables del marcador (Quiroz, 1984).

## 3. Modelos de flujo de la digesta en rumiantes

El estudio de la dinámica de la digesta, a través del tracto gastrointestinal (TGI) de rumiantes, se hace cada día más importante en la búsqueda de un mejor entendimiento de los procesos digestivos que ocurren en este sistema de múltiples compartimientos. Aunque varios autores han intentado describir este proceso dinámico (Balch, 1950; Blaxter *et al.*, 1956; Grofum y Williams, 1973b; Ellis *et al.*, 1979b), aún no existe una metodología totalmente adecuada para la descripción cuantitativa de los fenómenos que ocurren en el TGI (Warner, 1981).

La ingestión o introducción en el retículo-rumen, en una sola dosis, de partículas de alimento marcadas y su cuantificación posterior en las heces, a diferentes horas post-dosis, resulta en curvas bi-exponenciales de excreción del marcador con un tiempo de desfase o tránsito. De

estas curvas se deduce que el flujo de residuos no digeridos en el TGI de rumiantes es a través de dos compartimientos. Por definición, un compartimiento puede existir en cualquier segmento anatómico del TGI, donde haya mezcla de las partículas que entran con las partículas ahí presentes. La localización anatómica de estos compartimientos en el rumiante ha sido tema de discusión entre los investigadores, y Ellis *et al.* (1984) han hecho una buena revisión del tema. Con base en esa discusión, se resumen a continuación los principales modelos de flujo propuestos en la literatura.

#### a. Modelo de Blaxter

Para cuantificar el flujo de residuos no digeridos en rumiantes, Blaxter *et al.* (1956) utilizaron partículas de forraje de diferente tamaño (0.6 y 0.15 mm), las cuales tiñeron y suministraron en una sola dosis a ovinos con tres niveles de consumo. La curva de excreción de las partículas marcadas en las heces fue bi-exponencial ( $k_1$  = pendiente rápida y  $k_2$  = pendiente lenta) con un tiempo de desfase o tránsito (T). El mayor efecto del tamaño de partícula y del nivel de consumo fue en  $k_1$  y T. Tanto la disminución en el tamaño de partículas marcadas, como el incremento en consumo, resultaron en un mayor valor de  $k_1$  y menor valor de T. Con base en estos resultados, Blaxter sugirió que  $k_1$  representaba la tasa de pasaje del alimento del rumen,  $k_2$  la tasa de pasaje de partículas del abomaso y

T el tiempo de tránsito de las partículas entre el duodeno y las heces.

#### b. Modelo de Hungate

Según Hungate (1966), el flujo de digesta en rumiantes es dependiente de atributos los de la digesta y no de segmentos anatómicos en el TGI. Con base en este concepto, sugirió que un primer compartimiento podría ser el de partículas grandes en el rumen, con una tasa rápida que representaba la reducción en el tamaño de partículas, que pasaban a un segundo compartimiento de partículas pequeñas en la fase líquida del rumen. Con este segundo compartimiento se asoció una tasa lenta, que representa la salida de partículas pequeñas del retículo-rumen.

#### c. Modelo de Grovum

En una serie de trabajos, Grovum y colaboradores (Grovum y Williams, 1973a, b; Grovum y Williams, 1977) estudiaron en detalle los flujos de las fases líquida y sólida de la digesta en ovinos. La metodología empleada incluyó la dosificación y muestreo de partículas sólidas marcadas con  $^{144}\text{Ce}$ , en diferentes segmentos del TGI, para detectar directamente la secuencia de los compartimientos. Los resultados de estos estudios indicaron que la tasa lenta ( $k_2$ ) estaba asociada con un primer compartimiento en el rumen, mientras que la tasa rápida ( $k_1$ ) estaba asociada con el ciego y colon proximal. El tiempo de tránsito (T) se



definió como el tiempo transcurrido entre la dosificación del marcador y su aparición en las heces. Incrementos en el nivel de consumo resultaron en aumentos tanto de  $k_1$  como de  $k_2$ , pero el efecto fue mayor en la tasa lenta ( $k_2$ ), lo cual contrasta con lo observado por Blaxter et al. (1956).

#### d. Modelo de Ellis

El flujo de digesta en ovinos se estudió usando el concepto de tasas dependientes del tiempo en uno de los compartimientos (Matis, 1972). Esta modificación se sugirió debido a las alteraciones físicas que sufren las partículas de alimento en el proceso digestivo. Según este concepto, la probabilidad de escape de las partículas a través del orificio retículo-omasal aumenta a medida que el tamaño de la partícula disminuye con el tiempo de residencia (Matis, 1972; Matis y Tolley, 1980). El uso de una distribución exponencial del tiempo de permanencia de las partículas en el compartimiento da igual probabilidad de escape a todas las partículas, independientemente de su tamaño o edad. El uso de estos modelos con dependencia del tiempo en un compartimiento resultaron en un mejor ajuste de los datos de excreción del marcador en las heces vs. tiempo, en comparación con modelos con tasa no dependiente del tiempo.

Posteriormente, con base en un gran número de estudios con animales en confinamiento y pastoreo, y utilizando lantánidos como marcadores, Ellis et al. (1979a, b) sugirieron

que los dos compartimientos identificables en el flujo de digesta en rumiantes estaban asociados con el retículo-rumen. Con esta interpretación, la tasa rápida dependiente del tiempo ( $\lambda_1$ ) representa la velocidad de mezcla de partículas ingeridas con partículas presentes en el retículo-rumen. La tasa lenta ( $k_2$ ), no dependiente del tiempo, representa la salida de partículas del retículo-rumen y es numéricamente similar a tasas estimadas en el abomaso y heces (Conner et al., 1977). En el modelo, T representa el tiempo transcurrido entre la ingestión del marcador y su primera aparición en el punto de muestreo (abomaso, heces). Al incluir dependencia del tiempo en un compartimiento del modelo, los estimados de T normalmente se reducen. La estimación de  $\lambda_1$  está asociada con un error alto, particularmente si no se tienen suficientes puntos en la parte ascendente de la curva de excreción del marcador vs. tiempo.

Con el modelo propuesto por Ellis et al. (1979a), el retículo-rumen es el compartimiento que regula el flujo de digesta, a través del tracto, mediante la tasa lenta de pasaje ( $k_2$ ). Por otra parte, los eventos asociados al compartimiento con la tasa más rápida, dependiente del tiempo ( $\lambda_1$ ), ocurren principalmente en el rumen y posiblemente en menor grado en el tracto digestivo posterior.

En un estudio (Quiroz, 1984) se compararon el modelo bi-exponencial independiente de la edad de las partículas (Grovmum y Williams, 1973b) y

cinco modelos gama edad-dependientes (Ellis *et al.*, 1979a; Ellis *et al.*, 1984; Pond *et al.*, 1984b) en la descripción de la curva de excreción en heces de la fase líquida y de tres tamaños de partículas. Se encontró que el modelo de Grovum se ajustó mejor a la curva de excreción correspondiente a la fase líquida, cosa que tiene sentido, ya que la salida de la fase líquida del retículo-rumen es función de la tasa de apertura del orificio retículo-omasal y, por ende, la probabilidad de escape debe ser exponencial. En el caso de las partículas sólidas, el modelo gama-2 (de dos compartimientos) fue el más versátil para los tres tamaños de partículas (Cuadro 1), y también presentó un buen ajuste para la fase líquida. También, fue notorio que para las partículas grandes (>1.5 mm) se requería de un modelo gama-3.

Con base en estos resultados, se sugiere utilizar el modelo biexponencial para la fase líquida y el modelo gama-2 si el estudio comprende todos los componentes de la digesta. En ensayos de pastoreo es muy frecuente encontrar que las dos tasas de cambio (rápida y lenta) son similares; por lo tanto, un modelo de un compartimiento se ajusta mejor a los datos de excreción del marcador *vs.* tiempo (Pond *et al.*, 1986).

#### 4. Tasa de pasaje en estudios de nutrición animal

El nivel de consumo de forrajes en rumiantes se ha relacionado positivamente con el volumen y flujo de

la digesta en el tracto que, a su vez, están determinados por la tasa de reducción de las partículas en el rumen (Ellis *et al.*, 1982; Pond *et al.*, 1984a).

Para entender mejor una de las posibles aplicaciones de los resultados de estudios de la tasa de pasaje en nutrición animal, se toma como ejemplo un modelo simplificado de la dinámica de digestión y pasaje en rumiantes propuesto por Ellis (1978). En este modelo, el alimento ingerido se divide en: 1) pared celular digerible, 2) pared celular indigerible y 3) contenido celular. La mayor parte del contenido celular que entra al tracto digestivo desaparece por digestión con una tasa  $k_d$ . El contenido celular que desaparece por pasaje ( $k_p$ ) es pequeño y hace que esta fracción del alimento se considere de una disponibilidad nutritiva casi total y uniforme. La porción digerible de la pared celular puede desaparecer del rumen por digestión ( $k_d$ ) y pasaje ( $k_p$ ), pero la fracción indigerible de la pared celular sólo puede desaparecer por pasaje ( $k_p$ ). En el caso de forrajes, la pared celular constituye la fracción que tiene mayor influencia sobre el flujo de la digesta y, por ende, sobre el consumo voluntario.

Con el modelo anterior es posible cuantificar el consumo con la siguiente relación:

$$\text{Consumo} = \frac{\text{Volumen} \times k_p}{k_p / (k_p + k_d)}$$

**Cuadro 1. Modelos usados para describir la excreción de marcadores en las heces luego de una dosis única de marcador.**

Nombre	Modelos
<b>Un compartimiento<sup>1</sup></b>	
Gama-2 (edad dependiente)	$Y = (K_0 t e^{-\lambda t})/0.59635$
<b>Dos compartimientos<sup>1</sup></b>	
Bi-exponencial	$Y = K_0 (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t})$
Gama-2 (edad dependiente, edad independiente)	$Y = K_0 (S^2 e^{-k_2 t} + e^{-\lambda_1 t} (-S^2 + S \lambda_1 t))$
donde:	
Y = Concentración del marcador en las heces	
t = Tiempo luego de administrar el marcador	
K <sub>0</sub> = Concentración inicial del marcador en el TGI, suponiendo un mezclado instantáneo	
λ = Tasa de cambio dependiente del tiempo en el modelo de un compartimiento	
k <sub>1</sub> = Tasa de cambio en el primer compartimiento del modelo bi-exponencial (independiente del tiempo)	
k <sub>2</sub> = Tasa de cambio en el segundo compartimiento (independiente del tiempo)	
λ <sub>1</sub> = Tasa de cambio en el primer compartimiento del modelo gama-2	
S = λ <sub>1</sub> / (k <sub>2</sub> - λ <sub>1</sub> )	

<sup>1</sup> En todos los modelos se sustituye t por (t-T), donde T = tiempo transcurrido entre la administración del marcador y su primera aparición en las heces.

El numerador representa la excreción de heces por unidad de tiempo. La fracción no digestible (1 - fracción digestible) del alimento está dada por  $k_p / (k_p + k_d)$ . De esta relación se hace evidente que, en rumiantes, tanto cambios en digestibilidad como en volumen y tasa de pasaje pueden afectar el consumo voluntario de un forraje determinado.

Para determinar volumen ocupado y la tasa de pasaje de un forraje (MS o fibra) se usan los marcadores de partículas, tal y como se discutiera anteriormente. El forraje marcado se dosifica en el retículo-rumen y su excreción se mide en las heces a diferentes horas post-dosificación (por ejemplo, 4, 8, 16, 20, 24, 28, 40, 48, 64, 72, 88, 96, 112, 120, 136, 144) por seis

días. Los datos de excreción del marcador en heces *vs.* tiempo post-dosis se pueden ajustar a un modelo bi-exponencial o a un modelo gama, con dependencia de tiempo en uno de los compartimientos, y un tiempo de tránsito. Para la obtención de los estimados de los parámetros de los modelos (Cuadro 1), se usa un programa estadístico con modelos de regresión no lineales (SAS, 1984).

Los cuatro parámetros básicos que se estiman con los modelos descritos en el Cuadro 1 son: la tasa de pasaje o tasa de cambio del compartimiento ( $k_p$ ), el tiempo medio de retención del marcador (fase sólida o líquida) en el TGI (TMR), el llenado del tracto o volumen de la digesta (V) y la producción fecal (H).

Los cálculos con los modelos descritos son:

### Gama-2 de un compartimiento

$$k_p/h = \lambda_1$$

$$\text{TMR, } h = 2/\lambda + T$$

$$V, g = \text{Dosis de marcador } (\mu\text{g}) / K_o (\mu\text{g/g})$$

$$H, g/d = V \times \lambda \times 24 \text{ (h/d)}$$

### Bi-exponencial

$$k_p/h = k_1$$

$$\text{TMR, } h = 1/k_1 + 1/k_2 + T$$

$$V, g = \text{Dosis de marcador } (\mu\text{g}) / K_o (\mu\text{g/g})$$

$$H, g/d = V \times k_1 \times 24 \text{ (h/d)}$$

### Gamma-2 de dos compartimientos

$$k_p/h = k_2$$

$$\text{TMR, } h = 2/\lambda_1 + 1/k_2 + T$$

$$V, g = \text{Dosis de marcador } (\mu\text{g}) / K_o (\mu\text{g/g})$$

$$H, g/d = V \times k_2 \times 24 \text{ (h/d)}$$

Si el único objetivo del estudio es estimar la tasa de pasaje ( $k_p$ ), se puede tomar el tiempo al cual la concentración del marcador alcanza el nivel más alto y se ajusta la porción descendiente de la curva a un modelo exponencial ( $Y = Ae^{-kt}$ ) o a uno lineal, usando el logaritmo natural de la concentración del marcador.

Para medir la indigestibilidad del forraje ( $k_p/(k_p+k_d)$ ), el otro componente de la ecuación de consumo, hay varias alternativas:

- Estimar la tasa de digestión ( $k_d$ ) del forraje (MS o fibra) con métodos *in vitro* o *in situ*, utilizando modelos apropiados de ajuste (Waldo *et al.*, 1972; Mertens y Ely, 1979).
- Estimar digestión *in vitro* en forraje (MS o fibra) representativo de lo que el animal ingiere (extrusa esofágica) usando estándares de digestibilidad *in vivo* conocida.
- Estimar digestión con marcadores internos apropiados, tales como fibra detergente neutro o fibra detergente ácido indigerible (Cochran *et al.*, 1986).

## 5. Correlaciones entre la tasa de pasaje y el consumo

En estudios sobre el flujo de la digesta se ha encontrado que la tasa de pasaje lenta puede variar como consecuencia del marcador empleado, punto de muestreo (rumen o recto) o modelo de ajuste utilizado (Hartnell y Satter, 1979; Coleman *et al.*, 1984). Por otro lado, las correlaciones entre consumo voluntario de forraje y la tasa de pasaje han sido variables y no significativas en algunos estudios (Guzmán, 1983; Coleman *et al.*, 1984). Sin embargo, el consumo voluntario ha estado negativamente correlacionado con el tiempo total de retención de la digesta en el tracto (Guzmán, 1983) y positivamente relacionado con la tasa de reducción de partículas en el rumen (Ellis *et al.*)<sup>1</sup>.

La relación entre la tasa de pasaje de la fase líquida y nivel de consumo voluntario se ha encontrado que es variable. En algunos estudios la tasa de pasaje de la fase líquida ha aumentado linealmente con incrementos en consumo de forraje o concentrados (Galyean *et al.*, 1979); Adams y Kartchmer, 1984), mientras que en otros no se ha visto afectada (Hodgson *et al.*, 1976), lo cual podría estar asociado con atributos de la dieta ingerida, a través de su efecto sobre la salivación (Harrison *et al.*, 1975).

En resumen, los estudios de la dinámica de digestión en rumiantes han permitido determinar factores que afectan el consumo voluntario de forrajes (gramíneas y leguminosas) con diferentes grados de madurez, relación hoja:tallo o forma de procesamiento (molido o peletizado). Este conocimiento se considera fundamental en la formulación de programas eficientes de alimentación, y para el desarrollo o selección de plantas forrajeras tropicales de mayor calidad nutritiva.

## 6. Referencias

- ADAMS, D.C.; KARTCHMER, R.J. 1984. Effect of level of forage intake on rumen ammonia, pH, liquid volume and liquid dilution rate in beef cattle. *Journal of Animal Science* 58:713.
- BALCH, C.C. 1950. Factors affecting the utilization of food by dairy cows. I. The rate of passage through the digestive tract. *British Journal of Nutrition* 4:361.
- BLAXTER, K.L.; GRAHAM, N.M.; WAINMAN, F.W. 1956. Some observations on the digestibility of food by sheep, and on related problems. *British Journal of Nutrition* 10:69.

<sup>1</sup> ELLIS, W.C.; MATIS, J.H.; LASCANO, C.E.; MEHDI MAHLOOGI, POND, K. Size reduction, fermentation and passage of forage particles and forage intake by cattle. (En preparación).

- CAMPLING, R.C.; FREER, M.; BALCH, C.C. 1961. Factors affecting the voluntary intake of food by cows. II. The relationship between the voluntary intake of roughages, the amount of digesta in the reticulo-rumen and the rate of disappearance of digesta from the alimentary tract. *British Journal of Nutrition* 15:531.
- COCHRAN, R.C.; ADAMS, D.C.; WALLACE, J.D. GALYEAN, M.L. 1986. Predicting digestibility of different diets with internal markers: Evaluation of four potential markers. *Journal of Animal Science* 63:1476.
- COLEMAN, S.W.; EVANS, B.C.; HORN, G.W. 1984. Some factors influencing estimates of digesta turnover rates using markers. *Journal of Animal Science* 58:979.
- COMBS, D.K.; SINGH, N.; SHAVER, R.D.; SATTER, L.D. 1984. Evaluation of ytterbium (Yb) or cerium (Ce) as forage particulate markers. *Journal of Animal Science* 59 (Suppl. 1):425.
- CONNER, M.E.; MATIS, J.H.; LASCANO, C.; ELLIS, W.C. 1977. Associated flow of lanthanides and digesta particulates in cattle. *In* Abstracts of Annual Meeting of the American Society of Animal Science. Southern Section. p. 67. (Compendio).
- DOWNES, A.M.; McDONALD, I.W. 1964. The chromium-51 complex of ethylenediamine tetraacetic acid as soluble rumen marker. *British Journal of Nutrition* 18:153.
- EHLE, F.R.; BAS, F.; BARNO, B.; MARTIN, R.; LEONE, F. 1984. Particulate rumen turnover rate measurement as influenced by density of passage marker. *Journal of Dairy Science* 67:2910.
- ELLIS, W.C.; HOUSTON, J.E. 1967. Caution concerning the stained particle technique for determining gastrointestinal retention time of dietary particles. *Journal of Dairy Science* 50:1996.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1968.  $^{144}\text{Ce}$  -  $^{144}\text{Pr}$  as particulate digesta flow markers in ruminants. *Journal of Nutrition* 98:67
- \_\_\_\_\_. 1968. Dysprosium as an indigestible marker and its determination by radioactivation analysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 16:220.
- \_\_\_\_\_. 1978. Determinants of grazed forage intake and digestibility. *Journal of Dairy Science* 61:1828.
- \_\_\_\_\_.; MATIS, H.H.; LASCANO, C. 1979a. Quantitating ruminal turnover. *Federation Proceedings* 38:2702.

- \_\_\_\_\_.; LASCANO, C.; MATIS, J.H. 1979b. Sites contributing to compartmental flow of forage residues. *Annales de Recherche Veterinaire* 10:166.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; TEETER, C.; OWENS, F.N. 1980. Solute and particulate flow markers. In Protein requirements for cattle: Symposium. Stillwater, Oklahoma, EE.UU. Oklahoma State University. Miscellaneous Publication No. 109. p. 37
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; GUERRERO, J.; POND, K.; MATIS, J.H. 1982. Particle size degradation in and escape from the rumen. *Federation Proceedings* 41:434. (Compendio).
- \_\_\_\_\_.; MATIS, J.H. POND, K.R.; LASCANO, C.; TELFORD, J.P. 1984. Dietary influences on flow rate and digestive capacity. In *Herbivore Nutrition in the Subtropics and Tropics*. Ed. by F.M.C. Gilchrist, R.I. Mackie. Craighall, South Africa. Science Press. p. 269.
- GALYEAN, M.L.; WAGNER, D.G.; OWENS, F.N. 1979. Level of feed intake and site and extent of digestion of high concentrate diets by steers. *Journal of Animal Science* 49:199.
- GROVUM, W.L.; WILLIAMS, V.J. 1973a. Rate of passage of digesta in sheep. III. Differential rate of passage of water and dry matter from the reticulo-rumen, abomasum, caecum and proximal colon. *British Journal of Nutrition* 30:231.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1973b. Rate of passage of digesta in sheep. IV. Passage of marker through the alimentary tract and the biological relevance of rate constants derived from the changes in concentration of marker in faeces. *British Journal of Nutrition* 30:313.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1977. Rate of passage of digesta in sheep. VI. The effect of level of food intake on mathematical prediction of the kinetics of digesta in the reticulo-rumen and intestines. *British Journal of Nutrition* 38:424.
- GUZMAN, S. 1983. Evaluación de la calidad forrajera de tres genotipos de *Andropogon gayanus* (Kunth). Tesis Mag. Sc. Santiago, Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile. 77 p.
- HARRISON, D.G.; BEEVER, D.E.; THOMPSON, D.J.; AUSBURN, D.F. 1975. Manipulation of rumen fermentation in sheep by increasing rate of flow of water from the rumen. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 85:93.
- HART, S.P.; POLAN, C.E. 1984. Simultaneous extraction and determination of ytterbium and cobalt ethylenediamine tetraacetate complex in feces. *Journal of Dairy Science* 67:888.

- HARTNELL, G.F.; SATTER, L.D. 1979. Extent of particulate marker (samarium, lanthanum and cerium) movement from one digesta particle to another. *Journal of Animal Science* 48:375.
- HENDRICKSEN, R.E.; POPPI, D.P.; MINSON, D.J. 1981. Studies on the reticulo-rumen. 5. Voluntary intake, digestibility and retention time by cattle and sheep of leaf and stem fractions of a tropical legume (*Lablab purpureus*). *Australian Journal of Agricultural Research* 32:389.
- HODGSON, J.C.; THOMAS, P.C.; WILSON, A.G. 1976. The influence of the level of feeding on fermentation in the rumen of sheep receiving a diet of ground barley, ground hay and flaked maize. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 87:297.
- HOUSTON, J.E.; ELLIS, W.C. 1968. Evaluation of certain properties of radiocerium as an indigestible marker. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 16:225.
- HUNGATE, R.E. 1966. The rumen and its microbes. New York, EE.UU. Academic Press. 555 p.
- HYDEN, S.A. 1955. Turbimetric method for the determination of higher polyethylene glycols in biological material. *Kunge. Lantbr. Hösgk. Ann.* 22:139.
- KOLB, A.R.; LUCKEY, T.D. 1972. Markers in nutrition. *Nutrition Abstracts and Reviews* 42:28.
- KYKER, G.C. 1962. Rare earths. In *Mineral metabolism*. Ed. by C.L. Comar, F. Bronner. New York, EE.UU. Academic Press v.2. 499 p.
- KNISELEY, R.N.; BUTLER, C.C.; FASSEL, V.A. 1969. Flame emission detection and determination limits for the rare earths elements in the nitrous oxide-acetylene flame. *Analytical Chemistry* 41:1494.
- LAREDO, M.A.; MINSON, D.J. 1973. The voluntary intake, digestibility and retention time by sheep of leaf and stem fractions of five grasses. *Australian Journal of Agricultural Research* 24:875.
- LASCANO, C. 1979. Determinants of grazed forage voluntary intake in cattle. Ph. D. Thesis. College Station, Texas, EE.UU. Texas A&M University. 199 p.
- MADER, T.L.; TEETER, R.G.; HORN, G.W. 1984. Comparison of forage labeling techniques for conducting passage rate studies. *Journal of Animal Science* 58:208.
- MATIS, J.H. 1972. Gamma time-dependency in Blaxter's compartment model. *Biometrics* 28:597.



- \_\_\_\_\_.; TOLLEY, H.D. 1980. On the stochastic modelling of tracer kinetics. *Federation Proceedings* 29:104.
- MERTENS, D.R.; ELY, L.O. 1979. A dynamic model of fiber digestion and passage in the ruminant for evaluating forage quality. *Journal of Animal Science* 49:1085.
- MEYER, J.H.; GASKILL, G.S.; STOEWSAND, G.S.; WEIR, W.C. 1959. Influence of pelleting on the utilization of alfalfa. *Journal of Animal Science* 18:336.
- MILLER, J.K.; BRYNE, W.F. 1970. Comparison of scandium-46 and cerium-144 as nonabsorbed reference materials in studies with cattle. *Journal of Nutrition* 100:1287.
- \_\_\_\_\_.; MOSS, B.R.; BRYNE, W.F. 1971. Distribution of cerium in the digestive tract of the calf according to the time after dosing. *Journal of Dairy Science* 54:497.
- MINSON, D.J. 1966. The apparent retention of food in the reticulo-rumen at two levels of feeding by means of an hourly feeding technique. *British Journal of Nutrition* 20:765.
- \_\_\_\_\_.; COWPER, J.L. 1966. Diurnal variation in the excretion of faeces and urine by sheep fed once daily or at hourly intervals. *British Journal of Nutrition* 20:757.
- \_\_\_\_\_. 1967. The voluntary intake and digestibility, in sheep, of chopped and pelleted *Digitaria decumbens* (Pangola grass) following a late application of nitrogen fertilizer. *British Journal of Nutrition* 21:587.
- POND, K.R.; AKIN, D.; ELLIS, W.C. 1984a. Ingestive mastication and fragmentation of forages. *Journal of Animal Science* 58:1567.
- \_\_\_\_\_.; ELLIS, W.C.; MATIS, J.H. 1984b. Development and application of compartmental models for estimating various parameters of digesta flow in animals. College Station, Texas. Texas A&M University. Department of Animal Science Technical Report 84-2.
- \_\_\_\_\_.; BURNS, D.S.; FISHER, D.S.; QUIROZ, R.A. 1986. Appropriate markers and methodology for grazing studies. *In Proceedings of the 42nd Southern Pasture and Forage Crop Improvement Conference*. Athens, Georgia. p.62. (Compendio)
- POPPI, D.P.; MINSON, D.J.; TERNOUTH, J.H. 1980. Studies of cattle and sheep eating leaf and stem fractions of grasses. I. The voluntary intake, digestibility and retention time in the reticulo-rumen. *Australian Journal of Agricultural Research* 32:99.
- QUIROZ, R.A. 1984. Particle size of forage masticate and its effect on digestion, rate of passage, and

- intake by goats. Mag. Sc. Thesis. Raleigh, North Carolina, EE.UU. North Carolina State University. 58 p.
- REID, C.S.W. 1965. Total removal and return of digesta for quantitative sampling in studies of digestion in the reticulo-rumen of cattle. *In* Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. 25th Annual Conference, Palmerston North, February 1985. p. 65.
- SAS. 1984. SAS User's guide. Statistical Analysis Systems Institute, Inc. Cary, North Carolina. 923 p.
- SCHRENK, W.G. 1971. Evaluation of data. *In* Flame emission and atomic absorption spectrometry. Ed. by J.A. Dean, T.C. Rains. New York, EE.UU, Marcel Dekker. 523p.
- TEETER, R.G.; OWENS, F.N.; MADER, T.L. 1984. Ytterbium chloride as a particulate marker in the rumen. *Journal of Animal Science* 58:465.
- UDEN, P.; COLUCCI, P.E.; VAN SOEST, P.J. 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta rate of passage studies. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 31:625.
- WALDO, D.R.; SMITH, L.W.; COX, E.L. 1972. Model of cellulose disappearance from the rumen. *Journal of Dairy Science* 55:125.
- WARNER, A.C.I. 1981. Rate of passage of digesta through the gut of mammals and birds. *Nutrition Abstracts and Reviews* 51:789.

# UTILIZACION DE LA TECNICA DE DIGESTION *IN SITU* PARA LA CARACTERIZACION DE FORRAJES

*Francisco Romero*<sup>1</sup>

## 1. Introducción

La técnica de incubación de substratos en el rumen (*in situ*), para el estudio de la degradación de la fibra, fue inicialmente utilizada por Quin *et al.* (1938); ellos usaron bolsas cilíndricas de seda muy fina para medir la digestión de varios alimentos en el rumen de ovejas. Posteriormente la seda fue reemplazada por materiales sintéticos totalmente resistentes a la degradación ruminal; así, Schoeman *et al.* (1972) utilizaron bolsas de polyester y Mehrez y Orskov (1977a) sugirieron la utilización de bolsas de nylon como técnica rutinaria. Actualmente se utilizan las bolsas de dacrón, las cuales son más baratas y de un bajo contenido de nitrógeno (N).

La técnica *in situ* consiste en colocar cierta cantidad de muestra dentro de una bolsa, asegurarse que quede bien cerrada y colocarla en el rumen de animales fistulados por cierto período de tiempo (McQueen *et al.*, 1980). Esta técnica permite determinar simultáneamente la cantidad de muestra que es digerida y la tasa a la cual esta digestión se realiza. Se utiliza principalmente cuando se requiere de información acerca del efecto de las condiciones ruminales sobre la digestión de un número limitado de muestras. Por otro lado, permite mantener constantes las condiciones ruminales y variar los substratos incubados, o variar las condiciones ruminales incubando materiales conocidos (estándares) para determinar el efecto del cambio en el ambiente ruminal sobre la tasa y potencial de degradación de los alimentos.

---

<sup>1</sup> Ph.D., Producción y Evaluación de Forrajes, Area de Ganadería Tropical, CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Varios investigadores informan que existe una alta correlación entre los valores de digestibilidad de varios forrajes, encontrados por los métodos *in situ*, *in vitro* e *in vivo* (Barnes, 1973). Así, Burton *et al.* (1967) se basaron en la técnica *in situ* para determinar que el Bermuda Cruza-1 era superior que el Bermuda de la Costa.

Los nuevos sistemas de caracterización de las fracciones nitrogenadas (Orskov, 1970; Satter y Roffler, 1975; Verite *et al.*, 1979) reconocen la importancia de la degradabilidad de la proteína en el rumen. Su determinación permite estimar la cantidad de N disponible para la síntesis de proteína microbial y también la cantidad a ser enzimáticamente digerida y absorbida en el intestino delgado.

Existen dos alternativas para estimar la degradabilidad de materiales en el rumen: el método *in vivo* y el método *in situ*. En el método *in vivo* se requiere de animales fistulados en el rumen o en el intestino delgado, requiriéndose tomar muestras de digesta en estos sitios por períodos largos de tiempo. Además se debe asegurar que la proteína microbial y la proteína proveniente de la dieta sean debidamente separadas. Otro inconveniente del método es que no permite estimar la tasa de degradación de los diferentes materiales en el rumen, la cual es tan importante como la cantidad total que es degradada.

Una de las mayores desventajas en el método *in situ* es la falta de uniformidad con que se ha usado por

los investigadores, encontrándose gran variación en los estimados de digestibilidad. Sin embargo, si esta técnica se utiliza cuidadosamente es posible obtener resultados reproducibles, con errores estándares aceptables.

## 2. Factores que afectan los valores de digestibilidad *in situ*

Uden y Van Soest (1984) y Nocek (1985) evaluaron las fuentes de variación en la estimación de la digestibilidad de la materia seca (MS) y de la proteína cruda (PC), cuando se utiliza el método *in situ*, encontrando como más importantes:

- Tamaño del poro de la bolsa.
- Tamaño de partícula de la muestra (grado de molienda).
- Relación entre la cantidad de muestra y tamaño de la bolsa.
- Secuencia de introducción de las bolsas al rumen.
- Posición de las bolsas en el rumen
- Tiempo de incubación ruminal de las bolsas.
- Uso de repeticiones.
- Variaciones debidas a períodos y animales.
- Dieta de los animales.

### a. Tamaño del poro de las bolsas

Investigaciones llevadas a cabo por Van Hellen y Ellis (1977) utilizando bolsas de 70 milimicras (m $\mu$ ) mostraron una entrada a la bolsa

de 0.27 g de paredes celulares durante 48 horas de incubación. Sin embargo, cuando el tamaño del poro se redujo a 10  $\mu\text{m}$  la entrada de partículas del líquido ruminal a las bolsas fue despreciable.

Nocek (1985), estudiando dos tamaños de poros diferentes (un aumento de 20 a 40  $\mu\text{m}$  y otro de 50 a 80  $\mu\text{m}$ ), encontró que, en general, a medida que se aumenta el tamaño de los poros, la desaparición de MS y de N de harina de soya incubada en el rumen aumenta. Lindberg (1984) encontró que todos los componentes fueron más extensamente degradados a medida que se aumentó el tamaño de los poros (10 vs. 36  $\mu\text{m}$ ), pero que los patrones de degradación fueron semejantes.

Van Soest (1983) sugiere que el tamaño óptimo de los poros está alrededor de 30  $\mu\text{m}$ , ya que poros más pequeños retardan la entrada de microorganismos e inhiben una óptima fermentación, mientras que poros más grandes permiten la entrada de pequeñas partículas lignificadas que distorsionan los resultados.

#### **b. Área superficial de la bolsa**

Varios investigadores han examinado la importancia de la relación entre la cantidad de muestra en la bolsa y el tamaño de la misma. Así, se ha encontrado que al aumentar la cantidad de muestra de 6.5 a 50  $\text{mg}/\text{cm}^2$  de bolsa se disminuye la digestibilidad de la pared celular de pasto Guinea (*Panicum maximum*) de 54 a 38% (Uden y Van Soest, 1984). Simi-

larmente, Nocek (1985) encontró que la desaparición de la MS puede reducirse 3 unidades porcentuales cuando la relación entre peso de la muestra y tamaño de la bolsa aumenta de 9.2 a 20.3  $\text{mg}/\text{cm}^2$  y reducciones de hasta 8 unidades de porcentaje cuando se aumentó de 18.3 a 32.7  $\text{mg}/\text{cm}^2$ . Esto confirma aseveraciones hechas por Bullis *et al.* (1967) y Tomlin *et al.* (1967), en el sentido de que a medida que aumenta el peso de la muestra, en bolsas de tamaño constante, disminuye la digestibilidad a diferentes períodos de incubación. En general, se recomienda una relación de 10  $\text{mg}/\text{cm}^2$  para estudios con forrajes (Van Hellen y Ellis, 1977).

Según Van Soest (1983), es deseable que se mantenga una amplia relación entre el peso de la muestra y el tamaño de la bolsa porque contribuye a minimizar la variación de los resultados. Así mismo, la cantidad de muestra que recomienda para trabajar con forrajes es de alrededor de 8 g, lo que permite tener suficiente material residual en las bolsas, después de incubaciones de 48 a 72 h, para efectuar análisis de laboratorio.

#### **c. Efecto del tamaño de partícula de la muestra**

La preparación de muestras para incubación debe ser tal que el material a incubar realmente represente la forma física del material en el rumen, luego de ser consumido por el animal. La preparación ideal sería utilizar muestras colectadas de animales fistulados al esófago, las cuales ya han

sido debidamente masticadas (Bailey, 1962).

A medida que disminuye el tamaño de partícula, la desaparición, tanto de la MS como del N, y ésta es mayor cuando se pulveriza el material. Las diferencias más grandes en desaparición de los materiales ocurren durante las primeras horas de incubación ruminal (Weakley *et al.*, 1983). Cribas menores que 2 mm no deberían utilizarse ya que al disminuir tanto el tamaño de las partículas se incrementa el área de exposición del material al líquido ruminal, aumentando así las posibilidades de ataque por los microorganismos ruminales; todo esto conduciría a una sobrestimación del valor de digestibilidad (Uden y Van Soest, 1984). Adicionalmente, se ha encontrado que con partículas menores de 0.6 mm las partículas tienden a agruparse (formar "clumps"), cuya parte central no se ve expuesta al líquido ruminal, reduciéndose así la degradación del substrato (Figroid *et al.*, 1972).

Orskov (1982) sugiere que las pajas y henos se muelan con una criba de 2.3-3.0 mm. Materiales frescos, como forrajes y ensilajes deberían macerarse hasta un tamaño de 5.0 mm. Suplementos proteicos secos no deberían molerse.

#### **d. Secuencia de introducción de las bolsas al rumen**

La introducción simultánea de todas las bolsas puede aumentar la variación entre réplicas, especial-

mente cuando se estudian tasas de degradación. Es común que las bolsas se enreden entre sí dentro del rumen y que, para sacar aquellas con períodos cortos de incubación, se tenga que sacar todas las bolsas, interrumpiéndose temporalmente la fermentación en aquellas con períodos de incubación más largos. Al respecto, Nocek (1985) sugiere introducir las bolsas a diferentes intervalos de tiempo, de acuerdo con las horas de incubación que se desee estudiar, y sacar todo el grupo al mismo tiempo, con el fin de disminuir la variación encontrada entre réplicas.

Otro factor importante es el lavado de las bolsas. Es difícil aplicar el mismo tratamiento de lavado a todas las bolsas, cuando éstas se sacan individualmente a diferentes tiempos. Cuando todas se sacan simultáneamente, el lavado es más homogéneo y además está sujeto a menos variación debido a la fatiga del investigador. Se sugiere el uso de un lavado mecánico con tiempos fijos para que todas las muestras de diferentes corridas tengan el mismo tratamiento.

#### **e. Tiempo de incubación**

La medición de la tasa de degradación ruminal requiere de tiempos de incubación mayores a los normalmente empleados cuando sólo se quiere relacionar la desaparición de MS de las bolsas con la digestibilidad aparente del alimento (Orskov *et al.*, 1980). El tiempo necesario para medir la tasa de degradación varía en función del material que se está evaluando.

la tasa de degradación varía en función del material que se está evaluando, por lo que no se puede generalizar un tiempo máximo de incubación, ni tiempos intermedios. Sin embargo, es importante incluir suficientes observaciones en la parte más sensitiva de la curva de degradación y poner sólo las observaciones necesarias que permitan describir bien la parte asintota, que representa el potencial de degradación.

El mejor período de incubación para predecir la digestibilidad depende de la forma de la curva de degradación. Faria y Huber (1984), trabajando con henos de alfalfa y ensilaje de maíz encontraron una correlación de 0.82 y 0.59 entre sus estimados de digestibilidad *in vitro* de la MS y los estimados por el método *in situ* a 48 h y 72 h de incubación, respectivamente. Rodríguez (1968) encontró grandes variaciones entre bolsas y entre animales asociadas con tiempos cortos de incubación. Estas variaciones se redujeron a medida que las incubaciones fueron mayores que 24 h. McQueen *et al.* (1980) obtuvieron resultados similares y, además encontraron una importante reducción en la variación obtenida en la digestibilidad de la MS cuando incubaron las muestras 72 h en lugar de 48 h.

En forma general se podría decir que los concentrados requieren de 12 a 36 h de incubación; henos, pajas y otros materiales fibrosos requieren de más de 36 h. Para muchos suplementos proteícos incubaciones de 2, 4, 6, 12 y 24 h es adecuado. En el caso de

forrajes tropicales los períodos de incubación deben ser superiores a 48 h (Orskov, 1982). Para leguminosas herbáceas (*Arachis* y Alfalfa 77) y leguminosas arbóreas (*G. sepium* y *E. berteroana*) es suficiente con 48 h de incubación (Romero, 1985; CATIE, 1987).

#### f. Posición de la bolsa en el rumen

Balch y Johnson (1950) y Van Soest (1983) indicaron la ventaja de controlar la posición de las bolsas dentro del rumen, y que el mejor sitio de colocación es el saco ventral donde la fermentación es más rápida. Sin embargo, otros investigadores no encontraron ningún efecto de la posición de las bolsas dentro del rumen sobre la degradabilidad de varios alimentos (Mehrez y Orskov, 1977b).

La mayoría de los investigadores que trabajan con ésta técnica recomiendan que las bolsas se amarren a la cánula con un hilo de nylon de 25 cm en ovejas y de 50 cm en bovinos (Orskov, 1982). Esto permite a las bolsas moverse libremente en las fases líquidas y sólidas del rumen. Al respecto, Rodríguez (1968) encontró que la variación entre bolsas se redujo cuando éstas se ataron a un hilo de 50 cm en lugar de 30 cm, indicando que el mayor movimiento disminuyó el efecto de variaciones en el ambiente ruminal.

### g. Variación en el tiempo y entre animales

Van Keuren y Heinemann (1962) no encontraron diferencias importantes entre días cuando heno incubaron heno de alfalfa por cinco días consecutivos. Sin embargo estudios realizados por Mehrez y Orskov (1977a) demostraron que la principal fuente de variación para la desaparición de la MS de las bolsas fue la debida a animales, en este caso ovejas (6.2% del promedio), seguida por la variación encontrada entre días (4.9%). La menor variación encontrada fue aquella entre bolsas (3.2%) que fueron incubadas juntas y removidas del rumen al mismo tiempo.

Orskov y Mehrez (1977) calcularon que una muestra que se repite dos veces en el tiempo, en el mismo animal (2 períodos), y utilizando tres animales simultáneamente, es un método conveniente para obtener resultados confiables (variación del promedio de 3.43%). El adicionar una oveja más al experimento resultó en una variación del promedio de 3.19%, pero esto significa un mayor uso de recursos en términos de animales y de incubaciones.

La variación del promedio se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{V_B + (b+V_D) + (b \times d \times V_A)}{b \times d \times a}$$

donde,

$V_B$ ,  $V_D$  y  $V_A$  = Variación de los promedios de bolsas, días y animales, %

$b$ ,  $d$ ,  $a$  = Número de bolsas, días y animales.

McQueen *et al.* (1980) encontraron que, en vacas fistuladas, los resultados eran suficientemente confiables cuando se incubaban simultáneamente dos bolsas por vaca; el error estándar fue de 0.8% y 1.0% para la digestibilidad promedio de la MS y de la pared celular, respectivamente. En este mismo estudio, se logró reducir el error estándar del promedio a 0.3% para la digestibilidad de la MS y de la pared celular, utilizando cuatro vacas, tres bolsas y dos períodos.

### h. Número de bolsas

Cuando se utilizan ovejas se pueden utilizar hasta nueve bolsas siempre y cuando el diámetro interno de la cánula sea de 40 cm (Orskov *et al.*, 1980). Romero *et al.* (1987) utilizaron 18 bolsas en vacas Holstein, sin encontrar ningún problema; para ello, introdujeron las bolsas en forma secuencial, atadas a lo largo de una cadena de 30 cm de largo, la cual a su vez fue atada a la cánula con un cordón de nylon.

### i. Efecto de la dieta

La dieta de los animales fistulados puede tener un efecto importante sobre la tasa de degradación del ma-



terial que se está evaluando. Sin embargo, existen resultados contradictorios sobre el efecto de la dieta en la desaparición de la MS y la PC de bolsas incubadas *in situ*. Así, Romero *et al.* (1987) encontraron que la tasa de degradación de la MS de alfalfa fue 10.5 % superior cuando se alimentaron vacas con heno de maní que cuando éstas recibieron 70% de concentrado y 30 % de heno de maní. Por otro lado, Weakley *et al.* (1983) encontraron una disminución en la desaparición de MS y PC a medida que aumentaron los niveles de heno de alfalfa en la dieta de 20% a 80%. Ganev *et al.* (1979) también encontraron que la tasa y potencial de degradación de la PC dependía de la dieta basal del animal.

Owens y Zinn (1982) y Orskov (1982) postularon que las diferencias en la tasa de degradación de las proteínas de origen vegetal, resultantes del uso de diferentes tipos de dieta, son debidas a diferencias intrínsecas en su contenido de fibra. El material celulolítico podría proteger más a las proteínas cuando se alimenta con una dieta basada en concentrados, que con una de forrajes. Weakley *et al.* (1983) sugieren la existencia de fuerzas abrasivas y diferencias de presiones que podrían ayudar a mantener limpios los poros de bolsas que son incubadas en el rumen de animales alimentados con sólo forrajes (resultando en una mayor degradación de la MS y la PC), que bolsas que se incuban en un medio ruminal más líquido, como ocurre con dietas basadas en concentrados.

En contraste con lo anterior, otros investigadores no han encontrado ningún efecto de la dieta sobre la degradación de la MS o la PC en el rumen. (Faria y Huber, 1984; Figroid *et al.*, 1972; Schaibly y Wing, 1974).

### 3. Referencias

- BAILEY, C. B. 1962. Rates of digestion of swallowed and unswallowed dried grass in the rumen. *Canadian Journal of Animal Science* 42:49.
- BALCH, C. C.; JOHNSON, V. W. 1950. Factors affecting the utilization of food by dairy cows 2 Factors influencing the rate of breakdown of cellulose (cotton thread) in the rumen of the cow. *British Journal of Nutrition* 4:389-394.
- BARNES, D. K. 1973. Laboratory methods of evaluating feeding value of herbage. *In Chemistry and Biochemistry of Herbage*. Ed. by G. W. Butler and R. W. Bailey. New York, EE.UU., Academic Press. p. 179.
- BULLIS, D. D.; MAJMANOUCHEHRI, M. A.; KNOX, K. L. 1967. *In vivo* nylon bag dry matter digestibility as a predictor of ration feeding value. *Journal of Animal Science* 26:130. (Abstract).
- BURTON, G. W.; HART, R. H.; LOWREY, R. S. 1967. Improving forage quality in bermudagrass by breeding. *Crop Science* 7:329.

- CATIE 1987. Efecto de la edad de rebrote sobre la degradación *in situ* de *G. sepium* y *E. berteriana*. II Informe Anual, Proyecto Sistemas Silvopastoriles, CATIE/CIID. Turrialba, Costa Rica. 124 p.
- FARIA, V. P. De; HUBER, J. T. 1984. Influence of dietary protein and energy on disappearance of dry matter from different forage types from dacron bags suspended in the rumen. *Journal of Animal Science* 59:246.
- FIGROID, W. W.; HALE, H.; THEURER, B. 1972. An evaluation of the nylon bag technique for estimating rumen utilization of grains. *Journal of Animal Science* 35:113.
- GANEV, G.; ORSKOV, E. R.; SMART, R. 1979. The effect of roughage or concentrate feeding and rumen retention time on total degradation of protein in the rumen. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 93:651.
- LINDBERG, J. E. 1984. Nitrogen metabolism in sheep. 2. A comparison between rumen degradability of nitrogen and organic matter *in sacco* and *in vivo* in sheep fed hay rations and various protein supplements. *Swedish Journal of Agricultural Research* 14:37.
- McQUEEN, R. E.; BUSH, R. S.; NICHOLSON, J. W. G. 1980. Variability of forage digestion in nylon bags suspended in the rumen. Proceedings of a meeting held in Alberta, Canada. p. 9.
- MEHREZ, A. Z.; ORSKOV, E. R. 1977a. The use of a dacron bag technique to determine rate of degradation of protein and energy in the rumen. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 93:645.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1977b. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 93:645.
- NOCEK, J. E. 1985. Evaluation of specific variables affecting *in situ* estimates of ruminal dry matter and protein digestion. *Journal of Animal Science* 60:1347.
- ORSKOV, E. R. 1970. Nitrogen utilization by the young ruminants. Proceedings of the Fourth Nutrition Conference, Nottingham, U.K. 113 p.
- \_\_\_\_\_.; MEHREZ, A. Z. 1977. Estimation of extent of protein degradation from basal feeds in the rumen of sheep. Proceedings of the Nutrition Society 36:78.
- \_\_\_\_\_.; DeB HOVELL, F. D.; MOULD, F. 1980. Uso de la técnica de la bolsa de nylon para la evaluación de los alimentos. *Producción Animal Tropical* 5:213.

- \_\_\_\_\_. 1982. Protein Nutrition in Ruminants. 1 Ed. New York, New York, Academic Press, Inc. 160 p.
- OWENS, F. N.; ZINN, R. A. 1982. The standard reference system of protein bypass estimation. *In* Protein Requirements for Cattle: Symposium. Ed. by F. N. Owens. Stillwater, Oklahoma, Oklahoma State University. 363 p.
- QUIN, J. I.; WATH, J. G. VAN DER; MYBURGH, S. 1938. Studies on the alimentary tract of Merino sheep in South Africa. 4. Description of experimental techniques Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry 11:341.
- RODRIGUEZ, H. 1968. The *in vivo* bag technique in digestibility studies. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 2:285.
- ROMERO, F. 1985. Nutritional evaluation of Florida 77 alfalfa and Florigraze Rhizoma peanut as forages for dairy Cattle. Ph.D. Thesis. Gainesville, Florida, EE.UU., University of Florida. 172 p.
- \_\_\_\_\_.; VAN HORN, H. H.; PRINE, G. M.; FRENCH, E. C. 1987. Effect of cutting interval upon yield, composition and digestibility of Florida 77 alfalfa and Florigraze Rhizoma peanut. *Journal of Animal Science* 65:786.
- SATTER, L. D.; ROFFLER, R. E. 1975. Nitrogen requirements and utilization in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 58:1219.
- SCHAIBLY, G. E.; WING, J. M. 1974. Effect of roughage concentrate ratio on digestibility and rumen fermentation of corn silage-citrus pulp rations. *Journal of Animal Science* 38:697.
- SCHOEMAN, E. A.; De WET, P. J.; BURGER, W. J. 1972. The evaluation of the digestibility of treated proteins. *Agroanimalia* 4:35.
- TOMLIN, D. A.; ANDERSON, M. J.; HARRIS, L. E. 1967. Refinements in the *in vivo* bag rumen technique. *Journal of Animal Science* 27:939. (Abstract).
- UDEN. P.; VAN SOEST, P. J. 1984. Investigation of the *in situ* bag technique and a comparison of the fermentation in heifers, sheep, ponies and rabbits. *Journal of Animal Science* 58:213.
- VAN HELLEN, R. W.; ELLIS, W. C. 1977. Sample container porosities for rumen *in situ* studies. *Journal of Animal Science* 44:141.
- VAN KEUREN, R. W.; HEINEMANN, W. W. 1962. Study of a nylon bag technique for *in vivo* estimation of digestibility. *Journal of Animal Science* 21:340.

VAN SOEST, P. J. 1983. Nutritional Ecology of the Ruminant. 1 Ed. Corvallis, Oregon, EE.UU., O & B Books. 374 p.

WEAKLEY, D. C.; STERN, M. D.; SATTER, L. D. 1983. Factors affecting disappearance of feedstuffs from bags suspended in

the rumen. *Journal of Animal Science* 56:493.

VERITE, R.; JOURNET, M.; JARRIGE, R. 1979. A new system for the protein feeding of ruminants: The PDI system. *Livestock Production Science* 6:349.

# MEDICION DE LAS TASAS DE DEGRADACION RUMINAL EN ALIMENTOS

*Danilo A. Pezo*<sup>1</sup>

## 1. Introducción

Los alimentos ingeridos por los animales desaparecen del tracto gastro-intestinal, o de cualquiera de los compartimentos digestivos, ya sea a través de su digestión y absorción, o por medio del pasaje a otro compartimiento. Consecuentemente, la degradación que sufre un alimento en un compartimento dado, o en el tracto total, es la resultante de dos fuerzas competitivas que actúan simultáneamente, la tasa de pasaje y la tasa de degradación (Mertens, 1977; Ellis, 1978; Van Soest, 1982; Faichney y Black, 1984).

El concepto de simultaneidad de estos procesos (degradación y pasaje), conjuntamente con la reducción física del tamaño de partículas, se ha consi-

derado en la mayoría de los modelos de función ruminal propuestos (Baldwin *et al.*, 1977; Mertens y Ely, 1979; Faichney y Black, 1984; Fisher, 1985; Murphy *et al.*, 1986). Sin embargo, tanto el nivel de resolución, como los criterios usados para definir los componentes dietéticos han variado en los diferentes modelos propuestos. Por ejemplo, Baldwin *et al.* (1977), Faichney y Black (1984), y Murphy *et al.* (1986) consideraron en sus modelos constituyentes o fracciones químicas individuales, mientras que Mertens y Ely (1979) clasificaron los componentes dietéticos en función de sus tasas de degradación. Por otro lado, Fisher (1985) propuso una modificación al modelo de Mertens y Ely, incluyendo la distribución del tamaño de partículas como un criterio adicional para definir los diferentes reservorios ("pools") de material ingerido.

---

<sup>1</sup> Ph.D., Agrónomo de Pasturas, Area de Ganadería Tropical, CATIE, Turrialba, Costa Rica.

En las recientes revisiones bibliográficas de Mertens y Ely (1982), Ellis *et al.* (1984a, b) Grovum (1984) y Lascano y Quiroz (ver su contribución en esta publicación) se discuten la definición, procedimientos de medición y fuentes de variación que afectan las tasas de pasaje y la reducción del tamaño de las partículas ingeridas, así como sus implicaciones en la función ruminal. Por lo tanto, en el presente trabajo sólo se enfatizará lo referente a los parámetros de degradación ruminal.

## **2. Parámetros medidos en ensayos de velocidad de degradación ruminal**

### **a. Degradabilidad potencial**

El concepto de degradabilidad potencial fue propuesto por Wilkins (1969), definiéndolo como la degradación que sufriría un alimento en el ecosistema ruminal si es que las condiciones presentes, y el tiempo de retención en el mismo, no fueran limitantes.

No existe acuerdo sobre el tiempo de incubación requerido para estimar la degradabilidad potencial de la materia seca (MS), de los constituyentes de pared celular o de cualquier otra fracción. Algunos sugieren que el valor de degradabilidad potencial se alcanza al cabo de 48 a 120 horas (h) de incubación (Wilkins, 1969; Smith *et al.*, 1971; Pezo y Vohnout, 1977); pero Wilkins y Minson (1970) y Goto y

Minson (1977) observaron que ocurrían cambios en la degradación de la MS incluso después de 6 y 14 días de incubación, respectivamente.

Para propósitos prácticos, Orskov *et al.* (1980) proponen que para obtener un estimado de la degradabilidad potencial se requieren de 12 a 36 h de incubación en el caso de alimentos concentrados, de 24 a 60 h en forrajes de alta calidad y de 48 a 72 h para forrajes de baja calidad. Sin embargo, en varios estudios con forrajes muy diversos han sido las 72 h de incubación el tiempo utilizado para determinar la degradabilidad potencial (Gill *et al.*, 1969; Smith *et al.*, 1971; Cherney *et al.*, 1986).

En el caso de forrajes, la fracción potencialmente no degradable ha sido caracterizada anatómicamente utilizando técnicas de microscopía de luz, de barrido y de transmisión de electrones, siendo sus principales componentes los tejidos más lignificados, como son el esclerénquima y el xilema (Akin, 1979; Akin *et al.*, 1983) y porciones del parénquima presente en la envoltura de los haces vasculares en gramíneas tipo C<sub>4</sub> (Akin y Burdick, 1981; Akin *et al.*, 1984a,b).

### **b. Degradabilidad inicial**

El valor de degradabilidad inicial corresponde al intercepto de la ecuación que describe la degradación acumulativa de las diferentes fracciones componentes de un alimento en

función del tiempo. En otras palabras, la degradabilidad inicial corresponde al valor de digestibilidad obtenido a tiempo cero (Orskov *et al.*, 1980; Miller, 1982). En el caso de la proteína cruda (PC) o de la MS, este valor representa las fracciones solubles que se degradan rápida y completamente en el rumen.

Cuando se determina la degradación de las fracciones fibrosas se asume que el valor de degradabilidad inicial es cero, aún cuando pudiera obtenerse algún valor positivo si es que se utilizan técnicas *in situ*, y no se prevee el uso de factores de corrección que tomen en cuenta el escape de partículas muy finas a través de la bolsa. A este respecto, San Martín (1980) cuantificó que el material que escapaba de la bolsa representaba el 0.67% de la muestra original cuando se trabajaba con materiales molidos a 3 mm, mientras que Playne *et al.* (1978) obtuvieron valores que variaban entre 3.7 y 4.7% para muestras molidas a 2 mm.

#### **c. Largo del período pre-fermentativo ("digestion lag")**

Otro parámetro evaluado frecuentemente en estudios de degradación ruminal de los alimentos es la duración del período pre-fermentativo ("digestion lag"), el cual representa el tiempo que transcurre antes de que se inicie la degradación de la fibra por acción enzimática de los microorganismos ruminales. Varios de los mo-

delos propuestos para la estimación de las tasas de digestión incluyen un parámetro que toma en cuenta este fenómeno (Mertens, 1977; Mertens y Loften, 1980).

La existencia de este período pre-fermentativo no es un artificio de los modelos usados, sino que, por el contrario, tiene sentido biológico puesto que para que ocurra degradación de la fracción fibrosa se requiere que ésta se hidrate, sufra alteraciones físicas y químicas, y que las bacterias celulolíticas se adhieran a la fibra, especialmente si se trata de los tejidos más lignificados que se degradan muy lentamente (Akin, 1979; Mertens y Ely, 1982; Morris, 1984).

#### **d. Tasa de degradación ruminal**

La tasa de degradación de un alimento se refiere a la cantidad de substrato que puede ser degradada por unidad de tiempo (Van Soest, 1982). La estimación de las tasas de degradación de una fracción dada requiere el describir matemáticamente la degradación o desaparición de dicha fracción en función del tiempo (Mertens y Ely, 1982), para lo cual se detiene el proceso de digestión *in vitro* o *in situ* a intervalos previamente establecidos. Estos intervalos variarán en función del tipo de alimento y de la fracción cuya tasa de degradación se pretende evaluar.

### 3. Modelos propuestos para estimar las tasas de degradación ruminal

Se han propuesto diferentes modelos para describir la degradación acumulativa de las diferentes fracciones que componen un alimento, en función del tiempo de fermentación ruminal. Tal vez el enfoque matemático más frecuentemente empleado ha sido el uso de modelos semilogarítmicos, en los que la variable dependiente es el logaritmo natural del porcentaje de material inicial remanente a cada tiempo de incubación, y la variable independiente es el tiempo transcurrido al detenerse el proceso fermentativo. Smith *et al.* (1971) sugieren que esta relación es lineal cuando el residuo no degradado se expresa en términos relativos, con respecto a la porción del alimento que es potencialmente degradable. Dentro de este contexto, Waldo *et al.* (1972) propusieron que la digestión de la fracción de celulosa potencialmente degradable sigue un modelo de cinética de primer orden, el cual queda definido por un sólo parámetro denominado tasa fraccional de digestión. El mismo concepto fue utilizado por Cross *et al.* (1974) para definir la tasa de degradación de los constituyentes de pared celular, y por Broderick (1978) para el caso de la PC.

El modelo de cinética de primer orden propuesto por dichos investigadores es el siguiente:

$$R = A e^{-kt} \quad [1]$$

donde:

R = Residuo no digerido al tiempo "t", expresado como porcentaje del material potencialmente degradable

A = Fracción potencialmente degradable

k = Coeficiente de regresión

t = Tiempo de fermentación

$k * 2.303 * 100$  = Tasa de degradación, % h<sup>-1</sup>

El modelo anteriormente descrito posee ventajas de cálculo, en cuanto la estimación de las tasas de degradación puede hacerse utilizando calculadoras manuales, pero tiene como desventaja que al ser la variable dependiente función del valor de degradabilidad potencial, su estimación variará de acuerdo a cómo se define esa degradabilidad potencial; por ejemplo, degradabilidad obtenida a las 48, 72, 96 ó 120 h (Mertens, 1977).

Más aún, incluso cuando se ha utilizado un criterio uniforme de degradabilidad potencial, se han presentado problemas con los estimados de tasa de degradación por el método propuesto por Smith *et al.* (1971). Por ejemplo, al evaluar las tasas de degradación para diferentes porciones de la planta en dos cultivares de *Panicum amarulum*, previamente identificados como de alta y baja digestibilidad, Pezo (1987) observó que el ordenamiento de las diferentes porciones de la planta en función de sus tasas de degradación fue tallos > vainas > láminas. Obviamente, estos resultados estuvieron influenciados por la magnitud de la fracción poten-



cialmente degradable, estando el ordenamiento de las diferentes porciones de la planta en sentido opuesto al esperado si se consideraba la proporción relativa de los tejidos más lentamente degradables presentes en cada una de ellas (Akin, 1979).

Otro problema de orden conceptual en el uso de los modelos de cinética de primer orden, es que en ellos se asume que la fracción potencialmente degradable constituye un reservorio ("pool") uniforme, cuando realmente no lo es. Esto se evidencia por la curvilinearidad observada al graficar la relación entre el logaritmo natural del material no degradado y el tiempo de incubación (Mertens, 1977; Nocek y English, 1986; Pezo, 1987), lo que es indicativo de que la fracción potencialmente degradable está compuesta de más de un reservorio ("pool").

Dentro del mismo contexto, al estudiar la degradación de la MS en función del tiempo de incubación, Pezo (1987) identificó cuatro reservorios ("pools"): a) Una fracción soluble en la mezcla licor ruminal/saliva artificial, definida como degradación inicial (DIVMS a tiempo cero), la cual se asume que es degradada a una tasa muy rápida; b) Una fracción potencialmente no degradable, la cual se consideró equivalente a la MS residual al cabo de 120 h de incubación; c) Una fracción degradable a una tasa rápida ( $k_1$ ), la cual desaparece en las primeras 36 a 48 h de incubación cuando se analizan gramíneas tropicales, y d) Una fracción degradable a una tasa lenta ( $k_2$ ), la cual desaparece

entre las 36 a 48 h y las 120 h en el caso de gramíneas tropicales. Es lógico esperar sin embargo, que los tiempos requeridos para la degradación de estos dos últimos reservorios ("pools") deben de ser menores en el caso de forrajes de mayor calidad, como son las gramíneas de zona templada y las leguminosas.

El modelo propuesto por Pezo (1987) para estimar  $k_1$  y  $k_2$  es similar al propuesto por Smith *et al.* (1971), con la diferencia de que el residuo no digerido no es ajustado por la magnitud de la fracción potencialmente degradable, y que las estimaciones de cada una de las tasas de degradación ( $k_1$  y  $k_2$ ) se hacen por separado, tomando los residuos obtenidos en las primeras 36 a 48 h y entre las 36 ó 48 h y las 120 h de incubación, respectivamente.

Por otro lado, Mertens y Ely (1982) incorporaron en un mismo modelo los dos componentes de tasa de degradación previamente descritos ( $k_1$  y  $k_2$ ), más el componente largo del período pre-fermentativo ("lag time") en que se asume no ocurre degradación. El modelo en mención es el siguiente:

$$R = Fe^{-k_1(t-l)} + Se^{-k_2(t-l)} + I \quad [2]$$

donde:

R = Residuo no degradado al tiempo "t"

F = Fracción rápidamente degradable

S = Fracción lentamente degradable

$k_1$  = Tasa de degradación para la fracción rápidamente degradable

$k_2$  = Tasa de degradación para la fracción lentamente degradable

L = Largo del período pre-fermentativo

I = Fracción potencialmente no degradable

Tanto el modelo propuesto por Mertens y Ely (1982) como el propuesto por Pezo (1987), son consistentes con lo observado por Akin (1979) respecto al potencial de degradación de los diferentes tejidos presentes en las plantas. Akin (1979) sugiere que éstos se pueden agrupar en: a) Tejidos rápidamente degradables (mesófilo y floema); b) Tejidos lentamente degradables (epidermis y envoltura de los haces vasculares) y c) Tejidos no degradables (esclerénquima y haces vasculares lignificados).

Adicionalmente a los modelos exponenciales simple y múltiple descritos previamente, Ellis *et al.* (1984b) propusieron un modelo estocástico de tasa heterogénea, con una distribución gamma de las tasas de degradación, y DeRuiter (1984) utilizó el modelo Weibull decreciente, el cual incluía un componente para variable de clase. En ambos casos, el valor de degradabilidad obtenido a cualquier tiempo de incubación, fue ajustado con base en la magnitud de la fracción fibrosa potencialmente degradable.

El modelo estocástico de tasa heterogénea propuesto por Ellis *et al.* (1984b) es el siguiente:

$$F(t) = A [1 + \beta(t - L)]^\alpha + I \quad [3]$$

donde:

F(t) = Pared celular que se espera no esté degradada al tiempo "t"

A = Pared celular potencialmente degradable

t = Tiempo de fermentación

L = Largo del período pre-fermentativo ("lag time")

I = Pared celular potencialmente no degradable

$\alpha$  y  $\beta$  = Parámetros de forma para una distribución gamma de las tasas de digestión

Obviamente, un modelo de este tipo posee desventajas en términos de la complejidad de los procesos de cálculo, y no acarrea mejoras en la precisión de los estimados de tasa de digestión. Por otro lado, permite una estimación más precisa del largo del período pre-fermentativo y de la magnitud de la fracción potencialmente degradable (Ellis *et al.*, 1984b).

Otra opción que se ha utilizado para la estimación de parámetros de velocidad de degradación de la MS o de sus componentes, la constituyen los modelos tipo "curva de crecimiento", en los cuales la variable dependiente es la degradación acumulativa y la variable independiente es el tiempo de fermentación. A manera de ejemplo, a continuación se ilustran algunos de los modelos empleados.

Para el caso de la degradación de la MS, Pezo y Vohnout (1977) propusieron el modelo siguiente:

$$Y = 1/(A + Be^{-ct}) \quad [4]$$

donde:

- Y = Degradabilidad acumulativa de MS al tiempo "t"  
 1/A = Degradabilidad potencial de la MS  
 1/(A+B) = Degradabilidad inicial de la MS  
 c = Tasa de degradación  
 t = Tiempo de fermentación

Para la degradación de los constituyentes de la pared celular (CPC), Espinoza (1983) utilizó el modelo siguiente:

$$Y = A [ 1 - e^{-b(t-l)} ] \quad [5]$$

donde:

- Y = Degradabilidad acumulativa de los CPC al tiempo "t"  
 A = Degradabilidad potencial de los CPC  
 b = Tasa de degradabilidad de los CPC  
 t = Tiempo de incubación  
 l = Largo del período pre-fermentativo ("lag time")

Por otro lado, para el caso de la degradación acumulativa de la PC, Orskov y McDonald (1979) propusieron el modelo siguiente:

$$P = A + B (1 - e^{-ct}) \quad [6]$$

donde:

- P = Degradación acumulativa de PC al tiempo "t"

- A = Degradabilidad inicial de PC  
 B = Fracción de PC potencialmente degradable por acción fermentativa  
 c = Tasa de degradación de la PC  
 t = Tiempo de incubación

Una limitante en el uso de modelos tipo "curva de crecimiento" es el que, al estimar los diferentes parámetros que definen la tasa de degradación de los diferentes alimentos estudiados, se requiere del uso de los procedimientos de Regresión No-Lineal por Mínimos Cuadrados disponibles en los paquetes estadísticos (SAS, 1985). En general dichos paquetes estadísticos utilizan procedimientos iterativos, cuya efectividad va a depender de cuán cercanos al valor real se encuentran los estimados de los parámetros que se proveen al computador. Obviamente, esto supone que cada juego de datos (degradación acumulativa *vs.* tiempo) debe tratarse independientemente, y que manualmente se obtengan estimados de dichos parámetros.

#### 4. Aplicabilidad de los datos obtenidos en estudios de tasas de degradación de alimentos

Los estudios de tasa de degradación ruminal de los alimentos proporcionan información que puede ser utilizada para: a) Estimar la degradación real a nivel ruminal de los alimentos utilizados, ya sea como componentes básicos de la dieta o como suplementos (Kempton, 1980);

b) Detectar las posibles interacciones entre alimentos componentes de una ración (Preston, 1986); y eventualmente, c) Seleccionar ingredientes de la dieta que serían compatibles para maximizar la síntesis de proteína microbial en el ecosistema ruminal. Otra aplicación importante de las tasas de degradación ruminal es su posible utilización en modelos dinámicos de digestión, los cuales permiten simular el consumo de forrajes (Fisher, 1985).

Quizás el área donde se ha logrado mayor desarrollo metodológico en el uso de la información generada en estudios de tasa de degradación ruminal es la que trata de la fracción proteica contenida en los alimentos. Al respecto, tres de los nuevos sistemas propuestos para la evaluación de alimentos y formulación de raciones (Sistema de Proteína Metabolizable de Burroughs, Sistema ARC de Gran Bretaña y Sistema de Proteína Degrada en el Intestino del INRA de Francia), sugieren reemplazar el concepto de proteína cruda o digerible por el de proteína metabolizable (NRC, 1985).

La magnitud de la fracción proteína metabolizable es función del valor de degradabilidad real de la proteína a nivel ruminal, el cual se estima a partir de la tasa de degradación ruminal de la fracción proteica y de la tasa de dilución o pasaje a través del rumen (Kempton, 1980).

Otra aplicación donde ha existido algún desarrollo de metodologías en la utilización de las tasas de degradación

ruminal, conjuntamente con las tasas de pasaje, es en la valoración de alimentos en términos de su potencial de consumo, información que es relevante para sistemas de formulación de raciones que incorporan el concepto de capacidad de llenado ruminal, como es el caso del Sistema INRA de "Unidades de Llenado o Lastre" (Jarrige *et al.*, 1986). En este sentido, Varga y Hoover (1983) demostraron la factibilidad de formular raciones con diferente potencial de consumo, tomando en cuenta la tasa y nivel de degradación de la pared celular y su tasa de pasaje. Igualmente, Fisher (1985) demostró que era posible predecir el consumo utilizando un modelo que incorpora información sobre la magnitud de los diferentes reservorios ("pools") por tamaño de partícula, sus tasas de degradación para la MS y sus tasas de pasaje.

En resumen, es evidente que en años recientes se han hecho esfuerzos importantes de investigación en la búsqueda de aplicaciones para la información obtenida en estudios de tasa de degradación ruminal de las diferentes fracciones que componen el alimento, pero definitivamente es un área que merece mayor atención de los investigadores en el futuro.

## 5. Referencias

- AKIN, D. E.. 1979. Microscopic evaluation of forage tissue by rumen microorganisms. A review. *Journal of Animal Science* 48:701.

- \_\_\_\_\_.; BURDICK, D. 1981. Relationship of different histochemical types of lignified cell walls to forage digestibility. *Crop Science* 21:577.
- \_\_\_\_\_.; WILSON, J.R.; WINDHAM, W.R. 1983. Site and rate of tissue digestion in leaves of C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> intermediate *Panicum* species. *Crop Science* 23:147.
- \_\_\_\_\_.; BROWN, R.H.; RIGSBY, L.L. 1984a. Digestion of stem tissues in *Panicum* species. *Crop Science* 24:769.
- \_\_\_\_\_.; RIGSBY, L.L. ; BROWN, R.H. 1984b. Ultrastructure of cell wall degradation in *Panicum* species differing in digestibility. *Crop Science* 24:156.
- BALDWIN, R. L., KOONG, L.J.; ULYATT, M.J. 1977. A dynamic model of ruminant digestion for evaluation of factors affecting nutritive value. *Agricultural Systems* 2:255.
- BRODERICK, G. A. 1978. *In vitro* procedures for estimating rates of ruminal protein degradation and proportions of protein escaping the rumen undegraded. *Journal of Nutrition* 108:181.
- CHERNEY, J.H.; MOORE, K.J.; VOLENEC, J.J.; AXTELL, J.D. 1986. Rate and extent of digestion of cell wall components of brown-midrib sorghum species. *Crop Science* 26:1055.
- CROSS, H. H.; SMITH, L.W.; DeBARTH, J.V. 1974. Rates of *in vitro* forage fiber digestion as influenced by chemical treatment. *Journal of Animal Science* 39:808.
- DeRUITER, J. M. 1984. Characterization and prediction of cell wall carbohydrate composition of the subtropical forage grasses: *Pennisetum flaccidum*, *Panicum amarum*, *Panicum amarulum* and *Panicum virgatum*. Ph.D. Thesis. Raleigh, EE.UU., North Carolina State University. 275 p.
- ELLIS, W. C. 1978. Determinants of grazed forage intake and digestibility. *Journal of Dairy Science* 61:1828.
- \_\_\_\_\_.; MATIS, J.H.; POND, K.R.; LASCANO, C.E.; TELFORD, J.P. 1984a. Dietary influences on flow rate and digestive capacity. *In* *Herbivore Nutrition in the Subtropics and Tropics*. Ed. by F. M. C. Gilchrist, R. I. Mackie. Craighall, South Africa, Science Press. p. 269.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; MAHLOOJI, M. 1984b. Physical and chemical digestion of forage fragments with emphasis in stochastic heterogeneous rate models. *In* *II International Workshop on Modeling Ruminant Digestion and Metabolism. Proceedings*. Ed. by R.L. Baldwin, A.C. Bywater. University of California, Davis. p.34.

- ESPINOZA, J. R. 1983. Consumo y parámetros de digestión en rastrojos de maíz cultivado sólo o en asocio con leguminosas. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., Programa Universidad de Costa Rica/CATIE. 71 p.
- FAICHNEY, G. J.; BLACK, J.L. 1984. Modeling rumen function and the absorption of nutrients. *In* II International Workshop on Modeling Ruminant Digestion and Metabolism. Proceedings. Ed. by R. L. Baldwin, A. C. Bywater. University of California, Davis. p. 49.
- FISHER, D. S. 1985. Grass canopy dry matter distribution and animal diet relationships. Ph.D. Thesis. Raleigh, North Carolina State University. 114 p.
- GILL, S.S.; CONRAD, H.R.; HIBBS, J.W. 1969. Relative rate of *in vitro* cellulose disappearance as a possible estimator of digestible dry matter intake. *Journal of Dairy Science* 52:1687.
- GOTO, I.; MINSON, D.J. 1977. The potential digestibility of leaf and stem fractions of grasses. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 89:143.
- GROVUM, W. L. 1984. Integration of digestion and digesta kinetics with control of feed intake - a physiological framework for a model of rumen function. *In* *Herbivore Nutrition in the Subtropics and Tropics*. Ed. by F. M. C. Gilchrist, R. I Mackie. Craighall, South Africa, Science Press. p. 244.
- JARRIGE, R.; DEMARQUILLY, C.; DULPHY, J.P.; HODEN, A.; ROBELIN, J.; BERANGER, C.; GEAY, Y.; JOURNET, M.; MALTERRE, C.; MICOL, D.; PETIT, M. 1986. The INRA "fill unit" system for predicting the voluntary intake of forage-based diets in ruminants: a review. *Journal of Animal Science* 63:1737.
- KEMPTON, T. J. 1980. El uso de bolsas de nylon para caracterizar el potencial de degradabilidad de alimentos para el rumiante. *Producción Animal Tropical* 5:115.
- MERTENS, D. R. 1977. Dietary fiber components: relationship to the rate and extent of ruminal digestion. *Federation Proceedings* 36:187.
- \_\_\_\_\_; ELY, L.O. 1979. A dynamic model of fiber digestion and passage in the ruminant for evaluating forage quality. *Journal of Animal Science* 49:1085.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. 1982. Relationship of rate and extent of digestion to forage utilization. A dynamic model evaluation. *Journal of Animal Science* 54:895.
- \_\_\_\_\_; LOFTEN, J.R. 1980. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. *Journal of Dairy Science* 63:1437.

- MILLER, E. L. 1982. Methods of assessing proteins for ruminants, including laboratory methods. *In Protein Contribution of Feedstuffs for Ruminants: Application to Feed Formulation*. Ed. by E. L. Miller, I. H. Pike, A. J. H. Van Es. Londres, Butterworth. p. 18.
- MORRIS, E. J. 1984. Degradation of the intact plant cell wall of subtropical and tropical herbage by rumen bacteria. *In Herbivore Nutrition in the Subtropics and Tropics*. Ed. by F.M.C. Gilchrist, R.I. Mackie. Craighall, South Africa, Science Press. p. 378.
- MURPHY, M. R.; BALDWIN, R.L.; ULYATT, M.J. 1986. An update of a dynamic model of ruminant digestion. *Journal of Animal Science* 62:1412.
- NOCEK, J. E.; ENGLISH, J.E. 1986. *In situ* degradation kinetics: evaluation of rate determination procedure. *Journal of Dairy Science* 69:77.
- NRC. 1985. Ruminant Nitrogen Usage. National Research Council (U.S.A.), National Academy of Sciences, Washington, D. C. 138 p.
- ORSKOV, E.R.; McDONALD, E. I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 92:499.
- \_\_\_\_\_.; DeB HOVELL, F.D.; MOULD, F. 1980. Uso de la técnica de la bolsa de nylon para la evaluación de los alimentos. *Producción Animal Tropical* 5:213.
- PEZO, D.; VOHNOUT, K. 1977. Tasas de digestión *in vitro* en seis gramíneas tropicales. *Turrialba* 27:47.
- \_\_\_\_\_.; 1987. Nutritional diversity of maritime accessions of the Virgata Section of *Panicum*. Ph.D. Thesis, Raleigh, EE.UU., North Carolina State University. 203 p.
- PLAYNE, M. J.; KHUMNUALTHONG, W.; ECHEVERRIA, M. C. 1978. Factors affecting the digestion of esophaegal fistula samples and hay samples in nylon bags in the rumen of cattle. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 90:193.
- PRESTON, T. R. 1986. Better utilization of crop residues and by-products in animal feeding: research guidelines. 2. A practical manual for research workers. FAO, Animal Production and Health Paper N°. 50/2. FAO, Roma. 154 p.
- SAN MARTIN, F. A. 1980. Evaluación de una técnica de digestión *in situ* en la determinación de la digestibilidad de la materia seca y de pared celular. Informe Problema Especial. Turrialba, C.R., Programa Universidad de Costa Rica/CATIE. 23 p.

- SAS. 1985. SAS User's Guide: Statistics. 5 Ed. Statistical Analysis System Institute, Inc., Cary, North Carolina. 921 p.
- SMITH, L. W.; GOERING, H. K.; WALDO, D. R.; GORDON, D. H. 1971. *In vitro* digestion rates of forage cell wall components. *Journal of Dairy Science* 54:71.
- VAN SOEST, P. J. 1982. Nutritional Ecology of the Ruminant. 1 Ed. Corvallis, Oregon, O & B Books. 374 p.
- VARGA, G. A.; HOOVER, W. H. 1983. Rate and extent of neutral detergent fiber degradation of feedstuffs *in situ*. *Journal of Dairy Science* 66:2109.
- WALDO; D. R. SMITH, L. W.; COX, E. L. 1972. Model of cellulose disappearance from the rumen. *Journal of Dairy Science* 55:125.
- WILKINS, R. J. 1969. The potential digestibility of cellulose in forage and feces. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 73:57.
- \_\_\_\_\_.; MINSON, D. J. 1970. The effects of grinding, supplementation and incubation period on cellulose digestibility *in vitro* and its relationship with cellulose and organic matter digestibility *in vivo*. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 74:445.



# RECOMENDACIONES SOBRE LA UTILIZACION DE LOS METODOS *IN VITRO*, *IN SITU* Y ENZIMATICO EN EL ESTUDIO DE LA DIGESTION DE ALIMENTOS

*Diego González<sup>1</sup>, Manuel E. Ruiz, Francisco Romero, Danilo Pezo*

## **1. Digestion *in vitro***

### **a. Donante de licor ruminal**

(1) **Dieta.** Idealmente debe haber coincidencia entre el alimento que consume el animal donante y el (los) alimento (s) a evaluar. Sin embargo, en la evaluación *in vitro* se distinguen dos objetivos generales: 1) la evaluación masiva de germoplasma (selección primaria) y 2) la generación de información puntual para el desarrollo de modelos de digestión, con miras a la predicción del consumo voluntario. En el primer caso no es factible que los donantes estén adaptados a los alimentos a evaluar y, además, el propósito es clasificar los distintos germoplasmas. En este caso, se recomienda proveer a los animales

una dieta de calidad intermedia (con respecto al germoplasma en evaluación) que asegure una adecuada actividad celulolítica. En el segundo caso, la coincidencia alimentaria es primordial. En ambos casos, los animales donantes deben recibir una alimentación adecuada en cuanto al suministro de nitrógeno y minerales.

(2) **Adaptación dietética.** Para análisis rutinarios, el aspecto de adaptación dietética no es de preocupación, siempre y cuando se mantenga la condición de que los donantes reciban una dieta intermedia, y que estén adecuadamente provistos de nitrógeno y minerales. Es decir, las fluctuaciones en calidad y disponibilidad de alimento deben corregirse a lo largo del año.

---

<sup>1</sup> Coordinador del grupo de trabajo.

Para el análisis específico de alimentos seleccionados, la adaptación de los animales debe tomar por lo menos 14 días, dependiendo del grado de cambio con respecto a la dieta previa. Cuando se trate de evaluar alimentos no tradicionales, el período de adaptación puede ser mayor, siendo el criterio para declarar al donante adaptado, la estabilidad en el consumo voluntario. Durante el período de adaptación no debe usarse el licor ruminal.

### **(3) Frecuencia de alimentación.**

Este aspecto sólo aplica a condiciones en que el donante se mantiene en corral. Según evidencias, una frecuencia de alimentación de dos veces por día es semejante a frecuencias mayores, en cuanto a la tasa de recambio ruminal y la tasa de digestión (Ruiz Paz y Thiago, 1988). En todo caso, la interrogante sobre la frecuencia de alimentación queda reducida en gran medida si se aseguran condiciones ad libitum. Cualquier frecuencia que se use, debe ser mantenida durante todo el período experimental.

Otro aspecto de relevancia es el momento en que se debe obtener el licor ruminal. En situaciones en que se alimente dos o tres veces por día, se recomienda que esto se efectúe en un momento intermedio entre una y otra alimentación. Si la frecuencia de alimentación es de una vez por día, es preferible hacer la extracción del licor inmediatamente antes de efectuar la alimentación.

**(4) Edad.** El criterio fundamental es que el animal tenga una actividad ruminal plena. Se recomienda fistular los animales después del estrés del destete (en el caso de ovejas, una vez que hayan alcanzado un tamaño apropiado para la fístula), y no usarlos como donantes después que hayan alcanzado la madurez. En el caso de bovinos esto implica que los animales deben estar entre uno y cinco años de edad (Ruiz Paz y Thiago, 1988), mientras que en los ovinos el intervalo sería de uno a cuatro años.

### **b. Variación entre especies e individuos**

Existen diferencias entre especies en cuanto a tasas de digestión y de recambio y, asociado a esto, diferencias en población microbiana en las pruebas de digestibilidad *in vitro*. Estas diferencias tienden a desaparecer debido al uso de soluciones "buffer" y nutritivas, además de que la tasa de recambio no puede ser medida en estas pruebas.

La variación entre individuos se contrarresta teniendo el cuidado de que el licor ruminal sea una muestra compuesta de por lo menos dos donantes.

### **c. Manejo del licor ruminal**

**(1) Método de extracción.** La extracción del licor puede hacerse a mano o por bombeo, sin que ello altere los resultados. En el caso que se desee aumentar la actividad celulolítica del

inóculo, se debe obtener contenido ruminal (licor + material sólido) para separar los microorganismos celulolíticos adheridos a la fibra, según se explica más adelante. En cualquier caso, el licor debe tomarse de los diferentes compartimientos del rumen, en forma aleatoria, pero asegurando que una parte se obtenga de la región ventral anterior.

**(2) Manejo del licor.** El tiempo transcurrido desde la extracción hasta la preparación final del inóculo debe ser el mínimo necesario. Se recomienda que los animales se mantengan cerca del laboratorio a fin de que el tiempo transcurrido entre la extracción y la inoculación no sea superior a los 15 minutos.

Dos prácticas que disminuyen el riesgo de reducción de la actividad fermentativa del inóculo son mantener el frasco de colección a una temperatura de alrededor de 40°C, y llenar a capacidad el frasco, evitando así la oxigenación del material. El material obtenido debe ser filtrado en por lo menos cuatro capas de gasa, para evitar el paso de partículas.

#### **d. Preparación de la muestra a ser digerida**

**(1) Tamaño de partícula.** A medida que el tamaño de partícula se reduce la estimación de la digestibilidad aumenta. Sin embargo, a tiempos prolongados de incubación, los valores de digestibilidad acumulada tienden a asemejarse. Como

ejemplo, a 96 h la diferencia en digestibilidad acumulada entre partículas de 0.4 y 1.96 mm es de 2.4 unidades porcentuales, pero a 48 h la diferencia es de 4.7 unidades. Se recomienda que el tamaño de partícula se estandarice a 1 mm.

**(2) Cantidad de muestra.** Si se reduce la cantidad de muestra, manteniendo constante el volumen de inóculo, se incrementa la estimación de digestibilidad y la variabilidad entre duplicados. A fin de compensar parcialmente posibles errores de manejo del método, y previendo que el investigador podría incluir análisis posteriores en el residuo, se recomienda que para un volumen de 50 ml de inóculo se use 0.5 g de muestra. En el caso particular de tener que analizar un gran número de muestras, y en función de la economía de reactivos, se puede reducir a 0.25 g de muestra y 25 ml de inóculo.

#### **e. Observaciones sobre el método**

**(1) Relación licor/"buffer".** Manteniendo la incubación a 48 h, una relación de 10 ml de "buffer" por 40 ml de licor ruminal es suficiente para producir resultados que difieren poco (aproximadamente dos unidades) de la digestibilidad *in vivo*, así como del valor de digestibilidad potencial.

**(2) Solución "buffer".** Existe una gran proliferación de soluciones "buffer". Un punto en que hay acuerdo es que éstas deben mantener un rango

de pH óptimo de 6.7 a 7.0, recomendándose 6.9 para la digestión de materiales celulósicos y 6.8 para materiales ricos en almidón. El "buffer" a usar debe proveer una fuente constante de nitrógeno. La importancia de esto es mayor cuando se analizan materiales pobres en proteína. Sin embargo, también es necesario añadir una fuente de azúcares reductores para evitar tiempos de latencia excesivamente largos. Si no se añade azúcar, la adición de nitrógeno no ejercerá ningún efecto sobre la digestión. Se recomienda usar la solución "buffer" de McDougall, por ser la más frecuentemente usada. A ésta se recomienda añadir sulfato de amonio y glucosa, quedando la composición (cantidades por litro, peso/volumen) como sigue:

9.80 g  $\text{NaHCO}_3$   
 7.00 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (3.71 g  
 anhidro) 0.57 g  $\text{KCl}$   
 0.47 g  $\text{NaCl}$   
 0.12 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
 0.17 g  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$   
 0.50 g glucosa

Según el procedimiento de McDougall, hay que preparar también una solución al 4% (peso/volumen) de cloruro de calcio. Antes de usar el "buffer" se añade 1 ml de dicha solución por litro de "buffer", gaseándose luego con  $\text{CO}_2$  durante una hora.

**(3) Tipo de tubo.** De preferencia deben usarse tubos de vidrio de 100 ml. En caso de usar tubos de plástico, es preferible que éstos sean de polietileno que de policarbonato, pues con

los primeros se obtienen mejores resultados (Moore y Mott, 1975). También se pueden usar frascos Erlemmeyer de 125 ml, con el inconveniente de ocupar más espacio en la incubadora, aunque tienen la ventaja de producir valores de digestibilidad más altos (2-4 unidades porcentuales), por la mayor superficie de contacto que se obtiene entre substrato e inóculo. En forrajes de baja digestibilidad, las diferencias entre tubo y frasco Erlemmeyer son mayores. En substratos de alta digestibilidad, la diferencia es nula.

**(4) Gaseado.** El usar gaseo continuo o gaseo único es una decisión que depende de tres factores: 1) Número de muestras a procesar, 2) Facilidades con que se cuenta en el laboratorio y, 3) Preferencia o comodidad del investigador. Por ejemplo, sería impráctico y engorroso el usar gaseo continuo cuando se tienen que procesar un gran número de muestras, como sería el caso de la evaluación primaria de germoplasma.

**(5) Frecuencia de agitación.** Se recomienda la práctica de agitar suavemente el contenido de los tubos una hora después de iniciada la incubación, hasta que se vea que las partículas estén humedecidas, seguida por dos agitaciones adicionales en el primer día. En el segundo día se deben agitar tres veces.

**(6) Réplicas.** Como norma general, cada determinación debe hacerse en duplicado. Sin embargo, en la práctica, y por las limitaciones de

laboratorio, tiempo y recursos, se recomienda que si el muestreo de campo ya tiene réplicas, éstas no se junten en muestras compuestas, para poder hacer determinaciones sin duplicado. Para fines de ilustración se citan las siguientes situaciones:

- Un experimento de pastoreo en que se obtienen muestras compuestas de cada tratamiento a diferentes épocas: El análisis de digestibilidad debe hacerse en duplicado dentro de cada época para cada muestra.
- Un experimento de pastoreo en que se obtienen varias muestras de cada potrero en cada época: Se hace un análisis de digestibilidad, sin réplica, de cada muestra.
- Un experimento de corral, donde de un comedero comunitario se obtiene una muestra del alimento rechazado: Se hace la determinación de digestibilidad *in vitro* en duplicado.

**(7) Estándares.** Es necesario tener un estandar interno, pudiendo el material usado para ese propósito provenir de un forraje cuya digestibilidad *in vivo* es conocida. Se recomienda que el estándar interno represente dos o tres diferentes niveles de digestibilidad *in vitro* (alto, mediano y bajo).

**(8) Duración de las fases celulolítica y enzimática.** Se recomienda mantener la fase celulolítica en 48 h. En el caso de la fase enzimática,

estudios de CIAT y del Comité NC-64 (USDA) indican que la fase enzimática debe limitarse a 24 h. En el caso de forrajes muy fibrosos y de bajo contenido proteico, la fase enzimática puede eliminarse.

**(9) Filtrado.** Con el fin de mantener homogeneidad entre laboratorios, se recomienda el uso de un papel de filtrado rápido (Whatman 54). En el caso de determinaciones en MO, se deberá usar un papel filtro con bajo contenido de cenizas (Whatman 541).

**(10) Tratamientos especiales.** En el caso de alimentos que presenten problemas de filtrado, como aquellos con alto contenido de grasa, se recomienda la utilización de "surfactantes" (Solka Floc, Hyflo Supercel).

**(11) Parámetros a medir.** Los siguientes son los parámetros de mayor significado nutricional:

- Valor D, definido como la cantidad de MO digerible expresada como porcentaje de la MS.
- Digestibilidad de la MO (DMO).
- Digestibilidad de la MS (DMS).
- Digestibilidad de los componentes de la pared celular.

Si el objetivo es determinar el valor energético del alimento, es preferible calcular el valor D. En el caso de analizar los componentes de la pared celular, se puede efectuar el análisis de los componentes en el

residuo. En muestras contaminadas con tierra, es preferible calcular la DMO. La mayor utilidad de la DMS es en trabajos de evaluación primaria de germoplasma, por su facilidad y rapidez.

Todos los métodos de digestibilidad *in vitro* resultan en una estimación de la digestibilidad aparente. Sólo en el caso en que la fase de digestión con pepsina sea seguida por un análisis de NDF en el residuo, se puede estimar la digestibilidad verdadera.

## 2. Degradación enzimática

Si bien los métodos de degradación enzimática son aplicables en la evaluación primaria de germoplasmas, en la selección inicial de recursos alimenticios y para la predicción del valor energético, no lo son así para otros objetivos. Aún en el caso en que estos métodos son aplicables, contienen limitaciones relacionadas principalmente con el costo y disponibilidad de enzimas, y el requerimiento de especificidad de las mismas con respecto al substrato.

Experiencias en la utilización de celulasas para estimar la digestibilidad del componente fibroso de concentrados, forrajes verdes de clima templado y ensilajes, indican que este método es tan efectivo y, en ciertos casos, hasta superior al método de digestibilidad *in vitro*. En los casos en que se ha concluido esto se demuestra

mayor precisión, repetibilidad y menor tiempo de digestión. Para forrajes tropicales, aparentemente no hay evidencia de que la efectividad del método enzimático sea menor que la del método de digestibilidad *in vitro*. Sin embargo, esta es un área que requiere mayor investigación, recomendándose la realización de estudios comparativos entre estos métodos y los *in vitro*, la estandarización de procedimientos y la definición de condiciones mínimas necesarias para la aplicación de estos métodos a nivel de análisis rutinarios.

## 3. Digestibilidad *in situ*

### a. Características de las bolsas

(1) **Material.** Las bolsas que se utilicen deben ser preferentemente de dacrón (poliester), debido a que esta tela está hecha de fibras soldadas y no tejidas. Esto evita los problemas que se presentan cuando se trabaja con nylon, el cual tiende a estirarse con el uso repetido de las bolsas, variando el tamaño original de los poros. Al fabricar las bolsas, se deben coser con hilo de poliester (no algodón), evitando dejar ángulos rectos en la base de las bolsas. Las costuras deberán sellarse con un pegamento resistente al agua, de preferencia uno de los utilizados para pegar vinil.

(2) **Tamaño de los poros.** La tela de dacrón a ser usada deberá tener un tamaño de poro que varíe entre 30

y 50  $\mu\text{m}$ . Dado que el grosor de las fibras puede variar, también es importante considerar la densidad de poros, la cual puede variar entre 1600 y 2000 poros/ $\text{cm}^2$ .

**(3) Tamaño de la bolsa.** Se han utilizado diferentes tamaños de bolsa; sin embargo, si se consideran las cantidades de muestra frecuentemente empleadas y la relación superficie de bolsa/peso de muestra, se concluye que el tamaño de bolsa recomendable es de 17 x 9 cm.

#### **b. Características de la muestra**

**(1) Tamaño de partícula.** El tamaño de partícula recomendado para muestras a ser digeridas *in situ* varía en función de la naturaleza del material evaluado. En el caso de pajas, henos muestras secas de forraje y granos se recomienda moler la muestra usando un tamiz de 2 a 3 mm. En forrajes frescos y ensilajes el tamaño de partícula deberá ser de 5 mm. Es preferible no moler los suplementos proteicos y los concentrados comerciales, a menos que estén en forma de "pellets", caso en que deberán ser molidos ligeramente con un mortero.

**(2) Cantidad de muestra y su relación al tamaño de la bolsa.** A menudo la cantidad de muestra que se utiliza en estos estudios es de 5 g; sin embargo, la cantidad a ser incubada variará de acuerdo con los análisis que se deseen hacer en el residuo. Para la estimación de la superficie de la bolsa, se debe considerar el área de

ambas caras. Con base en esto, la relación cantidad de muestra/tamaño de la bolsa recomendada es de 10-15  $\text{mg}/\text{cm}^2$ .

#### **c. Características del animal fistulado**

Las técnicas *in situ* pueden trabajarse ya sea con ovinos o bovinos, debiendo considerarse que en los primeros el número de bolsas a introducir en una corrida es de 6 a 9, mientras que en bovinos pueden introducirse de 24 a 36 bolsas por corrida. Con respecto a la edad del animal fistulado y su dieta, aplica lo descrito para el animal donante en la sección de digestión *in vitro*. El único caso en que la dieta varía es cuando se estudian interacciones entre alimentos (efecto de la dieta sobre la degradación de diferentes alimentos).

#### **d. Localización de las bolsas dentro del rumen**

**(1) Posición de las bolsas.** Las bolsas deberán colocarse preferentemente en la región ventral del rumen, dejándoles cierta libertad de movimiento, a fin de que estén expuestas a las diferentes condiciones del rumen.

**(2) Método de sujeción.** Para sostener las bolsas dentro del rumen, éstas deben amarrarse a cadenas, tubos o anillos plásticos con peso. Cualquiera que sea el método de sujeción, es importante que la distancia

entre la cánula y las primeras bolsas sea de 20 a 25 cm en ovejas, y de 40 a 50 cm en bovinos.

#### **e. Repeticiones**

La variabilidad de las determinaciones es mayor entre animales, seguido por períodos y menor entre bolsas incubadas en el mismo animal. Por ello, se recomienda que las determinaciones se hagan en tres animales y dos períodos por animal, con una sola bolsa por cada muestra. Si el propósito es determinar la tasa de degradación, se puede considerar una sola bolsa por cada tiempo dentro de período y animal, con duplicados para los tiempos más cortos de incubación.

#### **f. Tiempos de incubación**

En el caso de estudios en los que se pretende estimar las tasas de degradación, se recomienda introducir las bolsas en forma secuencial y extraerlas todas del rumen simultáneamente, a fin de tener un lavado uniforme de las mismas.

Los tiempos de incubación recomendados como mínimo, en el caso de suplementos proteicos, son: 2, 4, 6, 12, 24 y 36 h; en forrajes de alta calidad y leguminosas : 2, 4, 6, 12, 24 y 48 h; y en gramíneas tropicales y residuos fibrosos: 2, 6, 12, 24, 48 y 72 h. Los tiempos intermedios podrían variarse en función del punto de inflexión detectado en estudios piloto.

### **4. Modelos matemáticos**

En teoría, todos los componentes nutritivos del alimento requieren de un período antes de que se inicie la fermentación microbiana, denominado período de latencia. En el caso de los componentes de la pared celular, este período de latencia es el necesario para que los microorganismos entren en contacto físico con el substrato. En el caso de la fermentación de la MS, MO y PC, la degradación aparente es detectable desde un principio y difícilmente se observa un período de latencia, dado que existen enzimas proteolíticas y amilolíticas en el fluido ruminal.

Si bien existen modelos que permiten estimar el período de latencia, la experiencia indica que este parámetro es altamente variable y poco reproducible. A falta de mejores técnicas de análisis y modelos, se recomienda basar la evaluación de la cinética de digestión en los parámetros de tasa de digestión y digestibilidad potencial. En la práctica se utiliza el tiempo de digestión media, el cual se ha definido de distintas formas. Una de ellas es el tiempo requerido para alcanzar una digestibilidad equivalente al 50%, lo que tiene poca aplicación con materiales cuya digestión es menor al 50%. Otra forma ha sido el tiempo requerido para alcanzar una digestibilidad igual al 50% de la digestibilidad potencial. Esta definición tampoco es satisfactoria pues no considera la fracción soluble del alimento. Una definición de mayor sentido nutricional es el tiempo re-



querido para que se digiera la mitad de la fracción digerible por acción microbiana. En este caso, la fórmula para calcular este valor depende del modelo matemático descriptivo de la cinética ruminal y siempre se expresa en función de los otros parámetros: digestibilidad potencial, tasa de digestión y valor de digestión a tiempo = 0 (en casos en que no hay período de latencia) o el valor de digestión al final del período de latencia (en casos en que éste exista).

La selección del modelo a aplicar en estudios de digestión *in vitro* o *in situ* depende de dos factores principales: 1) Coherencia del modelo con eventos biológicos y 2) Facilidades de computación. Obviamente, un criterio adicional en la selección del modelo es el grado de ajuste de éste a las observaciones; sin embargo, este criterio no debe primar sobre el criterio de que el modelo tenga sentido biológico.

Si existen facilidades de computación que permitan procesos iterativos para llegar a definir los parámetros, se recomienda utilizar modelos no lineales, que permiten escoger expresiones con sentido biológico y consideran que la digestión del alimento en el rumen no procede en forma lineal. Por otro lado, el uso de modelos no lineales requiere de cierto conocimiento matemático; además, estos modelos no diferencian las tasas de digestión de las fracciones muy fácilmente degradables de las lentamente degradables (a menos que se usen modelos no lineales de dos compartimientos). En la actualidad hay pro-

gramas para microcomputadoras que permiten la generación de ecuaciones no lineales por métodos iterativos (SAS, SYSTAT y otros).

En caso de no existir facilidades computacionales, queda la alternativa de emplear funciones linearizables o aplicar la técnica de "resolución gráfica" descrita por Shipley y Clark (1972), que es un método visual de aproximación y, por lo tanto, sujeto a errores de apreciación subjetiva. El método de linearización fue concebido por Smith *et al.* (1971), asumiendo una cinética de digestión de primer orden y una tasa constante de degradación. Este método fue corregido para reconocer que existe, en la digestión de la fibra una fracción de digestión rápida y otra de digestión lenta. En la práctica, la estimación de esta última fracción ha presentado problemas por el comportamiento un tanto errático de los datos.

#### **a. Análisis de datos: un ejemplo**

Consecuente con la recomendación de usar modelos no lineales para describir el proceso de fermentación microbiana, se ofrece a continuación una serie de considerandos e ilustraciones de su aplicación.

(1) **El modelo no lineal.** Tal y como indica Pezo (ver su contribución en esta publicación), existe una variedad de modelos exponenciales. Por su simplicidad y significado biológico, se prefiere usar el modelo de Orskov y McDonald (1981), que se expresa así:

$$Y = a + b(1 - e^{-kt}) \quad [1]$$

donde:

Y = Digestibilidad acumulativa del componente nutritivo, %.

a = Intercepto a  $t = 0$ , o el valor de digestibilidad al final del período de latencia.

a+b = Digestibilidad potencial del componente nutritivo.

k = Tasa de digestión por acción fermentativa.

### (2) Expresión de resultados.

Los resultados de la incubación de alimentos *in vitro* e *in situ* generalmente se expresan en términos de porcentaje de digestibilidad acumulativa con respecto al material inicial.

**(3) Análisis inicial.** El primer paso en el análisis de los datos consiste en graficar la digestibilidad acumulativa (Y) vs. tiempos de incubación (X). Así por ejemplo, la representación gráfica de la degradación ruminal de alfalfa deshidratada (Cuadro 1) se presenta en la Figura 1.

Este ejercicio no sólo ayuda a detectar valores fuera de la tendencia general de los datos ("outliers"), sino que también ayuda a decidir sobre el modelo matemático a utilizar.

**(4) Cómo calcular los parámetros.** El ejemplo escogido muestra un período aparente de latencia de 2 h (Fig. 1). Si el modelo matemático

**Cuadro 1. Degradación *in situ* en ovejas de alfalfa deshidratada.**

Tiempo de incubación, h	Degradación acumulativa de la MS, %			
	Oveja 1	Oveja 2	Oveja 3	Promedio
0	35.1	32.8	33.8	33.9
1	34.6	31.8	32.9	33.1
2	33.8	33.0	36.7	34.5
3	36.9	38.7	38.1	37.9
4	42.8	44.5	44.1	43.8
6	51.3	51.8	53.2	52.1
9	55.8	55.2	57.0	56.0
12	61.4	61.0	63.0	61.8
18	69.4	70.1	69.0	69.5
24	71.1	71.1	72.0	71.4
36	73.6	74.1	74.0	73.9
48	73.3	73.9	74.2	73.8

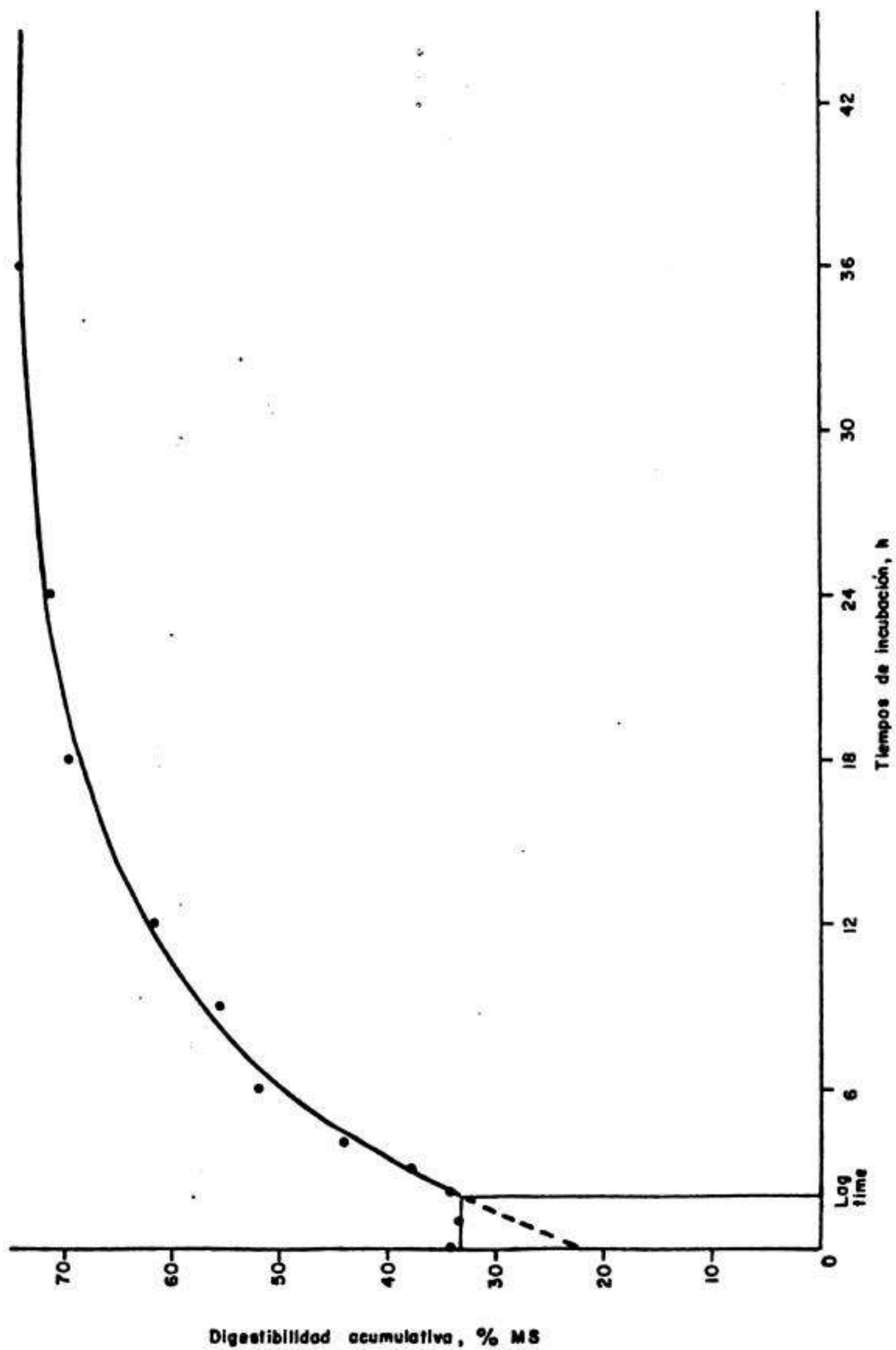


Fig. 1 Representación gráfica (manual) de la digestibilidad acumulativa de alfalfa deshidratada

escogido es uno que no estima la duración del período de latencia, el modelo aplicará únicamente a valores de "t" 2. En el ejemplo, cuando "t" = 2, Y es aproximadamente 25.0; es decir, "a" (el intercepto) = 25.0.

La digestibilidad potencial se estima proyectando el valor de digestibilidad acumulativa sobre el eje de las "X", hasta alcanzar un valor asintótico, que en el ejemplo sería de 74. Es decir, "(a+b)" = 74. El valor de "b" se calcula por diferencia, restando de "(a+b)" el valor de "a", o sea, 74.0 - 25.0 = 49.0.

Para estimar el valor "k", se escoge un valor cualquiera de "Y" digamos 55, y se estima a que "t" corresponde este valor. En el ejemplo de la Figura 1, el "t" correspondiente es 8. El despeje de "k" en la función [1] se hace de la siguiente forma:

$$1 - e^{-kt} = (Y - a)/b \quad [2]$$

$$-e^{-kt} = ((Y - a)/b) - 1 \quad [3]$$

$$e^{-kt} = 1 - ((Y - a)/b) \quad [4]$$

$$e^{-kt} = 1 + ((a - Y)/b) \quad [5]$$

$$-kt = \ln[1 + ((a - Y)/b)] \quad [6]$$

$$k = -\ln[1 + ((a - Y)/b)]/t \quad [7]$$

Sustituyendo en [7] los valores encontrados y para Y = 55,

$$k = -\ln[1 + ((25.0 - 55.0)/49)]/8$$

$$k = 0.94738/8$$

$$k = 0.118$$

Entonces, los valores del Cuadro 1 y los valores estimados de "a", "b" y "k" se someten a un proceso de iteración, para definir los verdaderos valores de la función [1]. En el ejemplo el resultado es:

$$Y = 22.5 + 52.0 (1 - e^{-0.121t})$$

Si se desea calcular el parámetro tiempo de digestión media ( $t_{1/2}$ ) con el modelo [1], la fórmula es:

$$t_{1/2} = (-\ln 0.5)/k \quad [8]$$

Sustituyendo,

$$t_{1/2} = (-\ln 0.5)/0.121$$

$$t_{1/2} = 5.7 \text{ h.}$$

Se recuerda que la fórmula para el cálculo de  $t_{1/2}$  es dependiente del modelo matemático usado.

Para calcular el tiempo de latencia en la digestión de MS, MO o PC de acuerdo a [1], se requiere determinar la fracción soluble de dichos componentes. La fracción soluble de la pared celular (FND) se puede considerar que tiene un valor de cero. En el caso de querer determinar la fracción soluble cuando se utiliza la técnica *in vitro*, esto se puede hacer añadiendo a la muestra el inóculo (licor ruminal + solución "buffer") e inactivando inmediatamente las bacterias con cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ). Luego se filtra y se determina el peso del residuo siguiendo los mismos

pasos del proceso de digestibilidad *in vitro*. La diferencia entre el peso inicial de la muestra y el peso del residuo representa la fracción soluble. También se puede determinar la fracción soluble introduciendo las muestras en bolsas de dacrón y lavándolas tal y como se hace con bolsas incubadas en el rumen.

Con base en el valor de la fracción soluble (a') y los parámetros de la ecuación no lineal [1] (a, b y k) se puede calcular el tiempo de latencia ( $t_0$ ) según la siguiente fórmula (Orskov y McDonald, 1981):

$$t_0 = 1/k \ln[b/(a+b-a')]$$

### 5. Referencias

- MOORE, J.E.; MOTT, G.O. 1975. Fermentation tubes for *in vitro* digestion of forages. *Journal of Dairy Science* 59:167.
- ORSKOV, E.R.; McDONALD, I. 1981. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 92:499.
- RUIZ PAZ, M.E.; THIAGO, L.R.R. DE S. 1988. Methodological aspects in ruminal digestion studies. 1. Effect of feeding frequency. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 23:797.
- SHIPLEY, R.A.; CLARK, R.E. 1972. Tracer methods for *in vivo* kinetics: Theory and applications. New York, EE.UU., Academic Press. 347 p.
- SMITH, L.W.; GOERING, H.K.; WALDO, D.R.; GORDON, D.H. 1971. *In vitro* digestion rates of forage cell wall components. *Journal of Dairy Science* 54:71.

## DISCUSION DE LAS RECOMENDACIONES DEL GRUPO DE TRABAJO No.2

*Moderador: Dr. Claudio Wernli*

### **G. PICHARD**

Me produce inquietud la recomendación de dejar suelta la bolsa dentro del rumen. Más bien tenía entendido que es conveniente mantenerlas en el saco ventral, precisamente evitando que queden sobre el forraje grueso en la parte superficial. Quisiera conocer la posición del grupo al respecto.

### **D. GONZALEZ**

La recomendación va en el sentido que puedan circular aún con un peso. Lo que no queremos es que sea un peso tan excesivo que cause que las bolsas no tengan movimiento.

### **G. PICHARD**

Creo que existen otras metodologías de digestibilidad *in vitro* que vale la pena señalar. Algunos laboratorios en Europa usan la bolsa de nylon que incuban *in vitro*, lo que les permite procesar gran cantidad de muestras en cada corrida. Después entran to-

das a la lavadora y se miden los residuos. Igualmente convendría citar otros métodos como el de Alexander y el de Goering y Van Soest, cuya aplicabilidad es considerable, y han servido de base para la adaptación de numerosos sistemas.

### **C. LASCANO**

En relación al método *in vitro*, no veo que recomienden el uso de blancos. ¿Creen que no es necesario?

### **D. PEZO**

La cuestión de blancos no ha sido presentada, pero consideramos que es básico tener blancos en el caso del *in vitro*, para tener una estimación de la contribución de lo que viene con el licor ruminal. En el caso de *in situ* hay algunos puntos interesantes que revisamos. Hay dos correcciones que con frecuencia se han venido haciendo: la corrección del material que escapa de la bolsa y la de cuánto ingresa a la bolsa. Cuando revisamos

cuánto varían los estimados al hacer la doble corrección, encontramos que estas variaciones son mínimas, cuando se trabaja con materiales molidos a 2 ó 3 mm, pero pueden ser importantes en muestras de forraje con tamaños de partícula menores a 2 mm o en el caso de alimentos concentrados.

### C. LASCANO

En relación con la digestibilidad *in vitro* se mencionó que era recomendable tener estándares, no necesariamente de digestibilidad *in vivo* conocida. ¿Qué función cumplen estos estándares? ¿Se van a usar como factor de corrección? ¿Se van a usar para hacer estandarizaciones entre corridas?

### M.E. RUIZ

Principalmente para hacer un chequeo de las corridas. Es decir, si entre corridas hay diferencias notables con respecto al estándar interno usado, es obvio que algo tiene que ser corregido y, posiblemente en algunos casos podría ser necesario repetir todas las corridas. Los estándares en la digestibilidad *in vitro* no tendrían otro propósito que el control de las corridas.

### C. LASCANO

En el caso de tener un estándar de digestibilidad *in vivo* conocida, ¿se podría usar para corregir la digestibilidad *in vitro* y ponerla en términos de *in vivo*?

### M.E. RUIZ

Lo que concluimos fue que la corrección de la información obtenida en digestibilidad *in vitro*, para estimar la digestibilidad del alimento *in vivo*, solamente se podría hacer en condiciones en que el alimento ofrecido y consumido por el animal sean iguales, o muy semejantes, condición que se logra por ejemplo al peletizar. Ahora, esa condición en situaciones prácticas (especialmente en nuestros laboratorios) difícilmente se va a dar. Otro punto que podría añadirse es que si el objetivo es estimar digestibilidad verdadera entonces habría que proceder con una segunda fase de digestión con pepsina y ésta a, su vez, sería seguida por el análisis del residuo, principalmente el análisis de fibra.

### C. LASCANO

Hacia la pregunta sobre estándares porque es clave, en nuestro objetivo de tratar de estandarizar métodos y poder hacerlos comparables. Dentro de la Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales (RIEPT), hemos preparado estándares de digestibilidad *in vivo* conocida. Estos estándares se obtuvieron ofreciendo al animal una cantidad de alimento que consumiera totalmente, es decir, que no hubiese mayor cantidad de residuo. Lo que hacemos o pretendemos es distribuir estos estándares a una serie de laboratorios para que sean incluidas en sus corridas y podamos tener un punto de comparación. Yo sugeriría que pensáramos en recomendar que haya una distribución de estándares

dares entre los laboratorios con la finalidad de poder estandarizar los resultados.

#### D. PEZO

Existe la necesidad de poder disponer de un juego de muestras, obtenidas en condiciones como las que el Dr. Lascano ha descrito, que pudieran distribuirse en diferentes laboratorios para poder conseguir esa estandarización. Sin embargo, también podrían utilizarse muestras a las que no necesariamente se conoce su valor de digestibilidad *in vivo*, pero que a lo largo de su uso en varias corridas *in vitro* se les puede determinar su "valor de digestibilidad".

#### G. PICHARD

Quiero señalar la importancia que tiene, en el sistema de digestibilidad *in vitro* el usar estándares sensibles a lo que deseamos medir o estudiar. Un forraje muy digestible no sirve para estándar porque a las 24 ó 36 horas está totalmente digerido y en la asíntota de máxima digestibilidad. A las 48 horas, si la corrida ha funcionado mal y todo viene lento, el mayor tiempo compensa y ese estándar no sirve para mostrar esa deficiencia. Me parece que los estándares más sensibles son aquellos con una tasa lenta de digestión.

#### D. PEZO

No estamos planteando el uso de un solo estándar, sino un rango de estándares o, por lo menos, uno de alta

(del orden del 60%) y otro de baja (35% a 40%) digestibilidad.

#### F. OJEDA

La digestibilidad *in vitro* sirve para clasificar la calidad de los alimentos, pero para saber el valor nutritivo se necesita estimar también el consumo. Este indicador puede ser decisivo cuando se trata de un ecotipo de una misma especie, donde las digestibilidades de los nutrimentos no varían mucho, pero sí el consumo, por lo que considero importante que también se investigue el consumo. ¿Considera el grupo conveniente realizar predicciones de consumo con base en la digestibilidad *in vitro*?

#### D. PEZO

No pretendimos en ningún momento sugerir que cualquiera de estas técnicas, llámese *in vitro*, *in situ* o método enzimático, puede reemplazar la determinación directa del consumo, parámetro que nos va a dar la respuesta final. Sin embargo, sucede que cuando se evalúa una colección grande de germoplasma, con frecuencia no se tiene cantidad suficiente de material para evaluaciones de consumo. En una primera instancia el *in vitro* puede ayudar. Por otro lado, mediante el uso de los modelos de Mertens y Ellis y la modificación de Fisher, vemos la posibilidad de que combinando datos que incluyen distribución de tamaño de partícula, tasas de degradación de esas partículas, tasas de pasaje, etc., eventualmente se consiguiera una estimación de lo que sería el consumo real.



## C. LASCANO

Creo que cuando estamos manejando especies, o ecotipos dentro de especies, el *in vitro* es muy bueno. Por ejemplo, si se tiene una colección de *Panicum*, y se encuentran en ella algunas accesiones con digestibilidad consistentemente más alta que otras, es posible que esas tengan una repercusión en producción animal, pero tiene que validarse de todas maneras. Para mí la limitación del *in vitro* surge cuando queremos comparar especies diferentes. Ahí se incurre en problemas serios porque no necesariamente el que tiene menos digestibilidad es el menos consumido o viceversa.

Un segundo comentario se refiere al empleo de métodos de digestibilidad *in vitro* diferentes a los presentados por el grupo. Los alemanes han desarrollado un método mediante el cual lo que miden es la formación de gas. Aquí en Centroamérica, lo están usando en el Zamorano, Honduras. Creo y entiendo que esta alternativa metodológica tiene una serie de ventajas sobre el método convencional que hemos discutido.

## J. ZORRILLA

Según mi entender, una de las funciones de introducir una etapa enzimática en el proceso *in vitro* es la de imitar, lo más cercanamente posible, lo que ocurre en el sistema digestivo del rumiante. Quiero sugerir que, cuando el objetivo es puramente de estratificación de los materiales en

estudio, en base a su posible grado de digestión ruminal, se recomienda el obviar esa parte enzimática y usar únicamente la fermentación por 48 horas con líquido ruminal. Si la comparación a este nivel de digestión satisface el objetivo del estudio, la prueba sería más práctica, menos tardada y más económica.

## D. PEZO

No tengo una respuesta clara pero voy a especular. Creo que dependerá en buena medida, de cuán diferentes son los materiales a evaluar. Por ejemplo, si en una corrida hay materiales con alto contenido de proteína y otros con muy bajo tenor proteico, la eliminación de la fase enzimática podría castigar aquellas muestras con alto contenido proteico.

## C. WERNLI

Deseo preguntar al grupo acerca de la efectividad de la digestibilidad *in vitro* como método en la evaluación de la calidad de forrajes toscos. En general, mientras más baja es la digestibilidad del material analizado, mayor será la variabilidad entre duplicados y más difícil será alcanzar un resultado confiable. Me refiero a forrajes con muy baja digestibilidad (35 ó 40%), en los que se tiene mayor variabilidad entre duplicados, teniéndose que entrar a repetir el análisis muchas veces y finalmente conformarse con un promedio de 6 a 8 determinaciones.

## G. PICHARD

Me parece muy relevante la consulta del Dr. Wernli, no solamente en relación a la variabilidad que tienen las muestras, sino también en relación a los tiempos de fermentación que se da a los sistemas *in vitro*. En forrajes muy rápidamente fermentables o bien en forrajes toscos, las incubaciones por tiempos más breves o más prolongados que 48 horas deben ser consideradas.

## D. PEZO

Ese aspecto no lo documentó el grupo. Sin embargo, quisiera comentar que, incluso cuando se enriquece el medio, se encuentra esa alta variabilidad y esas grandes discrepancias en relación con valores *in vivo*, que imagino son los que ustedes están tomando como punto de referencia.

## C. WERNLI

No, en realidad no estaba considerando la posibilidad de enriquecer medio, sólo el problema de la alta variabilidad entre duplicados de este tipo de muestras.

## G. PICHARD

Quisiera comentar respecto al cultivo con la saliva McDougall, que se ha propuesto acá. Cuanto más tosco es el forraje, mayor es la variabilidad, y cuanto más rico el medio que se

prepara menor es esa variabilidad; por eso, soy partidario de hacer medios muy ricos aunque parezcan complicados.

La saliva McDougall no sólo no contiene nitrógeno sino que además contiene poco azufre. La adición de sulfatos de amonio corrige ambas deficiencias. Por otra parte, ese medio no tiene esqueletos ramificados de carbono y la única fuente para síntesis de aminoácidos, como valina, leucina e isoleucina, sería el licor ruminal, y la cantidad de éstos puede ser insuficiente. Tampoco contiene compuestos aromáticos que sirven para síntesis de otros aminoácidos. Trabajos antiguos de Hungate y Bryant, y de otros autores, han mostrado claras respuestas en tasas de síntesis microbiana cuando se enriquece el medio con todos estos elementos.

También es conveniente asegurar un buen estado de reducción del sistema *in vitro*, para lo cual se pueden usar varias alternativas. En el medio diseñado por Van Soest se incluye cisteína, ácido clorhídrico y sulfuro de sodio. Por lo que le entendí al Dr. Ruiz, él sugiere agregar también medio gramo de azúcar. Ese es el límite hasta el cual se puede llegar sin afectar negativamente la acidez con una excesiva producción de ácidos grasos volátiles.

Adicionalmente recomiendo el gaseo continuo porque se obtiene una anaerobiosis más perfecta. Eso es lo que más frecuentemente falla en los laboratorios; optar por el gaseo continuo es tomar un seguro.

Por último, creo que vale la pena considerar o hacer una anotación especial cuando se hace digestibilidad *in vitro* de sustratos ricos en almidón. Hay que ajustar las condiciones para asegurar el mantenimiento de un pH adecuado, ya sea reduciendo el tamaño de la muestra o reforzando el buffer, pero con cuidado de mantener niveles normales de concentración iónica en el medio.

### C. LASCANO

Nosotros hemos comparado la solución buffer normal (con macrominerales, etc.) con una solución que tiene una mayor capacidad reductora, con  $H_2S$  o cisteína, y con caseína. Cuando hacemos digestiones mayores de 48 horas (como cuando queremos hacer determinaciones de fibra neutral indigerible, donde dejamos el tubo en incubación por 6 días), no hemos encontrado mayor diferencia con el uso de estos medio enriquecidos, aún con

forrajes de muy baja calidad o de muy alta fibrosidad. Yo más bien sugeriría estudiar si realmente 48 horas es suficiente para forrajes menos digeribles.

### D. GONZALEZ

El hecho de que algunas materias primas puedan requerir más de 48 horas de fermentación fue considerado para la técnica *in situ*. Sin embargo, incluir materiales que requieran diferentes tiempos de fermentación en un sistema de digestibilidad *in vitro* complicaría su manejo y limitaría su uso con gran número de muestras.

Con respecto al gaseo, se discutieron bastante los pros y contras del gaseo continuo y el gaseo inicial. Al no hacer la recomendación de usar gaseo continuo, sólo consideramos aspectos prácticos, como la dificultad de manejar una complicada red de mangueras y el costo de los materiales (mangueras, uniones T y Y, etc.).

## CAPITULO III

### CONSUMO Y DIGESTION *IN VITRO*

#### GRUPO DE TRABAJO No. 3

Dr. Rolain Borel  
Dr. Carlos Chaves  
Dr. Carlos Lascano  
Dr. Roberto Quiroz  
Dr. José Zorrilla  
Dr. Claudio Wernli

# METODOLOGIA PARA MEDIR CONSUMO BAJO PASTOREO

*Carlos E. Lascano<sup>1</sup>*

## 1. Introducción

La cantidad y calidad nutritiva de un forraje son factores que interactúan y que influyen significativamente en la producción animal bajo condiciones de pastoreo. Si la cantidad de forraje disponible no es limitante y no se presentan problemas de cosecha del forraje por parte del animal, las ganancias de peso estarán determinadas por el consumo voluntario de materia seca digerible, sinónimo de calidad nutritiva (Elliot *et al.*, 1961).

Si se acepta que la calidad de un forraje en gran parte determina el nivel de producción animal, y que los componentes básicos de calidad son digestibilidad y consumo, entonces es conveniente tener alguna estimación

de estos parámetros en el proceso de evaluación de forrajes.

El obtener medidas indirectas de calidad de un forraje ha sido un gran reto para los nutricionistas. Mucho se ha avanzado en la estimación de la digestibilidad por métodos rápidos. Uno de estos métodos es el de digestibilidad *in vitro* que, de acuerdo a un gran número de trabajos, predice digestibilidad *in vivo* con alto grado de precisión (Clark y Mott, 1960; Tilley y Terry, 1963). Por otro lado, las variaciones en consumo de una serie de forrajes tropicales no se han podido explicar satisfactoriamente por diferencias en composición química (Van Soest, 1965), tasa de digestión *in vitro* (Minson, 1971), solubilidad de la materia seca (MS) en pepsina (Minson y Haydock, 1971) o digestibilidad de la MS (Milford y Minson, 1965). Otros

---

<sup>1</sup>Ph.D., Científico Principal, programa de Pastos Tropicales, CIAT, Cali, Colombia.

trabajos han mostrado una relación positiva, pero cuantitativamente variable, entre la digestibilidad del forraje y el consumo voluntario (Blaxter *et al.*, 1961; Conrad *et al.*, 1964). Estas inconsistencias han sido interpretadas por Ellis (1978) como una indicación de que la relación digestibilidad:consumo varía con atributos del forraje y del animal. Tanto Ellis (1978) como Minson (1982) han indicado que el consumo de forrajes tropicales está regulado por: a) Volumen del retículo-rumen, b) Espacio ocupado en ese volumen por partículas del forraje en proceso de degradación, y c) Tasa de reducción y remoción de esas partículas del tracto digestivo. Además, Minson (1982) y Weston (1982) han señalado que el consumo puede estar influenciado por deficiencias de minerales en el forraje y por la condición fisiológica del animal, respectivamente. A todo lo anterior, hay que agregar el efecto que tiene la estructura del pastizal sobre el consumo de un forraje, lo cual ha sido ampliamente discutido por Hodgson (1982).

Considerando que los factores que afectan el consumo en pastoreo son múltiples, no es de extrañar que su predicción por métodos simples de laboratorio sea inconsistente. Ante esta realidad, muchos investigadores han optado por medir el consumo de forrajes con animales estabulados, utilizando principalmente carneros (Minson, 1971; Zemmeling, 1980). Desafortunadamente, la extrapolación de estos resultados al bovino en pastoreo no es del todo posible, debido a diferencias en oportunidad de selec-

ción en condiciones de confinamiento *vs.* pastoreo y a diferencias en hábitos de selección entre carneros y bovinos (Hodgson, 1982). Un buen ejemplo de diferencias entre especies animales es el alto consumo de *D. ovalifolium* 350 por carneros en jaula y su bajo consumo por bovinos en pastoreo (CIAT, 1980). No quiere decir lo anterior que la evaluación de forrajes con carneros en jaula no tenga cabida en la investigación con forrajes, pues sería desconocer toda la evidencia que se ha podido obtener con esta técnica en relación a algunos factores que afectan el consumo en rumiantes (Minson, 1982).

Dada la importancia del consumo como medida de calidad de un forraje para bovinos en pastoreo y las dificultades asociadas con su predicción por métodos de laboratorio o con carneros estabulados, se plantea la necesidad de realizar mediciones de consumo directamente con animales en pastoreo. Estas mediciones servirían para cuantificar la variación en calidad de los forrajes, debidas a especies, época del año y manejo, que sean de tal magnitud que se reflejen en respuestas en producción animal. Se pretende en este trabajo revisar y discutir: 1) Técnicas indirectas usadas para la medición de consumo bajo pastoreo; 2) Variabilidad animal asociada con consumo, y 3) Aplicación de la metodología en ensayos de pastoreo.

## **2. Técnicas indirectas para medir consumo en pastoreo**

Existen en la literatura varios trabajos en donde se han discutido

métodos para medir consumo bajo pastoreo utilizando técnicas indirectas, y entre ellos se recomiendan los de Theurer (1970) y Córdova *et al.* (1978).

El método usual para estimar el consumo diario de forraje bajo pastoreo ha consistido en medir la producción diaria de heces y digestibilidad del forraje (Reid, 1952), usando la fórmula:

Consumo =

$$\frac{\text{Producción heces}}{(100 - \text{digestibilidad})} \times 100$$

En la mayoría de los estudios de consumo se ha estimado la producción de heces mediante la administración (2 veces/día) de marcadores como el óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) en cápsulas (Raymond y Minson, 1955), papel impregnado con óxido de cromo para minimizar la variación diurna en la excreción del marcador (Corbett *et al.*, 1960) o con iterbio (Yb) (Prigge *et al.*, 1981). Con este método es necesario dosificar el marcador durante un mínimo de 14 días, que incluyen 7 días de ajuste y 7 días de colección de heces. La relación entre la dosis diaria de marcador y su concentración en las heces (marcador dosificado por día/concentración promedio de marcador en heces) da un estimado de la producción fecal diaria.

Otra alternativa para estimar la producción de heces por métodos indirectos es la de utilizar partículas tratadas con un marcador externo

(por ejemplo Yb o fibra mordantada con cromo) dosificadas una sola vez al retículo-rumen (Teeter *et al.*, 1984; Uden *et al.*, 1980). La excreción del marcador en las heces *vs.* tiempo post dosis se ajusta a un modelo bi-exponencial con dependencia de tiempo (Matis, 1972), que permite estimar la concentración inicial del marcador en el tracto ( $C_i$ ), y la tasa de pasaje de los residuos no digeridos ( $K_p$ ) (Ellis *et al.*, 1979). La relación entre dosis del marcador ( $D$ ) y la concentración inicial del marcador ( $D/C_i$ ), da un estimado de la cantidad de residuos no digeridos en el tracto ( $V$ ) que, multiplicado por  $K_p$  ( $V \times K_p$ ), representa la excreción de heces por unidad de tiempo. Los estimados de producción de heces obtenidos con este método de una sola dosis han sido similares a los obtenidos con el de dosis continua del marcador (De Laney *et al.*, 1981), pero variables en comparación con colección total (Guzmán, 1983; Mader *et al.*, 1984). En general, la variabilidad en la estimación de la producción total de heces con marcadores externos depende del marcador empleado (Mader *et al.*, 1984), el método de administración del marcador (Guzmán, 1983; Mader *et al.*, 1984), la frecuencia de colección de heces (Prigge *et al.*, 1981) y el método de colección de heces (Wanjoike y Holmes, 1981).

Para estimar la digestibilidad, el otro componente de la fórmula para calcular consumo, existen varios métodos en la literatura y Faichney (1975) ha publicado una revisión sobre el tema. Entre ellos se destaca el método de proporciones, utilizando

marcadores internos tales como cromógeno (Kennedy *et al.*, 1959) y lignina (Wallace y Van Dyne, 1970). Problemas de recuperación de estos marcadores en las heces han limitado su uso. Otros marcadores internos, como la fibra detergente neutro (FDN) o la fibra detergente ácido (FDA) indigerible, han dado mejores resultados en cuanto a su recuperación en las heces, por lo menos con algunos forrajes (Cochran *et al.*, 1986). La variabilidad de los estimados de digestibilidad con FDN o FDA indigerible está asociada con el método de determinación y con el secado de las muestras. Tanto en gramíneas como en leguminosas tropicales, la digestión de las muestras durante seis días con el método de Tilley y Terry (1963), sin la fase de pepsina, resulta en estimados de FDN indigerible similares a los que se obtienen con recambio de bacterias a las 72 horas (CIAT, datos sin publicar). Es bien sabido que en forrajes inmaduros o muy húmedos el secado a temperaturas altas puede resultar en la reacción Maillard, mediante la cual se forman compuestos indigeribles resultantes de la unión de proteína con carbohidratos. Para evitar esto, las muestras de forraje y, en menor grado, de heces deben secarse a temperaturas no mayores de 60°C o, alternativamente, liofilizarse (Theurer, 1970; Van Soest, 1982).

Otro procedimiento para estimar la digestibilidad es el uso de índices fecales, sobre todo N (Van Dyne y Meyer, 1964; Langlands, 1969). Con este método se establecen, en pruebas de consumo en estabulación, regresio-

nes entre la digestibilidad y la concentración del índice fecal. Posteriormente, se mide la concentración del índice en heces de animales en pastoreo y se calcula con la regresión respectiva la digestibilidad. Arnold y Dudzinski (1963) han discutido las fuentes de error en la técnica de índices fecales, y en general, su aplicación parece limitada a casos donde existen diferencias muy grandes en digestibilidad. Por último, un método alternativo para medir digestibilidad en pruebas de pastoreo es el de utilizar muestras de forraje consumido por animales fistulados al esófago y someterlas a una prueba de digestibilidad *in vitro*, incluyendo en cada corrida un forraje de digestibilidad *in vivo* conocida. Dado el contenido de humedad de las extrusas esofágicas es necesario secar las muestras a temperaturas bajas para evitar el aumento artificial de fibra indigerible.

### 3. Variabilidad animal en consumo

Uno de los factores que afectan la precisión en las mediciones de consumo es la alta variabilidad entre animales (Van Dyne y Meyer, 1964). Como consecuencia de esta variabilidad, es necesario utilizar un número relativamente alto de animales para poder detectar diferencias significativas entre tratamientos.

Dado que el consumo en pastoreo puede estimarse de la relación peso de heces/indigestibilidad, las variaciones en consumo pueden resultar de diferencias en composición de la dieta



seleccionada y de la tasa de excreción de heces. En períodos cortos, la composición de la dieta es bastante uniforme y se ha calculado que para estimar la digestibilidad del forraje dentro de 10% de la media, con una probabilidad de 95%, se requieren entre uno y tres animales, dependiendo de la disponibilidad de forraje. Por otro lado, para estimar producción de heces con la misma precisión se requieren entre dos y nueve animales, también dependiendo de la disponibilidad del forraje (Van Dyne y Meyer, 1964).

#### 4. Aplicación de la metodología

En la evaluación de germoplasma forrajero podría ser de interés medir consumo bajo pastoreo, para determinar efectos debidos a especie, manejo del pastoreo, época del año y nivel de fertilización. Este tipo de mediciones pueden formar parte de estudios en donde el objetivo central es medir productividad y persistencia de gramíneas/leguminosas bajo pastoreo (Paladines y Lascano, 1983) o de estudios donde el objetivo es determinar nivel de producción animal (Lascano *et al.*, 1986).

##### a. Cálculo de área

En ensayos de pastoreo en parcelas pequeñas donde se desee medir consumo, es importante tener en cuenta el área de las parcelas, ya que se debe dar un período de acostumbramiento previo a los animales de por lo

menos siete días. En estos ensayos, las áreas para acostumbramiento y medición pueden calcularse así:

$$A = \frac{(PVT) \times (D) \times (PP)}{(MVS) \times (100)}$$

donde:

A = área, ha  
PVT = peso vivo total, kg  
D = días de pastoreo  
PP = presión de pastoreo,  
MVS = materia verde seca kg MVS/  
100 kg PV/día (hojas + tallos)  
en oferta, kg/ha.

Alternativamente, estas áreas pueden calcularse con base en la relación:

$$A = \frac{(UA) (D)}{(CA) (DPE)}$$

donde:

A = área, ha  
UA = unidades animales  
D = días de pastoreo  
CA = carga, UA/ha  
DPE = días de ocupación + días de descanso de potreros

##### b. Fases de acostumbramiento y medición

La fase de acostumbramiento (normalmente siete días) tiene como finalidad permitir que los animales se

familiaricen con el área de pastoreo y con la especie o especies de forraje a evaluar, producir un recambio del contenido del tracto digestivo y saturar la digesta con el marcador externo empleado, en el caso del método de dosis continua.

En ensayos de pastoreo donde se mide ganancia de peso, las fases de acostumbamiento y medición pueden hacerse en el mismo potrero si el pastoreo es continuo o en potreros diferentes si el pastoreo es rotacional.

Durante la fase de acostumbamiento se debe: 1) Tomar muestras de heces antes de aplicar el marcador externo; 2) Dosificar el marcador mañana y tarde y 3) Tomar muestras de extrusa esofágica para estimar la digestibilidad y/o para marcar y dosificar al rumen.

La dosificación del marcador puede hacerse vía oral (cápsulas con óxido de cromo o con iterbio), directamente al retículo-rumen a través de la pared ruminal (inyección), o a través de una fístula (marcador en solución o aplicado a muestras de extrusa). En el caso de utilizar dosis continua de marcador (cromo o iterbio) se recomienda dosificar 3-4 g de marcador/100 kg PV/día.

Durante la fase de medición, con una duración de siete a 10 días, se debe recolectar muestras de heces mañana y tarde, preferiblemente del recto. Si esto no es factible, se pueden tomar heces depositadas por el animal en presencia del operario. En el caso

de utilizar una dosis única de marcador, las muestras deben tomarse a diferentes horas post-dosificación (por ejemplo, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144 h) para un posterior ajuste con el modelo matemático apropiado.

Tanto las muestras de extrusa como las heces deben congelarse para su posterior procesamiento y análisis. El secado de las muestras, particularmente la extrusa, debe hacerse a temperaturas no mayores de 60°C y, de ser factible, se recomienda liofilizarlas.

## 5. Referencias

- ARNOLD, G.W.; DUDZINSKI, M.L. 1963. The use of fecal nitrogen as an index for estimating the consumption of herbage by grazing animals. *Journal of Agricultural Science* 61:33.
- BLAXTER, K.L.; WAINMAN, F.W.; WILSON, R.S. 1961. The regulation of food intake by sheep. *Animal Production* 3:51.
- CLARK, K.W.; MOTT, G.O. 1960. The dry matter digestion *in vitro* of forage crops. *Canadian Journal of Plant Science* 40:123.
- COCHRAN, R.C.; ADAMS, D.C.; WALLACE, J.D.; GALYEAN, M.L. 1986. Predicting digestibility of different diets with internal markers: Evaluation of four potential

- markers. *Journal of Animal Science* 63:1476.
- CONRAD, H.R.; PRATT, A.D.; HIBBS, J.W. 1964. Regulation of feed intake in dairy cows. I. Changes in importance of physical and physiological factors with increasing digestibility. *Journal of Dairy Science* 47:54.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. 1980. Programa de Pastos Tropicales. Informe anual. Cali, Colombia, CIAT. 86 p.
- CORDOVA, F.J.; WALLACE, J.D.; PIEPPER, R.D. 1978. Forage intake by grazing livestock: A review. *Journal of Range Management* 31:430.
- CORBETT, J.L.; GREENGALGH, J.F.D.; McDONALD, I.; FLORENCE, E. 1960. Excretion of chromium sesquioxide administered as a component of paper to sheep. *British Journal of Nutrition* 14:289.
- DE LANEY, D.S.; POND, K.R.; LASCANO, C.E.; ELLIS, W.C. 1981. Comparison of fecal output as estimated by two marker methods. *In* Beef Cattle Research in Texas. The Texas Agricultural Experiment Station. PR 3768. 34p.
- ELLIOT, R.C.; FOKKEMA, K.; FRENCH, C.H. 1961. Herbage consumption studies by beef cattle. II. Intake studies on Afrikander and Mashona cows on veld grazing. 1959/1960. *Rhodesia Journal of Agriculture* 58:124.
- ELLIS, W.C. 1978. Determinants of grazed forage intake and digestibility. *Journal of Dairy Science* 61:1828.
- ELLIS, W.C.; MATIS, J.H.; LASCANO, C.E. 1979. Quantitating ruminal turnover. *Federation Proceedings* 38:2702.
- GUZMAN, S. 1983. Evaluación de la calidad forrajera de tres genotipos de *Andropogon gayanus* (Kunth). Tesis Mag. Producción Animal. Santiago, Chile, Pontificia Universidad Católica de Chile. 77 p.
- HODGSON, J. 1982. Influence of sward characteristics on diet selection and herbage intake by the grazing animal. *In* Nutritional limits to animal production from pastures. Ed. by J.B. Haker. Farnham Royal, U.K. Commonwealth Agricultural Bureaux. p. 153.
- KENNEDY, W.K.; CARTER, A.N.; LANCASTER, R.J. 1959. Comparison of fecal pigments and fecal nitrogen as digestibility indicators in grazing studies. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 2:627.
- LANGLANDS, J.P. 1969. Studies on the nutritive value of the diet selected by grazing sheep. IV. Variation in the diet selected by

- sheep differing in age, breed, sex, strain and previous history. *Animal Production* 11:369.
- LASCANO, C.E.; PIZARRO, E.E.; TOLEDO, J.M. 1986. Recomendaciones generales para evaluar pasturas con animales. *In* Evaluación de pasturas con animales. Alternativas metodológicas. Ed. por C.E. Lascano, E.A. Pizarro. Cali, Colombia. Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales, CIAT. p. 251.
- MADER, T.L.; TEETER, R.G.; HORN, G.W. 1984. Comparison of forage labeling techniques for conducting passage rate studies. *Journal of Animal Science* 58:208.
- MATIS, J.N. 1972. Gamma time-dependency in Blaxter's compartmental model. *Biometrics* 28:597.
- MINSON, D.J. 1971. The nutritive value of tropical pastures. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* 37:225.
- \_\_\_\_\_.; HAYDOCK, K.P. 1971. The value of pepsin dry matter solubility for estimating the voluntary intake and digestibility of six *Panicum*. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 11:181.
- \_\_\_\_\_. 1982. Effects of chemical and physical composition of herbage eaten upon intake. *In* Nutritional limits to animal production from pastures. Ed. by J.B. Haker. Farnham Royal, U.K. Commonwealth Agricultural Bureaux. p. 167.
- MILFORD, R.; MINSON, D.J. 1965. Intake of tropical pasture species. Proceedings of the 9th International Grassland Congress. Sao Paulo, Brazil. January 7-20, 1968. p. 815.
- PALADINES, O.; LASCANO, C.E. 1983. Recomendaciones para evaluar germoplasma bajo pastoreo en pequeños potreros. *In* Germoplasma forrajero bajo pastoreo en pequeñas parcelas: Metodologías de evaluación. Ed. por O. Paladines, C.E. Lascano. Cali, Colombia, Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales, CIAT. p. 165.
- PRIGGE, E.C.; VARGA, G.A.; VIEINI, J.L.; REID, R.L. 1981. Comparison of ytterbium chloride and chromium sesquioxide as fecal indicators. *Journal of Animal Science* 53:1629.
- RAYMOND, W.F.; MINSON, D.J. 1955. The use of chromic oxide for estimating the fecal production of grazing animals. *Journal of the British Grassland Society* 10:282.
- REID, J.T. 1952. Indicator methods, their potentialities and limitations. Proceedings of the 6th International Grassland Congress. Pennsylvania State College, August 17-23, 1952 p. 1334.

- TEETER, R.G.; OWENS, F.N.; MADER, T.L. 1984. Ytterbium chloride as a marker for particulate matter in the rumen. *Journal of Animal Science* 58:465.
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. 1963. A two-stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society* 18:104.
- THEURER, C.B. 1970. Chemical indicator techniques for determining range forage consumption. In *Range and Wildlife habitat*. USDA Miscellaneous Publication 1147. 220 p.
- UDEN, P.; COLUCCI, P.E.; VAN SOEST, P.J. 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta rate of passage studies. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 31:625.
- VAN SOEST, P.J. 1965. Symposium on factors influencing voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility. *Journal of Animal Science* 24:834.
- \_\_\_\_\_. 1982. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 1 Ed. Corvallis, Oregon, O & B Books. 374 p.
- VAN DYNE, G.M.; MEYER, J.H. 1964. Forage intake by cattle and sheep on dry annual range. *Journal of Animal Science* 23:1108.
- WALLACE, J.D.; VAN DYNE, G.M. 1970. Precision of indirect methods for estimating digestibility of forage consumed by grazing cattle. *Journal of Range Management* 23:424.
- WANJOIKE, M.M.; HOLMES, W. 1981. A comparison of indirect methods of estimating feed intake on pasture. *Grass and Forage Science* 36:221.
- WESTON, R.H. 1982. Animal factors affecting feed intake. In *Nutritional limits to animal production from pastures*. Ed. by J.B. Haker. Farnham Royal, U.K. Commonwealth Agricultural Bureaux. p. 183.
- ZEMMELINK, G. 1980. Effect of selective consumption on voluntary intake and digestibility of tropical forages. Wageningen, The Netherlands. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Agriculture Research Report 896. 100 p.

## RECOMENDACIONES SOBRE METODOLOGIA PARA LA MEDICION DE CONSUMO Y DIGESTIBILIDAD *IN VIVO*

*Carlos E. Lascano<sup>1</sup>, Rolain Borel, Roberto Quiroz, José Zorrilla,  
Carlos Chaves, Claudio Wernli*

### **1. Consumo y digestibilidad en pruebas de confinamiento**

Para determinar la calidad nutritiva de un alimento se requiere tener una estimación, lo más precisa posible, de su digestibilidad y consumo. Su determinación bajo condiciones de confinamiento es una técnica que frecuentemente se utiliza en la evaluación de henos, ensilajes, pastos de corte y residuos de cosecha. En la evaluación nutritiva de alimentos no tradicionales, tales como subproductos y follaje de plantas arbóreas y de nuevas introducciones de gramíneas y leguminosas, es recomendable medir digestibilidad y consumo, para detectar la posible presencia de factores anti-cualitativos o de compuestos tóxicos. En esta sección se resumen recomen-

daciones generales sobre pruebas de digestibilidad y consumo en confinamiento.

#### **a. Tipo de animal**

Se recomienda utilizar el mismo tipo de animales (especie, raza, sexo y edad) para los que el alimento está destinado. Si esto no es posible, se pueden utilizar carneros, reconociendo las limitaciones en la extrapolación de los resultados.

#### **b. Alojamiento**

Tanto con ovinos como con bovinos se pueden utilizar jaulas individuales de madera o metálicas, que permitan la colección de heces, ya sea por medio

---

<sup>1</sup>Coordinador del grupo de trabajo.

de separadores o con el uso de bolsas colectoras. En el caso de bovinos, éstos se pueden mantener en corrales individuales o sujetos con una cadena en posición fija a lo largo de la línea de comederos, colocándole a cada animal bolsas colectoras de heces.

### **c. Régimen alimenticio**

En las pruebas de digestibilidad y consumo en confinamiento puede utilizarse un régimen de oferta de alimento fijo, un régimen *ad libitum* o un régimen a diferentes niveles.

El nivel fijo de alimentación normalmente se utiliza cuando se quiere medir la digestibilidad de un alimento a un nivel de consumo que se aproxime a mantenimiento. Sin embargo, lo más común es medir digestibilidad y consumo en condiciones de alimentación *ad libitum*. En este caso el nivel *ad libitum* se logra suministrando 10 a 15% más de alimento, sobre el consumo máximo observado.

El régimen de alimentación a diferentes niveles se recomienda en la evaluación de gramíneas y leguminosas tropicales. Esto se debe a que con niveles crecientes de oferta de especies forrajeras tropicales se observan incrementos en consumo voluntario, principalmente debido a una mayor oportunidad de selección de hojas en relación a tallos.

### **d. Acostumbramiento y medición**

Es esencial que en las pruebas de digestibilidad y consumo se tenga un

período pre-experimental o de acostumbramiento. Este período, que puede variar entre siete y 12 días, tiene como objetivo el asegurar que los animales se acostumbren a la condición de confinamiento, y que haya una remoción total del tracto de los residuos no digeridos de alimentos previos. Durante este período, el alimento debe suministrarse en niveles fijos o crecientes dependiendo del régimen alimenticio escogido. Se recomienda que la medición o colección se realice durante un período de siete a 10 días, en los cuales no se debe variar el régimen alimenticio previamente escogido.

Los animales deberán pesarse al inicio y al final de la prueba, y desparasitarse antes de iniciar el período de acostumbramiento. Además, se debe revisar su estado general de salud.

### **e. Colección de residuos alimenticios y de heces**

Durante el período de acostumbramiento y colección, el alimento se suministra en dos raciones (en la mañana y en la tarde) y los residuos no consumidos deben retirarse diariamente, especialmente bajo condiciones de altas temperaturas. La colección de heces debe empezar dos días después de iniciada la colección de residuos de alimento y continuarse por dos días más, después de finalizada la colección de los mismos.

Los residuos de alimento de cada animal deben pesarse diariamente y en una submuestra determinar mate-

ria seca (MS), la cual puede utilizarse para posteriores análisis químicos. Alternativamente, los residuos de cada animal pueden acumularse y congelarse, y al final de la prueba se pesan y se toman submuestras para determinación de MS y análisis químico.

#### f. Cálculos para la determinación de la digestibilidad

El consumo de MS o materia orgánica (MO) se calcula por diferencia; es decir, alimento ofrecido menos alimento rechazado. El porcentaje de digestibilidad (D) de la materia seca del alimento ofrecido se calcula con la siguiente ecuación:

$$D, \% = \frac{\text{MS consumida} - \text{MS excretada en heces}}{\text{MS consumida}} \times 100$$

A partir de la fórmula anterior, se puede obtener el coeficiente de digestibilidad de cualquier componente de la dieta, mediante la siguiente relación:

$$D_i = \frac{100(y - x) + xD}{y}$$

donde:

$D_i$  = coeficiente de digestibilidad del componente de interés (fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, etc.).

$y$  = Porcentaje del componente en el alimento en base seca.

$x$  = Porcentaje del componente en heces en base seca.

$D$  = Porcentaje de digestibilidad de la MS.

Para eliminar errores en la determinación del valor nutritivo de la dieta debidos a contaminación con suelo, se recomienda expresar los resultados con base en la MO. Para esto se requiere determinar ceniza en el alimento ( $A_y$ ) y heces ( $A_x$ ). En la ecuación anterior el valor de "y" se sustituye por  $(100 - A_y)$  y el de "x" por  $(100 - A_x)$ ;  $D_i'$  sería entonces el porcentaje de digestibilidad de la MO.

En ocasiones es de interés estimar la digestibilidad de dos o más ingredientes en el alimento ofrecido a los animales. Para ello, se debe determinar en una primera prueba el coeficiente de indigestibilidad del ingrediente basal ( $R_b$ ). En una segunda prueba se incluye el ingrediente (x) al cual se le quiere determinar su digestibilidad y se aplica la siguiente ecuación:

$$R_a = R_x x_i + R_b B_i$$

donde,

$R_a$  = indigestibilidad de la ración total con los dos ingredientes (basal y adicional)

$R_x$  = indigestibilidad del ingrediente adicional (x)

$x_i$  = concentración en la dieta del ingrediente (x)



Rb = indigestibilidad del ingrediente basal

Bi = concentración en la dieta del ingrediente basal.

La indigestibilidad de la dieta total es igual a la suma de las indigestibilidades parciales de sus componentes, por lo que la indigestibilidad del ingrediente adicional (Rx) es:  $(Ra - Rb Bi)/xi$ .

La relación anterior presupone que no existe ninguna interacción (efecto asociativo) entre los ingredientes incluidos de la ración, lo cual no siempre es así. Para determinar la magnitud y tendencia de los efectos asociativos entre ingredientes en ruminantes, debe realizarse una prueba de digestibilidad en la que se incluyen varias proporciones de los ingredientes de interés y se determina sus respectivos coeficientes parciales de digestión. El grado en que el coeficiente de digestibilidad adscrito a uno de los componentes aumente o disminuya con las diferentes proporciones empleadas, será un indicativo del efecto asociativo.

### g. Balance de nitrógeno

La estimación del balance de nitrógeno (N) implica la diferencia entre cantidad de N consumido y eliminado en heces y orina. En este caso debe tenerse en cuenta que el N fecal no es todo de origen alimenticio, ya que hay una porción de origen metabólico.

Para determinar el balance de N se recomienda adicionar al recipiente colector de orina un volumen aproximado de 100 ml de una solución al 5% (v/v) de ácido sulfúrico. Diariamente debe registrarse el volumen de orina producido y se debe guardar una alícuota del 10%. Al final del período de colección se pueden mezclar las alícuotas de orina y proceder a los análisis de N.

Los cálculos para estimar el N aparentemente retenido (NAR) se realizan con la siguiente ecuación:

$$\text{NAR, \%} = \frac{\text{N consumido} - \text{N fecal} - \text{N orina}}{\text{N consumido}} \times 100$$

Si el investigador está interesado en tener un estimado de digestibilidad verdadera de N (DVN), debe realizar una prueba en la que los animales reciban un alimento con proteínas altamente digestibles (caseína). En este caso, el N fecal se asume que es todo de origen metabólico y se expresa por unidad de MS consumida. El cálculo se realiza con la siguiente ecuación:

$$\text{DVN, \%} = \frac{\text{N consumido} - \text{N Fecal total} - \text{N metabólico}}{\text{N consumido}} \times 100$$

### h. Variabilidad animal

En el diseño de estudios para medir consumo y digestibilidad en confinamiento, es importante considerar la variabilidad animal. Se conoce que el

consumo es altamente variable entre animales (CV = 10-30%), particularmente cuando se utilizan ovinos. Por lo tanto, dependiendo de las diferencias esperadas entre tratamientos, se debe ajustar el número de animales para detectar diferencias con cierto nivel de probabilidad, tal como se muestra en el Cuadro 1.

El investigador deberá llegar a un compromiso entre el número ideal de animales necesarios para detectar diferencias verdaderas y lo factible bajo sus condiciones de trabajo. Cuando se dispone de pocos animales, el investigador puede pensar en utilizar diseños apropiados, como por ejemplo el cuadrado latino. En estos casos se debe tener el cuidado de eliminar efectos

residuales mediante períodos lo suficientemente largos de acostumbramiento entre períodos experimentales del diseño, sobre todo si se va a estimar digestibilidad.

## 2. Estimación del consumo y digestibilidad en pastoreo con métodos indirectos (marcadores)

En situaciones específicas, el investigador puede requerir de la estimación del consumo y digestibilidad en pasturas. Para ello, se puede pensar en el uso de bolsas colectoras de heces o en marcadores. Las bolsas dan gran exactitud en la estimación de producción de heces, pero su uso pue-

**Cuadro 1. Número de animales a utilizar en función de la magnitud de la diferencia en consumo esperada.**

Diferencia verdadera en consumo <sup>1</sup> , g/kg <sup>75</sup> /dia	No. de animales necesarios
30	3
21	4
18	5
16	6
13	8
11	10
9	15
8	20
7	25
6	33
5	48

<sup>1</sup>Estimado de media  $\pm$  20%, y una probabilidad de 95%

Fuente: Keaney *et al.* (1968), citados por los autores pero no localizada para su cita completa.

de afectar el comportamiento del animal. En esta sección se dan recomendaciones sobre el uso de marcadores para estimar consumo y digestibilidad de forrajes bajo pastoreo, y se describe la metodología para estimar consumo y utilización de forrajes en pastoreo por métodos directos.

Para medir consumo voluntario bajo pastoreo (g/día) es necesario tener un estimado de la producción fecal (g/día) mediante marcadores externos y de digestibilidad mediante marcadores internos. El consumo se calcula así:

$$\text{Consumo} = \frac{\text{Producción heces}}{100 - \text{digestibilidad}} \times 100$$

#### a. Marcadores externos

El iterbio (Yb) y la fibra mordantada con cromo (Cr) son los marcadores externos más utilizados hoy en día. Estos marcadores pueden suministrarse al animal dos veces por día (en la mañana y en la tarde) o en dosis única vía oral o vía fístula ruminal.

Para calcular la producción de heces cuando se dosifica el marcador dos veces/día o en forma continua (bomba de infusión ruminal) se utiliza la siguiente relación:

$$PH = \frac{MD}{CMH}$$

donde:

MD = Marcador dosificado, g/día  
 PH = Producción heces, g/día  
 CMH = Concentración marcador en heces, g/gMS

El cálculo de producción de heces cuando se dosifica el marcador una sola vez, requiere del uso de un modelo bi-exponencial para ajustar los datos de excreción del marcador en heces *vs.* tiempo post-dosis. Con el modelo se puede estimar la concentración inicial del marcador ( $C_0$ ), una tasa rápida de mezcla ( $K_1$ ), una tasa lenta de pasaje ( $K_2$ ) y tiempo de tránsito (TT). Para calcular producción de heces se aplican las siguientes ecuaciones:

$$V = \frac{MD}{C_0}$$

$$PH = V \times K_2 \times 24$$

donde:

V = Volumen de digesta, g  
 MD = Marcador dosificado, g  
 $C_0$  = g/g  
 PH = Producción heces, g/día  
 $K_2$  = fracción/h

Con el uso de marcadores externos para estimar producción de heces, se puede esperar que haya variabilidad debida a marcador empleado, método de administración del marcador, y frecuencia y método de colección de heces. El investigador deberá estandarizar el uso de marcadores para su situación específica y determinar el grado de error probable en sus estimados de producción fecal.

## b. Marcadores internos

Para estimar digestibilidad se recomienda el uso de la fibra detergente neutro indigerible (FDNI) o la fibra detergente ácido indigerible (FDAI). Esta fibra se determina tanto en forraje representativo de la dieta (extrusa esofágica) como en heces, mediante digestión *in vitro* por 144 horas, seguido por una extracción del residuo con detergentes. Se recomienda que el medio que se utilice en el *in vitro* sea suplementado con caseína y una sustancia reductora (H<sub>2</sub>S). En caso contrario, se sugiere hacer un recambio del medio e inóculo a las 72 horas de fermentación.

Para calcular la digestibilidad de la MS o MO por medio de marcadores internos, se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{DMS, \%} = \left[ 1 - \frac{\text{CMF}}{\text{CMH}} \right] \times 100$$

donde:

CMF = concentración del marcador en el forraje, %

CMH = concentración del marcador en las heces, %

Para calcular la digestibilidad (D) de cualquier nutriente (fibra detergente neutro) se aplica la fórmula:

$$\text{DFND, \%} = \left[ 1 - \frac{\text{CMF} \times \text{FDNH}}{\text{CMH} \times \text{FDNF}} \right] \times 100$$

donde:

CMF = concentración marcador en forraje %

FDNH = Fibra detergente neutro en heces, %

CMH = concentración del marcador en las heces, %

FDNF = fibra detergente neutro en heces, %

Se ha demostrado que con la FDNI o la FDAI se puede subestimar la digestibilidad de forrajes en estado inmaduro. Esto posiblemente se debe a la formación de sustancias indigeribles en el proceso de secado en horno. Por lo tanto, se recomienda que muestras de forraje inmaduro y/o muestras de extrusa esofágica se sometan a liofilización o a secado en horno con temperaturas no mayores de 60°C.

En general, los estimados de digestibilidad utilizando marcadores internos dependen del marcador utilizado, la determinación analítica del marcador y el método de procesamiento de la muestra (secado). Se recomienda que el investigador evalúe diferentes marcadores internos bajo sus condiciones, y determine qué confiabilidad tienen los estimados de digestibilidad.

## c. Variabilidad animal

En la determinación de consumo y digestibilidad en pastoreo, es importante tener en cuenta la variabilidad animal. Un factor que contribuye sig-

**Cuadro 2. Número de animales requerido para determinar digestibilidad y consumo en función de la disponibilidad de forraje<sup>1</sup>.**

Forraje disponible kg/ha	Parámetro	No. animales vacunos
420	Digestibilidad	1
	Heces	9
1200	Digestibilidad	1
	Heces	3
1500	Digestibilidad	1
	Heces	1

<sup>1</sup> Estimado de media con  $\pm 10\%$  y una probabilidad de 95%.

Fuente: Van Dyne y Meyer (1966).

nificativamente a esta variabilidad es la disponibilidad del forraje debido al manejo del pastoreo (cargas) o a la época del año. En la medida que disminuya el forraje disponible se requerirá más animales para estimar la producción fecal, pero no la digestibilidad (Cuadro 2). Lo contrario sucede cuando aumenta la disponibilidad de forraje.

El investigador deberá establecer un compromiso entre lo posible bajo sus condiciones y lo ideal, reconociendo las fuentes de error al emplear marcadores para estimar consumo y digestibilidad.

### 3. Estimación de consumo con métodos directos

En muchas ocasiones, el investigador se ve en la necesidad de estimar el consumo en sus pruebas de pasto-

reo, pero carece de animales fistulados o tiene limitaciones para emplearlos. En tal circunstancia, una alternativa es la de utilizar métodos agronómicos o recurrir a la determinación del comportamiento ingestivo del animal.

#### a. Métodos agronómicos

Con este método el consumo de forraje se calcula por la diferencia entre la MS disponible antes y después del pastoreo. La disponibilidad de forraje puede determinarse por medio de cortes utilizando marcos o siguiendo el método de doble muestreo (Hargreaves y Kerr, 1978). En el muestreo debe cosecharse el forraje a ras del suelo, evitando la contaminación. Las muestras cosechadas deben separarse en material verde e inerte, ya que el animal es extremadamente selectivo hacia la parte verde.

El método agronómico para estimar el consumo de forraje se recomienda únicamente con pasturas muy homogéneas, que son pastoreadas con cargas instantáneas altas, y que permiten una utilización de más de 50% del forraje en dos o tres días. Esta condición normalmente se encuentra en ensayos de pastoreo en pequeñas parcelas donde se evalúan asociaciones gramíneas/leguminosas bajo diferentes manejos (Paladines y Lascano, 1983).

Es importante que el período entre las mediciones antes y después del pastoreo no sea de más de 2-3 días para reducir errores debidos a crecimiento de forraje. Si se utilizan períodos largos de pastoreo (> 7 días) es necesario tener en cuenta el crecimiento del forraje durante el período de ocupación. Para tal efecto, se deben situar jaulas en la pastura, para estimar la tasa de crecimiento, o suponer que el crecimiento durante la ocupación es similar al que ocurre durante el período de descanso. Esto último es válido siempre y cuando el período de descanso sea corto (3-4 semanas) y durante el cual el incremento de biomasa es lineal.

#### **b. Comportamiento ingestivo**

El comportamiento ingestivo del animal en pastoreo expresado en términos de tiempo de pastoreo (TP, h/día), tasa de toma de bocados (TTB, No. de bocados/h) y tamaño de bocado (TB, g) permite obtener estimaciones del consumo. La relación entre consumo y los componentes del comporta-

miento ingestivo se expresa en la siguiente fórmula:

$$\text{Consumo} = \text{TP} \times \text{TTB} \times \text{TB}$$

El tiempo de pastoreo se puede determinar con mucha exactitud utilizando un "vibracorder" (reloj con tarjeta) ajustado al animal, y que es accionado únicamente cuando el animal pastorea activamente. Para determinar el número de bocados por unidad de tiempo, se utiliza un contador mecánico o electrónico, ajustado a la mandíbula del animal por medio de un arnés. Con este contador se puede diferenciar la acción de masticación de la de rumia. El tamaño de bocado se mide obstruyendo la parte distal del esófago de animales fistulados (con un corcho), en tal forma que todo el forraje ingerido en cada bocado caiga en una bolsa recolectora.

En pasturas tropicales se observa que a medida que disminuye el forraje disponible, el animal tiende a incrementar el TP hasta cierto límite, o sea, que existe una compensación. Por otra parte, bajo estas condiciones puede haber también un aumento en la TTB, pero se llega a un punto en que se disminuye significativamente el TB y, por ende, el consumo total. Así mismo, el TB puede disminuir en pasturas tropicales debido a la baja densidad de forraje (kg MS/ha o /cm<sup>2</sup>).

En general, los estimados de los componentes del comportamiento del animal son muy adecuados para detectar cambios debidos a variaciones en disponibilidad de forraje y estruc-

tura de la pradera. Sin embargo, debe indicarse que no siempre resulta fácil medir el TB, lo cual puede llevar a errores en la estimación del consumo.

#### 4. Referencias

- HARGREAVES, J.N.G.; KERR, J.D. 1978. Botanal: A comprehensive sampling and computing procedure for estimating pasture yield and composition. II. Computation package. Division of Tropical Crops and Pastures. Tropical Agronomy. CSIRO. Technical memorandum No. 9. p. irr.
- PALADINES, O; LASCANO, C.E. 1983. Recomendaciones para evaluar germoplasma bajo pastoreo en pequeños potreros *In* Germoplasma forrajero bajo pastoreo en pequeñas parcelas. Ed. por O. Paladines, C.E. Lascano. Cali, Colombia. Red internacional de Evaluación de Pastos Tropicales, CIAT. p. 165.
- VAN DYNE, G.M.; MEYER, J.H. 1966. Forage intake by cattle and sheep on dry annual range. *Journal of Animal Science* 23:1108.

## DISCUSION DE LAS RECOMENDACIONES DEL GRUPO DE TRABAJO No.3

*Moderador: Dr. Claudio Wernli*

### **G. PICHARD**

¿Hay alguna razón especial para utilizar el término "preferencia" en lugar de "selección" o son equivalentes?

### **C. LASCANO**

Se podría adicionar otra que ya está bastante aceptada: palatabilidad. Consideramos que preferencia era un término suficientemente general, que cubre aspectos de gustosidad, de palatabilidad y de selectividad en una pastura mixta.

### **F. OJEDA**

¿Qué carga o presión de pastoreo recomiendan utilizar en pruebas de cafetería? Hago esta pregunta porque esta es una de las condiciones que más impacto tiene en evaluaciones de germoplasma, pues las respuestas pueden variar de acuerdo con la carga y la presión de pastoreo.

### **J. ZORRILLA**

Lo que estamos sugiriendo es la utilización de pequeñas parcelas ya establecidas, producto de la introducción inicial de un determinado número de germoplasma nuevo (los llamados ensayos ERA) y que, una vez cumplido su objetivo agronómico, pueda obtenerse información complementaria relativa al consumo de algunas de estas especies. Es una metodología que ya está descrita en la literatura y vamos a hacer referencia a ella en la guía metodológica.

### **F. OJEDA**

¿Qué sucedería cuando se aumenta la carga o la presión de pastoreo hasta un nivel crítico? ¿No dificultaría esto las mediciones de preferencia, dado que los animales, por un problema de hambre, consumirían todo lo que se les oferte?



## C. LASCANO

La lectura de preferencia que uno obtenga no debe estar influenciada por la disponibilidad de forraje al inicio de la prueba. Obviamente, a medida que transcurra la prueba algunas parcelas se van a acabar y eso es lo que interesa. El criterio es que haya una disponibilidad adecuada, para que ello no sea un factor limitante, y realmente exista una expresión de lo que queremos medir.

## MARIA KASS

En relación con la evaluación de árboles forrajeros, utilizados como suplementos proteicos o como bancos de proteína o ensilajes, ¿cómo se mediría su consumo si el animal está consumiendo pasto?

## C. LASCANO

Sólo tengo una experiencia y en la literatura no he encontrado mayor información al respecto. La experiencia que tengo es un trabajo donde el objetivo era medir la contribución de un banco de proteína a un pasto nativo, en términos de producción animal, y queríamos cuantificar el consumo. Mediante el análisis de carbono 12 y carbono 13 podíamos determinar la proporción de gramínea ( $C_3$ ) y leguminosa ( $C_4$ ) en la dieta. El problema que tuvimos fue al querer estimar digestibilidad, porque tomamos muestras de extrusa en el banco y en la gramínea, con digestibilidades diferentes. Para corregir, observamos los animales en cuanto a su tiempo de per-

manencia en el banco y en la gramínea, y usamos estas frecuencias en pastoreo para estimar la dieta teórica, utilizando un promedio ponderado.

Esta metodología podría aplicarse en el caso donde el investigador está estudiando un sistema silvopastoril y quiere ver qué contribución hace el árbol a la dieta total, siempre y cuando no haya leguminosas en la vegetación herbácea. Además, sería necesario tener observaciones visuales para poder hacer una estimación de la frecuencia de consumo de árboles y vegetación herbácea.

## C. WERNLI

Creo que el problema se suscita cuando el consumo de ninguno de los componentes puede medirse individualmente. Entiendo que la consulta de la Dra. Kass es referente a una situación en que uno de los componentes puede medirse, como en el caso de ensilajes o un subproducto o un complemento. En esta situación, la metodología óptima sería medir la cantidad de alimento que diariamente otorgamos al animal. El problema sería determinar el consumo del otro recurso que está siendo utilizado, que podría ser una pastura o arbustos. En algunos experimentos han recurrido a la medición indirecta del consumo del segundo componente, a través de la respuesta animal o el gasto energético. Así se podría llegar a estimar lo que el animal consumió, ya sea en materia orgánica o en energía. También es posible determinar en esta forma la tasa de sustitución, es decir,

en qué medida el segundo alimento es consumido en menor cantidad por la ingestión del otro. Su limitación radica en que son estimaciones indirectas, a través de la respuesta del animal, influenciada por la disponibilidad de forraje y la eficiencia con que se usó la pastura. Otra alternativa sería hacer la medición a través de alguna técnica para medir consumo en pastoreo.

Considero fundamental que cuando vamos a medir consumo, justifiquemos esa medición; si el experimento tiene como objetivo final medir consumo, obviamente tenemos que aplicar una metodología para medirlo con la mayor precisión posible. Alternativamente, si estamos en un ensayo de producción, con respuesta animal y eficiencia de uso de la pastura, y no es fácil medir consumo, tenemos que pensar si realmente se justifica hacer dicha medición o no.

En trabajos sobre medición de consumo normalmente se usan cuatro animales, cinco en el mejor de los casos. Sin embargo, el Dr. Lascano indicó que el número de animales requerido, para medir consumo en forma confiable, era función de la disponibilidad de forraje y de otros factores, y que cuatro o cinco son insuficientes, dado el alto coeficiente de variación de este parámetro, especialmente en pastoreo. Entonces, me pregunto si realmente vale la pena hacer una medición de consumo con un tercio de los animales que deberían ser usados y el enorme esfuerzo que implica dicha determinación.

## C. LASCANO

Siguiendo lo que dice el Dr. Wernli, el punto central de nuestra discusión es hasta dónde debemos estimular a nuestros colegas a que midan consumo como práctica estándar en la evaluación nutritiva de pasturas. Debemos identificar áreas en donde realmente se justifica medir consumo, porque a mi me preocupa que vendamos esto como una metodología aplicable a todo tipo de situación.

## M.E. RUIZ

Por lo que acotaba el Dr. Wernli, creo importante indicar cuál es el objetivo del experimento. Si el objetivo es reunir información precisa para diseñar un sistema de alimentación, sea en pastoreo o pastoreo con suplementación o en confinamiento, es obvio que se necesita bastante precisión en la medición. Para ello, existen una serie de técnicas, que son variables en cuanto al grado de precisión.

Una posibilidad sería el establecer una clasificación, o por lo menos señalar dos o tres situaciones, en las que el consumo sería requisito indispensable, requiriendo la máxima precisión, y otras en que no. Por ejemplo, en la evaluación que mencionaba el Dr. Lascano, en la que interesa la clasificación de las preferencias por diferentes especies, ahí no sería necesario tanta precisión.

Comparto la preocupación de que debemos ser cuidadosos en la manera

como describimos estas guías metodológicas. Si lo hacemos muy superficialmente y ponemos el consumo como un parámetro necesario, el lector va a sentirse obligado a tomar esa medida, y seguramente, al continuar leyendo el manual, su máxima preocupación no será si debe o no medir consumo sino, definir cuál de las diferentes técnicas usar; y en esta decisión se corre el riesgo que la selección siempre sea por la técnica de mayor precisión, aunque el experimento no lo demande. Creo que la respuesta está en la definición clara del objetivo del trabajo.

Quiero aprovechar la intervención para hacer una pregunta. De la presentación hecha entendí que el grupo estaba recomendando que, cuando se hacen pruebas de consumo, la medición se debe hacer con alimentación en grupo y no con animales individuales, ¿o entendí mal?

### **J. ZORRILLA**

Eso depende del objetivo. Si el propósito es utilizar esa información en sistemas de producción en corral, definitivamente es más conveniente hacer la prueba con grupos, porque así el comportamiento del animal será más representativo del sistema productivo que queremos incidir. Cuando el objetivo es la estimación del potencial de consumo relativo de varios ecotipos o dietas, las observaciones individuales tienen mayor relevancia que las de grupo.

### **M.E. RUIZ**

Hacia la pregunta con el propósito de llamar la atención, a que cuando se hace una recomendación como la de alimentación en grupo, es necesario ligarla con el requerimiento de repeticiones. Existen muchos experimentos en los que se han hecho toda clase de análisis estadísticos, basados exclusivamente en datos obtenidos en grupo, sin haber repetido el tratamiento en otro grupo. Aún cuando se han repetido los grupos, debe considerarse que repeticiones de grupo, comparado con repeticiones de individuos, son cosas diferentes; en un caso estamos hablando de distribución de medias, y en el otro de distribución de observaciones individuales. En todo caso, las consideraciones estadísticas, usando alimentación individual o por grupo, dependen mucho del objetivo del experimento.

### **G. PICHARD**

Quiero comentar acerca de una situación que estamos enfrentando con sistemas de producción en los que sospechamos el consumo es el factor limitante número uno. Corresponde a un ecosistema árido, con sequía prolongada, en el cual la disponibilidad de forraje es muy baja y donde el consumo, consecuencia de una alta degradación de la pradera es muy bajo. Son, en general, praderas muy complejas en cuanto a composición botánica, pues combinan estratas herbáceas anuales y perennes con arbustivas, por lo que la complicación para medir consumo es grande.

El otro comentario que quiero hacer respecto a consumo es metodológico y referente a estudios de digestibilidad *in vivo* en confinamiento. Estoy de acuerdo en que se asuma un consumo *ad libitum* si de asegura 20% de rechazo. Sin embargo, quiero sugerir la posibilidad de incorporar, como una medición adicional, el consumo a nivel de mantención. La razón para ello es conocer la depresión en digestibilidad por efecto del consumo. Nuestros trabajos de digestibilidad *in vivo* siempre se inician con consumo *ad libitum*, pero terminado el período de colección de 10 días, vienen tres días de consumo restringido a nivel de mantención, y se inicia de nuevo un período de colección de 10 días. Con este procedimiento hemos encontrado que con algunos forrajes, el consumo *ad libitum* ha sido 1.2 veces el consumo a nivel de mantención, y con otros 3.1 veces. Las implicaciones de esto son obvias; creo que experimentalmente añada muy poco esfuerzo y puede ser de gran interés para el investigador.

### M.E. RUIZ

Entiendo que ese 20% de sobrante que ustedes están indicando, no es el exceso que están recomendando para toda situación. Hay muchos investigadores que critican incluso el 10 a 15% de exceso, que es más usual en-

contrar en la literatura y que uno casi toma como regla fija, mientras otros dicen que debe ser un 5%, existiendo un método para lograr 5% ó 7%. Esta es otra decisión que también depende del objetivo del experimento, pues podría ser que a mayor sobrante de alimento, menor será la correspondencia entre un parámetro como consumo y por ejemplo digestibilidad, y aún otros de calidad del alimento.

### C. LASCANO

Sabemos muy bien que en algunos forrajes, en la medida que aumenta la posibilidad de selección del animal, aumenta el consumo dramáticamente. El sugerir una metodología estándar al 20% de rechazo tiene problemas. En el grupo se sugirió que, en la medida que se pudiera, lo que se debe tratar de hacer es dar diferentes niveles de oferta, con la finalidad de tener una regresión. En ese sentido, la guía metodológica podría hacer referencia a una metodología publicada en el trabajo de Gary Zemmeling<sup>1</sup>.

### G. PICHARD

Una experiencia nuestra que puede ser de utilidad es la tremenda variabilidad que hemos encontrado en el comportamiento individual de los animales en las jaulas, durante el período de adaptación, y el hecho de que he-

---

<sup>1</sup>ZEMMELINK, G. 1980. Effect of selective consumption on voluntary intake and digestibility of tropical forages. Wageningen, The Netherlands. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Agricultural Research Report 896. 100 p.

mos tenido que desechar animales del grupo experimental porque simplemente no sirven. Comen cuando quieren, cuanto quieren y botan alimento. Existen animales con comportamientos muy particulares que deben ser observados en el período de acostumbramiento y quizás eliminarlos oportunamente.

## **R. QUIROZ**

Quiero volver al punto de si se debe usar consumos individuales o consumos colectivos. Cuando se quiere evaluar consumo para extrapolar a condiciones de pastoreo, o incluso a condiciones de confinamiento, lo ideal sería usar consumo individual. Sin embargo, hay condiciones en las que hay que alimentar animales en un mismo corral. Forzar esos resultados a consumo individuales no es real, por lo que para esos casos estamos recomendando hacer las mediciones en grupo, con sus respectivas repeticiones.

## **C. WERNLI**

La recomendación va en el sentido que si queremos medir consumo, debemos contar con repeticiones, las cuales pueden ser individuales o grupos de animales que se constituyen en repeticiones. Por otro lado, en experimentos de producción o respuesta animal, en los que no hay repeticiones para consumos, sino que pretenden medir, por ejemplo, variación de peso vivo, eficiencia y conversión, se tiene el parámetro consumo como referencia, pero estadísticamente no es válido

hacer comparaciones porque hay un solo valor, una sola repetición por tratamiento, el grupo de animales.

## **G. PICHARD**

Respecto al uso de marcadores, he seguido con interés el uso del residuo fibra detergente insoluble. Nuestra experiencia muestra, por lo menos a nivel de estudio, que el NDF debe ser sometido a un tratamiento con pepsina en medio ácido. Es decir, el NDF debe ser tratado con pepsina luego de la incubación en licor ruminal. La pepsina en medio ácido permite mayor liberación de compuestos nitrogenados que están asociados a la pared celular y, con ello, hemos logrado aumentar la extracción. En esa forma, cumpliría mejor con las condiciones que debe tener un marcador.

Quisiera también hacer una pregunta sobre el análisis microhistológico de las heces que este grupo presentó. ¿Qué tan avanzado está el sistema y qué tipo de entrenamiento o de equipo especial requiere? Evidentemente, si fuera un análisis relativamente fácil de realizar, abre un campo interesante desde el punto de vista del estudio de la flora que consumen los animales.

## **R. BOREL**

Vi funcionar el método hace poco en el norte de los Estados Unidos, en condiciones de agostadero. Estamos hablando de un período de entrenamiento del orden de un año, cuando la composición botánica es muy comple-

ja. Una vez obtenido ese entrenamiento, se requiere de un equipo básico de microscopía y de preparación de placas muy sencillo y aparentemente bastante confiable.

## **J. ZORRILLA**

Complementando lo expresado por el Dr. Borel, el período de entrenamiento está directamente relacionado con el número de ecotipos que componen la pradera en estudio. Entre mayor sea el número de estos, más tiempo le toma al investigador aprender a reconocerlas al microscopio. El

método se basa en la identificación de estructuras anatómicas de las células de las plantas en estudio a dos niveles: en el marco de referencia y en las heces de los animales pastoreando el ecosistema. El equipo de apoyo requerido se limita a un microscopio óptico y material de vidriería básico. Si bien es cierto que esta es una técnica útil y de gran apoyo en estudios de selección de dietas en pastoreo, también debe recordarse que es una metodología que en poco tiempo genera una enorme cantidad de preparaciones microscópicas, cuya lectura es lenta y tediosa.

## CAPITULO IV

### CONSERVACION DE FORRAJES

#### GRUPO DE TRABAJO No. 4

Dr. Diego González  
Dr. María Kass  
Dr. Félix Ojeda  
Dr. Claudio Wernli

# METODOLOGIAS PARA INVESTIGACIONES SOBRE CONSERVACION Y UTILIZACION DE ENSILAJES

*Claudio Wernli<sup>1</sup> y Felix Ojeda<sup>2</sup>*

## 1. Introducción

Los ensilajes, considerados como un caso particular entre los forrajes utilizados en la alimentación de rumiantes, presentan características intrínsecas que deben ser consideradas desde el momento mismo en que se decide su preparación, hasta su suministro a los animales, aspectos que serán abordados en el presente capítulo.

El ensilado constituye el método de conservación de forrajes más aplicable en el mundo, debido a su independencia de las condiciones climáticas en comparación a la henificación. Sin embargo, su uso se encuentra poco difundido, recurriéndose principalmente al secado natural del forraje, a

pesar de los inconvenientes climáticos. Ello, a juicio de los autores, se explica en gran medida por desconocimiento de la tecnología por parte de los productores en latinoamérica y otras regiones del globo. Se reconoce también que, para los sistemas de producción en los trópicos, la información es escasa, destacándose la importante y urgente necesidad de investigar sobre el tema. Una definición de pautas metodológicas para la investigación con ensilajes, materia del presente documento, contribuiría en el avance de estudios sobre el uso de forrajes ensilados en sistemas de producción con rumiantes.

El ensilaje se diferencia de los forrajes utilizados en otras formas (pastoreo, "soiling", heno secado al aire o por deshidratación artificial y

---

<sup>1</sup> Ing. Agr., Ph.D., Agrostólogo, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

<sup>2</sup> Lic. Quím., C. Dr. C., Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba.



procesado) en que incluye una fracción (hasta alrededor del 15% de su MS) consistente en productos derivados de la fermentación de carbohidratos no estructurales y proteínas del forraje, siendo por ello un alimento física y químicamente particular. Se distingue también por sus características nutricionales, ya que el valor nutritivo de los ensilajes es inferior al del mismo forraje suministrado en fresco o deshidratado, reflejado fundamentalmente en el menor consumo voluntario de los ensilajes y asociado a la fracción fermentativa volátil que poseen (Wernli, 1975). Por otro lado, la conservación de forrajes u otros alimentos en forma de ensilaje deriva en pérdidas de MS y en un deterioro del valor nutritivo del material originalmente ensilado; por ello, la tecnología de conservación debe tender a minimizar estos dos efectos. En consecuencia, los estudios sobre uso de ensilajes en sistemas de producción animal requieren de procedimientos, mediciones y metodologías especiales.

En las investigaciones con ensilaje corresponde analizar tres aspectos:

- Tipificación y caracterización físico-química del material original (cosechado, ensilado) y del producto final.
- Pérdidas inherentes al proceso de conservación.
- Valor nutritivo del ensilaje y respuesta animal.

## 2. Silos experimentales

Con el objeto de estudiar el proceso de ensilado, simulando la conservación de forrajes u otros alimentos en silos de campo (parva, canadienses, trincheras, torre, otros, con capacidad generalmente superior a 50 TM de materia verde), se han diseñado silos experimentales a escala reducida. En general, los principios básicos deben estudiarse en escalas reducidas y a partir de ellos pasar a dimensiones mayores. Las investigaciones deben iniciarse caracterizando, en primer lugar, el material a ensilar, teniendo en cuenta no sólo sus características químicas y bioquímicas, sino también su potencial de producción; sobre la base de estos conocimientos se deberá definir los tratamientos más factibles a ejecutar en las condiciones de un país o zona de interés económico, sin excluir aquellos tratamientos con potencial de constituirse en un avance científico. Se debe reconocer que es imposible pretender evaluar un número grande de tratamientos y especies forrajeras en silos de producción, como tampoco es factible resolver los problemas técnicos de ensilado con estudios de laboratorio.

El tipo de silo que se debe utilizar está en función del objetivo que se persiga con la investigación y de los medios que se disponga. Los silos experimentales pueden clasificarse en dos grupos:

- Silos de laboratorio, con capacidad aproximada de 1 a 30 kg de materia húmeda.

- Silos piloto, con capacidad entre 200 y 5 000 kg de materia húmeda, o de 0.5 m<sup>3</sup> con un óptimo frecuente de 2 m<sup>3</sup>.

### a. Silos de laboratorio

Con ellos se pretende realizar estudios precisos del comportamiento químico y bioquímico de los ensilajes en condiciones controladas.

Minisilos de laboratorio con 2 l de capacidad fueron descritos ya a comienzos de la década de 1940 (Odland *et al.*, 1941; Autrey *et al.*, 1947). Posteriormente, se presentó un silo consistente en una cañería de vapor (15 cm diámetro y 45 cm largo) implementado con émbolo para ejercer distintas presiones (Perkins y Pratt, 1951) o con tornillo de acero accionando un disco de madera con igual objetivo (Allred y Kennedy, 1956).

Entre los métodos más utilizados se encuentran los propuestos por Cullinson (1960) y por el Laboratorio de Alimentos de Theix (Celanie, 1960), los cuales se describen a continuación. El método Cullinson consiste en utilizar pomos de cristal de 300 a 500 ml de capacidad en los cuales se introduce el forraje a evaluar. La hermeticidad de estos silos se logra mediante un tapón de goma, con una válvula Bunsen en su centro y una contratapa metálica, parafinándose todos los bordes. El forraje previamente troceado, entre 1 y 2 cm, se coloca en una bandeja en cantidades suficientes para confeccionar de una

sola vez todas las réplicas de que constará el tratamiento, homogeneizándose lo más cuidadosamente posible. Seguidamente se procede a introducir el forraje en pequeñas porciones y se compacta con la ayuda de un mango de mortero, o similar, procurando que no queden espacios intersticiales, ni vacíos en la boca del frasco. De inmediato se hermetiza el silo y se guarda en un lugar ventilado y fresco, en ausencia de luz. Todos los tratamientos se realizarán al menos por triplicado, lo cual permitirá que posteriormente puedan ser analizados estadísticamente; es imprescindible en todos los casos preveer un ensilaje control como referencia.

El método de Theix utiliza bidones cilíndricos de 50 cm de diámetro por 150 cm de alto con tapas que los cierran herméticamente, teniendo una válvula inferior que permite extraer los posibles efluentes. El procedimiento es similar al anterior, aunque la capacidad es en este caso de 30 a 40 kg de forraje y la compactación se realiza con los pies. Es recomendable recubrir interiormente estos depósitos con polietileno para evitar el contacto directo del material con las paredes del recipiente.

También puede utilizarse tanques de 60 l de capacidad (60 cm de alto, 35 cm de diámetro), que permiten conservar aproximadamente 30 kg de forraje. Estos silos se recubren interiormente con polietileno, se les fija en el fondo una plancha de metal en forma de plano inclinado y se les abre un orificio en el extremo más bajo para

facilitar la salida de efluentes. Una vez llenados, se cierra la parte superior con polietileno, se le coloca una tapa de zinc o de madera y un peso de 20 kg como carga.

Otis *et al.* (1959) describieron una unidad para nueve minisilos de 3 kg de material cada uno, todo organizado en un complejo sistema de ambiente, luz y temperatura controlados, medición individual de presión neumática aplicada y colección automatizada de gases y líquidos exudados. Por otra parte, se han probado tubos de ensayo de vidrio de 3.8 x 20 cm para 100 g de material (Wilson y Wilkins, 1972), tubos de acrílico para 250 g de forraje, con tornillo para compresión a través de plancha circular (El Hag *et al.*, 1982), o silos revestidos de polietileno interior con acción física de pesas de cemento sobre pistón de madera para comprimir un espacio de 23 l de capacidad (Leask y Daynard, 1973). Los silos de laboratorio permiten una mejor colección de gases y líquidos producidos durante el ensilado, en comparación con silos mayores o de campo.

En las Figuras 1 y 2 se presentan planos descriptivos de dos tipos de minisilos de plástico o acrílico, probados satisfactoriamente.

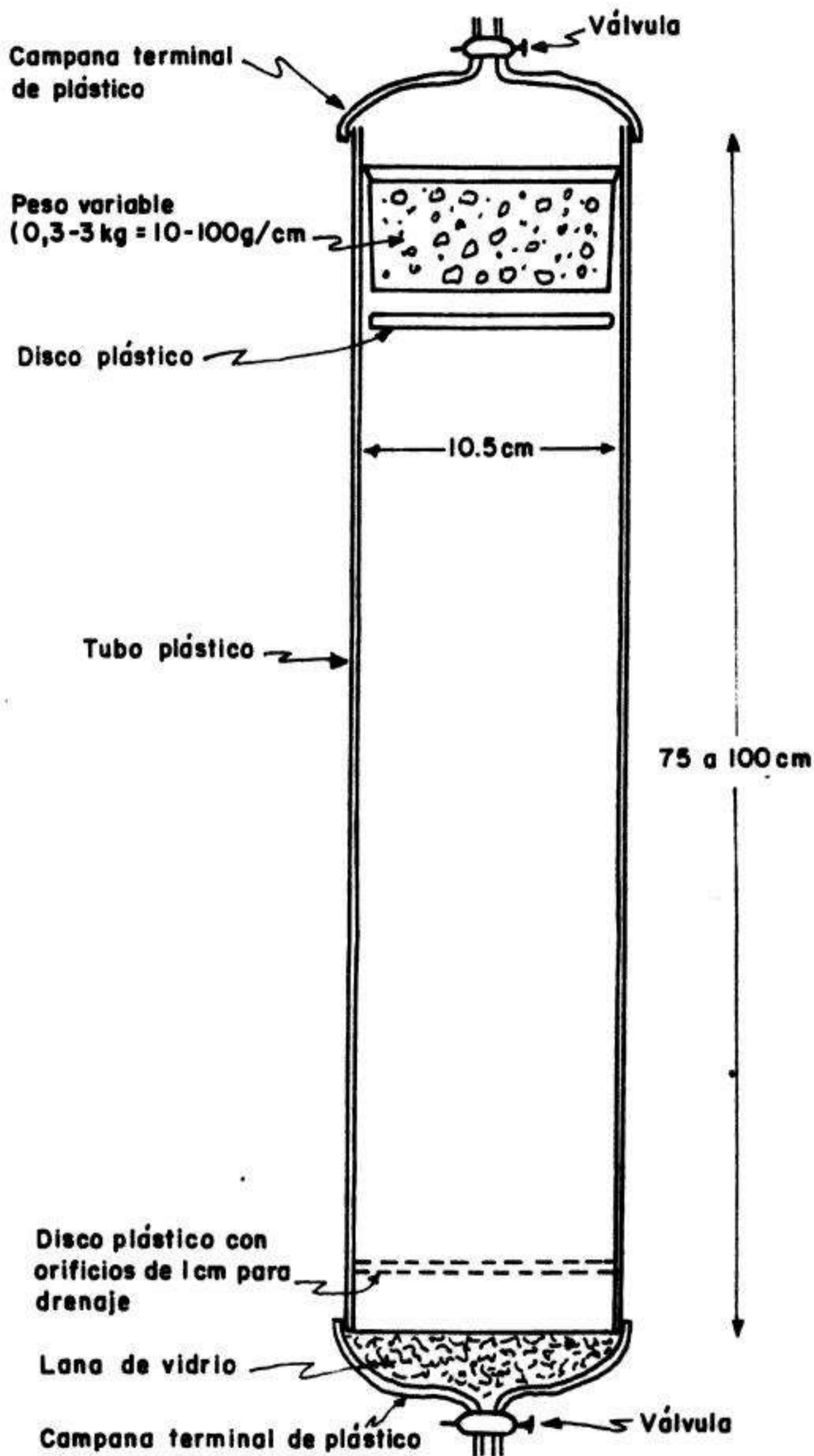
En la confección de silos de laboratorio, es importante considerar la impermeabilidad absoluta de sus paredes, disponer de un mecanismo de colección de gases y líquidos eliminados, y controlar factores exógenos claves, como son la compresión del

material ensilado, y la temperatura ambiental externa y su efecto sobre el proceso de fermentación del forraje.

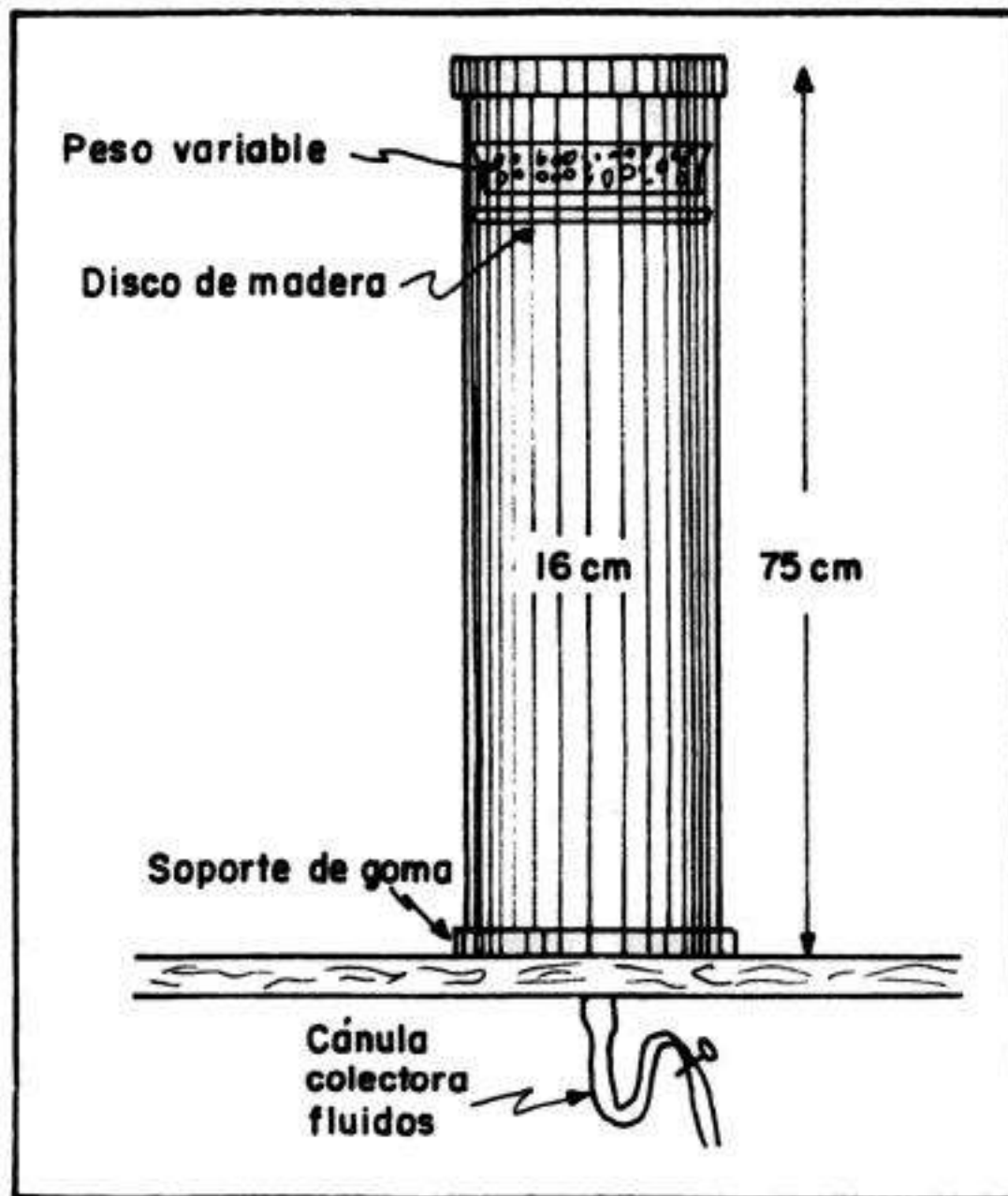
Sobre los ensilajes logrados es factible realizar todos los análisis necesarios para caracterizar las fermentaciones que han tenido lugar, realizar análisis estadísticos y modelaciones matemáticas y establecer así el comportamiento teórico de los tratamientos estudiados. Los estudios de laboratorio permiten también discriminar variantes y reducir el espectro a evaluar. La mayoría de los indicadores, cuando se evalúa su cinética en el tiempo, el efecto de dosis crecientes de conservantes, proporciones de gramíneas y leguminosas, etc., pueden ser descritos por ecuaciones de regresión lineal, cuadráticas, cúbicas o exponenciales, lo cual permite hacer inferencias apoyándose en estas modelaciones matemáticas.

## **b. Silos piloto**

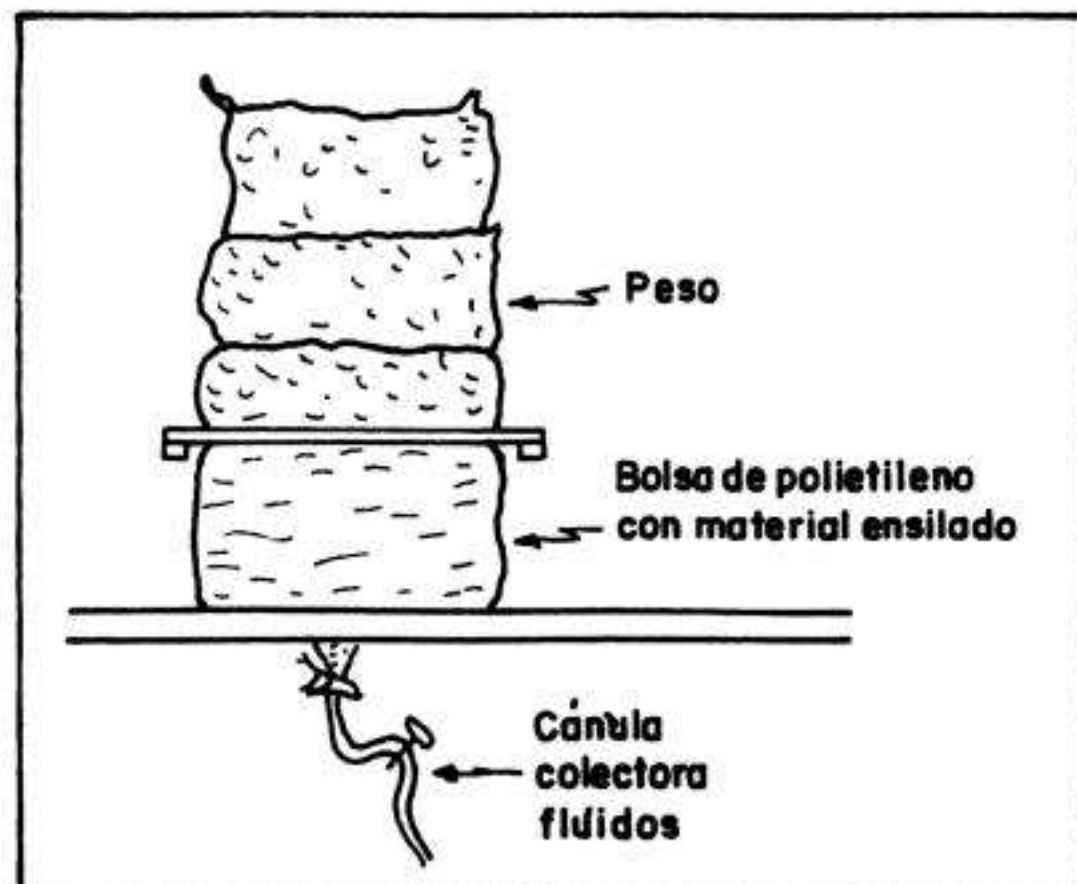
En la literatura se describen silos de mayor capacidad que los anteriores, usando otros materiales. Su construcción puede realizarse en concreto, madera, bolsas de nylon, butilo o cloruro de polivinilo (PVC), reforzadas estas últimas con estructuras metálicas exteriores. La forma más utilizada es la circular, entre 1 a 2 m de diámetro (Figura 3), aunque no se excluyen otras formas. Siempre es conveniente preveer un orificio de salida en la parte inferior que permita la evacuación de los efluentes. Cilindros de



**Fig. 1 Minisilo de laboratorio propuesto por Parker (1978)**



Silo de laboratorio: tubo de PVC con 5kg capacidad



Silo piloto: bolsa de polietileno con evacuación de vacío (15-20kg de material ensilado)

Fig. 2 Silos de laboratorio y piloto propuesto por Hargreaves *et al.* (1986)

acero de 0.90 m de diámetro y 1.50 m de alto con tapa atornillada y sellada con empaquetadura de goma e implementados con válvula de liberación de gases, han sido utilizados satisfactoriamente (Anderson y Jackson, 1970).

En la Figuras 2 y 3 se presentan planos de confección de silos piloto en polietileno sellado con capacidad aproximada de 20 ó 1 500 kg, respectivamente. El cloruro de polivinilo (PVC) constituye un material más adecuado, flexible y resistente que el polietileno para estos fines. Se han descrito silos de PVC para 2-3 toneladas, con equipos de colección de gases y líquidos, registradoras de cambios de temperatura y pH, incluyendo además un implemento portátil para llenar varios silos directamente desde la máquina cosechadora (Sprague y Taylor, 1965).

También es factible trabajar con silos de concreto (Figura 4), siendo necesario impermeabilizar las paredes interiores (vitrificación, aplicación de silicona). La compactación se ejecuta generalmente con los pies, y como elementos de fuerza vertical de compactación pueden usarse bolsas de agua, arena u otros. El sellado completo se logra cubriendo el espacio presente entre el borde externo de la tapa-peso circular y el borde interno del cilindro. Es recomendable cubrir el material ensilado con una carpa circular de polietileno previo a la colocación de la tapa, pudiendo además sellar las orillas con agua u otro material.

### c. Ventajas y limitaciones de los silos experimentales e investigaciones con ensilajes

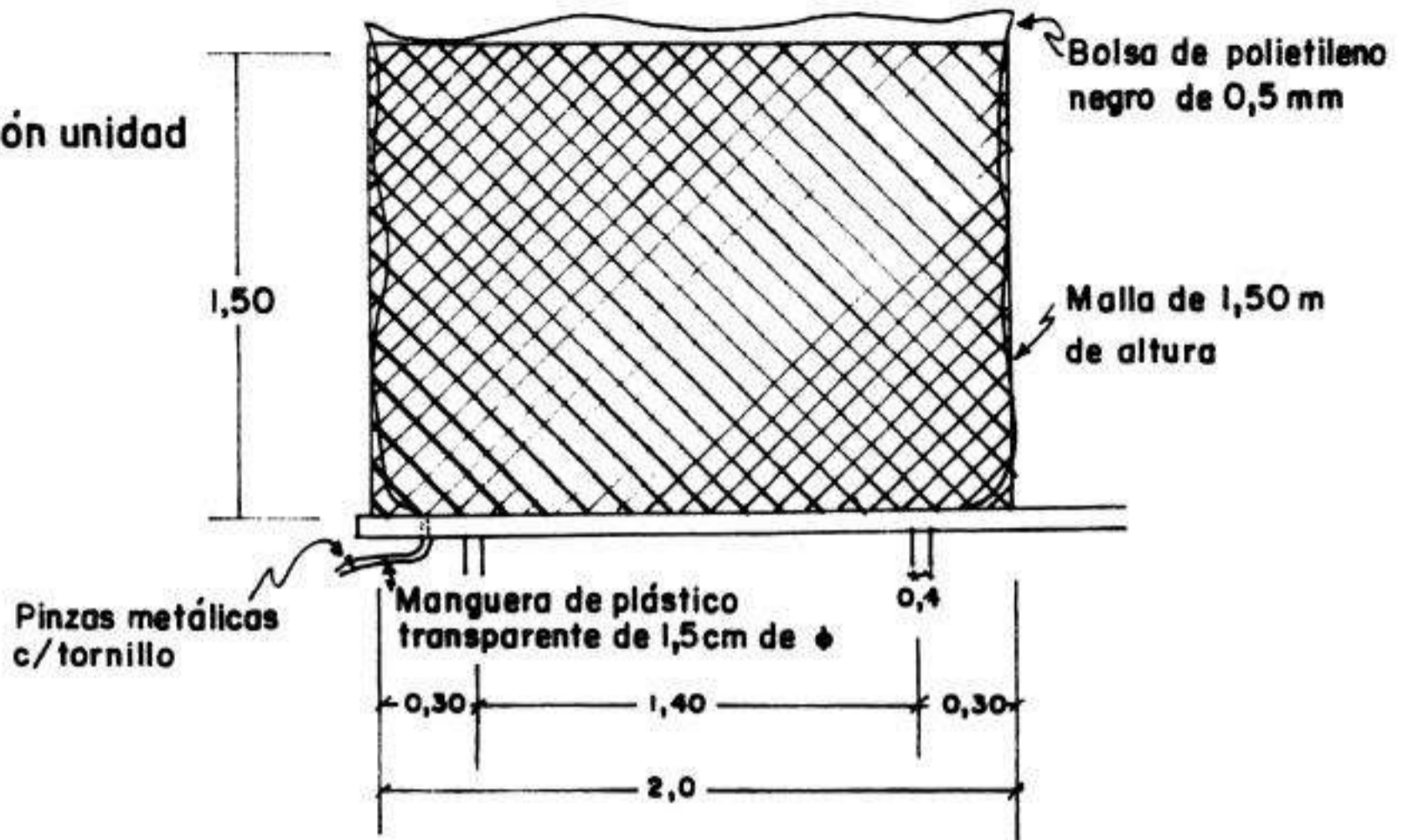
El uso de silos experimentales, por su menor tamaño en comparación con los silos de campo o comerciales, presenta las siguientes ventajas:

- Ampliación del número de tratamientos a estudiar.
- Poder contar con elevado número de repeticiones.
- Reducción de costos.

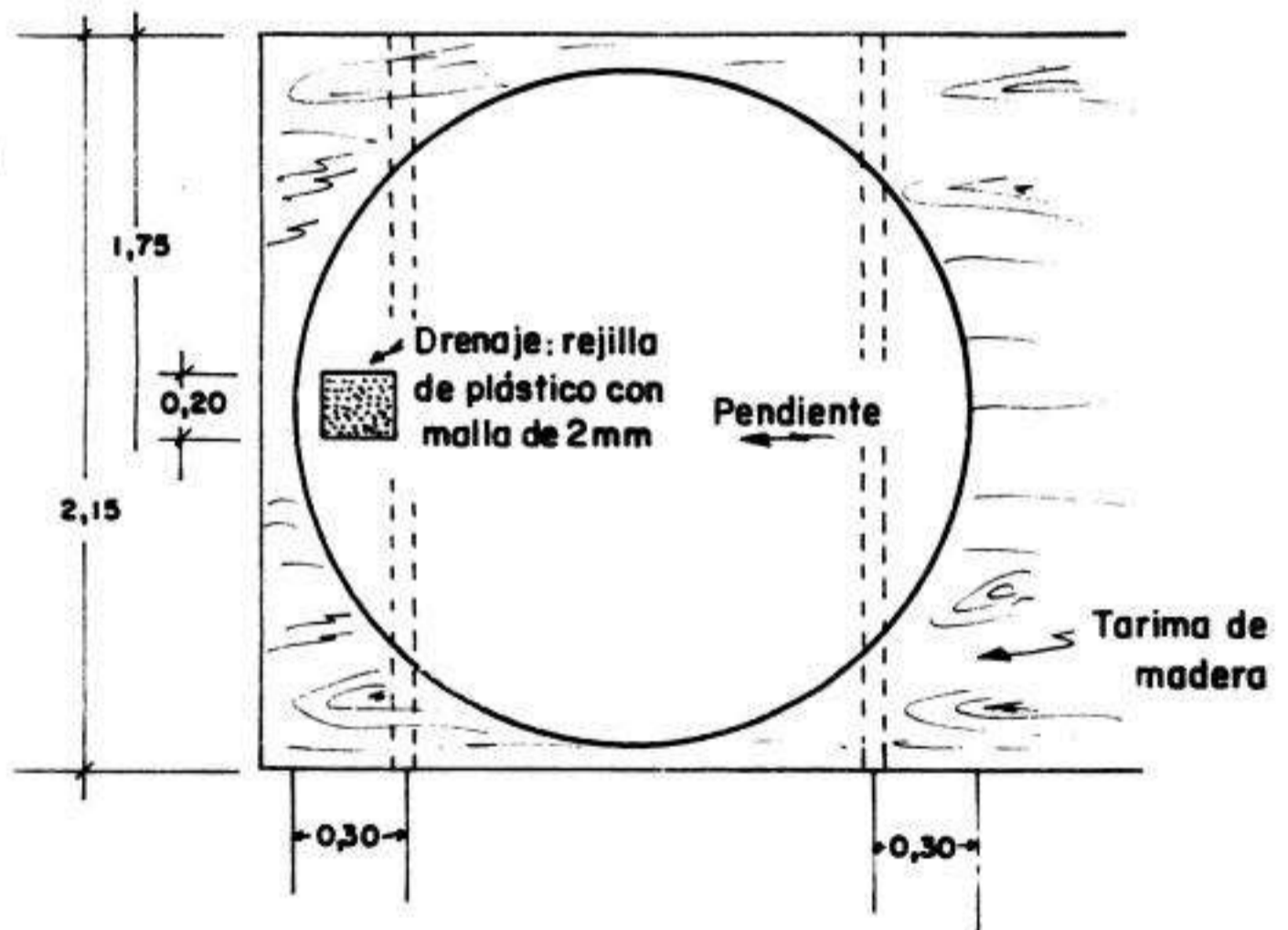
De acuerdo a los objetivos, podrían usarse diversos materiales para su confección. Los silos podrán ser de cualquier tamaño, siempre que se cumplan las condiciones básicas para silos experimentales, descritas anteriormente.

Constituyen herramientas de utilidad, permitiendo conocer procesos de fermentación, los sustratos generados, y la evolución microbiológica que ocurrirían en silos de mayor escala. Estudios comparativos entre silos de laboratorio (de 100 g ó 5 kg) y silos piloto (de 3 a 20 kg, respectivamente) (Hargreaves *et al.*, 1986; Wilson y Wilkins, 1972) permitieron concluir que existe estrecha concordancia entre los patrones de fermentación y los compuestos generados (N amoniacal, ácidos grasos volátiles, ácido láctico, etc.) en ambas clases de silo. Anteriormente, Autrey *et al.* (1947) observaron cambios fermentativos simi-

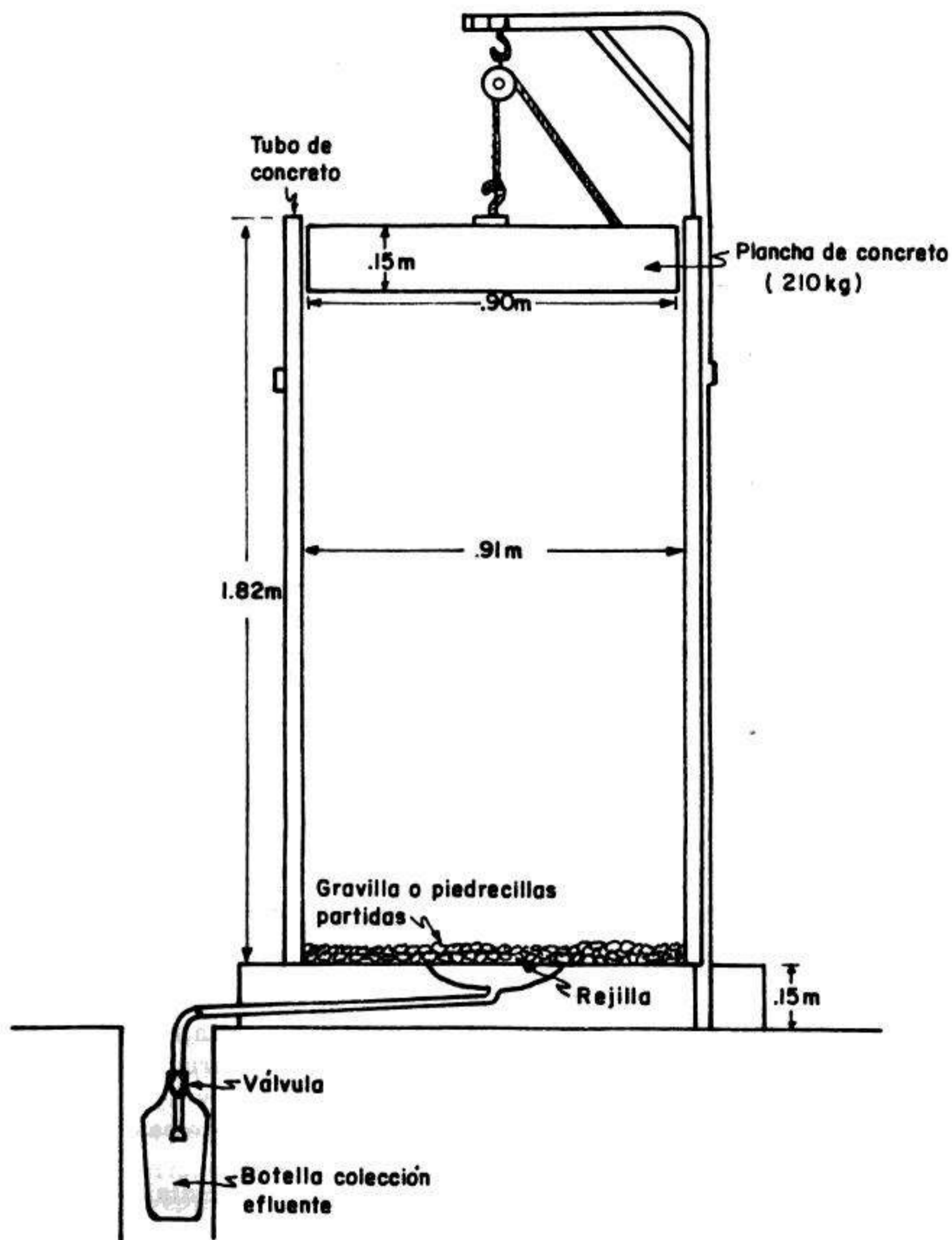
**A: Elevación unidad**



**B: Planta unidad**



**Fig. 3** Silo piloto de polietileno en estructura de malla de alambre, de  $4,3\text{ m}^3$  para aproximadamente 1500 kg de material. Sin escala (Wernli y Tamés, no publicado)



**Fig. 4 Silo piloto de concreto para 1000 kg de material ( según Barnett y Miller, 1951, descrito por Parker, 1978 )**



lares en minisilos de 2 l y en silos de campo. Los silos de laboratorio permiten además estudiar la evolución de las fermentaciones, analizando repeticiones completas en determinados momentos del proceso de ensilado, obviando así las alteraciones producidas al coleccionar las muestras y resellar las localidades de muestreo en silos de mayor capacidad. Se deduce de lo anterior que los silos experimentales permitirían estudiar la naturaleza de la fermentación surgida en forrajes y otros materiales ensilados, simulando el proceso y producto final que pudiera lograrse en un silo de mayor escala o de campo.

No obstante, estos silos presentan las siguientes limitaciones:

- Las pequeñas cantidades de material ensilado suelen ser poco representativas de lo conservado en silos de campo o comerciales.
- Una disponibilidad limitada de ensilaje impedirá su evaluación con animales, lo que tiene especial relevancia en los estudios con ensilajes orientados a los sistemas de producción animal.
- Las condiciones de ensiladura (velocidad de llenado, presión, temperatura ambiental externa, la dinámica térmica en el material, la relación masa ensilada a superficie, condiciones de anaerobiosis y otros) difieren sustancialmente de aquellas en silos de campo con capacidad usualmente sobre 20 TM. Ello redundará en que con silos

experimentales no puedan evaluarse pérdidas de MS y nutrientes. La comparación entre ambos silos descritos en la Figura 2 reveló pérdidas de materia seca considerablemente mayores con el silo de tubo PVC de 5 kg de capacidad, observándose que las diferencias en pérdidas de N entre ambos fueron variables, dependiendo del contenido de humedad del forraje y la compactación ejercida (Hargreaves *et al.*, 1986). Otras investigaciones (Anderson y Jackson, 1970) han encontrado pérdidas 19 veces mayores con silos de 4 000 kg en bolsas de polietileno, en relación con cilindros de acero para aproximadamente 500 kg de material.

Los silos experimentales pilotos de tamaño mediano permiten frecuentemente llevar a cabo evaluaciones nutritivas (consumo, digestibilidad *in vivo*, balance de N) de ensilajes con animales menores (ovinos, caprinos). Sin embargo, los estudios enfocados hacia la inclusión de ensilajes en sistemas de producción de leche, carne o lana, y que integren todos los aspectos que lo condicionan (preservación del forraje o material ensilado, pérdidas de material y respuesta animal) deberán hacerse necesariamente bajo aquellas condiciones y tipos de silos vigentes en dichos sistemas.

#### **d. Estudios sobre ensilajes a nivel predial**

Con el objeto de conocer el potencial nutritivo de los forrajes conservados y la calidad fermentativa del

proceso de ensilajes preparados en fincas y predios, la metodología a emplear será la del muestreo aleatorio y representativo en el perfil del ensilado, o a través de la colección de muestras sistemáticas y representativas durante su utilización.

En el primer caso, se utiliza una barrena confeccionada con un tubo de acero inoxidable, biselada en la punta, con un diámetro de 5 a 7 cm, y una altura de 150 a 160 cm, terminada en dos agarraderas que faciliten su extracción posteriormente del silo, y un nudo de acero capaz de soportar golpes de mandarina para la introducción de la barrena por este medio. El silo se divide en dos diagonales imaginarias, tomándose muestras en los extremos de ambas y donde se cortan. Este método permite realizar dos tipos de investigación, una por estratos y otra del ensilaje como un todo. Para la primera, teniendo en cuenta que la muestra se acumula de abajo hacia arriba, se reúnen las partes introducidas en la barrena a los 100, 50 y 30 cm según se desee y se confeccionan muestras de 1 a 1.5 kg. Para la segunda, se homogeniza todo el ensilaje extraído y se cuartea para tomar una muestra representativa.

Alternativamente, se puede proceder a un muestreo periódico, permanente y representativo del material extraído del silo, de acuerdo a las recomendaciones sobre tipificación de pasturas publicadas por RIEPT-CIAT.

Un sistema de calificación de los ensilajes analizados, en función de su

composición química y respuesta animal (consumo voluntario) se describe en el Anexo B.

### **3. Consideraciones generales sobre la colección de muestras**

Previo a la realización de cualquier experimento, es conveniente definir la estrategia de toma de muestras, con el objeto que estas sean representativas del material analizado. También cabe definir el programa de preparación de muestras compuestas, determinar las muestras a analizar y los análisis químicos y nutricionales que correspondan, lo cual es función de los objetivos del experimento. Es frecuente que los costos experimentales sean abultados debido a un exceso innecesario de muestras (repeticiones) tratadas, o de parámetros químicos con escasa utilidad dentro de los objetivos planteados.

Es recomendable guardar rutinariamente submuestras en un "archivo de muestras" para eventuales decisiones sobre análisis posteriores a hacer en el contexto del mismo experimento, o llevar a cabo futuros análisis para nuevas investigaciones.

### **4. Caracterización del material ensilado y de los ensilajes**

#### **a. Material original**

Las pasturas y forrajes deben tipificarse; la metodología para definir la altura, condición fenológica,

relación hoja:tallo, composición botánica, disponibilidad de MS, u otros, es la misma descrita para el estudio de estos recursos utilizados en pastoreo o "soiling", expuestas en las secciones sobre análisis químico de esta guía metodológica.

La colección de muestras de la pastura deberá hacerse lo más próximo posible a la fecha de corte, como máximo tres días antes de ensilar, a través de un muestreo aleatorio dentro de los sectores destinados al estudio. Si las parcelas son pequeñas (25-30 m<sup>2</sup>) se cortará 0.5 kg de forraje en cada uno de los puntos extremos y en el centro de la parcela, confeccionando una muestra única la cual se cuartea hasta obtener una muestra final de 1 kg, para determinación del contenido en materia seca y otros componentes. En parcelas mayores se puede adoptar el muestreo con marco de 0.25 m<sup>2</sup> en varios lugares al azar. Según los objetivos de la investigación, estos antecedentes permitirían adecuar la cantidad de conservante a utilizar, reconsiderar los tratamientos previstos y sobre todo asegurarse de que los objetivos propuestos se podrán alcanzar.

Cuando en los tratamientos a estudiar se prevean evaluaciones de forraje presecado, es conveniente, además de lo anteriormente señalado, confeccionar una curva de velocidad de deshidratación que permita conocer con la mayor aproximación posible las horas sol con las cuales se alcanzan los contenidos de materia seca desea-

dos. Para ello, se corta una franja de 2 x 5 m y se toman muestras de 0.5 kg cada una hora. Esta curva puede variar de un día a otro según las condiciones meteorológicas, pero disminuye considerablemente los errores de apreciación. Cuando se disponga de una estufa con un sistema de vacío acoplado, este muestreo se puede realizar el mismo día de la confección del ensilaje con un intervalo de precisión de 0.5 h, que equivale al tiempo que demora el análisis.

Este muestreo previo no excluye al que se debe llevar a cabo el mismo día que se realicen los ensilajes. El material cosechado o disponible para ensilar debe caracterizarse física y químicamente. Corresponde coleccionar muestras representativas del mismo, y la frecuencia y tamaño de muestreo dependerá de la homogeneidad del material. Se considera adecuada la obtención de una muestra de 200 a 400 g por TM de material (en fresco) por cada descarga de material en silos de campo. En silos pequeños y de laboratorio, sería recomendable el obtener muestras correspondientes a una mayor proporción del volumen conservado. Para la determinación del contenido de almidón en maíz para silo, las muestras deberán ser mayores por la distribución heterogénea de los granos en el material.

Las muestras deben colectarse al momento del ingreso al silo y rápidamente refrigeradas (5°C) o secadas en horno de ventilación forzada (Grassland Research Institute, 1961),

a fin de suspender la respiración endógena del forraje y el desarrollo y actividad microbiana. Las muestras húmedas podrán almacenarse individualmente o en forma común en bolsas plásticas impermeables. En la medida que aumente la acumulación de muestras, podrá procederse a mezclar acuciosamente el material y obtener una muestra compuesta representativa, cuidando que dicha muestra corresponda a una misma proporción del material reducido, repitiéndose el proceso hasta el término del llenado del silo. Una nueva muestra compuesta de todas las muestras colectadas constituiría la representante del alimento ensilado, no pudiendo constituir cada muestra repeticiones experimentales para fines de análisis estadísticos.

La cosecha y descarga del material son usualmente mecánicos; por ello es preciso evitar la contaminación con suelo durante el corte del forraje y compactación del material, siendo conveniente determinar el contenido de materia orgánica.

Entre los parámetros de caracterización física del material ensilado, es conveniente determinar el tamaño de las partículas y la densidad, ambas variables condicionantes de la facilidad de compactación y exclusión de oxígeno de la masa. La determinación del tamaño de partícula se puede realizar mediante un análisis de frecuencia simple. Sobre una muestra representativa del forraje, de 0.5 kg, se mide las partículas con una regla graduada, agrupándolas por clases preestablecidas y tomando la clase

más frecuente como el nivel de troceado del ensilaje. Alternativamente, el tamaño de partículas puede medirse mediante el tamizado seco (Tetlow, 1974) y expresarse como módulo de finura (American Society of Agricultural Engineers, 1967). Bosma y Dervedde (1980) y Gale y Knight (1980) han descrito nuevas metodologías en forrajes secos y húmedos.

Las muestras pueden molerse con tamiz de 1 mm de apertura; los parámetros químicos y nutricionales a medir se indican a continuación y la metodología de determinación es la misma ya descrita en esta guía metodológica para otras clases de forraje (ver capítulo sobre análisis químico de forrajes).

Componentes a expresarse en base seca:

- Humedad
- Cenizas
- Extracto etéreo
- Proteína cruda (N total)
- Proteína verdadera
- N soluble e insoluble en agua
- Energía bruta
- Carbohidratos no estructurales totales
- Almidón
- Carbohidratos solubles
- Componentes estructurales (FDN, FDA, celulosa, hemicelulosa, lignina, sílice)
- Digestibilidad in vitro de la MS, MO, N y energía (valor "D")
- pH
- Capacidad tampón ("buffer")
- Ácidos orgánicos

De acuerdo a los objetivos, podría también determinarse el contenido de elementos minerales o vitaminas.

Los principales factores que caracterizan la ensilabilidad de un material son: a) Contenido de materia seca, b) Concentración de carbohidratos solubles, c) Compuestos nitrogenados y d) Capacidad tampón. Otros componentes del vegetal actúan como cofactores, como son los carbohidratos estructurales y los minerales; por lo tanto, es necesario conocer adecuadamente los mismos en relación a la conservación del material.

**(1) Materia seca (MS).** El contenido mínimo de MS que debe poseer un forraje para que no genere efluentes, es de 25% (Woolford, 1978). Desde el punto de vista microbiológico y bioquímico, la proporción de la MS actúa como reguladora del crecimiento de las bacterias, evitando la germinación de Clostridias (Wieringa, 1977), reduciendo y mejorando las fermentaciones (Sauvant y Gouet, 1979) y, desde el punto de vista nutricional, induciendo un mayor consumo de los ensilajes (Marsh, 1979)

**(2) Carbohidratos solubles (CHS).** Los glúcidos o carbohidratos solubles se determinan según se describe en el Anexo A. Su expresión en base húmeda permite evaluar en mejor forma su contribución a la preservación fermentativa rápida del material. Tan importante como la concentración de estos compuestos en el material es la rapidez con que los mismos se encuentren en condiciones

de ser empleados, lo que en términos prácticos se traduce en lograr una rápida plasmólisis del contenido celular y una anaerobiosis adecuada del material (Devuyst y Vanbelle, 1964).

La respiración y la actividad microbiana utilizan principalmente CHS de la planta, sustrato de especial consideración en los estudios con ensilajes, por constituir la materia prima de la fermentación anaeróbica que permite la preservación ácida del material. Principalmente, estos son los fructosanos, la sucrosa y con contenidos menores de los monosacáridos glucosa y fructosa. Su concentración en la planta depende de la especie forrajera, cultivar, estado de desarrollo, momento del día, fertilizantes y clima (intensidad de luz y temperatura); algunos de estos registran mayores variaciones que otros (McDonald, 1981). El contenido de fructosanos en pastos aparentemente decrece a medida que la temperatura media ambiental es mayor. La variación notoria entre días, y particularmente dentro del día, en el contenido de azúcares y carbohidratos fácilmente fermentables del forraje, hace necesario que la colección de muestras sea permanente y así representativa de la composición del material que ingresa al silo.

En el caso de los forrajes tropicales, el contenido de CHS es sumamente bajo y frecuentemente nulo (Ojeda *et al.*, 1987) constituyendo una limitante en su conservación como ensilaje. La concentración mínima de glúcidos solubles que debe tener un

forraje para garantizar una buena conservación es de 12 g/kg materia seca. Cuando se aplican aditivos al momento de ensilar, es importante cuantificar el aporte en CHS de estos (ej. miel o melaza, u otro aditivo azucarado) sobre la masa ensilada.

**(3) Compuestos nitrogenados.** Estos inciden sobre la calidad fermentativa y sobre el valor nutritivo. En el forraje fresco, entre el 75 y 90% del nitrógeno total se encuentra como proteína, mientras que el resto está en forma no proteica (Oshima y McDonald, 1978). Sin embargo, durante la conservación esta proporción cambia considerablemente. En un ensilaje mal conservado, 75% o más de nitrógeno puede solubilizarse, principalmente en forma de amoníaco (Sauvant y Gouet, 1979). Además de la pérdida que representan en el valor nutritivo de la proteína, estos cambios se oponen a la disminución del pH, dificultando la estabilización del ensilaje.

Con respecto al valor nutritivo, cuando un forraje tiene menos de 7% de proteína cruda en base seca, el consumo y la digestibilidad de los nutrientes se ven afectados por la falta de nitrógeno en el rumen. Aún más, si este se encuentra parcialmente solubilizado, la eficiencia de su utilización disminuye (Demarquilly, 1983).

Las investigaciones que se realicen con el objetivo de caracterizar los compuestos nitrogenados deben tener en cuenta ambas fracciones (insoluble y soluble), para que sirvan de referencia durante el estudio de la evolu-

ción que posteriormente sufren durante la conservación.

**(4) Capacidad amortiguadora o tampón.** Se define como capacidad amortiguadora, la cantidad de mili-equivalentes de H<sup>+</sup> gastados para llevar el pH de un forraje o un ensilaje desde 6.0 hasta 4.0 (McDonald y Henderson, 1962; Bousset *et al.*, 1977). Este indicador proporciona un criterio de la resistencia que hacen los componentes orgánicos e inorgánicos presentes en el forraje a la acidificación durante la conservación. Una evaluación de los ácidos orgánicos en forrajes verdes fue hecha por Jones y Barnes (1967).

Las técnicas propuestas para la estimación de este indicador, se dividen en dos grupos: las que se ejecutan en fresco, y las que trabajan sobre el material seco y molido. En las primeras, el material se macera durante 18 horas a 4°C, se filtra el sobrenadante y se titula con HCl 0.1 N hasta pH 3 para eliminar todo el bicarbonato presente como CO<sub>2</sub>; posteriormente, se lleva a pH 6 con NaOH 0.1 N, comenzándose a medir el volumen gastado hasta llegar a pH 4 (Playne y McDonald, 1966). Bousset *et al.* (1977) al comparar otras formas de preparación de las muestras, (maceración sobre la muestra molida y molienda conjuntamente con el líquido de maceración), encontraron diferencias en los valores obtenidos entre especies, si bien concluyen que el método original propuesto es el más conveniente.

Los autores que preconizan los análisis sobre la muestra molida y seca, consideran que se facilita la manipulación de las mismas. Weise (1972) maceró durante 30 minutos y valoró con ácido láctico 0.1 N hasta pH 4; Dulphy (datos no publicados) maceró también durante 30 minutos pero valoró con HCl 0.02 N en tres etapas (hasta pH 4.2, 4.0 y 3.8), dejando transcurrir 30 minutos entre cada etapa. Esta última es la que parece prestarse más al trabajo en serie del laboratorio.

## **b. Ensilajes**

El procedimiento de colección y preparación de muestras es también aquí muy importante. El ensilaje, por ser un producto obtenido por fermentación, es decir en condiciones de anaerobicidad, tiene como primer inconveniente que desde el momento mismo que se pone en contacto con el aire su composición como un todo comienza a transformarse. Los primeros elementos en sufrir oxidación son los pigmentos de la planta, los cuales cambian su coloración verde a diferentes tonalidades, que van desde verde hasta marrón oscuro, lo que hace imprescindible que cualquier interpretación sobre esta particularidad deba efectuarse en el momento mismo de apertura del silo. Seguidamente se produce una inactivación de la flora anaeróbica, hasta ese momento predominante, y se comienza a desarrollar otra de tipo aeróbica, la cual tomará como sustratos nutritivos los carbohidratos solubles residuales, los ácidos orgánicos formados y el

amoníaco, provocando cambios sustanciales en la composición original de los ensilajes. Estas variaciones se hacen más notables en función de la temperatura y del tiempo que permanezca la muestra sin analizar, por lo que cualquier imprecisión o demora en el inicio de los análisis deseados pueden provocar resultados errados.

El volumen de cada muestra y la metodología de reducción en muestras compuestas, son iguales a lo descrito para el material originalmente ensilado. Las muestras simples no pueden considerarse como repeticiones para fines de análisis estadísticos; en cambio, cada silo completo constituirá una repetición dentro de un tratamiento.

Las muestras deben colectarse diariamente en el momento de extraer el material del silo y durante el período completo de utilización del ensilaje, dividiendo cada muestra en dos fracciones: una preservada en congelación en bolsas plásticas impermeables y la otra secada en horno. En caso de que las muestras no puedan ser analizadas inmediatamente después de colectadas, deberán congelarse rápidamente a  $-15^{\circ}\text{C}$  y, en caso de muestreo en el campo, deberá contarse con una nevera adecuada con hielo seco.

Varios análisis deben hacerse en la muestra húmeda, pudiendo realizarse otros en la muestra seca. Parker (1978) describe un esquema de preparación y trabajo con muestras húmedas (Figura 5). La preparación de las muestras húmedas para aná-

lisis químico puede llevarse a cabo en molino de bolas (Grassland Research Institute, 1961), tal y como obtenidas o previa mezcla con nitrógeno líquido o hielo seco picado; aunque el hielo seco impedirá la determinación del pH. Las muestras secas pequeñas pueden molerse manualmente o usando una picadora-mezcladora de laboratorio o cocina, pero en todos los casos la homogenización imperfecta es un problema con muestras frescas. Usualmente se procede a la extracción por presión del líquido retenido en el ensilaje, ya que todos los componentes se obtienen en mayor concentración. No obstante, cuando se trata de ensilajes con altos contenidos de MS o presecados es factible extraerlos por maceración: filtrar 100 g de ensilaje en 1 l de agua a 4°C durante 16 horas, realizando los análisis en el filtrado.

Las muestras que se han secado en horno deben molerse a través de un tamiz con malla de 1 mm. Los análisis (N total y proteína, azúcares, componentes estructurales, otros) pueden hacerse sobre muestras secadas a temperaturas que no interfieran con la composición de la entidad química analizada (ej. lignina, proteína), facilitando así la molienda y representatividad de la fracción sometida a análisis de laboratorio.

La caracterización de laboratorio de los ensilajes comprende las siguientes propiedades:

- Físicas
- Químicas, bioquímicas y nutricionales

- Organolépticas
- Microbiológicas

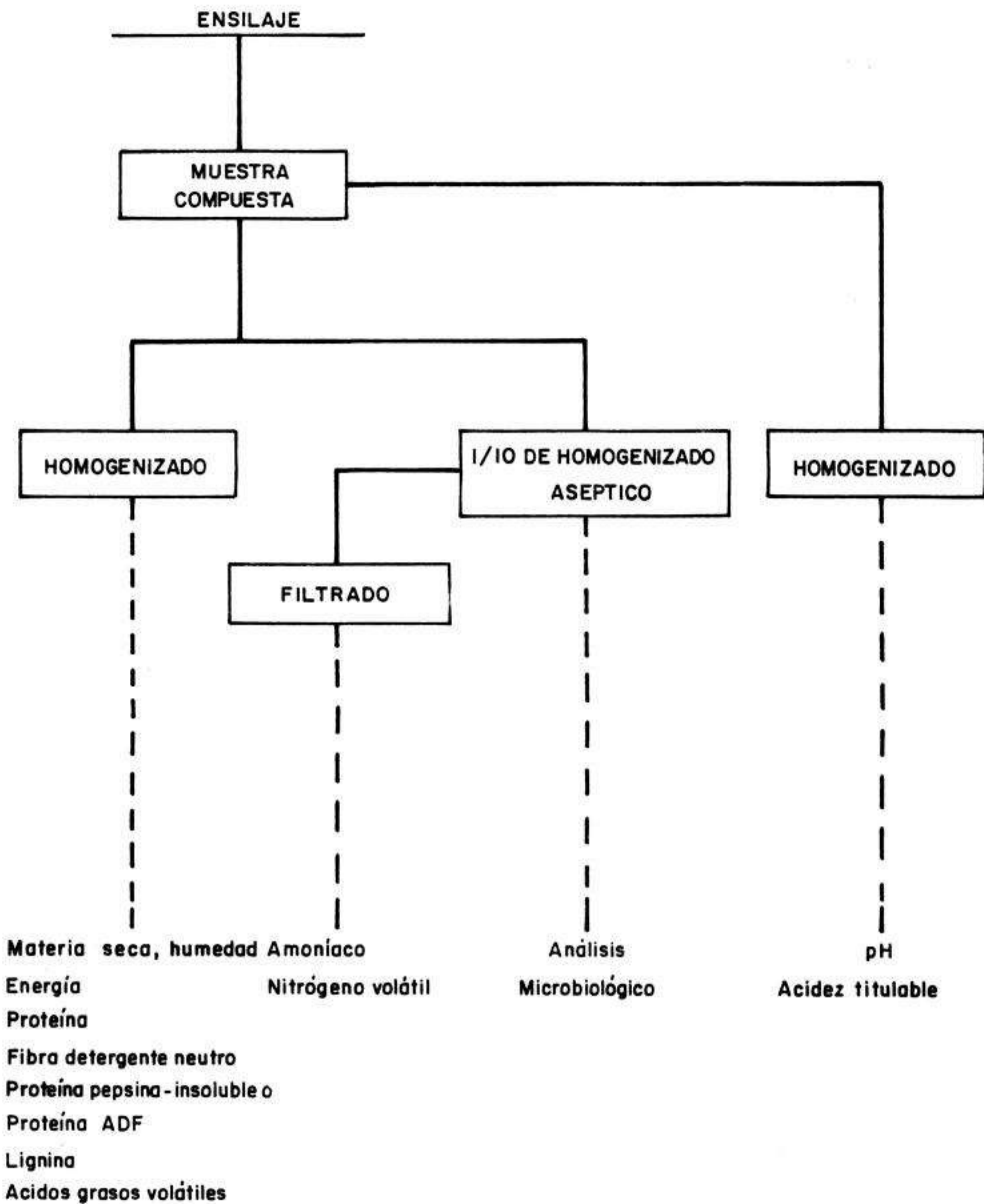
Se indican a continuación los análisis a realizar, citando las referencias sobre aquellas técnicas específicas para ensilajes.

### (1) **Propiedades físicas**

(a) **Densidad de ensilaje.** Está influenciada por el grado de compactación, altura del silo y contenido de MS (Edner, 1986). Uno de los procedimientos más usados para determinar la densidad consiste en dividir la masa conservada entre el volumen que ocupa, lo cual ofrece una estimación del grado de compactación. Mediciones hechas por los autores en silos horizontales, indican valores de entre 450 y 600 kg de materia verde/m<sup>2</sup> con forrajes de climas templados, y de entre 350 y 400 kg de materia verde/m<sup>3</sup> para forrajes tropicales; sin embargo, se requiere mayor información al respecto.

(b) **Temperatura.** Puede emplearse un instrumento hermético portátil para medir temperatura y contenido de oxígeno a distintas profundidades de la masa ensilada (Rees, 1981). Alternativamente, se recomienda el empleo de termómetros basados en termopares, tanto por su rapidez como por su exactitud y facilidad que brindan para realizar las mediciones. De no ser posible, la temperatura se puede medir con un termómetro de mercurio siempre





**Fig. 5 Esquema de tratamiento y análisis de muestras de ensilaje en fresco (Parker, 1978)**

y cuando la lectura se pueda realizar sin extraerlo del silo.

La determinación se debe efectuar tomando dos o tres puntos al azar, teniendo la precaución de retirar los primeros 10 cm superiores del silo. Mediante la introducción de una cala de metal se profundiza hasta no menos de 30 cm y se coloca el órgano de medición en el fondo de la perforación, rellenando nuevamente con el material extraído. La lectura debe realizarse luego de esperar 3 minutos, para que se restablezca el equilibrio de temperatura. Mejores resultados serán obtenidos con termómetros insertos permanentemente en la masa ensilada, desde el momento de sellado del silo.

Temperaturas superiores a los 40°C durante la estabilización del ensilaje indican que la compactación no se ha ejecutado correctamente y que existe reentrada de aire. Una temperatura igual o muy ligeramente superior a la ambiental indica una adecuada estabilización del proceso fermentativo.

En el ensilaje extraído del silo se pueden producir elevaciones de temperatura por inicio de un proceso degradativo, denominado deterioro anaeróbico, provocando cambios sustanciales en la composición química, bioquímica y microbiológica original. De aquí la importancia de congelar las muestras o analizarlas inmediatamente

después de ser colectadas.

**(c) Tamaño de partículas.** Las metodologías para realizar esta medición han sido descritas para el material original, y son igualmente válidas para los ensilajes. El tamaño óptimo se sitúa entre 1 y 2 cm, aunque para bovinos puede llegar hasta 4 cm. En el caso de los forrajes tropicales este aspecto reviste particular importancia dada la rusticidad y lignificación que presentan los mismos, lo que dificulta su compactación.

**(2) Propiedades químicas, bioquímicas y nutricionales.** La descripción de las técnicas usadas en la determinación de algunos parámetros cualitativos de los ensilajes ha sido publicada por Parker (1978) y se adjunta en el Anexo A. Varios procedimientos son iguales a los usados para otros tipos de forraje, indicándose a continuación sólo aquellos específicamente empleados para ensilajes. Los parámetros a cuantificar son los siguientes:

**(a) Materia seca (MS).** Algunos compuestos orgánicos normalmente presentes en los ensilajes se volatilizan en mayor o menor proporción según las condiciones de temperatura y tiempo de secado a las cuales sean sometidos. Esto implica, por una parte, una subestimación del contenido real de MS del producto y, por otra, errores en los cálculos de todos los otros componentes que se determinan en base seca.

El método más empleado para determinar MS ha sido el de destilación con tolueno (Dewar y McDonald, 1961), sugiriéndose posteriormente la destilación con una mezcla de xileno-anil alcohol (Anexo A). También se puede utilizar cromatografía gaseosa, usando isopropanol con solvente extractivo y n-butanol o metanol como estándares internos (Burdick y McHan, 1982; Huida, 1982).

La complejidad de la destilación con tolueno y la poca adaptabilidad que presenta a los análisis en serie la hacen poco práctica. Es por ello que en los últimos años se ha pregonizado el establecimiento de ecuaciones que permitan estimar las pérdidas y establecer correlaciones capaces de subsanar este inconveniente. Una de las más completas hasta el presente es una propuesta para ensilajes de climas templados (Dulphy *et al.*, 1975), la que puede considerarse como válida para los de ambientes tropicales pues se basa en indicadores bioquímicos individuales, aunque esto deberá corroborarse. Alternativamente, es factible calcular el porcentaje de MS real de los ensilajes determinando el contenido de ácidos y bases volátiles y sumando estos a la MS determinada en horno. El secado en hornos de microonda, al igual que por calor con ventilación forzada, subestima el contenido de MS por pérdida de los compuestos volátiles (Narasimhalu *et al.*, 1982), por lo

que las correcciones antes descritas son necesarias.

Una clasificación de ensilajes y otros forrajes conservados en términos de su contenido de MS, propuesta por Ojeda *et al.* (1984) para los rangos de MS generalmente encontrados, se presenta en el Cuadro 1.

- (b) **pH.** Determinación directa sobre la muestra fresca macerada usando un medidor de pH con electrodo apropiado (Anexo A). Deben evitarse las mediciones con papel indicador dada la poca precisión del mismo y por la naturaleza coloreada de los jugos vegetales, lo cual enmascara el resultado correcto del análisis.
- (c) **Cenizas.**
- (d) **Nitrógeno total.**
- (e) **Nitrógeno soluble en agua.** Determinado sobre 5 ml de jugo extraído por presión de los ensilajes, según el método clásico de Kjeldahl (AOAC, 1965).
- (f) **Nitrógeno insoluble.** Prueba de insolubilidad en pepsina (Anexo A)
- (g) **Nitrógeno no proteico.**
- (h) **Nitrógeno volátil.** Con ácido bórico y destilación en Kjeldahl (Anexo A).

**Cuadro 1. Clasificación de los métodos de conservación según porcentaje de materia seca**

Tipo de conservación	% MS
Ensilado directo	< 30
Ensilado ligeramente marchitado	30 - 45
Ensilado presecado	46 - 65
Henaje o henilaje	66 - 80
Heno	> 80
Forraje deshidratado	> 90

(i) **Amoniaco.** Determinado por microdifusión (Conway, 1957), o por destilación (International Standard, 1979); la primera es más rápida y precisa. Alternativamente, se propone la medición con electrodo específico sobre la muestra tratada con hidróxido de sodio (Anexo A). Recientemente se ha demostrado que el uso de un electrodo gas-selectivo (Galletti y Piccaglia, 1983a) ha dado resultados comparables a los obtenidos con los métodos enzimáticos o por microdifusión de Conway (1957).

(j) **Aminas y amidas.**

(k) **Proteína verdadera (total, degradable, no degradable).** Se recomienda el uso de fijador coloreado en muestras frescas de ensilajes y forrajes (Wilson, 1980).

(l) **Carbohidratos solubles y azúcares residuales.** El método más factible para su extracción es el propuesto por Jarrige (1961), que consiste en una primera solubilización de la muestra seca y molida

en agua a 40°C durante 1 hora, seguida por una filtración y realización posterior de otra solubilización del residuo durante 15 minutos. También pueden determinarse con ferrocianida alcalina (Hagerdorn y Jensen, 1923), por tratamiento con fenol y ácido sulfúrico (Anexo A), o mediante las técnicas analíticas con antrona (Johnson *et al.*, 1964; Somogyi 1952).

(m) **Carbohidratos no estructurales totales.** Por poder reductor de glucosa (Smith, 1969).

(n) **Componentes estructurales.** FDA, FDA, celulosa, hemicelulosa, lignina, sílice.

(o) **Acido láctico.** Oxidación con sulfato cérico (Elsden y Gibson, 1954) o por fotometría con  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  y p-hidroxidifenil (Barker y Summerson, 1941; Anexo A). También se han descrito y usado métodos colorimétricos (Harper y Randolph, 1960) y enzimáticos (Noll, 1974).

Este último con la ventaja de su rapidez.

**(p) Ácidos grasos volátiles ( $C_1$ - $C_9$ , ácidos "n" e "iso" ácidos).** La técnica antigua de Lepper y Fleg (1938), por destilación fraccionada, produce resultados imprecisos y agrupa varios ácidos como un todo; además, sobreestima los valores de ácido láctico. Sin embargo, por su cristalería y reactivos convencionales está al alcance de todos los laboratorios.

Los métodos actualmente más usados utilizan cromatografía gaseosa (Jouany, 1981) o gas líquido (Martillotti y Puppo, 1985; Siegfried *et al.*, 1984; Jones y Kay, 1976). También puede hacerse la determinación conjunta de ácidos grasos volátiles y ácido láctico por cromatografía gaseosa sobre el jugo extraído del ensilaje (Brack *et al.*, 1982; Block y Weissbach, 1982; Centre de Recherches Zootechnie et Veterinaire, 1981; Galletti y Piccaglia, 1983b). El uso de la columna apropiada es importante y este aspecto ha sido tratado por Parker (1978; Anexo A). Cabe citar también los procedimientos comprendidos en una técnica isocrática simple (Canale *et al.*, 1984) y la esterificación de los ácidos a 80°C o su separación en tubo capilar con cuarzo (Osl y Ginzinger, 1986).

**(q) Alcoholes (metanol, etanol).** Por cromatografía gaseosa, inyectando directamente extracto acuoso

de ensilaje (Centre de Recherches Zootechnie et Veterinaire, 1981; Peteva-Vancheva y Suren, 1983).

**(r) Energía bruta (EB).** Por combustión en bomba calorimétrica adiabática (Terry y Osbourn, 1980), en muestras envueltas en polietileno (Anexo A), o con adición de ácido benzoico (Grassland Research Institute, 1961).

El valor calórico (EB) de los ácidos grasos volátiles es mayor que el del resto de la MS y materia orgánica, siendo el valor calórico de los ensilajes 7.5% mayor en comparación con forrajes verdes de similar contenido de proteína cruda (Terry y Osbourn, 1980). En consecuencia, el análisis de muestras secas al horno subestima el contenido de MS y su valor calórico. Alternativamente, aunque probablemente con menor precisión, se sugiere corregir el valor calórico de la MS determinada en horno, aplicando factores de corrección por la mayor EB de aquellos ácidos grasos y bases volátiles (ej. 14.6; 24.9; 29.8 KJoules/g para ácidos acético, butírico y etanol), en relación a la EB del almidón, fructosa, proteína o cenizas (17.7; 15.7; 24.6 y 0.0, respectivamente).

**(s) Energía digestible y energía metabolizable.** Es imprescindible que estos valores se determinen considerando el contenido real de MS del ensilaje y su valor calórico (EB). Cabe hacer notar,

sin embargo, que su estimación, basada en la digestibilidad *in vitro* de la MS (DIVMS) o en el contenido de fibra detergente neutro (FDN) o fibra detergente ácido

(FDA), todos corregidos por componentes volátiles del ensilaje, es poco precisa, con valores de  $r^2$  que oscilan entre 19% y 77% (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Ecuaciones de predicción de materia orgánica digerible (MOD) y de energía metabolizable (EM) en ensilajes.**

	n	$r^2$	DSR
MOD (%) = 25.04 + 0.605 DIVMS <sup>1</sup> por celulasa detergente neutro	68	62.6	2.93
MOD (%) = 26.55 + 0.651 DIVMS por celulasa pepsina/HCl	55	67.3	3.23
MOD (%) = 8.10 + 0.881 DIVMS	56	76.9	2.70
MOD (%) = 98.30 + 1.040 FDA modificada	79	53.6	3.64
MOD (%) = 96.30 + 0.583 FDN	77	46.3	3.97
MOD (%) = 95.20 + 0.883 FDA	79	48.4	3.84
EM <sup>2</sup> = 4.35 + 0.092 DIVMS por celulasa detergente neutro	68	25.6	0.97
EM = 4.51 + 0.100 DIVMS por celulasa pepsina/HCl	55	34.6	0.97
EM = 1.90 + 0.132 DIVMS	56	37.5	0.94
EM = 15.97 + 0.175 FDA modificada	79	32.4	0.94
EM = 14.91 + 0.084 FDN	77	20.3	1.03
EM = 14.55 + 0.122 FDA	79	19.2	1.03

<sup>1</sup> Digestibilidad *in vitro* de la materia seca.

<sup>2</sup> Energía metabolizable, MJ/kg de MS.

Fuente: Barber *et al.* (1984).

(t) **Digestibilidad *in vitro* de la MS, MO, proteína y energía.** La predicción de estos parámetros en ensilajes de climas templados no ha sido del todo satisfactoria (Cuadro 2), siendo posiblemente menos precisa para ensilajes de zonas tropicales.

(u) **Capacidad amortiguadora o tampón.** La utilización de los componentes en el forraje, que proporcionan la energía, proteína y minerales requeridos para el desarrollo de los microorganismos, provoca cambios en la composición original y la capacidad amortiguadora del forraje, que en general es 1.5 a 3 veces superior en los ensilajes con respecto a los forrajes que les dieron origen. El incremento que se produce en los aniones orgánicos, conjuntamente con los inorgánicos (ortofosfatos, sulfatos y cloruros), da lugar a un equilibrio dinámico en los ensilajes, muy superior con respecto al forraje, donde los primeros se encuentran en una proporción menor. De igual manera, el incremento notable que se produce en el amoníaco liberado y de otros productos de la proteólisis aumenta la capacidad amortiguadora en los ensilajes. Se señalan como cofactores, la especie, la calidad de la fermentación y conservantes utilizados (Bousset *et al.*, 1977; Playne y McDonald, 1966). Para su determinación se recomiendan los mismos procedimientos y métodos descritos para el material original.

(v) **Contenido de oxígeno en la masa ensilada.** Existen aparatos y métodos para estimar la estabilidad aeróbica asociada a la cesación de la actividad respiratoria, de hongos y bacterias en la masa ensilada, determinando el contenido de O<sub>2</sub> (Rees, 1981), o la Demanda Biológica de Oxígeno (BOD) (Pahlow, 1981).

Todos los análisis químicos y nutricionales realizados en ensilajes deben expresarse sobre base seca real. Por otro lado, las técnicas que se desarrollen para el análisis de determinados parámetros deberán corresponder o mejorar los resultados en comparación con aquellas usadas en el momento. Es también importante propender a la unificación de metodologías usadas en los laboratorios dentro y entre países (Wernli, 1977).

Cabe hacer notar la aplicación de la técnica física de reflectancia infrarroja (Near Infrared Reflectance) en la caracterización química y nutricional de los ensilajes. Dicha técnica es rápida, reproducible y precisa, siendo su principal dificultad el conseguir calibraciones sólidas y confiables. Murray (1986) ha discutido varias experiencias sobre su uso en muestras de ensilaje. Las calibraciones separadas para henilaje, ensilaje y heno, han dado resultados satisfactorios para la determinación de proteína cruda y fibra cruda (Valdés *et al.*, 1985; Moisisio, 1982), aunque erráticos para FDA y minerales (Valdés *et al.*, 1985), y digestibilidad *in vitro* (Moe y Carr, 1985).

Una revisión sobre los análisis efectuados en 75 experimentos usando ensilajes (Thomas y Thomas, 1985) revela que sólo 68% de los ensayos corrigen las determinaciones de MS al horno por componentes volátiles. Si bien 95% de los ensayos determinaron pH, menos de una tercera parte midieron concentración de ácidos y sólo 45% determinaron N amoniacal. Un quinto de las pruebas de N fueron hechas en muestra fresca, mientras que la determinación de la digestibilidad *in vitro* y del valor energético de los ensilajes se realizaron en muy pocos casos.

Finalmente, se han descrito instrumentos y técnicas que permiten la extracción de muestras de ensilaje sin que ingrese aire al silo durante la faena (Spoelstra, 1983; Rees *et al.*, 1983).

### **(3) Propiedades organolépticas.**

Las características de color, olor y textura pueden constituir un criterio subjetivo de calificación de los ensilajes, pero no existe relación demostrada entre estos y la eficiencia de preservación o el valor nutritivo sobre una amplia gama de ensilajes. En consecuencia, se trata de parámetros de escasa utilidad en los estudios con ensilajes.

### **(4) Propiedades microbiológicas.**

Los análisis microbiológicos durante el proceso de ensilado tienden a complementar el conocimiento sobre la forma en que se desarrolla la fermentación, considerando que en ello participan géneros y especies de bacterias y hongos con utilidad variada

para el proceso. Por ejemplo, entre las especies consideradas favorables se encuentran las bacterias acidolácticas (homo y heterofermentativas). En contraste, son consideradas perjudiciales las del género *Clostridium*, así como también bacterias, hongos y levaduras aeróbicas que intervienen una vez abierto el silo y que, a menudo, pueden agregar toxinas al forraje. Parker (1978) ha descrito algunos procedimientos (Anexo A) para el estudio de ciertos grupos de bacterias y hongos.

## **5. Conservantes y aditivos**

Existe la tendencia generalizada hacia el uso indiscriminado de estos nombres cuando al ensilado se le agrega algún producto artificial.

### **a. Conservante**

Es aquella sustancia que se agrega al forraje con el objetivo de contribuir a establecer una fermentación adecuada, ya sea por aporte de nutrientes para un adecuado crecimiento de las bacterias lácticas y otras fermentativas, o impidiendo el desarrollo de microorganismos indeseables. Los conservantes se dividen en: acidificantes (ácidos orgánicos e inorgánicos); bacteriostáticos, de acción general o específica sobre los microorganismos (ácido benzoico, metabisulfito de sodio, formol, nitrito de sodio); y promotores de fermentaciones



lácticas ( miel final de caña de azúcar, las cepas lácticas y hasta cierto grado, las celulasas como desdobladoras de los polisacáridos del forraje).

### **b. Aditivo**

Se considera aditivo aquel producto cuya finalidad sea incrementar el valor nutritivo del forraje. Cabe destacar que en ocasiones pudiera realizar simultáneamente algún efecto conservador. Es el caso de los subproductos de molinería de los granos, como afrecho de arroz, cebada, malta, avena, etc., y la urea.

Dado que las bacterias presentes en los ensilajes no presentan acción amilolítica (no emplean el almidón como sustrato energético, salvo que se mezcle previamente con amilasas), su uso no contribuye a la fermentación y se corre el riesgo de que, si el ensilaje resulta de mala calidad, se pierda un producto valioso que se pudo ofrecer directamente a los animales.

La urea incrementa el contenido de nitrógeno del ensilaje, pero su desdoblamiento en amoniaco, dificulta la estabilización del pH e incrementa el contenido de nitrógeno soluble, ya de por si elevado en los ensilajes. Esto obliga a suministrar este aditivo en forrajes ricos en azúcares solubles y con baja capacidad amortiguadora (como el maíz, sorgo y la caña de azúcar) o simultáneamente con una fuente energética de carbohidratos fácilmente fermentables.

## **6. Período de fermentación y estabilización**

Estudios con ensilajes de climas templados y tropicales, indican que la estabilización o punto terminal de la evolución fermentativa se alcanza generalmente entre los 40 y 60 días de iniciado el proceso. El no conseguir una hermetización completa de la masa ensilada, puede dar lugar a una degradación constante, la que será acelerada con la entrada de aire y/o la exposición de la masa ensilada a condiciones meteorológicas adversas.

## **7. Pérdidas del ensilado**

La caracterización física, química o nutricional de un ensilaje constituye sólo una parte de su evaluación cualitativa. Toda evaluación de la conservación de forrajes en forma de ensilado debe también considerar la eficiencia con que el forraje cosechado o el material ensilado fue convertido en alimento útil para el animal.

Las pérdidas se expresan usualmente en términos de MS, y, a veces, en términos de nutrientes más específicos (proteína, carbohidratos, energía, etc.). Los conceptos por los cuales ocurren estas pérdidas en los ensilajes pueden clasificarse como sigue:

### **a. Pérdidas de campo (PC)**

Estas pérdidas pueden ser estimadas con la siguiente ecuación:

PC =

MS disponible/ha - MS descargada  
en el silo

---

MS disponible/ha

### b. Pérdidas por respiración

Constituidas primordialmente por la oxidación de MS que ocurre como resultado del proceso respiratorio del material a ensilar, consumiendo carbohidratos celulares. Ocurren principalmente entre el corte y la muerte de la célula, incluyendo así la etapa de marchitamiento y la primera etapa en el silo.

### c. Pérdidas por fermentación

Son aquellas resultantes de la transformación de carbohidratos y proteínas en compuestos volátiles y no volátiles, con pérdida de calor.

### d. Pérdidas por descomposición o putrefacción (PD)

Resultado de la actividad de organismos aeróbicos en los contornos externos del silo, en presencia de oxígeno, a lo que se debe agregar las pérdidas de superficie expuesta durante el uso del ensilaje (Honig y Woolford, 1980). Su cálculo se realiza con la siguiente ecuación:

PD =

MS ensilada - MS descompuesta  
(inutilizable)

---

MS ensilada

### e. Pérdidas por lixiviación (PL)

Aquellas producidas por escurrimiento de líquido, y pueden ser determinadas mediante la ecuación:

PL =

MS ensilada - pérdida por  
escurrimiento

---

MS ensilada

### f. Pérdidas al suministro (PS)

Producidas entre la extracción del ensilaje y lo aprovechado por el animal. Su cálculo se realiza con la siguiente ecuación:

PS =

MS extraída del silo - MS ingerida  
por los animales

---

MS extraída del silo

Las pérdidas (a-f) se expresan en bases diferentes de materia prima. Los volúmenes perdidos en cada concepto permite determinar, por sumatoria, las pérdidas totales (PT), y la proporción que estas representan del material ensilado total:

PT =

MS ensilada - MS consumida

---

MS ensilada

La investigación sobre pérdidas registradas en condiciones de campo precisa del uso de silos de gran tamaño. El procedimiento de obtención y tratamiento de muestras debe ser cuidadoso y comprensivo, y la fracción volátil del ensilaje debe ser tomada en cuenta.

La distinción cuantitativa de los diversos tipos de pérdidas es difícil. Las pérdidas de campo pueden determinarse por muestreo del material original y pesaje de lo ensilado. Las pérdidas por putrefacción superficial se determinan mediante el pesaje del material putrefacto y la determinación de su contenido de MS. Esto, sin embargo, lleva a una subestimación de dicha pérdida, ya que durante la descomposición ocurren pérdidas en forma de gas, que no se consideran dentro del material pesado, existiendo técnicas para superar dicho error (Wittwer *et al.*, 1958).

También se ha probado el uso de bolsas insertas en el ensilaje para medir pérdidas por respiración y fermentación (Wittwer *et al.*, 1958; Hagemeister, 1967), con resultados satisfactorios.

Las pérdidas de lixiviación, que son función del contenido de agua del material, la presión aplicada y el tipo de silo, sólo pueden evaluarse mediante implementos que permitan la colección del efluente total y su rápido muestreo y análisis. Ello se hace más factible en silos de pequeña escala o laboratorio. Se ha sugerido la predicción de estas pérdidas, con base en

ecuaciones lineales simples, considerando el contenido de MS del material ensilado (Miller y Clifton, 1965). Sin embargo, éstas deben usarse con cautela, pues frecuentemente no corresponden a lo medido, probablemente explicado por otros factores que también inciden sobre las pérdidas por lixiviación.

Finalmente, las pérdidas al suministro se encuentran por diferencia entre lo extraído del silo y lo ingerido por el animal. Se incluye aquí un tipo de pérdidas oxidativas que suelen ocurrir al estar expuesta al aire la superficie de ensilaje utilizado, permitiendo la acción aeróbica de hongos y bacterias, particularmente en aquellos ensilajes bien preservados. Según las condiciones en que éstas se desarrollan, pueden llegar a ser elevadas (30%) y difíciles de controlar (Honig y Woolford, 1980). Entre las pérdidas al suministro se anotan además las de comedero, y otra equivalente a la MS volatilizada durante la permanencia del ensilaje en el comedero. Esta última es difícil de medir y está influenciada por la temperatura ambiental, estructura del material y aireación.

## **8. Evaluación nutritiva y respuesta animal en investigaciones con ensilajes**

La evaluación nutritiva de los ensilajes y de la productividad animal, obtenida cuando estos alimentos forman parte importante de la dieta, adquiere especial importancia. Ello se

debe a que el valor nutritivo de los forrajes y otros alimentos ensilados es generalmente inferior, en comparación con el mismo alimento antes de ensilar, explicado principalmente por su bajo consumo voluntario. También es ampliamente reconocida la baja eficiencia de utilización del N en ensilajes, y existen antecedentes preliminares que sugieren que la energía metabolizable de los forrajes ensilados es utilizada con menos eficiencia que lo esperado.

Concebido el valor nutritivo como una función del consumo voluntario, la digestibilidad y la eficiencia de utilización de los nutrientes digeridos y absorbidos, los estudios se deben centrar en la evaluación de dichos parámetros, siguiendo procedimientos y metodologías iguales a las recomendadas para otros alimentos y forrajes en capítulos anteriores. Por otro lado se deben reconocer y considerar algunas particularidades cuando se trabaja con ensilajes, y que se presentan a continuación.

#### **a. Mediciones de consumo voluntario**

Debe considerarse la fracción volátil de la MS (MS real), para evitar la subestimación característica del consumo cuando las muestras de ensilaje no se corrigen por estos compuestos. Los procedimientos para su determinación han sido descritos anteriormente. Con base en una ecuación de regresión sobre 79 muestras, Barber *et al.* (1984) propusieron la

siguiente corrección para estimar el contenido de MS real:

$$\begin{aligned} \text{MS total (tolueno), \%} = \\ 2.91 + 0.979\% \text{ MS en horno} \\ (r^2 = 0.99; \text{DSR} = 0.862) \end{aligned}$$

Con base en la anterior corrección, el contenido de cada nutriente calculado:

$$\begin{aligned} \text{Nutriente "N"} = \\ \frac{(\text{Nutriente "N", \%}) (\text{MS en horno, \%})}{\text{MS total (tolueno), \%}} \end{aligned}$$

Debido a la variación en la proporción de MS presente en forma volátil entre ensilajes, ésta deberá determinarse en cada caso, recurriendo a las ecuaciones anteriores sólo en situaciones excepcionales.

Dada su influencia directa sobre el consumo, los componentes volátiles deben identificarse y cuantificarse (Wernli, 1975). Por otra parte, la determinación del tamaño de partícula adquiere importancia por su efecto directo sobre el consumo y digestibilidad, al actuar sobre la velocidad de paso de la digesta a través del tubo digestivo, además de su influencia sobre el proceso fermentativo y la composición química y nutricional del ensilaje, los cuales a su vez afectan el consumo voluntario. La predicción del consumo voluntario de ensilajes, así como en otras clases de forrajes y

alimentos, es difícil y se caracteriza por un elevado error residual. En el caso de los ensilajes es aún más compleja ya que, además de los factores inherentes al animal y de los componentes normalmente considerados en los forrajes, intervienen también la concentración de los compuestos derivados de la fermentación, que se caracteriza por ser altamente variable.

### **b. Mediciones sobre digestibilidad *in vivo***

Debe considerarse la ingestión total de MS (no volátil y volátil), ya que de lo contrario se incurrirá en una subestimación en la digestibilidad del ensilaje. Barber *et al.* (1984) propusieron una ecuación para su conversión a base seca corregida:

$$\text{Dig. Nutr. "N"} = \frac{(100 - \text{Dig. Nut. "N"}) (\text{MS en horno})}{\text{MS total (tolueno), \%}}$$

### **c. Determinación del valor energético**

Debe considerarse el mayor valor calórico (EB) de los ácidos grasos volátiles en comparación con el de la MS restante. Esto explica por qué el valor energético del ensilaje es más alto en relación al mismo forraje fresco (Pahlow, 1981; Alderman *et al.*, 1971). Se ha encontrado que el valor calórico de la materia orgánica digerida de los ensilajes es, en promedio, 7.5% más

alta que los valores correspondientes al forraje fresco (Terry y Osbourne, 1980). Al corregir sobre esta base, el contenido de EM ha sido 7-12% más alto que al no considerar el aporte energético de la fracción volátil (Barber *et al.*, 1984).

La determinación de la pérdida de energía en la orina es otro aspecto de atención, ya que el valor energético de ésta suele ser mayor con dietas altas en ensilaje, debido a las mayores pérdidas de N urinario, resultantes de la menor eficiencia de utilización del N de los ensilajes.

La eficiencia de utilización de la EM para mantenimiento y ganancia de peso de algunos ensilajes parece ser menor que para otras formas de forraje. Algunos estudios indican cifras más bajas para estas eficiencias determinadas calorimétricamente, en relación a los valores calculados con base en las ecuaciones del ARC (Thomas y Thomas, 1985). Las diferencias no son constantes entre ensilajes y es evidente que falta investigación sobre el particular, usando la metodología apropiada para ello (calorimetría directa o indirecta; técnica de sacrificio comparativo).

Cabe señalar los esfuerzos realizados en torno a la predicción de la digestibilidad y valor energético de los ensilajes. En el Cuadro 2 se presentan algunos resultados sobre ello. Se aprecia que con base en la digestibilidad *in vitro* se logra una predicción algo mejor que con la digestibilidad por celulasa, y que éstos son notoriamente

superiores al compararlos con los resultados de ecuaciones que incluyen componentes estructurales (FDN, FDA) como variables independientes. Los resultados revelan que tales predicciones son débiles, requiriéndose de nuevos avances para poder aplicarlas con mayor confiabilidad y precisión, particularmente en la estimación del contenido energético.

#### **d. Utilización de la proteína y valor proteico en los ensilajes**

La eficiencia de utilización del N de los ensilajes es baja y menor que para los mismos forrajes no ensilados. Ello se explica principalmente por la degradación de la proteína durante el proceso de fermentación (70-50% del N como aminoácidos, aminos, amoniac y amidas, en contraste con el N del forraje original conformado por proteínas en 70-90%). A esto se suma un nivel bajo de energía fácilmente liberable a nivel ruminal, producto de la fermentación generalmente exhaustiva de azúcares solubles del forraje.

Como consecuencia de lo anterior, el aprovechamiento del N a nivel ruminal es bajo, requiriéndose de evaluaciones sobre niveles de amoniac ruminal, relación N amoniacal a materia orgánica digerible en el rumen, pérdidas de N urinario, síntesis de proteína ruminal, flujo de N proteico y aminoácidos al intestino delgado, y otras determinaciones relativas a la eficiencia de uso y retención de N. Investigaciones con vacas lecheras

demuestran que el índice de proteína verdadera digerida en intestino delgado (PDI) constituye un parámetro nutricionalmente más ajustado a la respuesta productiva que el contenido de N total de los ensilajes (Dulphy y Demarquilly, 1981).

Las particularidades de los ensilajes en términos de eficiencia de utilización de su proteína y energía sugieren la conveniencia de analizar más detalladamente el fraccionamiento de la digestión y absorción de estas entidades nutricionales básicas (retículo-rumen, intestino delgado e intestino grueso), siendo necesario para ello la implementación de técnicas de colección y re-entrada de digesta, usando canulación ruminal, duodenal e ileo-cecal (Brown *et al.*, 1968).

#### **e. Parámetros relevantes en la evaluación nutricional y respuesta productiva de raciones basadas en ensilajes**

Los parámetros a medir en investigaciones con animales en producción, así como las técnicas a utilizar, son las mismas aplicadas en ensayos de nutrición y alimentación bajo condiciones de encierro, descritas en el Capítulo V de esta Guía Metodológica. Se considera conveniente destacar la importancia de considerar los siguientes aspectos:

(1) **Eficiencia de utilización del nitrógeno.** Estudios de balance de N,  $\text{NH}_3$  ruminal, relación  $\text{NH}_3/\text{MOD}$  en el

rumen y flujos al duodeno de las diferentes fracciones nitrogenadas (N total, NNP, N-NH<sub>3</sub>, N proteico, N peptídico, N aminoacídico).

**(2) Mediciones complementarias.** Tiempo de masticación y rumia (Wernli y Wilkins, 1980) y valor "Ro" (Balch, 1971); pH ruminal y urinario; tasa de digestión de la MS, MO y componentes estructurales en el rumen, velocidad de paso de digesta a través del tracto digestivo, consumo de agua, volumen de líquido y tasa de flujo del retículo-rumen (Warner y Stacey, 1968), concentración y contenido de AGV en rumen y conducta animal.

El consumo, balance y uso de minerales y vitaminas también podría formar parte en estudios específicos sobre el tema. Es importante hacer notar que cada investigación deberá contemplar una cuidadosa elección de los parámetros a evaluar, en función directa de los objetivos del experimento.

#### **f. Investigaciones con raciones mixtas basadas en ensilajes**

Se pueden estudiar raciones basadas en ensilajes, principalmente bajo dos enfoques: (a) Raciones mixtas que incluyen distintas proporciones preestablecidas de ingredientes dietarios y (b) Suplementación creciente con un ingrediente sobre ensilaje ofrecido *ad libitum*.

Ambos planteamientos son válidos. Sin embargo, debido al bajo consumo voluntario característico de los ensilajes y a la menor tasa de sustitución esperada al suplementar ensilajes en forma creciente, en comparación con forrajes frescos o secos (Raymond, 1969), resulta generalmente de mayor interés realizar estudios sobre aportes variables de un ingrediente complementario. En estos estudios se podría determinar el consumo voluntario de ensilaje, la tasa de sustitución y el consumo de la dieta total, lográndose determinar así el potencial productivo de raciones con máximo uso de ensilaje. Ello implica medir separadamente el consumo de ensilaje y suplemento.

### **9. Consideraciones finales**

Se han analizado aquí diversas metodologías y procedimientos para la investigación en nutrición animal con forrajes y alimentos ensilados. En varios casos se presenta la posibilidad de seguir más de un procedimiento válido con igual objetivo, siendo difícil recomendar alguno de estos en particular. Más aún, los métodos evolucionan y se perfeccionan, siendo importante tener en cuenta que la nueva metodología sea válida en relación a la sustituida, y que se hagan esfuerzos permanentes por uniformizar los métodos, procedimientos de laboratorio y de campos experimentales, dentro y entre países, posibilitando así que los resultados sean comparables.

## 10. Referencias

- ALDERMAN, G.; COLLINS, F.C.; DOUGALL, H.W. 1971. Laboratory methods of predicting feeding value of silage. *Journal of the British Grassland Society* 26:109.
- ALLRED, K.R.; KENNEDY, W.K. 1956. The use of small silos to determine dry matter losses during ensiling. *Agronomy Journal* 48:308.
- AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS. 1967. Recommendation A.S.A.E. 2461: Method of determining modulus of uniformity and modulus of fineness of ground feeds. American Society of Agricultural Engineers. Yearbook 1967. 301 p.
- ANDERSON, B.K.; JACKSON, N. 1970. The conservation of grass in sealed metal and plastic containers, with and without ground barley meal. *Journal of the British Grassland Society* 25:136.
- AOAC. 1965. Official methods of analysis. Association of Official Agricultural Chemists. Washington, D.C. 904 p.
- AUTREY, K.M.; KNODT, C.B.; WILLIAMS, P.S. 1947. Grassland legume silage studies using 2-quart glass jars and miniature silos. *Journal of Dairy Science* 30:775.
- BALCH, C. 1971. Proposal to use time spent chewing as an index of the extent to which diets for ruminants possess the physical property of fibrousness characteristic of roughage. *British Journal of Nutrition* 26:383.
- BARBER, W.P.; ADAMSON, H.A.; ALTMAN, J.F.B. 1984. New methods of forage evaluation. *In* Recent advances in animal nutrition-1984. Ed. by E. Haresign, D.J. A. Cole. University of Nottingham, School of Agriculture. p. 169.
- BARKER, S.D.; SUMMERSON, W.H. 1941. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *Journal of Biological Chemistry* 138:535.
- BLOCK, H.J.; WEISSBACH, F. 1982. Determination of volatile fatty acids in silage by gas chromatography with an internal standard. *Archiv für Tierernährung* 32:693.
- BOSMA, A.H.; DERNEDDE, W. 1980. Measuring the particle length of chopped forage. *In* Forage Conservation in the 80's. Ed. by C. Thomas. Occasional Symposium No. 11, Hurley, Berkshire, U.K., British Grassland Society. p. 331.
- BOUSSET, J.; GOVET, Ph.; GIRARDEAN, J.P.; BOUSSET-FATIANOFF, N.; CONTREPOIS, M. 1977. Gnotoxenic forage silage. 3. Development of buffer strength in gnotoxenic lucerne, fescue and



- ryegrass silage. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysic (Francia)* 17:1035.
- BRACK, J.; BLECKERE, A. de; LEJEUNE, W. 1982. Perfecting a gas chromatography method for simultaneous analysis of the contents of lactic and volatile acids in silages. *Agro* 1:21.
- BROWN, G.F.; ARMSTRONG, D.G.; MacRAE J.C. 1968. the establishment in one operation of cannula into the rumen and re-entrant cannulae into the duodenum and ileum of the sheep. *British Veterinary Journal* 124:78.
- BURDICK, D.; McHAN, F. 1982. Rapid gas chromatographic procedure for measuring moisture in silage. *Journal of Dairy Science* 65:2396.
- CANALE, A.; VALENTE, M.E.; CIOTTI, A. 1984. Determination of volatile carboxylic acids (C<sub>1</sub>-C<sub>51</sub>) and lactic acid in aqueous acid extracts of silage by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 35:1178.
- CELANIE, M. 1960. Etude de l'évolution microbiologique et des caractéristiques fermentaires des ensilages de canne à sucre, de sorgho et de pangola en climat tropical humide. Thèse. Currie, Paris 6, Francia, Université Pierre et Marie. 114 p.
- CENTRE DE RECHERCHES ZOOTECHNIE ET VETERINAIRE DE THEIX. 1981. Bulletin Technique No. 46. 63 p.
- CONWAY, E.J. 1957. Microdiffusion analysis and volumetric error. 4 ed. London, U.K., G. Lockwood. 465 p.
- CULLINSON, A.E. 1960. A sample effective type of miniature silo for conducting silage investigation. *Journal of Animal Science* 19:198.
- DEMARQUILLY, C. 1983. Conservation et utilisation des fourrages: Incidences pathologiques. Academie d'Agriculture de France. Extrait du proces-verbal de la séance de 5 octobre 1983. p. 993.
- DEVUYST, A.; VANBELLE, M. 1964. The scientific fundamentals of ensiling. *Agricultura (Belgica)* 12:125.
- DEWAR, W.A.; McDONALD, P. 1961. Determination of dry matter in silage by distillation with toluene. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 12:790.
- DULPHY, J.P.; DEMARQUILLY, C HENRY, M. 1975. Losses of volatile constituents during the determination of the dry matter content of silage by oven drying. *Annales de Zootechnie (Francia)* 24:743.
- \_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_. 1981. Nitrogen value of grass silages for dairy cows. In *Sixth Silage Con-*

- ference Edinburgh, U.K., Edinburgh School of Agriculture. p. 17.
- EDNER, H.H. 1986. Degree of compaction of green fodder silage and a procedure for estimating mass. *Agrartechnik* 36:56.
- EL HAG, M.G.; VETTER, R.L.; KENEALY, M.D.; SMITH, R.J. 1982. Evaluation of a model laboratory silo. *Journal of Dairy Science* 65:250.
- ELSDEN, S.R.; GIBSON, Q.H. 1954. The estimation of lactic acid using ceric sulphate. *Biochemical Journal* 58:154.
- GALE, G.E.; KNIGHT, A.C. 1980. Apparatus and procedure for the accurate assessment of forage chop length. *In Forage Conservation in the 80's*. Ed. by C. Thomas. Occasional Symposium No. 11, Hurley, Berkshire, U.K., British Grassland Society. p. 335.
- GALLETTI, G.C.; PICCAGLIA, R. 1983a. Determinazione dell'ammoniaca nei foraggi insilati con l'elettrodo gas-selettivo. *Zootecnia e Nutrizione Animale* 9:213.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. 1983b. Rapida analisi gascromatografica dell'acido lattico e degli acidi organici volatili nel silomais. *Zootecnia e Nutrizione Animale* 9:347.
- GRASSLAND RESEARCH INSTITUTE. 1961. Research techniques in use at the Grassland Research Institute, Hurley, Berkshire, C. A.B., U.K., Bulletin No. 45. 166 p.
- HAGEMEISTER, H. 1967. Investigation on the preparation of silage and hay, losses on making haylage, fresh silage from grass and mixtures, and on their consumption. *Wirtschaftseigene Futter* 13:316.
- HAGERDORN, H.C.; JENSEN, B.N. 1923. Zur Mikrobestimmung des blutzuckers mittels ferricyanid. *Biochemische Zeitschrift* 135:46.
- HARGREAVES, A.; BUTENDIECK, N.; HIRIART, M. 1986. Comparación de dos silos experimentales para la investigación de ensilajes. *Agricultura Técnica (Chile)* 46:185.
- HARPER, W.J.; RANDOLPH, H.E. 1960. Study suggests possible relationship between flavor and the amount of lactic acid in cottage cheese. *American Milk Review* 22:43.
- HONIG, H.; WOOLFORD, M.K. 1980. Changes in silage on exposure to air. *In Forage Conservation in the 80's*. Ed. by C. Thomas. Occasional Symposium No.11, Hurley, Berkshire, U.K., British Grassland Society. p. 76.
- HUIDA, L. 1982. Gas chromatographic determination of water and ethanol in silage by internal standar method. *Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland* 54:137.

- INTERNATIONAL STANDARD. 1979. Animal feeding stuff. Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content. ISO 5983-1979 (E). 8 p.
- JARRIGE, R. 1961. Analysis of the carbohydrate constituents of forage plants. 1. Fractioning the constituents of the wall cell by acid hydrolysis. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique (Francia)* 1:163.
- JOHNSON, G.; LAMBERT, C.; JOHNSON, D.K.; SUNDERWHITH, S. 1964. Colorimetric determination of glucose, fructose, and sucrose in plant materials using a combination of enzymatic and chemical methods. *Journal of the Agricultural Food Chemistry* 12:216.
- JONES, D.W.; KAY, J.J. 1976. Determination of volatile fatty acids C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> and lactic acid in silage juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 27:1005.
- JONES, E.C.; BARNES, R.J. 1967. Non volatile organic acids of grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 18:321.
- JOUANY, J.P. 1981. Dosage des acides gras volatils et des alcools dans les ensilages par chromatographie en phase gazeuse. Centre de Recherches Zootechniques et Veterinaires de Thiex, Francia, *Bulletin Technique* No. 46:63.
- LEASK, W.C.; DAYNARD, T.B. 1973. Effects of percent moisture and compaction pressure on the ensiling of corn stover in laboratory silos. *Canadian Journal of Plant Science* 53:523.
- LEPPER, S.; FLEG, Z. 1938. *Tierennahrung. Futtermittelkunde* 1:187.
- MARSH, R. 1979. The effects of wilting on fermentation in the silo and on the nutritive value of silage. *Grass and Forage Science* 34:1.
- MARTILLOTTI, F.; PUPPO, S. 1985. Determination of organic acids in silages and the rumen by high performance liquid chromatography. *Annali dell' Instituto Sperimentale per la Zootecnia* 18:1.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A.R. 1962. Buffering capacity of herbage samples as a factor in silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 13:395.
- McDONALD, P. 1981. *The biochemistry of silage*. Chichester, New York. John Willey and Sons. 226 p.
- MILLER, W.J.; CLIFTON, C.M. 1965. Relation of dry matter content in ensiled material and other factors to nutrient losses by seepage. *Journal of Dairy Science* 48:917.
- MOE, A.J.; CARR, S.B. 1985. Laboratory assays and near-infrared reflectance spectroscopy

- for estimates of feeding value of corn silage. *Journal of Dairy Science* 68:2220.
- MOISIO, T. 1982. Silage analysis using NIR techniques. *In XXI International Dairy Congress v. 1, Book 1. U.S.S.R.* p. 84-85.
- MURRAY, I. 1986. Near infrared reflectance analysis of forages. *In Recent advances in animal nutrition-1986.* Ed. by W. Haresign, D.J.A. Cole. University of Nottingham, School of Agriculture. p. 141.
- NARASIMHALU, P.; KUNELIUS, H.T.; WINTER, K. 1982. Rapid determination of dry matter in grass silage of *Lolium sp.* using a microwave oven. *Canadian Journal of Plant Science* 62:233.
- NOLL, P. 1974. L(+) lactate determination with LDH, GPT and NAD. *In Methods of Enzymatic Analysis.* Ed. by H.V. Bergmeyer. London, Academic Press. v. 3, p. 1475.
- ODLAND, T.E.; COX, T.R.; SMITH, J.B. 1941. A comparison of different crops for grass silage by the use of mason jars as miniature silos. *Journal of the American Society of Agronomy* 33:304.
- OJEDA, F.; CACERES, O.; ESPERANCE, M. 1984. Conservación de pastos y forrajes. *Pastos y Forrajes No. 3.* Havana, Cuba, Ministerio de Educación Superior, Departamento de Textos y Materiales Didácticos. p. 409.
- OJEDA, F.; CACERES, O.; LUIS, L.; ESPERANCE, M.; SANTANA, H. 1987. Ensilajes de forrajes tropicales. *Symposium International sur l'Alimentation de Ruminants en Milieu Tropical Humide.* p. 17.
- OSHIMA, M.; McDONALD, P. 1978. A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29:497.
- OSL, F.; GINZINGER, W. 1986. Gas chromatographic determination of volatile fatty acids in silage using the headspace technique. *Landwirtschaftliche Forschung* 39:68.
- OTIS, C.K.; POMROY, J.H.; GAWRELUK, D. 1959. The laboratory silo: a tool for silage research. *Agricultural Engineering* 40:736.
- PAHLOW, G. 1981. Estimation of the aerobic stability of silages by measuring the biochemical oxygen demand (B.O.D.). *In Sixth Silage Conference, Edinburgh, U.K., Edinburgh School of Agriculture.* p. 65.
- PARKER, R.B. 1978. Methodology for determining quality of silage. *In Fermentation of silage, a review.* Ed. by M.E. McCulloch. Iowa, EE.UU., National Feed Ingredients Association. 332 p.

- PERKINS, A.E.; PRATT, A.D. 1951. A laboratory silo and its uses. *Journal of Dairy Science* 34:606.
- PETEVA-VANCHEVA, Z.; SUREN, S. 1983. Determination of the concentration of alcohols in silages by gas chromatography. *Zhivotnov dni Nanki* 20:56.
- PLAYNE, M.J.; McDONALD, P. 1966. The buffering constituents of herbage and of silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 17:264.
- RAYMOND, W.F. 1969. The nutritive value of forage crops. *Advances in Agronomy* 21:2.
- REES, D.V.H. 1981. Apparatus for measuring the oxygen content and temperature of silage. *Journal of Agricultural Engineering Research* 26:185.
- \_\_\_\_\_.; AUDSLEY, E.; NEALE, M.A. 1983. Apparatus for obtaining an undisturbed core of silage and for measuring the porosity and gas diffusion in the sample. *Journal of Agricultural Engineering Research* 28:107.
- SAUVANT, D.; GOUET, Ph. 1979. Les relation entre les processus fermentaire: consequence pour l'apreciation quantitative de la qualité de la conservation. *In La conservation des ensilajes. Journée C.A.A.A., Mars 1979.* p. 41.
- SIEGFRIED, R.; RUCKEMANN, H.; STUMPF, G. 1984. An HPLC method for determining organic acids in silage. *Landwirtschaftliche Forschung* 37:298.
- SMITH, D. 1969. Removing and analyzing total non-structural carbohydrates from plant tissue. University of Wisconsin, Research Division, College of Agriculture and Life Science, Research Report No. 41. 22 P.
- SOMOGYI, M. 1952. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195:19.
- SPOELSTRA, S.F. 1983. A laboratory silo permitting sampling. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 31:89.
- SPRAGUE, M.A.; TAYLOR, B.B. 1965. Preservation of silage in plastic bags, a new method of research with the forages. *In IX International Grassland Congress, Sao Paulo, Brasil, enero 1965.* p. 637.
- TERRY, R.A.; OSBOURN, D.F. 1980. Determination and prediction of the digestible energy in silages. *In Forage Conservation in the 80's.* Ed. by C. Thomas. Occasional Symposium No. 11, Hurley, Berkshire, U.K., British Grassland Society. p. 315.

- TETLOW, R.M. 1974. A method for determining particle size distribution in packages of dried forage. *Journal of Agricultural Engineering Research* 19:347.
- THOMAS, C.; THOMAS, P.C. 1985. Factors affecting the nutritive value of grass silages. *In Recent advances in animal nutrition-1984*. Ed. by W. Haresign, D.J.A. Cole. University of Nottingham, School of Agriculture p. 223.
- VALDES, E.V.; YOUNG, L.G.; McMILLAN, I.; WINCH, J.E. 1985. Analysis of hay, haylage and corn silage samples by near infrared reflectance spectroscopy. *Canadian Journal of Animal Science* 65:753.
- WARNER, A.C.I.; STACEY, B.D. 1968. The fate of water in the rumen. 1. A critical appraisal of the use of soluble markers. *British Journal of Nutrition* 22:369.
- WEISE, G. 1972. Nuevo método de la determinación de la capacidad amortiguadora. Berlin (D.D.R), Institute für Futterproduktion Pauline-naue. p. 56.
- WERNLI, C. 1975. El valor nutritivo de los forrajes ensilados. I. Consumo voluntario. *Agricultura Técnica (Chile)* 35:47.
- \_\_\_\_\_. 1977. Unificación de los procedimientos y metodología analítica en los laboratorios de nutrición. Ed. por V. Quiroga. San José, Costa Rica, Publicación Miscelánea No.174, IICA. p. 140.
- \_\_\_\_\_; WILKINS, R.J. 1980. Nutritional studies with sheep fed conserved ryegrass. I. Silage and ryegrass offered *ad libitum* without supplements. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 94:209.
- WIERINGA, G.W. 1977. Influence of moisture and nutrient content of forage plants on fermentation processes. *In Proceedings of the International Meeting on Animal Production in Tempered Grasses*. Ed. by B. Gilsenan. Dublin, Irlanda. p. 67.
- WILSON, R.F; WILKINS, R.J. 1972. An evaluation of laboratory ensiling techniques. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 23:377.
- \_\_\_\_\_. 1980. Estimation of "true" protein in herbages and conserved feeds. *In forage conservation in the 80's*. Ed. by C. Thomas. Occasional Symposium No. 11. Hurley, Berkshire, U.K. British Grassland Society. p. 323.

WITTWER, L.S.; KENNEDY, W.K.;  
TRIMBERGER, G.W.; TURK, K.L.  
1958. Effects of storage methods  
upon nutrient losses and feeding  
value of ensiled legume and grass  
forage. Cornell University

Agricultural Experiment Station,  
Bulletin No. 931. 35 p.

WOOLFORD, M.K. 1978. The  
problem of silage effluent. *Herbage  
Abstracts* 48:397.

## ANEXO A

### PROCEDIMIENTOS EN ALGUNOS ANALISIS QUIMICOS Y MICROBIOLOGICOS EN ENSILAJES

#### 1. Determinación de materia seca

El siguiente procedimiento está diseñado para retener cantidades significativas de otras sustancias además del agua volátil a 100 °C. Para una explicación completa de este procedimiento, referirse a AOAC 16.219 (AOAC, 1975).

Se pesan 10 g de muestra homogenizada y se ponen en un frasco de ebullición ("beaker"). Se cubre la muestra con una mezcla de xilen-amil alcohol, se calienta y se refluja por una columna de condensación en un recipiente de humedad Bidwell-Sterling. El agua se separa del vapor solvente y se atrapa en un dedo, manteniéndose el reflujo hasta alcanzar el equilibrio.

Las determinaciones de tolueno se sugieren también, pero estas requieren corrección por ácidos volátiles destilados.

De manera simple, pueden hacerse determinaciones directas de MS

pesando 100 g de muestra homogenizada, esparciéndola en el fondo de un recipiente de 15-20 cm de diámetro y midiendo las pérdidas de peso después de 12 horas de estar sometida a un flujo de aire a 65°C. Sin embargo, algunos ácidos grasos volátiles del ensilaje se escaparán por esta técnica, resultando en una subestimación de la MS. Algunos trabajos han mostrado una mayor precisión usando una temperatura menor (55°C), reduciendo el flujo de aire y midiendo la pérdida de peso luego de 24 horas (Larsen, comunicación personal).

#### 2. Determinación de pH

En esta técnica se maceran 25 g de tejido vegetal en una licuadora con 225 ml de agua destilada. La muestra no debe haber sido molida con hielo seco. El pH se mide directamente con el pHmetro de electrodos.

La técnica de extracción con agua hirviendo de Barnett (1954) no re-



quiere equipo mecánico y ha sido recomendada por su simplicidad. Sin embargo, en ensilajes con pH bajo algunos ácidos grasos volátiles escapan resultando en lecturas incorrectas.

### 3. Determinación de ácido láctico total

A continuación se sugieren dos métodos para la determinación del ácido láctico en ensilajes. El primer método corresponde al descrito por Baker y Summerson (1941), y el segundo es el de Harper y Randolph (1960).

#### a. Método de Baker y Summerson

##### (1) Reactivos

**Solución de ácido láctico estándar.** Disuelva lactato de zinc puro (0.0135 g) en 10 ml de agua destilada en un frasco estándar de un litro. Agregue 0.5 ml de ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ) y termine de llenar el frasco hasta la marca con agua destilada. La solución es estable, pero debe guardarse en refrigeración.

**Reactivo p-hidroxidifenil.** Disuelva 1.5 g de p-hidroxidifenil en 10 ml de NaOH acuoso (5% P/V), completando luego a un litro con agua destilada. Este reactivo también es estable, pero debe guardarse en una botella color ámbar.

#### Hidróxido de calcio.

**Solución de sulfato de cobre.** Se requieren dos soluciones de  $CuSO_4$ , una 0.80M y otra 0.16M. Estas soluciones se preparan con  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , grado AR.

**Acido sulfúrico concentrado.** Russell (1944, citado por Parker, 1978)) ha mostrado que los nitratos y nitritos interfieren con la reacción; por esta razón se usa el  $H_2SO_4$  libre de N, usado en la determinación de N por Kjeldahl.

**(2) Procedimiento.** Ponga dos porciones de 5 g de muestra homogenizada en dos "beakers" con 100 ml de agua destilada hirviendo y déjelas enfriar por cinco minutos. Cada preparación se trata de la siguiente manera: agite la mezcla muy vigorosamente por cinco minutos usando un agitador mecánico. Durante este tiempo, agregue alrededor de 0.5 g de  $Ca(OH)_2$  sólido para facilitar la filtración subsiguiente. El producto se filtra con un filtro de papel duro y se descartan los primeros 20 ml del filtrado. Se toman 2 ml y se diluyen a 10 ml con agua destilada. De esta solución se transfiere 1 ml a una botella pequeña de vidrio con tapón, a la cual se le agregan, en el siguiente orden, 8 ml de agua destilada, 1 ml de  $CuSO_4$  0.80M y 1 g de  $Ca(OH)_2$ . Se prepara un estándar usando 5 ml de una solución estándar de ácido láctico sometidos a los mismos pasos descritos para la porción de la prueba, usando sólo 4 ml

de agua destilada. De igual forma, se prepara un blanco usando 1 ml de agua en vez de la muestra.

Las botellas se tapan y se agitan por 20 minutos en un agitador mecánico. Después de ese tiempo, los contenidos se filtran en papel de filtro, descartándose los primeros 2 ml de filtrado en cada caso. El resto del filtrado se recolecta en tubos de ensayo pequeños. Un ml del filtrado se transfiere a un tubo de pyrex (200 x 30 mm) y se mezcla con 0.05 ml de  $\text{CuSO}_4$  0.16M y 6 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  libre de  $\text{N}_2$ . Los tubos se ponen en baño maría por cinco minutos y luego que han enfriado, se les agrega 0.1 ml del reactivo p-hidroxidifenil. El contenido debe agitarse lateralmente para asegurar una distribución uniforme del reactivo insoluble. Los tubos se colocan nuevamente en baño maría (30-33°C) por 30 minutos agitándose a intervalos de 10 minutos. Finalmente, los tubos y su contenido se calientan por dos minutos en baño maría hirviendo y se dejan enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente. La concentración de ácido láctico se determina usando un fotómetro a 5200 Å (filtro verde). Se deben correr estándares apropiados con 0.2 a 0.3% de ácido láctico.

El ácido láctico total puede también determinarse de acuerdo con el método de Harper y Randolph (1960). Determinando la cantidad de ácido láctico en el filtrado colorimétricamente, midiendo el color amarillo del filtrado adicionando cloruro férrico.

## b. Método de Harper y Randolph

### (1) Reactivos

**Cloruro férrico.** Prepare 1%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en agua, inmediatamente antes de usarse.

**Solución estándar de lactato de litio.** Se prepara diluyendo con agua hasta 100 ml la cantidad de 1.0656 g de lactato de litio. Corresponde a 10 mg de ácido láctico por ml.

(2) **Procedimiento.** Pipetee 1 ml del filtrado obtenido en el método anterior (Baker y Summerson, 1941) a un tubo de ensayo con tapón mezclador de vidrio. Agregue 10 ml de agua y mezcle. Agregue 1 ml de solución fresca de cloruro férrico y mezcle. Lea la densidad óptica luego de 15 minutos con el espectrofotómetro a 4700 Å (filtro azul), contra un blanco tratado al mismo tiempo que la muestra. La cantidad de ácido láctico se determina contra una curva estándar. Si hubiesen muestras con niveles de lactato superiores al 0.3%, éstas deben diluirse para permanecer en el rango del método.

### 4. Determinación de energía total

Representa la energía total oxidable en los alimentos o las heces. El valor incluye la energía de sustancias tales como lignina, cutina, etc., que no son biológicamente aprovechables. Sin embargo, las pérdidas en energía

que ocurren durante el proceso de ensilaje son casi todas de las fracciones aprovechables por el animal.

La calorimetría en forrajes húmedos, ensilajes o heces se puede hacer de la siguiente manera (McDonald *et al.*, 1973): Se utilizan bolsas pequeñas de polietileno, que pesen alrededor de 0.3 g, para pesar entre 1 y 2 g de muestra de forrajes húmedos, ensilajes o heces de ganado, y promover el inicio de la combustión en el calorímetro. Idealmente, las bolsas deben tener alrededor de 3.5 cm de ancho y 9 cm de largo, con un espesor de 150 gauges. Estas bolsas de polietileno tienen un valor energético de alrededor de 11 000 cal/g. Sin embargo, es necesario determinar su valor energético exacto para cada nuevo lote.

#### a. Procedimiento

Pese las bolsas de polietileno hasta el 0.1 mg más cercano. Agregue de 1 a 1.5 g de muestra húmeda y pese. Comprima la muestra en el tercio inferior de la bolsa. Anude la parte superior de la bolsa dos o tres veces y póngala en la cápsula de la bomba. Conduzca el análisis como se especifique en el manual de operación. Reste el valor calórico de la bolsa, además de las otras correcciones, para obtener el valor calórico de la muestra.

### 5. Determinación del nitrógeno insoluble en pepsina o del nitrógeno insoluble en ácido detergente

El calentamiento del forraje durante el ensilaje o el secado puede resultar en un incremento de la pro-

teína insoluble en pepsina o proteína insoluble en ácido detergente. Por ello, este valor debe sustraerse del de la proteína total estimada por Kjeldahl o técnicas equivalentes. Ninguno de los procedimientos anteriores parece estar firmemente establecido como indicador de la calidad del forraje. El procedimiento de pepsina insoluble es quizás más simple y se realiza en muchos laboratorios comerciales. La exactitud de la técnica con pepsina depende de la actividad de una enzima no estandarizada.

En estos procedimientos, 2 g de muestra homogenizada son, ya sea digeridos con pepsina y luego lavados o bien reflujados con ácido detergente y lavados. El nitrógeno o proteína se determina en el residuo. Para mayor detalle referirse al AOAC 2.049 (AOAC, 1975)

Existe otro procedimiento para medir proteína no disponible que puede emplear la técnica de Tilley y Terry (1963) para digestión *in vitro* de los forrajes cosechados.

### 6. Determinación de amoníaco

En los ensilajes el amoníaco y otros compuestos nitrogenados volátiles pueden formarse por degradación de la proteína (Rouxton y McDonald, 1974). El siguiente procedimiento puede emplearse para determinar la extensión de esta degradación.

## a. Procedimiento

Agregue 5 g de muestra homogenizada a 45 ml de agua en un "beaker" de 250 ml. Agregue 1 ml de NaOH concentrado y mida el ión amonio con el electrodo del "Orion Specific Ion", siguiendo los requisitos de estandarización e indicaciones especificados por el fabricante.

## 7. Determinación del nitrógeno volátil

El nitrógeno volátil se determina por el siguiente procedimiento; mayores referencias pueden encontrarse en el método AOAC 2.055 (AOAC 1975):

Pese de 5 a 10 g de muestra húmeda, usando papel filtro Whatman N° 42 (15 cm), como medio de transferencia. Póngala en un frasco Kjeldahl de 800 ml. Prepare dos blancos. Agregue 50 ml de una solución de ácido bórico al 4% a un Erlenmeyer y póngalo como trampa para el destilado. Agregue al frasco Kjeldahl 1 cucharadita rasa de carbonato libre de MgO y aproximadamente 0.1 g de parafina, esto último para prevenir la formación de espuma. Inmediatamente agregue alrededor de 400 ml de agua y conecte el frasco Kjeldahl al aparato de destilación. Destile más de 200 ml. Titule con HCl 0.741N, usando un indicador bromo-cresol verde, hasta que cambie de azul a amarillo. Corrija por la titulación del blanco.

## 8. Determinación de carbohidratos solubles residuales

Los azúcares son la fuente inmediata de energía. Algunos de ellos se convertirán en ácido láctico y otros a ácidos volátiles durante el proceso de ensilaje. Otros se perderán como dióxido de carbono u otros productos finales de la fermentación (McDonald *et al.*, 1973). Dubois *et al.* (1956) han informado que el método del ácido fenol sulfúrico es satisfactorio para la determinación de estos carbohidratos. Waldo *et al.* (1975), citados por Parker, 1978) también han sugerido el uso de una técnica con paratoluidina. De los diferentes procedimientos, el del ácido fenol sulfúrico es el más simple y relativamente insensible a alteraciones en la especie molecular del carbohidrato.

### a. Método con ácido fenol sulfúrico

#### (1) Reactivos

**Solución de fenol.** Mezcle 80 g de fenol cristalizado etiqueta GILT, con 20 ml de agua destilada. Guarde la solución en botella oscura y bajo refrigeración.

**Acido sulfúrico.** Concentrado, grado AR.

**(2) Procedimiento.** Prepare un extracto mezclando 10 g de muestra homogenizada con 90 ml de agua destilada. Agite la mezcla por dos

minutos y centrifuge a 2000 RCF por 10 minutos. Separe el filtrado claro y diluya 1 en 10. Pipetee 1 ml en un tubo de ensayo (7 x 12 mm). Agregue 1 ml de agua destilada. Luego agregue 0.15 ml de la solución fenol al 80% mezcle bien. Agregue 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y deje que la mezcla enfríe. Haga la lectura a 4700 A° (filtro azul). Prepare un estándar seco de una mezcla equimolar de glucosa y xilosa. Diluya con agua destilada y analice por lo menos 5 diluciones para obtener una curva estándar. Prepare un blanco de 2 ml de agua destilada, 0.15 ml de solución fenol y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. **CUIDADO:** El ácido sulfúrico concentrado genera mucho calor al diluirse. Agréguelo al final y agite la mezcla.

#### **b. Método con antrona**

El procedimiento con antrona también funciona adecuadamente para la medición de carbohidratos disponibles (Barnett, 1954).

##### **(1) Reactivos**

**Acido sulfúrico diluido.** Diluya 500 ml de  $H_2SO_4$  concentrado en 200 ml de agua.

**Antrona.** Disuelva 0.2 g en 100 ml del ácido diluido. Descarte cualquier partícula no diluida. Prepare este reactivo diariamente.

**(2) Procedimiento.** Pipetee 5 ml del reactivo de antrona a tubos pyrex con

tapa y enfriados en un baño de hielo. Vierta sobre la superficie 1 ml del extracto conteniendo de 10 a 100  $\mu g$  de carbohidratos. Mezcle los contenidos revolviendo y vuelva a poner las tapas en los tubos. Ponga los tubos en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos exactos. Enfríelos inmediatamente en el baño de hielo por lo menos dos minutos. Lea a 6200 A° (filtro naranja/rojo). El blanco consiste en 5 ml de reactivo de antrona y 1 ml de agua destilada. Los estándares se preparan con una solución de glucosa al 0.1% (p/v) en ácido benzoico saturado. La curva es lineal entre los 25 y 100  $\mu g$ .

#### **9. Determinación de la fibra detergente neutro (pared celular)**

Este procedimiento provee una estimación de la fibra total en los forrajes. Consiste en la extracción del ensilaje o forraje, con un detergente a temperatura ambiente combinado con un agente solvente de quelatos para remover grasa, proteína solubles, carbohidratos y sales minerales (Van Soest y Robertson, 1985; Robertson y Van Soest, 1980).

#### **10. Determinación de lignina y sílica en detergente ácido**

El propósito principal de este procedimiento es determinar el componente del forraje que no es modificado por el ensilamiento. El método contempla la determinación inicial de la

fibra detergente ácido, la cual incluye celulosa, lignina, cutina y minerales (principalmente sílice). Estos residuos se tratan con ácido sulfúrico 72% para remover la celulosa, lo cual deja atrás una combinación de lignina más cutina (si hay presentes cascarillas de semillas) y minerales insolubles en ácido (Van Soest y Robertson, 1985). Ninguna de estas sustancias sufren modificaciones por acción microbial en el ensilaje, por lo que estos compuestos pueden servir como marcadores internos, por medio de los cuales pueden medirse cambios en otros sustratos fermentables (Van Soest y Jones, 1968).

## **11. Determinación de ácidos grasos volátiles**

Se incluyen dos procedimientos. El primero de ellos utiliza cromatografía de gas o de gas-líquido. El segundo involucra un procedimiento rutinario de laboratorio de destilación con vapor más oxidación de ácido láctico a acetato (Parker, 1978). Se recomienda la cromatografía .

### **a. Determinación por cromatografía**

El análisis cromatográfico de los ácidos grasos volátiles (AGV) en ensilajes es un procedimiento altamente técnico que requiere un equipo complejo. El uso apropiado de varios cromatógrafos de gas para análisis de AGV se detalla en los manuales de operación comerciales y no se necesita duplicar aquí. Sin embargo, el uso de los materiales de columna correctos es

crítico. Los siguientes materiales de columna y dimensiones se han encontrado satisfactorios para el trabajo de determinación de AGV de ensilajes.

- (1) - Columna de vidrio de 6 pies x 2 mm de diámetro interno.
  - NPGSB al 5%.
  - Acido fosfórico al 1% en soporte Anakron A de 90-100 mesh (disponible en Analabs, Inc. de North Haven, Conn.) (Speckman, comunicación personal).
- (2) - Columna de vidrio de 6 pies x 2 mm de diámetro interno.
  - Supelco SP 1000 al 10% en soporte Supelcoport de 80- 100 mesh (Waldo, 1978, citado por Parker, 1978).

Para cromatografía gas-líquido:

- (1) - Columna de vidrio de 6' x 1/8" de diámetro interno.
  - Cromosorb 101 de 80-100 mesh (Jugust, comunicación personal).
- (2) - Columna de acero inoxidable 6' x 2 mm de diámetro interno.
  - SP 1200 al 10%.
  - Acido fosfórico al 1% en soporte Chromasorb WAW de 80-100 mesh.
  - Temperatura de la columna 125°C.

- Tasa de flujo del N<sub>2</sub> 40 ml/minuto.
- Temperatura del inyector 130°C.
- Temperatura del detector 175°C (Von Glan, 1978, citado por Parker, 1978).

## 12. Análisis microbiológico

Algunos análisis microbiológicos pueden ser muy útiles en el seguimiento del proceso de fermentación, como también en la investigación de aspectos relacionados con la putrefacción del ensilaje. Con estos objetivos en mente, se sugiere el análisis microbiológico que a continuación se presenta.

Los organismos causantes de la fermentación en los ensilajes son esencialmente bacterias productoras de ácido láctico, primordialmente los lactobacilos (Jensen, 1947, citado por Parker, 1978). De allí, se proponen dos medios de cultivo para contar lactobacilos. Ambos son apropiados. El más convencional es el medio Rogosa LBS, pero en la experiencia de los autores, el medio ácido MRS (De Man *et al.*, 1960) soporta mayor crecimiento y es igualmente selectivo.

La mayor parte de las putrefacciones y de la producción de micotoxinas en ensilajes proviene del crecimiento de hongos. Es por ello que se especifican los medios para conteo de hongos y levaduras. El efecto de otros grupos de bacterias menos específicas, tales como el total de aeróbicas,

total de anaeróbicas, coliformes, etc., sobre la calidad del ensilaje es realmente tenue. Además, es necesario producir información adicional que asocie la concentración de estos microorganismos con la calidad del ensilaje. Los medios específicos para el conteo de microorganismos aeróbicos y anaeróbicos totales se sugieren con la esperanza de uniformizar los esfuerzos de investigación.

El mantenimiento de condiciones anaeróbicas es requisito para ciertos conteos. Esta técnica puede no ser familiar en algunos laboratorios, por lo que pueden ser de alguna utilidad los siguientes comentarios.

La incubación anaeróbica puede plantear problemas especiales. Muchos de los recipientes anaeróbicos disponibles son satisfactorios. Estos incluyen los Torbol, Gas Pak, Mc Intosh-Fildes y Baird-Tatlock. Los últimos son modificaciones del recipiente Breuer. La mayoría utiliza una mezcla de gas que contiene alrededor del 10% de hidrógeno (80-90% N<sub>2</sub>; 5-10% H<sub>2</sub>; 5-10% CO<sub>2</sub>). El oxígeno se elimina por reacción catalítica con el hidrógeno para formar agua. Es preferible el uso de un catalítico frío (por seguridad), pero se debe tener mucho cuidado para asegurar su actividad catalítica. La forma usual es un "pellet" de paladio revestido con aluminio, que descansa sobre un cedazo de alambre. El paladio se desactiva con la humedad y el H<sub>2</sub>S, siendo necesario reactivarlo luego de cada uso, mediante calentamiento a 160°C por 90 minutos.

El sistema Gas Pak es un generador de hidrógeno con una envoltura de papel de aluminio. El hidrógeno se produce agregando 10 ml de agua. La actividad catalítica del Gas Pak puede detectarse por la generación de calor en la parte superior del recipiente. Los recipientes Gas Pak están disponibles con o sin válvula. Se recomienda el estilo con válvula.

Otra alternativa disponible a mucho menos costo es el uso de una olla de presión All American (completamente de aluminio). La olla se convierte en un recipiente anaeróbico reemplazando el medidor de presión con una válvula para salida e ingreso. La anaerobiosis se obtiene por un proceso de evacuación y regaseo. Primero se induce un vacío de al menos 55 cm (25") de Hg. Se usa una mezcla de hidrógeno, dióxido de carbono y nitrógeno para reemplazar el vacío. El proceso de evacuación y regaseo se repite un mínimo de tres veces. Las trazas remanentes de oxígeno se remueven ya sea con "pellets" de paladio o con lana de acero humedecida con una solución acidificada de sulfato de cobre. El uso de la lana de acero es ligeramente más complicado, pero evita la reactivación continua de los "pellets" de paladio.

### a. Conteos de plato

Para mayor detalle acerca del procedimiento que a continuación se presenta véase Hausler (1977).

Mezcle 25 g de muestra homogenizada con 225 g de agua estéril en una licuadora esterilizada. Pipetee 10 ml de esta dilución 1/10 en 90 ml de agua estéril, obteniéndose una dilución 1/100 ó  $10^{-2}$ . Deben hacerse otras diluciones más para obtener la escala de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ . En cada caso agite la dilución 50 veces. Después de obtener la dilución deseada, pipetee ya sea 0.1 ó 1.0 ml en agar líquido a 45°C (0.1 ó 0.5 ml en agar sólido) usando bastones de vidrio sólido para distribuir el inóculo uniformemente sobre la superficie del medio.

A continuación (Cuadro A1) se presentan recomendaciones para los diferentes medios de cultivo, pudiendo notarse que es posible usar diferentes marcas comerciales para obtener la misma composición del medio.

Bothast *et al.* (1974) sugieren el agar con extracto de malta (pH 5.4) conteniendo 0.03 g de tetraciclina por litro.



**Cuadro A1. Medios recomendados para conteo de microorganismos.**

Microorganismos de interés	Medio	Condiciones
Aeróbicos totales <sup>1,2</sup>	- Plato agar Difco 0479 - Plato agar Oxoid CM183 - MPH agar BBL 11381	Aeróbicas 30°C
Anaeróbicos totales	- RCA oxoid CM151 - BBL 11564	Frasco anaeróbico 30°C
Lactobacilos	- Rogosa Difco 0480 + Rogosa Oxoid Pm 221 + LBS BBL 11327  - MRS Difco 0881 + MRS Oxoid CM361	Frasco anaeróbico 30°C
Hongos y fermentos <sup>1</sup>	- Agar Difco 0013 con dextrosa de papa  - Agar Oxoid CM139 con dextrosa de papa  - Agar BBL 11549 con dextrosa de papa	

<sup>1</sup> pH ajustado a 4.0 con ácido tartárico.

<sup>2</sup> Para conteos aeróbicos el medio debe contener 0.1 g de ciclohexamida (Actidiona, Upjohn) adicional para prevenir el sobrecrecimiento de hongos y fermentos.

### 13. Referencias

- AOAC. 1975. Official Methods of Analysis. 12 ed. Washington D.C., EE.UU., Association of Official Agricultural Chemists. 1015 p.
- BAKERT, S.D.; SUMMERSON, W.H. 1941 The colorimetric determination of lactic acid in biological material Journal of Biological Chemistry 138:535.
- BARNETT, A.J.G. 1954. Silage fermentation. New York, Academic Press. 208 p.
- BOTHAST, R.J.; ADAMS, G.H.; HATFIELD, E.E.; LANCASTER, E.D. 1974. Preservation of high

- moisture corn: A microbiological evaluation. *Journal of Dairy Science* 58:386.
- DeMAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23:130.
- DUBOIS, M.; GILES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, D. 1956. Colorimetric determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350.
- HARPER, W.J.; RANDOLPH, H.E. 1960. Study suggests possible relationship between flavor and lactic acid in cottage cheese. *American Milk Review* 22:43.
- HAUSLER, W.J. 1977. Standard methods for the examination of dairy products. 13 ed. American Public Health Association. 350 p.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; RALTON, J. 1973. Energy changes during ensilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 24:827.
- PARKER, R.B. 1978. Methodology for determining quality of silage. *In Fermentation of silage: A review*. Ed. by M.E. McCulloch. Iowa, EE.UU., National Feed Ingredients Association. 332 p.
- ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P.J. 1980. The detergent system of analysis and its application to human foods. *In The analysis of dietary fiber*. Chapter 8. Ed. by W.P.T. James, P. Theanders. New York, EE.UU., Marcel Decker.
- ROUXTON, J.B.; McDONALD, P. 1974. The influence of oxygen on silage. I. Laboratory studies. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 25:107.
- VAN SOEST, P.J.; JONES, L.H.P. 1968. Effect of silica in forages upon digestibility. *Journal of Dairy Science* 51:1644.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B. 1985. Analysis of forages and fibrous foods. A laboratory manual for Animal Science 613. Ithaca, New York, EE.UU., Cornell University. 165 p.
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of British Grassland Society* 18:104.

## ANEXO B

### UNA PAUTA PARA LA CALIFICACION DE ENSILAJES DE ACUERDO A SU COMPOSICION QUIMICA Y CONSUMO VOLUNTARIO

#### 1. Con base en el pH y contenido de materia seca

En el Cuadro B1 se presenta una guía para la clasificación de ensilajes en función del contenido de MS y pH.

#### 2. Con base en el contenido de materia seca, fibra cruda, ácido butírico y nitrógeno amoniacal

Con estos indicadores se diseñó el Sistema de Evaluación "Indio Hatuey". Dicho sistema establece rangos discriminatorios para cada categoría en tres parámetros: dos indicadores bioquímicos y un consumo estimado. Las pautas para usar este sistema se resumen en el Cuadro B2.

La estimación del consumo de materia seca se obtiene mediante el uso de una ecuación lineal múltiple, generada a partir de datos de consumo de 33 ensilajes.

$$Y = 38.782 + 0.120 \text{ MS} - 0.054 \text{ FB} - 0.222 \text{ AB}$$

Error estándar :

$$0.143 \quad 0.015 \quad 0.016 \quad 0.053$$

$$R = 0.90; p < 0.01$$

donde:

$$Y = \text{Consumo estimado, g MS/kg}^{0.75}$$

$$\text{MS} = \text{Contenido de materia seca, g/kg}$$

$$\text{FB} = \text{Contenido de fibra bruta, g/kg MS}$$

$$\text{AB} = \text{Contenido de ácido butírico, g/}$$

Aún cuando no se determine el N-NH<sub>3</sub>/N total, es posible continuar aplicando el sistema. Para ello se sustrae del valor de los rangos de puntuación máxima y mínima los puntos que aporta este indicador en cada categoría.

**Cuadro B1. Relación entre el pH y la materia seca para la clasificación de los ensilajes.**

Categoría	MS (%)				
	15-20	21-25	26-30	31-35	35-40
Excelente	< 4.0	< 4.2	< 4.4	< 4.6	< 4.8
Bueno	< 4.2	< 4.4	< 4.6	< 4.8	< 5.0
Satisfactorio	< 4.4	< 4.6	< 4.8	< 5.0	< 5.2
Mediocre	< 4.6	< 4.8	< 5.0	< 5.2	< 5.4
Malos	4.6	4.8	5.0	5.2	5.4

**Cuadro B2. Sistema de clasificación para ensilajes tropicales.**

Clasificación	Puntaje por indicador	N-NH <sub>3</sub> /N total %	Acido butírico g/kg MS	Consumo estimado g/kg <sup>0.75</sup>	Puntaje de clasificación
Excelente	5	< 7	< 1	> 71	15-13
Bueno	4	7-10	< 5	71-62	12-10
Satisfactorio	3	11-15	5-9	61-52	9-7
Mediocre	2	16-20	10-20	51-42	6-4
Malos	1	> 20	> 20	< 20	3

### 3. Ejemplos de aplicación del Sistema de Evaluación de "Indio Hatuey"

Asuma el caso de un ensilaje al cual sólo se le determinó MS (26.9%) y pH (4.8). De acuerdo al Cuadro B1, este ensilaje puede considerarse entre satisfactorio y mediocre. Si además se le conocieran los valores de fibra bruta (36.7% MS); ácido butírico (0.65% MS) y N-NH<sub>3</sub>/N total (16%), se podrían aplicar las pautas presentadas en el Cuadro B2. Para ello se procedería a convertir los dos primeros indicadores

y la materia seca a g/kg MS, multiplicando a cada uno de ellos por 10. Con los valores así convertidos, seguidamente se determina el consumo estimado mediante la ecuación anteriormente indicada.

$$\begin{aligned} \text{Consumo estimado} &= 38.782 + 0.120 \\ &(269) - 0.054(367) - 0.222(6.5) \\ &= 49.8 \text{ g MS/kg}^{0.75} \end{aligned}$$

A continuación se busca en el Cuadro B2, la categoría a que corresponde cada indicador y se le otorga la puntuación. Según el puntaje de clasificación este ensilaje es satisfactorio.

Si no se dispusiera de alguno de los indicadores, por ejemplo N-NH<sub>3</sub>/N total (%), a la puntuación de clasificación se le restan los puntos corres-

pondientes al indicador, quedando el puntaje de clasificación de la siguiente forma:

<b>Clasificación</b>	<b>Puntaje de clasificación</b>
Excelente	10 - 9
Bueno	8 - 7
Satisfactorio	6 - 3
Mediocre	4 - 3
Malos	2

<b>Parámetro</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Puntos</b>
N-NH <sub>3</sub> /N total : 16%	Mediocre	2
Acido butírico: 6.5 g/kg MS	Satisfactorio	3
Consumo: 49.8 g MS/kg <sup>0.75</sup>	Satisfactorio	3
	<b>Total</b>	<hr/> 8

# RECOMENDACIONES SOBRE METODOLOGIA DE INVESTIGACION EN CONSERVACION DE FORRAJES

*Claudio Wernli<sup>1</sup>, Diego González, María Kass, Félix Ojeda*

## 1. Introducción

La posibilidad de conservar forrajes se ha conocido por muchos años, y en las zonas templadas su aplicación práctica se ha difundido entre los productores gracias al desarrollo de metodologías apropiadas de preparación y de estudio. En los trópicos, los métodos de conservación de forrajes no son tan populares, consecuencia de diferencias en las condiciones climáticas y a la falta de tecnologías adecuadas.

El estudio de la conservación de forrajes como ensilaje presenta características muy particulares en relación a métodos de investigación y de análisis químico, que justifican su consideración en un capítulo separado.

## 2. Conservación de forrajes como ensilaje

En la investigación sobre la producción de ensilajes se deben considerar los siguientes aspectos:

### a. Objetivos de la investigación

La preparación del material y los métodos de ensilado y análisis deben de estar en función de los objetivos de la investigación. Así por ejemplo, si el objetivo es estudiar la dinámica de fermentación, se deben utilizar silos de laboratorio y analizar variables como materia seca (MS), temperatura, pH, NH<sub>3</sub> y ácidos grasos volátiles (AGV)

---

<sup>1</sup> Coordinador del grupo de trabajo

## b. Uso de diferentes tipos de silo

En el documento de Wernli y Ojeda, que se presenta en esta Guía Metodológica, se describen los tipos de silo más comúnmente utilizados en investigación. En el Cuadro 1 se presenta una guía para la utilización de los diferentes tipos de silo, de acuerdo con los objetivos del trabajo.

## c. Caracterización del material a ensilar

Se deben considerar dos tipos de muestras: a) muestras para conocer el material original y su potencial pa-

ra ensilaje y b) muestras del material siendo ensilado para caracterizarlo de acuerdo a los objetivos de la investigación. En el caso de querer definir el potencial del material para ser ensilado, se sugiere una caracterización considerando aspectos agronómicos y químicos. Los análisis mínimos recomendados son: contenido de MS, carbohidratos solubles y capacidad tampón. Para caracterizar el material a ensilar se recomiendan los análisis ya mencionados más aquellos pertinentes, según objetivos del experimento. Para la determinación de carbohidratos solubles en el material a ensilar se recomienda analizar carbohidratos solubles en agua.

**Cuadro 1. Uso de diferentes tipos de silo según los objetivos del experimento.**

Objetivos	Tipo de silo		
	Laboratorio	Piloto	De campo
Dinámica de fermentación	sí	no	no
Fermentación final	sí	sí	sí
Pérdidas bajo condiciones del estudio	sí	sí	sí
Pérdidas bajo condiciones de un sistema de producción	no	no	sí
Evaluación con animales			
Ovinos	no	sí	sí
Bovinos	no	no	sí
Diseños experimentales con elevado número de tratamientos y/o repeticiones <sup>1</sup>	sí	sí	difícil

<sup>1</sup> Las muestras tomadas de un mismo ensilaje no son repeticiones del tratamiento en ese silo.

#### d. Caracterización del ensilaje

**(1) Muestreo.** Para silos piloto y de campo se recomienda realizar un muestreo a medida que se va utilizando el ensilaje. No se recomiendan los métodos de muestreo con barreno o bolsas de malla insertadas en la masa ensilada, por problemas de representatividad y alteración del proceso fermentativo.

Las muestras deben congelarse lo más rápidamente posible después de colectarse. De no ser factible, se recomienda mantener las muestras en bolsas plásticas herméticas, dentro de un recipiente aislado con hielo, hasta que puedan congelarse o analizarse.

**(2) Análisis químico y biológico.** En la evaluación de la fermentación del ensilaje se recomienda realizar los siguientes análisis: MS, pH, N total, N soluble y/o  $\text{NH}_3$  y AGV.

**(a) Materia seca.** Pese a su precisión y exactitud, en general no se recomienda la determinación por destilación con tolueno debido a: 1) su limitada capacidad para el análisis de un gran número de muestras; 2) riesgo personal por ser el tolueno cancerígeno; 3) baja magnitud de las diferencias entre valores de MS determinados por tolueno y por horno, que no son relevantes en algunos experimentos y 4) pérdidas inevitables de compuestos volátiles antes de que el ensilaje sea consumido, que hacen aún menores las diferencias entre los valores de MS determinados por los dos

métodos. Por lo tanto, se recomienda sumar los compuestos volátiles (AGV,  $\text{NH}_3$ ) a la MS determinada en horno a  $105^\circ\text{C}$ . También se puede estimar MS verdadera mediante el uso de ecuaciones de corrección de la MS determinada al horno, según se detalla en el documento de Wernli y Ojeda (presentado en esta misma Guía Metodológica), hasta tanto se desarrollen correcciones para ensilajes tropicales. Esto no descarta la posibilidad de utilizar el método de tolueno si los objetivos así lo justifican.

**(b) Nitrógeno.** Se recomienda determinar N total y  $\text{NH}_3$  en la muestra fresca. Las determinaciones de  $\text{NH}_3$  por destilación, con el electrodo o por el método de Conway (1957) son igualmente apropiadas. Las referencias respectivas se presentan en el documento de Wernli y Ojeda (ver este mismo capítulo).

**(c) Ácidos grasos volátiles.** Para la determinación de AGV totales se recomienda el método de Lepper y Fleg (para referencia ver documento de Wernli y Ojeda). Para el análisis de AGV individuales deben utilizarse técnicas cromatográficas.

**(d) Ácido láctico.** Se recomienda su determinación en ensilajes de materiales con un alto contenido de carbohidratos solubles. Un método preciso y asequible es el de Baker y Sommerson (1941). Otros



métodos alternativos se presentan en el documento de Wernli y Ojeda.

**(e) Análisis microbiológicos.** Estos se deben llevar a cabo en función de objetivos muy específicos de la investigación, existiendo metodologías confiables para su realización. Para más detalles referirse al documento de Wernli y Ojeda.

#### **e. Fuentes de variación**

**(1) Aditivos.** Cuando se utilicen, debe constatarse si existen limitaciones legales. Por ejemplo, el formaldehído se puede depositar en productos animales para consumo humano y su uso está prohibido en EE.UU.

**(2) Temperatura.** Para evaluar cambios en la fermentación y efectos de la temperatura ambiental es deseable hacer mediciones periódicas de la temperatura del silo (una vez por día durante los primeros diez días de fermentación, y una vez cada cinco días hasta la estabilización del proceso). Se recomienda usar termómetros de medición o cables para termómetros eléctricos que estén permanentemente localizados dentro de la masa ensilada.

**(3) Premarchitamiento.** Si se incluye este factor como un tratamiento experimental, debe considerarse que es muy variable y riesgoso, por diferencias en condiciones meteorológicas. Por lo tanto, se deben tener suficientes repeticiones y preferiblemente una curva de deshidra-

tación con respecto al tiempo previo y durante el premarchitamiento.

### **3. Conservación de forrajes como heno**

Los métodos recomendados para el análisis químico de henos son similares a los utilizados para el análisis de forrajes. En casos especiales puede medirse el contenido de carotenoides después de henificar.

### **4. Necesidades de investigación**

- a. Desarrollo de métodos para la predicción del contenido de MS total (tolueno) a partir de la determinación de MS en horno.
- b. Determinar el potencial del método Kjeldahl para el análisis de  $\text{NH}_3$ .
- c. Significado y utilidad de la determinación de la proteína soluble.
- d. Estudios microbiológicos en ensilajes tropicales.
- e. Utilidad de las determinaciones *in vitro* e *in situ* como indicadores del valor nutritivo de ensilajes tropicales.
- f. Uso de los efluentes como alimento y para reducir la contaminación
- g. Estimación de pérdidas en ambientes tropicales, con especial énfasis

al control de pérdidas una vez abierto el silo.

h. Desarrollo de tecnología apropiada para pequeños productores.

### 5. Referencias

BARKER, S.D.; SOMMERSON, W.H. 1941. The colorimetric determina-

tion of lactic acid in biological material. *Journal of Biological Chemistry* 138:535.

CONWAY, E.J. 1957. *Microdiffusion analysis and volumetric error*. 4 ed. London, U.K., G. Lockwood. 465 p.

## DISCUSION DE LAS RECOMENDACIONES DEL GRUPO DE TRABAJO No.4

*Moderador: Dr. Roberto Quiroz*

### **M. E. RUIZ**

Quisiera preguntar si el grupo consideró el efecto de altas temperaturas ambientales sobre la calidad de la fermentación en el ensilaje. Hago la pregunta fundamentado en observaciones que tuvimos en Panamá con silos de campo. Los hicimos en un período en que las temperaturas eran bastante elevadas (36 a 38 °C) encontrando grandes pérdidas del material ensilado con niveles de melaza que ya habíamos probado en otros ambientes, especialmente aquí en Turrialba, y donde no se observaba el mismo grado de carbonización extensa del material. No fue un experimento diseñado para definir el efecto de la temperatura ambiental, pero nos hizo sospechar que talvez eso pudiera haber coadyuvado el efecto de altos niveles de un material altamente fermentable sobre el tipo de fermentación y, adicionalmente, interferido con la liberación del calor de fermentación hacia el exterior.

### **F. OJEDA**

Debemos distinguir dos cosas. Si es que el ensilaje llegó a carbonizarse, esto pudo deberse a que hubo reentrada de aire y se produjo una combustión. Por otro lado, si lo que se encuentra es una mala fermentación a pesar de existir una adecuada hermeticidad, entonces lo que ocurrió fue que se instauraron las bacterias clostrídicas, conllevando a una putrefacción del material. No tiene nada de particular que pudieran ocurrir los dos fenómenos simultáneamente.

Realmente no consideramos el efecto de las altas temperaturas sobre la calidad fermentativa de los ensilajes, pero si le puedo decir que las altas temperaturas tropicales tienden a destruir la calidad final de los ensilajes. Eso es lo que hemos hallado en estudios microbiológicos.

A modo de ejemplo, en ensilajes de King Grass confeccionados bajo las

mismas condiciones pero conservados a diferentes temperaturas, los que se introdujeron en una incubadora a 55 °C presentaron una proliferación espontánea de bacterias clostrídicas, resultando en concentraciones altas de ácido butírico y en una disminución notable del número de bacterias lácticas presentes; en comparación con ensilajes que permanecieron entre los 15 y 20 °C.

Creo que la respuesta definitiva a la pregunta del Dr. Ruiz la encontraremos en la medida que se profundice en los conocimientos de la microbiología de ensilajes tropicales.

## **R. QUIROZ**

Quisiera agregar algo más al comentario del Dr. Ruíz. Adicional a la alta temperatura ambiental a que se exponían los silos, la cobertura se hacía con plástico negro. Con la absorción de radiación solar es probable que la temperatura del silo fuera de 40 °C o mayor.

## **G. PICHARD**

Efectivamente, existe influencia de la temperatura ambiental, y su mecanismo de acción es a través del estímulo de la tasa respiratoria del tejido todavía verde al inicio del proceso de fermentación.

## **J. ZORRILLA**

Quisiera sugerir que se ponga especial énfasis en la caracterización del material empleado, incluyendo as-

pectos como: género, especie, variedad, días de crecimiento a la cosecha, tipo de suelo del que proviene, prácticas de cultivo, especialmente niveles de fertilización empleados, etc. Algo más que deseo agregar es la caracterización en términos físico-estructurales de la planta, como podría ser la proporción hoja-tallo-mazorca.

También felicito al grupo por no recomendar métodos analíticos dando preferencia a su sofisticación y precisión, cuando no estén plenamente justificados por los objetivos de la investigación. Tal es el caso del método del tolueno para la determinación de materia seca, que ha sido tan apoyado en el pasado.

## **D. GONZALEZ**

El documento considera la caracterización del material no sólo en términos químicos, sino también otras características que no mencioné, tales como características físicas de tamaño de partícula antes y después de ensilar. Antes, porque influyen sobre el tipo de fermentación, y después, por la forma en que el animal lo va a consumir. Según el Dr. Ojeda, el tamaño de partícula a usar depende del tipo de animal con que se va a utilizar (bovinos u ovinos). También se discute la importancia de la procedencia del material ensilado.

## **R. BOREL**

Me interesó el comentario sobre la investigación en ensilajes para pequeños productores. Quisiera compartir

una experiencia negativa en los altiplanos de Etiopía, donde evaluamos la producción de sorgo y su uso en ensilaje en fincas muy pequeñas (2-5 ha). La principal limitante, que impidió la aplicación de esta tecnología, fue la necesidad de cortar, picar y comprimir un alto volumen de material, en muy poco tiempo y sin maquinaria. Esto resultó mucho más crítico que aspectos nutricionales y debería ser tomado en consideración en programas de investigación sobre el tema.

#### **D. PEZO**

Hasta donde entiendo, de los factores más importantes en el proceso de ensilaje es la compactación. ¿Hay alguna referencia en el documento respecto a cómo estandarizar ese proceso cuando se trabaja con microsilos?

#### **F. OJEDA**

Sí. Se encuentra en el documento base. La compactación es muy fácil en el caso de los ensilajes de laboratorio, no así en los silos de campo donde esta acción se complica y, para ser realistas, en eso estamos a nivel de empirismo. Lo que sí sabemos es que nuestros ensilajes son mucho menos densos que los ensilajes en climas templados, con mayor retención de aire intersticial, que contribuye al calentamiento y a mayores pérdidas de nutrimentos.

Concuerdo con lo manifestado por el Dr. Borel y es por eso que creo necesario dirigir investigaciones hacia cómo resolver la conservación a

nivel del pequeño productor. En investigaciones que he visto, se tiende a ir hacia lo clásico, dejando los problemas medulares sin resolver, y uno de ellos es cómo llevar la preservación de alimentos al ganadero de pocos recursos.

#### **J. ZORRILLA**

Quisiera compartir una experiencia realizada en Panamá, en la que se buscaba ofrecer al pequeño productor una alternativa menos dependiente de la maquinaria en el proceso convencional de ensilaje, factor fuertemente limitante en este tipo de productores.

Los procedimientos empleados para la conservación del forraje, caña de azúcar, fueron de dos tipos: el primero fue su conservación en una atmósfera de amoníaco, lograda mediante la aspersion del material con una solución de urea (5% del material fresco), y su recubrimiento con plástico. No se tomó ninguna precaución de eliminar el aire del interior por medio de la compactación. El segundo método fue aplicando vacío al material depositado a nivel de piso, sin compactar, cubierto con el plástico que comúnmente se usa para cubrir un silo. El vacío se ejerció usando una bomba, con una adaptación de mangueras acondicionadas *ex profeso* para lograr el vacío. Ambas alternativas rindieron resultados muy satisfactorios. Con esto quiero enfatizar el hecho que debiéramos redoblar esfuerzos para desarrollar alternativas tecnológicas prácticas, que eliminen la maquinaria requerida para llevar a

cabo los procesos de picado y compactación del material.

## G. PICHARD

Quisiera comentar respecto a las mediciones que ha propuesto el grupo para las fracciones nitrogenadas, fundamentalmente nitrógeno soluble y nitrógeno amoniacal. Creo que ambas son importantes, pero con objetivos diferentes. Cuando evaluamos la calidad de la fermentación, la fracción de nitrógeno amoniacal, expresado como porcentaje del nitrógeno total, es muy importante y tiene una alta correlación con la actividad clostridial y la producción de ácido butírico. Es muy buen indicador del grado de proteólisis ocurrido durante la fermentación.

Por otra parte, el nitrógeno soluble es evidentemente muy importante desde el punto de vista de la nutrición del rumiante y, de hecho, debe ser manejado por el nutricionista cuando formula dietas, teniendo en consideración el hecho de que en los ensilajes la fracción de nitrógeno soluble es mucho mayor que en los forrajes verdes.

En relación con la metodología para determinar el nitrógeno amoniacal, nosotros hemos usado el aparato Kjeldahl, destilando con óxido de magnesio y parafina, para evitar la producción de espuma, y funciona perfectamente. Hemos usado también electrodo de amoniaco con mucho éxito y también el método colorimétrico, basado en Chaney y Marbach.

Estos últimos métodos son muy útiles para la medición en gran cantidad de muestras.

Respecto a no recomendar el método de tolueno como práctica rutinaria de análisis, estoy de acuerdo; pero debemos ser cautelosos en la forma en que se presenta la recomendación, y no simplemente decir que no se recomienda. La decisión de usarlo debe depender de la precisión que desea el investigador y de acuerdo con eso verá si usa tolueno o usa estufa.

Para concluir, quiero preguntar al grupo ¿cómo abordarían el estudio o la evaluación del deterioro aeróbico del ensilaje una vez que se abre para alimentar el ganado?

## C. WERNLI

En realidad la idea de la comisión no ha sido decir que se descarta la medición por tolueno. La técnica de tolueno es un gran invento, ha ayudado y puede seguir ayudando mucho. Lo que queremos dejar claro es que no se considera necesario hacerla en caso de no tener facilidades para ello, ya que hay como sustituirla en forma eficiente.

## F. OJEDA

Quisiera decir con respecto a los silos que se fabrican al vacío, que esa tecnología se ha dejado de utilizar por lo complicada que resulta, aunque es innegable que es una buena opción. En Cuba, como no teníamos las máquinas para la extracción del aire,

recurrir a la toma de aire del tractor, lo que resultó un método magnífico.

Entrando a contestar la pregunta formulada por el Dr. Pichard, deseo indicar que el deterioro aeróbico del ensilaje, una vez abierto el silo, fue discutido por el grupo, y llegamos a la conclusión que es un tópico que está todavía por ser estudiado en ensilajes tropicales. Nosotros recién iniciamos algunas evaluaciones en un trabajo de tesis, y los resultados son realmente alarmantes. En sólo cuatro horas un ensilaje tropical puede transformarse en algo totalmente distinto a lo originalmente ofertado. Se producen pérdidas de materia seca, cambios profundos en la fracción soluble de nitrógeno, el amoníaco y en todos los ácidos orgánicos. Un ensilaje tropical expuesto al aire y al sol se convierte en un alimento incosumible por el animal en un tiempo muy breve. Este fenómeno puede tener grandes implicaciones, inclusive de manejo, a la hora de suministrar los ensilajes a los animales y complicar su manipulación, porque pudiera hacer necesaria dos extracciones, una por la mañana y otra por la tarde cuando se necesite dejar un suplemento nocturno en los comederos.

Consideramos que este tema debe estudiarse a profundidad, ya que no sólo es necesario obtener un ensilaje de buena calidad, sino que cuando se esté utilizando no pierda sus cualidades nutritivas.

## C. CHAVES

Mi comentario no es exactamente sobre metodología de hacer ensilajes, sino más bien sobre la conveniencia o no de estos sistemas de conservación en Centroamérica. Cuando se piensa en la lógica de conservar el exceso de forraje que se produce durante la época de lluvia para utilizarlo en el período seco, es evidente de que el ensilaje sería la solución; sin embargo, al visitar fincas en el área, se encuentran silos que fueron construidos a un alto costo y que ahora se usan con otros propósitos. De ahí mi preocupación. ¿Hasta dónde esta técnica, por el riesgo que implica ensilar materiales tropicales bajo nuestras condiciones, debería recomendarse? ¿Qué es lo que pasa con el ensilaje en condiciones tropicales?

## D. GONZALEZ

Personalmente no puedo recomendar si el ensilaje es o no una alternativa apropiada para el área centroamericana. ¿Por qué razón no funciona la técnica a nivel de muchos finqueros? Tal vez porque es un sistema de conservación que requiere de más cuidado, de más conocimiento y nuestra idiosincracia no está totalmente preparada para eso. Sin embargo, hay que recordar que se está discutiendo metodología de investigación para Latinoamérica en general.

## C. WERNLI

Creo que la observación es interesante y se puede considerar dentro de la historia de la agricultura mundial.

Dentro de los métodos de conservación de forrajes existentes (henificación, ensilaje o deshidratación artificial), sin duda alguna el ensilado es el método a utilizarse. Primero porque la deshidratación artificial ha sido dejada de lado por razones económicas. Segundo, las condiciones climáticas en la mayor parte de la superficie agrícola pecuaria del mundo no permiten hacer una buena henificación, así que si queremos conservar forrajes, si lo consideramos relevante dentro de un sistema de producción pecuaria, debemos recurrir al ensilado.

Me atrevería a especular que en los trópicos existe fundamentalmente un problema de tecnología, así como lo fue hace dos o tres décadas en el resto del mundo. Hace 20 ó 30 años en Inglaterra y Europa, con climas muy lluviosos y muy difíciles para la henificación, el grueso de la conservación de forrajes era henificación y no el ensilado; se pusieron a investigar para solucionar los problemas del ensilado, y hoy día lo tienen mayormente solucionado. Este método de conservación se encuentra dominando 60 o 70% del total del forraje conservado en esas áreas

En el sur de Chile, definitivamente las condiciones climáticas no permiten hacer un buen heno. Sin embargo, los índices de hace 5 ó 6 años indican que 70% de la conservación de forrajes se hace en forma heno, no ensilaje. Creo que es meramente un problema de tecnología en el caso nuestro, y yo creo que es el mismo caso en los trópicos. Me atrevería a decir

que en el trópico hay un desafío mayor, porque hay dificultades mayores y prácticamente hay que comenzar de cero. En este sentido estamos impresionados por los trabajos que ha presentado el Dr. Ojeda, en la forma que están abordando el tema, y los descubrimientos que están haciendo.

## F. OJEDA

Si bien los problemas de los ensilajes tropicales son fundamentalmente tecnológicos, para poder impulsar la tecnología es necesario empezar por la formación de los profesionales que están encargados de orientar al campesino o a la empresa ganadera. Esta formación falta en la mayoría de nuestras universidades, las cuales proporcionan, en el caso de la conservación de forrajes, sólo los elementos básicos de la misma. Así, en una asignatura como Nutrición Animal, la confección y utilización de los ensilajes se reduce a pocas horas clase; en la mayoría de los casos basadas en experiencias de zonas templadas. Consideramos que en la medida que se incorpore en los cursos universitarios la problemática de los ensilajes tropicales y se enseñen los avances tecnológicos que se han ido alcanzando, se va a ganar confianza en la aplicación de esta técnica.

En el caso de los ensilajes tropicales, abogamos porque conforme se promuevan proyectos para estudiar sistemas de manejo o para la creación de nuevas especies más productivas, también se incluyan estudios sobre la conservación de estos forrajes en los



trópicos. Si hacemos un balance del apoyo que se le brinda a la investigación en ensilajes tropicales contra el apoyo que le brindan los países desarrollados a otros temas, encontraremos que es mínimo. Quisiera aclarar que no sólo me refiero a los forrajes sino también a nuestros subproductos, los cuales se pudren por falta de investigaciones consecuentes.

El Dr. Borel tiene la preocupación de si las soluciones halladas se adecúan al pequeño productor; considero que es justa su preocupación, que las mismas están por ser estudiadas y que si no existen hay que buscarlas. Si se han encontrado soluciones para otras cuestiones más difíciles como las plagas, y los genetistas logran cultivos más resistentes, es de suponer que podamos encontrar dentro de los microorganismos que se desarrollan en los ensilajes tropicales, unos que sean termófilos, que resistan las altas temperaturas y que garanticen una adecuada conservación.

## G. PICHARD

Quisiera hacer un comentario respecto a la caracterización del material ya fermentado. Me parece que el Dr. González, al hacer la presentación, mencionó la conveniencia de determinar ácidos grasos volátiles y posiblemente ácido láctico también. Desde el punto de vista nutricional, la medición de acidez total, junto a la información del pH y de las reacciones

de proteólisis, medidas por la proporción de nitrógeno amoniacal, puede ser suficiente para interpretar la calidad del producto final.

No se mencionó la medición de etanol como una de las medidas y creo que debe incluirse en caso de querer describir detalladamente la fermentación. Igualmente, puede ser de interés determinar el nivel de carbohidratos no estructurales residuales en el material final, porque eso es indicativo del grado de fermentación que hubo y constituye una fracción de alto valor nutritivo que es preferencialmente fermentada, provocando pérdidas considerables.

Ultimamente nos ha interesado medir la estabilidad del material ensilado. Básicamente lo que hacemos es titular la acidez total acumulada, y hemos encontrado, para pH equivalentes, características de estabilidad muy diferentes. Proponemos evaluar esta técnica junto al valor de pH como indicadores de estabilidad del material ensilado.

## D. GONZALEZ

Para la determinación de los ácidos grasos, lo que recomendamos es un método sencillo de separación química sin ningún aparato (Lepper y Fleg, 1938)<sup>1</sup>. Después se dan como alternativa los métodos cromatográficos. Acogemos la proposición de la

<sup>1</sup>LEPPER, S.; FLEG, Z. 1938. Tierernahrung. Futtermittelkunde 1:187.

acidez total y consideramos que es una alternativa barata y fácil de implementar en muchos lugares.

### **G. PICHARD**

Quiero hacer mención a la utilización de inóculos en microsilo de laboratorio. Hemos tenido experiencias buenas y malas con eso. En la preparación de microsilos no hemos usado la maquinaria tipo "chopper" que usualmente se usa para cantidades mayores, y hemos tenido fermentaciones muy débiles y muy erráticas. Al incluir la inoculación en el proceso hemos solucionado totalmente el problema.

### **M.E. RUIZ**

Quería preguntar al grupo si en las pautas metodológicas se consideró algo sobre la arquitectura de los silos, tanto a nivel de laboratorio como en silos piloto y de campo, o si se considera que esto no tiene importancia. La consulta la hago con base en información que vi de Argentina, donde se compararon diferencias en arquitectura de silos a nivel de campo, y aparentemente habían efectos bastante importantes sobre el rendimiento de forraje útil. La otra razón de esta consulta es que estamos muy conscientes de la gran variedad que hay en los recipientes que se emplean, principalmente, para estudios a nivel de laboratorio. Si ustedes consideran que esto es algo que debería tender a estandarizarse, sugeriría incluir sus recomendaciones, pues ello ayudaría mucho en el establecimiento de estu-

dios comparativos entre diferentes laboratorios.

### **C. WERNLI**

Voy a permitirme comentar, primero, sobre la observación que acaba de hacer el Dr. Pichard. Quisiéramos dejar en claro que la adición de cultivos microbianos a un minisilo, o un silo piloto, debe depender del objetivo del trabajo. Al hacerlo, estaríamos alterando completamente el objetivo, si lo que se pretende es estudiar una situación de un ensilaje bajo las condiciones en que se realiza en la práctica. De manera que habría que tener el cuidado de que al agregar cultivos microbianos, que en algunos casos surten efecto y en otros no, se haga en concordancia con los objetivos de los experimentos.

En relación a la pregunta del Dr. Ruiz, la arquitectura de los silos de campo no fue considerada por esta comisión. Uniformar ese criterio me parece bastante difícil, pero si algún día los investigadores en conservación de forraje en Latinoamérica nos pudiéramos poner de acuerdo sería excelente. Lo hemos considerado en términos de microsilos y silos pilotos. Hay una descripción en el documento base, donde se indican formas y dimensiones, de acuerdo a trabajos que hemos hecho nosotros y otros citados en la literatura. Diría que estaríamos trabajando con silos cilíndricos, tipo tubo de ensayo en el caso de los minisilos, y tipo cilindros de concreto o de polietileno en el caso de silos piloto.

## CAPITULO V

### SISTEMAS DE ALIMENTACION

#### GRUPO DE TRABAJO No. 5

Dr. Carlos Chaves  
Dr. Danilo Pezo  
Dr. Oswaldo Rosero  
Dr. Manuel E. Ruiz  
Dr. Richard Taylor  
Dr. Charles Wilcox

# DESARROLLO DE SISTEMAS DE ALIMENTACION: MARCO CONCEPTUAL

*Manuel E. Ruiz<sup>1</sup>*

## 1. Introducción

Para un simple observador, pero (para preocupación de muchos) para una alta proporción de nutricionistas en particular y de zootecnistas en general, la tarea de investigación pecuaria tiene como propósito el desarrollar tecnología o sistemas eficientes, donde la eficiencia está definida como la relación entre un producto deseado y los recursos empleados. ¿Cuántas veces hemos escuchado o dicho que debemos desarrollar sistemas de producción más baratos o de mínima inversión o de máxima rentabilidad o de óptima eficiencia biológica?

En esta introducción ya se ha empleado el término "sistemas" sin mucho preámbulo. Por la naturaleza del manual metodológico, no hay espacio para elaborar sobre el enfoque

de sistemas en la investigación agropecuaria (para ello ver Sands, 1986; Ruiz, 1989), salvo dar una definición que permita ubicar mejor las consideraciones que siguen. El sistema agropecuario puede definirse como una combinación de factores y procesos, que actúan como un todo y que interactúan entre sí, y que son administrados por el productor y su familia para obtener, consistentemente, uno o más productos viables y consecuentes con sus metas y necesidades, manteniendo coherencia con el ambiente social, físico, biológico, económico, cultural y político.

Enlazando los conceptos de los dos párrafos anteriores, si tratamos de desarrollar sistemas eficientes de alimentación o de producción animal, es posible usar cualquiera de una serie de parámetros para evaluar la eficiencia, siendo posible considerar uno,

---

<sup>1</sup>Ph.D. Nutricionista, Secretario Ejecutivo de RISPAL, IICA/CIID, San José, Costa Rica.

dos o más productos pecuarios y uno, dos o más recursos e insumos. Sin embargo, independientemente de cuál sea la decisión en este sentido, lo más probable es que se estará tratando el sistema de producción animal *per se*, y poco o nada con el sistema mayor dentro del cual está contenido el sistema pecuario. Pero ¿por qué esta preocupación? Norman (1980), Hart (1979) y otros han expresado en la literatura lo que muchos otros han experimentado en la práctica: Cualquier sistema de producción agropecuaria, además de contener interacciones y relaciones internas, también está modulado por el comportamiento de otros sistemas y procesos que comparten el sistema de finca y que, a su vez, son modulados por factores externos que incluyen el ambiente social, el político, el económico, el cultural y el físico (suelo, clima).

En la medida que se consideren factores adicionales a los involucrados en el sistema de producción animal, mayor será la complejidad de desarrollar sistemas mejores de producción. Esto debido a que habría que tomar en cuenta las interacciones y el dinamismo de los sistemas considerados (Ruthenberg, 1980). En una reciente reunión de RISPAL<sup>1</sup> sobre la participación de las ciencias sociales en la investigación en sistemas agropecuarios (RISPAL, 1989), quedó evidente que cuando se trata exclusivamente del sistema de producción

animal, o agrícola, sin enlazarlo con los factores externos, las ciencias biológicas son las que intervienen en forma exclusiva en la investigación. En la medida que se quiera relacionar este sistema con el ambiente, y muy especialmente, cuando se trata de su transferencia y adopción, por el productor, las ciencias sociales toman más y más importancia. Este hecho no debe interpretarse en el sentido que el biólogo queda cómodamente circunscrito al desarrollo de paquetes tecnológicos o sistemas de alimentación o de producción animal, y que es responsabilidad de los colegas sociólogos el decidir cuál de estos productos realmente servirá al productor y a la sociedad. Si fuera así, poco o nada se ha avanzado con la evolución de un enfoque disciplinario o de sistemas. Y lo que internamente al sistema pudiera juzgarse como eficiente, al momento de transferir la tecnología podría encontrarse todo lo contrario: ineficiencia de la tecnología desarrollada con tanta inversión de tiempo, dinero y esfuerzo.

## 2. Metodología

Dadas las consideraciones presentadas en los párrafos anteriores, la proposición de una metodología para el desarrollo de sistemas mejorados debe incluir pasos que aseguren la

---

<sup>1</sup>Red de Investigación en Sistemas de Producción Animal en Latinoamérica

ubicación del sistema objetivo dentro de un contexto ambiental mayor, la orientación correcta del experimento y la identificación correcta de los recursos e insumos disponibles para la producción. Este documento es un esfuerzo en esa dirección.

#### a. Información requerida

(1) **Definición del contexto socio-económico y ecológico del sector rural para el cuál se pretende desarrollar el sistema de producción animal.** No debe bastar que el investigador esté consciente de la necesidad de aportar, con su tecnología, a una mayor producción de alimentos (leche, carne, etc.) o bienes (fuerza de tiro, inventario, etc.). Es necesario conocer las prioridades de desarrollo, las políticas agropecuarias, las necesidades de la población objetivo, la infraestructura rural presente y la misión de la institución o programa al cuál pertenece el investigador. En un principio, el tomar en cuenta estos aspectos sólo dará una imagen un tanto difusa de la región o estrato que envolverá el objetivo de la investigación. La resolución de la imagen se obtendrá con un estudio de la información que describe y clasifica los sistemas contenidos en la región. Quizás hace 10 años esa información era difícil de encontrar, pero ahora se tiene a disposición descripciones de amplia cobertura geográfica, por ejemplo, Cardozo *et al.* (1980) para la región andina, Paladines (1980) para el trópico, Habit (1980) para la zona templada-fría, y también descripcio-

nes más puntuales y de geografía más reducida como aparecen en las memorias de reuniones de RISPAL (por ejemplo, Li Pun y Gutiérrez, 1986).

(2) **Selección de parámetros biológicos que describen el sistema de producción.** Es obvio que si el propósito es desarrollar tecnología que permita el mejoramiento del sistema tradicional de producción, éste debe conocerse no sólo en estructura sino en funcionalidad, incluyendo su eficiencia y adecuación en el contexto socio-económico y ecológico.

La descripción del sistema (s) prevaleciente (s) en la región seleccionada es meramente una fotografía plasmada en el tiempo. Muestra los elementos que componen el sistema de alimentación, producción animal, el inventario de recursos y la calidad de los mismos, pero no muestra la dinámica con que estos recursos e insumos son utilizados en el tiempo para producir los productos o bienes. Es decir, es necesario conocer el engranaje que mueve al sistema pero, siguiendo los razonamientos de Hart (1979) y Spedding (1980), también es necesario conocer cómo éste sistema se conecta con otros, por ejemplo, agrícolas, forestales o de actividad comercial no agropecuaria. En otras palabras, reconociendo que existe una jerarquía de sistemas, es necesario conocer el sistema objetivo, el sistema mayor dentro del cuál se ubica el sistema objetivo, así como los sistemas menores que componen el sistema objetivo.

Según Chudleigh (1980), se tendría que recopilar información sobre los insumos y recursos (área total de la finca, área de pastos, número de animales, etc.) prácticas de producción (carga animal, tipo de pastoreo, manejo del ordeño, prevención de enfermedades, etc.) y los productos (novillos vendidos al destete, leche, lana, etc.). El sistema mayor o sistema ambiental, se conocería tomando información sobre el clima, precios, facilidades de comercialización, demanda de mano de obra, etc.; que pueden influir sobre las prácticas de producción, así como las cantidades y tipos de insumos que demanda el sistema objetivo y los productos que éste debe rendir. En el nivel inferior, la selección de parámetros se hace mediante un ejercicio de lógica, a partir de la pregunta ¿qué eventos implica la práctica de producción X? Por ejemplo, si el manejo del ternero es en un sistema de doble propósito, donde el amamantamiento es restringido, ¿cuántas veces por día amamanta ese ternero? ¿Por cuántas horas? ¿Recibe suplemento o pastorea? Si hay variaciones en estas prácticas, ¿qué intervalo entre partos se tiene en el hato? ¿existe esta información?

En general la información biológica es precisa o, por lo menos, implica precisión. Es concreta y, por ello, es posible pensar en el desarrollo de nuevos sistemas cuyo comportamiento biológico es predecible. Pero existe información biológica que, aunque se toma con esa suposición de estabilidad, puede variar en forma significativa e impredecible. Por ejemplo,

el requisito de mano de obra por vaca por año puede incluso considerarse como un coeficiente (invariable), pero puede cambiar según las motivaciones o esperanzas de los productores (Ruthenberg, 1980) o con cambios súbitos en la sociedad.

**(3) Selección de parámetros sociales que describen el sistema.** Ruthenberg (1980) argumenta que, si bien las ciencias biológicas permiten la predicción, con cierto grado de probabilidad, las ciencias sociales no tienen esa capacidad. De hecho, los datos socio-económicos son inherentemente inestables y cambian con el tiempo y objetivos. Sin embargo, el ignorar los parámetros sociales, justamente por esa inestabilidad, en el desarrollo de tecnología, puede conducir a conclusiones y recomendaciones peligrosas, porque al final de cuentas la selección de una tecnología por un biólogo no se sujeta exclusivamente a su ponderación de eficiencia biológica, sino también económica, lo que implica el uso de precios y demandas, y otros criterios que son inestables. Y si ese biólogo investiga con un enfoque de sistemas, la selección de la tecnología va a incluir su confrontación con el productor, es decir, va a sujetarse a sus apreciaciones personales, movidas por consideraciones sociales muchas veces difíciles de identificar y mucho más de cuantificar

Jackson (1981) ilustra la importancia de considerar variables sociales en el desarrollo de una recomendación tecnológica. El relata que en India, visitó a un productor para

recomendarle cómo mejorar la alimentación de su ganado. El ganado consumía 60% de paja, 35% de forraje verde y 5% de concentrado. Los animales jóvenes ganaban 0.1 kg/día, las vacas parían un año sí y el otro no y producían 600 kg de leche por lactancia. Con base en los resultados de la estación experimental (usando el mismo tipo de animales) él sabía que si se alimentaba con más forraje verde o concentrado las novillas podrían ganar 0.3 kg/día; las vacas parir cada año y medio y producir 1200 kg de leche por lactancia. Es más, la capacidad de tiro de sus bueyes podría hasta duplicarse. Haciendo cálculos le recomienda al productor que les de más forraje o concentrado y menos paja. Sin embargo, se encontró con que el productor no tenía más concentrado ni podía producir más forraje verde en su pequeña finca. Tampoco podía reducir el tamaño del hato para ganar más disponibilidad de forraje y concentrado para los animales restantes; él necesitaba de sus dos bueyes para arar, transportar y bombear el agua, y necesitaba una o dos vacas para producir reemplazos de los bueyes. Pero aún si pudiera reducir el tamaño del hato, digamos a la mitad, la disponibilidad de concentrado aumentaría de 0.2 kg a sólo 0.4 kg, mucho menos de lo que las tablas de requisitos le indicaban al técnico. Para rematar, el productor no estaba muy entusiasmado con la idea de dar menos paja. ¿Qué haría con el sobrante? Ni soñando desperdiciaría parte de su energía quemándola o haciendo "compost". Sus animales hacían un mejor trabajo convirtiéndola

en un bien de mayor beneficio: el estiércol. Este era su combustible (no tenía disponibilidad de otro) y lo quemaba directamente o lo usaba para producir biogas. Así que por no considerar otros parámetros, además de los biológicos, el técnico debe volver al punto inicial de preguntarse cómo es que puede desarrollar una recomendación tecnológica para el productor.

Tal como lo expresa Ruthenberg (1980), las variables socio-económicas son el resultado de las interacciones entre las relaciones técnicas o biológicas y las creencias y aspiraciones del hombre. La implicación es que muchas variables sociales son difíciles de determinar y dependen del criterio y experiencia del investigador. Para Ruthenberg (1980), es importante que entre las variables que se seleccionen, se encuentren las siguientes:

**(a) Relaciones de precios.** Contrario a la creencia de muchos investigadores y planificadores, lo que motiva a un productor a adoptar una tecnología, no es una explicación elocuente de las necesidades futuras del país, sino los precios que espera obtener por algo que él puede producir (aún mejor con la tecnología mejorada). Aún tecnología que minimiza los costos de producción o que optimiza el uso de la energía no será adoptada a menos que se pruebe que está ligada a algún atractivo de precios.

Intimamente relacionado con los precios, está toda la información que concierne a la infraestructura



que concierne a la infraestructura y servicios que permitan al productor entrar en el engranaje de mayor y mejor producción. Es decir, a veces el precio no es suficiente. Un ejemplo es el caso de la zona de Río Frío, en Costa Rica, donde gracias al establecimiento de un sistema de recolección, acopio, transporte y comercialización de leche, los productores adoptaron un sistema de producción de leche desarrollado por el CATIE (Villegas, 1982).

**(b) Tamaño de la finca.** Muchos han argumentado que la tecnología pecuaria (y en gran medida la nutrición y genética animal) ha sido más orientada a los productores especializados, que tienen los mejores hatos y los mayores recursos (Ruiz, 1987). Sin embargo, en los últimos 10 años se ha ganado más conciencia de que en los países de América Latina predominan los ingresos bajos, que la población aumenta rápidamente y que hay una tendencia (forzada o voluntaria) hacia la reducción del tamaño de finca. Pero, con la excepción de reformas agrarias sin soporte crediticio y de asistencia técnica, los pequeños productores han mostrado ser más eficientes que los terratenientes y, esto, puede asociarse con el alto nivel de dinamismo, capacidad de adaptación a cambios externos y mentalidad inquisitiva que son características del productor de escasos recursos (Sands, 1986).

El investigador pecuario debe estar consciente que la tecnología que desarrolle se preste a las condiciones del pequeño productor y, por ello, las variables ligadas a los objetivos de este productor deben ser consideradas por el investigador. Estas son: aumentar el ingreso, producir alimento para consumo familiar, en algunos casos producir tracción animal, producir estiércol para los cultivos y alcanzar seguridad mediante la acumulación de riqueza en forma de ganado (Ruthenberg, 1980)

**(c) Tenencia de la tierra.** El tipo e intensidad de la tecnología a desarrollar seguramente serán afectados por el estatus predominante de tenencia de la tierra. Es muy diferente si se está trabajando con productores dueños de sus fincas, a que se trabaje con ejidos o comunidades, donde los productores poseen hatos, pero usan una parcela comunitaria en que ningún individuo estará dispuesto a invertir en su mejora. Ahora bien, es posible pensar en incluir en la tecnología condiciones necesarias para su adopción y éxito, tal como la racionalización del uso de la tierra comunitaria a través de cuotas de pastoreo (Ruthenberg, 1980) o un calendario de uso escalonado de la tierra.

**(d) Conocimientos del productor.** Ruiz (1988) ha argumentado que el productor, especialmente el pe-

queño, es también un investigador, que gusta examinar y, a veces, este espíritu de investigador es el principal factor que lo mueve a adoptar parte o toda la tecnología desarrollada para él. El diagnóstico de esta actitud debe formar parte de las variables socio-económicas, no sólo por su importancia en una eventual transferencia de tecnología, sino también para que el investigador aprenda y registre los "resultados experimentales" que el mismo productor, sus antepasados o sus vecinos, han obtenido.

El hecho de que diferentes productores, en una misma región, tengan diferentes niveles tecnológicos, debe ser aprovechado para establecer estudios de relación que identifiquen las diferencias resultantes en productividad, así como las exigencias de insumos que cada nivel tecnológico demanda.

- (e) **La interrelación del sistema de alimentación animal con los sistemas de cultivo.** Este aspecto incluye tanto parámetros de tipo biológico como de orden social. En el aspecto biológico interesa cuantificar las relaciones de dependencia como por ejemplo, la producción de biomasa utilizable por el animal (subproductos, residuos de cosecha y productos) producida por cada cultivo por unidad de área en un período dado. En el aspecto social debe recopilarse información acerca de qué tan ínti-

mamente están ligadas ambas actividades, pecuaria y agrícola, porque a mayor intimidad más difícil será que el productor adopte una tecnología pecuaria (Ruthenberg, 1980)

Por otro lado, es importante recopilar información acerca de cultivos que practica el productor, o que podría practicar, pues tal vez sea necesario que la recomendación técnica pecuaria se autofinancie, parcial o totalmente, con una actividad agrícola de más rápida respuesta y menores exigencias de capital inicial.

- (f) **Disposición del productor a tomar riesgos.** Este es uno de los parámetros más importantes a tomar en cuenta. Los más escasos de recursos, aquellos que practican una agricultura de subsistencia, serán los más reacios a arriesgar en una tecnología distinta. Pero hay otros que sí pueden tomar riesgos. En cualquier caso, el productor debe resolver el conflicto entre dos objetivos: utilidad económica y seguridad (Zandstra *et al.*, 1975). Riesco (1987) ha presentado un modelo para la toma de decisiones en el que se incluye un elemento de aversión al crédito, en la forma de un nivel de confianza de no tener un flujo de caja negativo, debido a la introducción de una nueva tecnología. Según este modelo, la aversión al riesgo llega a ser el principal factor que controla la adopción de tecnología.

Como corolario, la investigación para el desarrollo de sistemas de alimentación animal debe incluir evaluaciones del factor riesgo involucrado, mediante análisis de sensibilidad de la tecnología.

## b. La decisión sobre qué investigar

Hasta aquí, se ha querido dejar evidente que existe una serie de consideraciones y factores que afectan la orientación y selección de áreas temáticas de la investigación. A manera de resumen, la toma de decisiones podría basarse en un conjunto de pasos (no secuenciales) metodológicos.

- Tomar conciencia del macroambiente dentro del cuál se va a pretender introducir cambios mediados por tecnologías a desarrollar.
- Cuantificar y calificar los recursos disponibles en la región y en las fincas, y sus costos de utilización
- Identificar los productos o bienes deseados, en armonía con la demanda, las políticas de desarrollo, infraestructura y expectativas del productor.
- Identificar los cuellos de botella en los sistemas locales de alimentación (producción) animal y establecer un orden de prioridad con base en análisis de simulación (puede ser sólo con análisis *ex-ante*).
- Documentar y analizar la tecnología desarrollada por los productores.

-Planear la investigación con un criterio de eficiencia en el uso de recursos e insumos, no sólo optimizando la conversión biológica sino también mejorando la utilidad económica.

-Seleccionar los experimentos a efectuar con base en tres criterios: a) utilidad económica potencial, b) conservación de la capacidad productiva de los recursos naturales, c) predisposición del productor a aceptar tecnología en el tema considerado.

-Mantener en mente que la tecnología a desarrollar será adoptada con mayor probabilidad si: a) satisface la expectativa de mayores ingresos, b) se adecúa a las características socio-económicas y culturales del productor, c) se fundamenta en el uso de recursos locales, d) minimiza la dependencia de insumos importados de fuera de la finca, e) está dirigida a mejorar el sistema y no a transformarlo, aunque la tecnología de transformación no debe desecharse de *ipso facto* (Ruthenberg, 1980), f) el grado de interacción con otros sistemas no pecuarios es mínimo.

## 3. Referencias

- CARDOSO, A.; FLORENTINO, R.; SALAZAR, J.J. 1980. Sistemas bioeconómicos de producción animal. *In* Memorias IV Conferencia Mundial de Producción Animal, v. 1. Ed

- por L.S. Verde; A. Fernández. Buenos Aires, Argentina. Asociación Argentina de Producción Animal. p. 34.
- CHUDLEIGH, P. 1980. The identification and description of animal production systems. *In* Memorias IV Conferencia Mundial de Producción Animal, v. 1. Ed por L.S. Verde; A. Fernández. Buenos Aires, Argentina. Asociación Argentina de Producción Animal. p. 250.
- HABIT, M. A. 1980. Sistemas bioeconómicos de producción animal en la zona templada-fría. *In* Memorias IV Conferencia Mundial de Producción Animal, v. 1. Ed por L.S. Verde; A. Fernández. Buenos Aires, Argentina. Asociación Argentina de Producción Animal. p. 92.
- HART, R. 1979. Agorecosistemas: Conceptos básicos. Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica. 211 p. (Mimeografiado).
- JACKSON, M.G. 1981. Who needs feeding standards? *Feed Science and Technology* 6:101.
- LIPUN, H.H.; GUTIERREZ, N. (Eds.) 1986. Informe de la VI reunión de trabajo sobre sistemas de producción animal. Centro Internacional de investigaciones para el Desarrollo. Bogotá, Colombia. Publicación IDRC-MR139s. 200 p.
- NORMAN, D.W. 1980. El método de investigación de sistemas agropecuarios: Su pertinencia para el pequeño productor. Estudios sobre el Desarrollo Rural, Reporte No. 5. East Lansing, Michigan, EE.UU. Michigan State University. 30 p.
- PALADINES, O. 1980. Sistemas de producción ganadera en el Trópico de América. *In* Memorias IV Conferencia Mundial de Producción Animal, v. 1. Ed por L.S. Verde; A. Fernández. Buenos Aires, Argentina. Asociación Argentina de Producción Animal. p. 49.
- RIESCO, A. 1987. Liquidity value of credit and risk attitude of small farmers: Impact on adoption of medium term technological innovations. Iowa State University, Department of Economics. 18 p.
- RISPAL. 1989. Las ciencias sociales aplicadas al enfoque de sistemas de producción: Aproximación a una metodología. Memorias de una Reunión de Trabajo, Chíncha, Perú. 25-27 de enero de 1988. Lima Perú. Red de Investigación en Sistemas de Producción Animal de Latinoamérica, IICA, CATIE, INIPA. En prensa.
- RUIZ, M.E. 1987. El enfoque de sistemas en la investigación pecuaria. Documento presentado en el Simposio Internacional del XXX Aniversario de la Escuela De Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, México.

- 2-3 de marzo de 1987. 22 p. (Mimeografiado).
- RUIZ, M.E. 1989. El enfoque de sistemas en la investigación pecuaria: Definición y estado actual en América Latina. *In* Las ciencias sociales aplicadas al enfoque de sistemas de producción: Aproximación a una metodología. Memorias de una Reunión de Trabajo, Chíncha, Perú. 25-27 de enero de 1988. Lima Perú. Red de Investigación en Sistemas de Producción Animal de Latinoamérica, IICA, CATIE, INIPA. En prensa.
- RUTHENBERG, H. 1980. Socio-economic variables within animal production systems. *In* Memorias IV Conferencia Mundial de Producción Animal, v. 1. Ed por L.S. Verde; A. Fernández. Buenos Aires, Argentina. Asociación Argentina de Producción Animal. p. 179.
- SANDS, DEBORAH M. 1986. Farming systems research: Clarification of terms and concepts. *Experimental Agriculture* 22:87
- SPEDDING, C.R.W. 1980. The effectiveness of animal production systems. *In* Memorias IV Conferencia Mundial de Producción Animal, v. 1. Ed por L.S. Verde; A. Fernández. Buenos Aires, Argentina. Asociación Argentina de Producción Animal. p. 121.
- VILLEGAS, L.A. 1982. Implementación del sistema CATIE para la producción de leche. *In* Sistemas de Producción con Bovinos en el Trópico Americano. Ed por L. Pearson de Vaccaro. Maracay, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. p. 75.
- ZANDSTRA, H.; SWANBERG, K.G.; ZULBERTI, C.A. 1975. Venciendo las limitaciones a la producción del pequeño productor. Instituto Colombiano Agropecuario y Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Bogotá, Colombia. Publicación IDRC-058s. 32 p.

# METODOLOGIAS PARA LA INVESTIGACION EN LA RELACION REPRODUCCION-NUTRICION

*Richard Taylor<sup>1</sup> y Carlos Chaves<sup>2</sup>*

## 1. Introducción

Durante muchos años se han reconocido las implicaciones de la nutrición sobre la eficiencia reproductiva del ganado. Sin embargo, a pesar de que se han hecho un número muy apreciable de observaciones, lo cierto es que no conocemos lo suficiente acerca de los mecanismos fisiológicos involucrados. Es preciso generar esta información para poder formular recomendaciones que aumenten la eficiencia reproductiva de los hatos, sobre todo en situaciones en las cuales los requerimientos nutricionales de los animales están por debajo del nivel ideal.

La reproducción es el resultado de una serie de eventos fisiológicos, los cuales se suceden a lo largo de la vida

del animal. En situaciones en las que tanto la cantidad como la calidad del alimento disponible a lo largo del año no son limitantes, se observa que es poco común encontrar problemas reproductivos. Sin embargo, bajo condiciones de manejo extensivas es usual que se den fluctuaciones marcadas en la disponibilidad alimentaria durante las diferentes épocas del año. Bajo estas circunstancias, la estrategia más apropiada de alimentación es aquella que contempla la suplementación alimentaria de los animales durante los períodos más críticos del ciclo reproductivo.

Algunos de los efectos que las variaciones en la disponibilidad de forrajes tienen sobre los rumiantes bajo pastoreo pueden evitarse mediante la suplementación; sin embargo, esta práctica no es muy difundida quizá

---

<sup>1</sup> Ph.D., Fisiólogo de la Reproducción, CATIE, Turrialba, Costa Rica.

<sup>2</sup> Ph.D., Nutricionista, CATIE, Turrialba, Costa Rica.

debido al hecho de que no existe información cuantitativa que nos permita predecir la respuesta animal.

Una de las mayores dificultades para interpretar las interacciones nutrición-reproducción, es la evaluación del estado nutricional del animal. Se puede definir la nutrición desde varios puntos de vista, en términos de oferta de energía, oferta de proteína y oferta de otros componentes en la dieta, tales como vitaminas y minerales; por otro lado, la evaluación del estado nutricional de los animales se hace con base en variables tales como el peso vivo y los cambios en condición corporal. El principal problema que presentan estas mediciones es su nivel de imprecisión ya que reflejan únicamente cambios a largo plazo, mientras que algunos de los componentes del proceso reproductivo (ovulación, fertilización e implantación) se dan en la hembra en períodos de tiempo bastante cortos.

Se hace necesario por lo tanto desarrollar sistemas de medición más eficientes para evaluar el estado nutricional, que permitan una mejor comprensión de los procesos fisiológicos involucrados (Haresign, 1984).

## 2. Estudios sobre pubertad

La pubertad en la hembra se define como la manifestación del primer celo acompañado por el desarrollo de un cuerpo lúteo funcional (Moseley *et al.*, 1982). En el macho, la pubertad se define como la edad a la cual se ha logrado por lo menos una monta duran-

te la prueba de libido, y que el eyaculado recolectado con vagina artificial o electroeyaculador contenga no menos de  $50 \times 10^6$  espermatozoides, con un mínimo de 10% de motilidad (Pruitt y Corah, 1985; Pruitt *et al.*, 1986).

La edad a la pubertad en bovinos puede estar influenciada por la raza, la nutrición y posiblemente por interacciones metabólicas endocrinas, inducidas por promotores del crecimiento (Moseley *et al.*, 1982). Se ha encontrado, a través de una serie de trabajos experimentales, la existencia de una relación directa entre la ganancia de peso, edad a la pubertad y eficiencia reproductiva en novillas de carne (Short y Bellows, 1971).

### a. Variables a evaluar

(1) **Ganancia de peso y crecimiento de los animales prepúberes en relación al nivel de alimentación.** Los estudios relacionados con el efecto alimentario sobre la pubertad deben diseñarse asignando los animales a grupos de acuerdo a los niveles energéticos y/o protéicos que contengan las diferentes dietas. El peso y crecimiento de machos y hembras deben relacionarse con los niveles de alimentación y con el inicio de la pubertad en machos y hembras. Se recomienda pesar y medir la altura a la cruz mensualmente.

(2) **Detección de manifestaciones de celo en novillas prepúberes.** La práctica recomendada por

la mayoría de los autores es la observación de las novillas un mínimo de dos veces diarias, temprano en la mañana y al final de la tarde. Los períodos de observación deben de hacerse cada uno por espacio de una hora y media a la misma hora todos los días.

El celo por si solo puede conducir a errores en la estimación de la edad a la pubertad ya que no es anormal que se presenten los llamados celos no púberes en novillas, los cuales no van acompañados de ovulación ni desarrollo de un cuerpo lúteo funcional, encontrándose además que estos están influenciados por genotipo, edad y época del año (Nelsen *et al.*, 1985).

**(3) Ovulación y desarrollo de un cuerpo lúteo funcional.** La manera más sencilla de detectar estas variables es mediante la palpación rectal de los ovarios, la cual debe practicarse a intervalos semanales, para constatar el desarrollo de los ovarios y la aparición de tejido luteal, indicador de la ovulación en la novilla. En la actualidad los estudios de pubertad en hembras se acompañan en lo posible (disponibilidad de equipo y personal calificado) con la cuantificación de progesterona en plasma sanguíneo, obtenido una, o idealmente, dos veces por semana, mediante punción de la vena yugular o la coccígea (Gowan y Etches, 1979; Clark y Bierschwal, 1986; Robert y Taylor, 1986).

**(4) Características testiculares.** En el macho es importante medir la circunferencia escrotal con una cinta métrica metálica, tomando además

medidas de la longitud y el ancho del testículo con un "vernier"; es importante además evaluar la consistencia de los testículos. Las mediciones anteriores deben hacerse con una periodicidad mensual a partir del año de edad. Una precaución importante que debe observarse se refiere al hecho de que a pesar de que, la circunferencia escrotal es un buen indicador de pubertad en el toro, se ha observado que en algunas razas esta puede variar dentro de diversas poblaciones (Fields *et al.*, 1982).

**(5) Número de animales experimentales.** La mayoría de los autores consultados utiliza en sus estudios de pubertad un número de animales relativamente pequeño, lo cual es contradictorio con el hecho de que para la variable edad a la pubertad, el coeficiente de variación está por encima del 15%. En pocos casos, sobre todo en machos, se encuentran trabajos en los cuales se utilizan más de 100 animales. Estos estudios por lo general se llevan a cabo en centros de inseminación artificial, donde se realizan pruebas de sementales.

### **3. Estudios sobre edad a primer parto**

La edad a primer parto está influenciada por el inicio de la pubertad, y como se apuntara anteriormente, esta última es afectada por el plano nutricional, que a su vez incide sobre el desarrollo corporal de los animales.



La mayoría de los trabajos que se han publicado en relación a la edad a primer parto se basan en el análisis de registros reproductivos, relacionando esta variable con el año y mes de nacimiento. La heredabilidad para esta variable en el bovino es muy baja, ya que la edad a primer parto está controlada principalmente por factores ambientales, en donde la época de nacimiento (seca o lluviosa) tiene un efecto importante a través de la disponibilidad de forraje, lo que a su vez afecta el crecimiento de las novillas (Ferreira *et al.*, 1982; Segura e Hinojosa, 1986; Silva *et al.*, 1986).

Existen pocos estudios sobre el efecto de diferentes tasas de crecimiento durante la etapa comprendida entre el destete y la época de empadre y su relación con el comportamiento reproductivo al primer parto, en función de la cantidad y calidad de forraje disponible bajo condiciones tropicales (Baker *et al.*, 1985).

#### **a. Variables a evaluar y condiciones necesarias para estos estudios**

**(1) Registros.** Es imprescindible contar con registros confiables para la realización de estudios que relacionen alimentación y edad a primer parto. Se requiere conocer con exactitud la fecha de nacimiento, fecha de parto e información relacionada con el crecimiento y peso de los animales.

**(2) Ganancia de peso del destete al empadre.** El pesaje de los animales debe hacerse a intervalos mensuales,

desde el destete hasta el empadre de las novillas.

**(3) Disponibilidad y calidad de los forrajes.** Cuantificar las fluctuaciones en la calidad y cantidad de forraje disponible durante el período que va desde el destete hasta el parto de las novillas.

**(4) Suplementación de novillas en crecimiento.** Esta práctica debe tomar en cuenta las necesidades nutricionales para lograr una ganancia de peso que permita alcanzar el peso requerido para la monta.

**(5) Genotipo.** De ser posible, debe considerarse en el diseño y posterior análisis de la información el genotipo de las novillas.

**(6) Problemas reproductivos durante la preñez y el parto.** Dentro de los problemas más importantes, que pueden presentarse durante la preñez y el parto, están la distócía (imposibilidad de parir dentro de las doce horas posteriores a la ruptura de la bolsa amniótica), la retención de placenta y los abortos.

**(7) Peso y sobrevivencia de la cría al parto.**

#### **b. Diseño y análisis de información generada en estudios de pubertad y edad a primer parto en bovinos**

La mayoría de los autores que investigan sobre estas variables utilizan el análisis de cuadrados míni-

mos (Harvey, 1979). Dependiendo de la naturaleza de los tratamientos, también es frecuente el uso de arreglos factoriales y el de parcelas divididas (Steel y Torrie, 1980).

#### **4. Estudios de comportamiento posparto**

El posparto es una de las áreas de mayor interés desde el punto de vista reproductivo, ya que durante y alrededor de este período se suceden una serie de eventos vitales para la productividad del hato, tales como el parto mismo, la lactancia (con o sin amamantamiento), la involución uterina, el reinicio de la actividad ovárica con la aparición de celos y, por último, la preñez, ya sea ésta por monta natural o inseminación artificial. Una variable estrechamente relacionada con el período posparto es el intervalo entre partos, el cual afecta de manera significativa los índices de fertilidad y productividad de los hatos bajo condiciones tropicales.

Desde el punto de vista nutricional se ha demostrado que los niveles energéticos en la dieta, tanto durante el pre como en el posparto, tienen un efecto significativo sobre el rendimiento reproductivo de la vaca. La restricción de energía en la dieta de hembras antes o después del parto provoca una disminución de la eficiencia reproductiva; sin embargo, los cambios de peso por sí solos no son suficientes para predecir el comporta-

miento reproductivo. Al respecto se sabe que, a menos que los animales tengan una condición física mínima, estos no presentarán celos después del parto, independientemente de los cambios de peso (Mendoza y Wiltbank, 1985; Richards *et al.*, 1986).

La relación nutrición-reproducción implica que se debe cuantificar de alguna manera los cambios corporales que se dan en el animal. En este sentido, los cambios en la condición corporal o el peso vivo son por lo general un reflejo de la acumulación o pérdida de las reservas energéticas, ya que las reservas de proteína lábil son muy limitadas. Aun más, la respuesta de los rumiantes al suministro de proteína es difícil de interpretar, debido a que los cambios en la disponibilidad del nitrógeno dentro del rumen pueden afectar de manera significativa la digestibilidad de la materia orgánica y así influenciar la disponibilidad de energía. Por lo tanto, es razonable asumir que las respuestas a la suplementación con proteína, que a menudo se observan, se deben en gran parte al efecto de la energía y no a la proteína (Haresign, 1984).

Estudios realizados por Buck y Light (1982) bajo condiciones de pastoreo en el trópico africano, indican que los incrementos de peso observados en vacas a partir de los 90 días posparto se asocian con un mejoramiento continuo en la concepción. Sin embargo, para determinar los requerimientos nutricionales pre o posparto es necesario tener una idea del nivel de las reservas tisulares del animal.

Estas se pueden estimar a través de los cambios en el peso vivo y la evaluación de la condición corporal (Holness, 1984). En relación con la evaluación de la condición corporal en bovinos, se han utilizado diferentes escalas para la valoración de esta variable. Existen algunas ventajas de la evaluación corporal con respecto a la determinación del peso vivo o el uso de la cinta torácica para estimar el peso. Las ventajas más relevantes son: rapidez de la técnica, poco manejo de los animales y que no se requiere de equipo alguno para su puesta en práctica. Aun más, la evaluación de la condición corporal da información acerca de las reservas corporales del animal, aspecto que el peso vivo o su estimación por medición torácica no son capaces de brindar. En relación a los cambios en el peso vivo y/o el estimado con cinta torácica existen variables que pueden introducir errores, tales como la preñez, las alteraciones a nivel del rumen, el contenido gastro intestinal y los cambios en el nivel de hidratación del animal. En contraposición, los cambios en la condición corporal reflejan de una manera más exacta cambios en las reservas energéticas del animal (Lowman *et al.*, 1976; Perkins *et al.*, 1985; Nicholson y Sayers, 1987).

En lo que respecta a la alimentación y el manejo de vacas y novillas posparto, se debe recordar que la novilla durante el período parto-concepción presenta demandas de nutrientes mucho mayores que las de vacas adultas. Por lo tanto, la novilla de primer parto debe recibir un trato preferencial desde el punto de vista nutri-

cional, si se quiere lograr su preñez (Holness, 1984).

#### **a. Variables a evaluar y condiciones necesarias para estos estudios**

(1) **Registros.** Dentro de las condiciones requeridas para llevar a cabo estudios sobre las variables relacionadas con el período posparto y la nutrición, están los registros que permitan determinar edad de los animales, las fechas de parto, el número de lactancia, el nivel de producción (lechería), las fechas de inseminación artificial o bien la época en que los animales entraron a la monta e igualmente indicar si se trata de sistemas de monta continua.

(2) **Actividad ovárica posparto.** La actividad ovárica posparto debe evaluarse quincenalmente, a partir de la segunda semana posparto, mediante palpación rectal del tracto reproductivo y ovarios. Es conveniente complementar los hallazgos de palpación rectal con la determinación de progesterona en leche descremada o plasma sanguíneo, realizada dos veces por semana a partir de la segunda semana posparto. Se recomienda realizar las determinaciones de progesterona mediante inmunoanálisis de fase sólida, radioinmunoanálisis o enzimoimmunoanálisis (Gowan y Etches, 1979; Clark y Bierschwal, 1986; Robert y Taylor, 1986).

(3) **Condición corporal y peso vivo de los animales.** En lo que respecta al peso vivo y la condición corporal de los animales, algunos autores recomiendan hacer evaluaciones

mensuales durante los tres meses anteriores al parto. Posteriormente se recomienda pesar y hacer evaluación corporal a intervalos semanales (Richards *et al.*, 1986). Sin embargo, por razones prácticas se sugiere que el peso y la condición corporal durante el posparto se determinen quincenalmente. La utilización de las diferentes escalas para evaluar la condición corporal debe de validarse, especialmente cuando ésta se quiera aplicar a cruces de ganado *Bos indicus* x *Bos taurus* o razas criollas mantenidas estrictamente bajo condiciones de pastoreo. Varios autores han descrito el método para la valoración de la condición corporal (Lowman *et al.*, 1976; Perkins *et al.*, 1985; Nicholson y Sayers, 1987).

#### **(4) Detección de celos posparto.**

Para corroborar el inicio de los celos posparto, la mayoría de los investigadores recomiendan la observación de las hembras a partir de la tercera semana posparto, un mínimo de dos veces diarias (al amanecer y al atardecer), durante no menos de 30 minutos cada vez (DiCostanzo *et al.*, 1986; Richards *et al.*, 1986). Se recomienda iniciar las observaciones de celo a partir del día 15 posparto y realizar las mismas durante hora y media en la mañana y hora y media en la tarde. La observación de celo debe hacerse en el repasto y procurando no romper o modificar la estructura jerárquica del grupo de animales incluidos en el estudio.

**(5) Disponibilidad y calidad de los forrajes.** Cuantificar las fluctuaciones en la calidad y cantidad de

forraje disponible durante el período pre y posparto. Discutir en el grupo de trabajo la frecuencia y el tipo de evaluación nutricional que debe acompañar estos estudios.

**(6) Suplementación de la novilla o vaca durante el período pre y posparto.** Esta práctica debe tomar en cuenta las necesidades nutricionales para lograr la ganancia de peso y la condición corporal que garanticen un máximo de productividad, y una eficiencia reproductiva posparto que permita una reducción en el período parto-concepción.

**(7) Tasa de parición.** Las variables que intervienen en el período parto concepción son difíciles de evaluar bajo condiciones de campo. Se sugiere por lo tanto complementar esta información con la cuantificación de la tasa de parición anual. Esta variable se calcula a partir de la relación entre vacas paridas y el total de animales servidos, y se expresa como porcentaje. En el documento base de Wilcox y Van Horn y en las recomendaciones preparadas por el grupo No. 5 (ver contribuciones en esta publicación) se ofrece información acerca del análisis de variables binarias y como determinar el número de animales a incluir por tratamiento.

#### **b. Análisis de información en experimentos acerca de la relación nutrición-reproducción durante el posparto.**

El número de días comprendidos entre el parto y el primer celo posparto, los días entre el parto y la

concepción y las diferencias en el peso vivo por lo general se analizan mediante el procedimiento de cuadrados mínimos (Steel y Torrie, 1980). Las tasa de concepción, preñez y los servicios por concepción, generalmente se comparan mediante pruebas de chi-cuadrado (Steel y Torrie, 1980).

## 5. Referencias

- BAKER, D. J.; MAY, P. J.; MORRIS, C. A.; RIDLEY, E. R. 1985. First calving performance of beef cattle. 1. Effects of moderate and slow growth between weaning and joining at 15 months of age. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 25:270.
- BUCK, N.G.; LIGHT, D. 1982. Breed and environmental factors affecting the reconception of indigenous beef cows in Bostswana. *Animal Production* 35:413.
- CLARK, B. L.; BIRSCHWAL, C. J. 1986. The practioner's use of a rapid progesterone assay in the dairy cow. *The Bovine Practioner* 21:128.
- DiCOSTANZO, A.; MEISKE, J. C.; PLEGGE, S. D.; HAGGARD, D. L.; CHALONER, K. M. 1986. Influence of manganese, copper and zinc on reproduction performance of beef cows. *Nutrition Reports International* 34:287.
- FERREIRA, J. J.; GONÇALVES, G.; MALDIDNI, V.; GRAÇA, C. 1982. Environmental factors affecting age at first calving of nelore heifers. *Arquivos da Escola Veterinária da Universidad Federal da Minas Gerais (Brasil)* 34:375.
- FIELDS, M. J.; HENTGES, J. F.; CORNELISSE, K. W. 1982. Aspects of the sexual development of Brahman *versus* Angus bulls in Florida. *Theriogenology* 18:17.
- GOWAN, E. W.; ETCHES, R. J. 1979. A solid-phase radioimmunoassay for progesterone and its application to pregnancy diagnosis in the cow. *Theriogenology*. 12:327.
- HARESIGN, D. H. 1984. Underfeeding and reproduction: Physiological mechanisms. *In* Reproduction of ruminants in tropical areas, Pointe-à- Pitre(F.W.I.), Junio 8-10 de 1983. Ed. by INRA Publications. (Les Colloques l'INRA, No 20).
- HARVEY, W. R. 1979. Least-squares analysis of data with unequal subclass numbers. USDA-SEA, AR, 0-310-945/SEA-5. 157 p.
- HOLNESS, D. H. 1984. The effects of pre- and post-partum levels of nutrition on fertility in cattle. *In* Reproduction of ruminants in tropical areas, Pointe-à- Pitre (F. W. I.), Junio 8-10 de 1983. Ed. by INRA Publications. (Les Colloques l'INRA, No 20).
- LOWMAN, B. G.; SCOTT, N. A.; SOMERVILLE, S. H. 1976. Condition scoring of cattle. *The East of*

Scotland College of Agriculture,  
Bulletin No. 6. 31 p.

MENDOZA, M.; WILTBANK, J. N. 1985. Condición física al parto y retiro temporal de la cría en la eficiencia reproductiva de bovinos. *Tecnología Pecuaria Mexicana* 48:69.

MOSELEY, W. M.; DUNN, T. G.; KALTENBACH, C. C.; SHORT, R. E.; STAIGMILLER, R. B. 1982. Relationship of growth and puberty in heifers fed monensin. *Journal of Animal Science* 55:357.

NELSEN, T. C.; SHORT, R. E.; PHELPS, D. A.; STAIGMILLER, R. B. 1985. Nonpuberal estrus and mature cow influences on growth and puberty in heifers. *Journal of Animal Science* 61:470.

NICHOLSON, M. J.; SAYERS, A. R. 1987. Repeatability, reproducibility and sequential use of condition scoring of *Bos indicus* cattle. *Tropical Animal Health and Production* 19:127.

PERKINS, B. L.; SMITH, R. D.; SNIFFEN, C. J. 1985. Body condition scoring: A useful tool for dairy herd management. Dairy Management, Cooperative Extension. New York State, Cornell University. Fact Sheet. 150.00. 150 p.

PRUITT, R. J.; CORAH, L. R. 1985. Effect of energy intake after weaning on the sexual develop-

ment of beef bulls. I. Semen characteristics and serving capacity. *Journal of Animal Science* 61:1186.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; STEVENSON, J. S.; KIRACOFE, G. H. 1986. Effect of energy intake after weaning on the sexual development of beef bulls. II. Age at first mating, age at puberty, testosterone and scrotal circumference. *Journal of Animal Science* 63:579.

RICHARDS, M. W.; SPITZER, J. C.; WARNER, M. B. 1986. Effect of varying levels of postpartum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. *Journal of Animal Science* 62:300.

ROBERT, O.; TAYLOR, R. T. 1986. El estado reproductivo en cuatro fincas de ganado Jersey valorado mediante niveles de progesterona en leche. *Turrialba* 36:179.

SEGURA, J. C.; HINOJOSA, J. A. 1986. Eficiencia reproductiva de un hato cebú comercial bajo condiciones tropicales. I. Edad a primer parto. *Veterinaria México* 17:249.

SHORT, R. E.; BELLOWS, R. A. 1971. Relationship among weight gains, age at puberty and reproductive performance in heifers. *Journal of Animal Science* 32:127.

SILVA, H. M.; WILCOX, C. J.; SPURLOCK, A. H.; MARTIN, F. G.; BECKER, R. B. 1986. Factors

affecting age at first parturition, life span, and vital statistics of Florida dairy cows. *Journal of Dairy Science* 69:470.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. 1980. Principles and procedures of statistics. A biometrical approach. 2 Ed. New York, McGraw-Hill. 633p.

# METODOLOGIA PARA ENSAYOS DE PRODUCCION: CRECIMIENTO Y ENGORDE

*Manuel E. Ruiz<sup>1</sup>*

## 1. Introducción

Aunque no se ha hecho nunca un estudio de frecuencias de experimentos de nutrición, con respecto al estado fisiológico de los animales usados, es obvio que la mayoría de ellos han utilizado animales en crecimiento o en fase de engorda. Con esta aseveración, no se implica que la motivación del investigador nutricionista haya sido la de generar conocimiento para lograr mejores o más eficientes ganancias de peso. Muchas veces los experimentos con estos animales han tenido como objetivo primario la evaluación de alimentos en cuanto a su preferencia por el animal, su valor alimentario *per se*, o su valor aditivo o complementario en relación a otros alimentos. En adición, al investigador muchas veces le está vedado el uso de otras categorías de animales por temor a que se afecte la producción

(como es el caso de vacas lecheras en producción) o porque la capacidad de respuesta a un estímulo nutricional, en términos de producción, no sea suficientemente sensible (por ejemplo, toros y vacas secas). Por lo tanto, frecuentemente el investigador no tiene otra opción que usar terneros, novillos o novillas.

En el presente documento no se tratarán aspectos metodológicos a seguir en condiciones de pastoreo. Estos están ampliamente tratados en publicaciones de la Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales (Paladines, 1986; Vaccaro, 1986). A pesar de este cuidado, seguramente se tocarán aspectos que están referidos en documentos de metodología en pastoreo toda vez que, al tratar de nutrición de rumiantes, se trata primordialmente acerca de la evaluación y utilización de alimentos de naturaleza fibrosa, que no pueden ser utili-

---

<sup>1</sup>Ph.D., Nutricionista, Secretario Ejecutivo de RISPAL. Proyecto IICA/CIID. San José, Costa Rica.



zados por animales no herbívoros. Un poco más allá de esta frase tan usada, y haciendo una relación con el contexto de sistemas de producción y del productor, es un tanto inescapable que el tratamiento de este documento tenga que ver con las metodologías que se han seguido en ensayos de utilización de residuos de cultivos, subproductos agroindustriales y otros recursos no tradicionales. De esta manera, el documento se fundamenta mucho en la experiencia acumulada en el CATIE.

## **2. Procedimientos preliminares**

### **a. Evaluación de la disponibilidad y características de recursos alimenticios**

Una vez definido el sistema objetivo y el macro-ambiente para el cual se pretendrá generar tecnología, un paso lógico es la cuantificación y calificación de los recursos disponibles en la región y fincas comprendidas en el universo de interés.

El levantamiento de la información puede hacerse de diversas formas. Una de ellas, que probó ser efectiva, está descrita por Ruiloba y Ruiz (1978a). De esta experiencia se pueden extraer los siguientes pasos:

- Encuesta de fábricas, mataderos y productores pecuarios a nivel nacional para determinar: disponibilidad, época de disponibilidad zonas, fluctuaciones de produc-

ción y precios de los recursos no tradicionales o que potencialmente podrían usarse en la alimentación de rumiantes.

- Utilización de información secundaria de las oficinas de estadística y censo del país.
- Muestro de los diversos recursos alimenticios o potencialmente alimenticios.
- Con respecto a recursos alimenticios de origen animal, y el registro histórico de poblaciones de bovinos y aves y el volumen de pesca, se incluye un paso de procesamiento estadístico en el que se establece la producción o tasa de generación de los recursos en función de ecuaciones de predicción de la población animal (Ruiloba y Ruiz, 1978a).
- En el caso de los recursos de origen vegetal, se obtiene información sobre variedades, área sembrada y los cultivos que los originan. El procesamiento de la información debe resultar en un fraccionamiento de los cultivos, o producto primario, en los subproductos y/o residuos generados (Ruiloba Ruiz, 1979).
- No es redundante enfatizar que en el caso de proyectos de investigación con orientación a los sistemas de productores de escasos recursos, la información aludida más arriba es de capital importancia. En los países centro-

americanos hay una relativa abundancia de información en este sentido (para cuatro regiones de Costa Rica, consultar CATIE, 1985).

### b. Cálculo de coeficientes de disponibilidad de los recursos

El área de siembra de los diversos cultivos varía de región a región y de país a país. Sin embargo, la proporción que cada uno de los cultivos provee en forma de residuos o subproductos es relativamente constante aún cuando se comparan cultivos fertilizados con no fertilizados. El conocer cuanto material, potencialmente uti-

lizable por el animal, puede esperarse de una hectárea de un cultivo es importante pues permite: a) Discernir si merece o no atención a juzgar por la cantidad disponible, o si es perecedero, o por la oportunidad de su disponibilidad; b) Diseñar y evaluar *ex ante* la tecnología que hace uso del material.

El cálculo de los coeficientes de producción de los recursos alimenticios es factible investigando la literatura y, por supuesto, por la información levantada. Una ilustración de estos coeficientes aparece en el Cuadro 1, basado en información de nueve diferentes fuentes bibliográficas.

**Cuadro 1. Coeficientes de producción de residuos y sub-productos agroindustriales.**

Recursos	Coeficientes
Paja de arroz	1091 kg/ha <sup>1</sup>
Harina de arroz	13% del arroz sin pilar
Paja de soya	Proporción semilla:paja = 1.1:1.0
Cáscara de vaina de soya	Proporción semilla:vaina = 0.9:1.0
Torta de soya	79% de la semilla
Rastrojo de maíz	Proporción rastrojo:grano = 1.92:1.0
Olote (coronta) de maíz	Proporción olote:grano = 1:4
Rastrojo de frijol	906 kg/ha <sup>1</sup>
Rastrojo de trigo	Proporción rastrojo:grano = 1:1
Rastrojo de algodón	Proporción rastrojo:algodón = 3:1
Cascarilla de algodón	Proporción cascarilla:torta = 0.54: 1.0
Torta de algodón	47% de la producción de algodón
Residuo de desmotadora de algodón	7% de los fardos de algodón
Punta (cogollo) de caña	25% de la planta <sup>1</sup>
Bagazo de caña	35% de la caña cortada

<sup>1</sup>En base de materia fresca  
Fuente: Ruiz *et al.*, 1984a.

### c. Planificación del experimento

No es posible enfatizar en exceso este paso preliminar. Muchos fracasos pueden evitarse dedicando suficiente tiempo a la planificación del trabajo. En este proceso, conviene tener presente lo siguiente:

#### (1) Los objetivos del estudio.

El establecimiento de objetivos es función del reconocimiento de problemas a resolver y de tener una idea clara de la contribución que se desea hacer en el contexto del desarrollo de un sistema mejorado de producción o, por lo menos, de alimentación animal. Por ejemplo, si el problema se refiere al bajo peso de los terneros al destete, en un sistema de doble propósito, ¿se pretende resolver total o parcialmente mediante un mejoramiento de la alimentación en el período inicial (en corraletas), o en el período total (en pastoreo con la madre) o mediante alteraciones del manejo del amamantamiento? Si la orientación es hacia el mejoramiento de la alimentación en condiciones de pastoreo, ¿se van a usar concentrados o residuos de cultivos o forraje conservado o mejorar el pasto? ¿Cómo se relaciona esta selección con los recursos del productor o su capacidad de inversión?

Con lo anterior, nótese que debe llegar un momento en que la identificación del problema y del objetivo del trabajo deben relacionarse con el sistema de producción. Marley y Spedding (1968) advierten que si sólo se estudian los componentes del sis-

tema, el investigador debe argumentar en forma convincente y, mejor aún, presentar evidencias que él ha escogido una parte del sistema, que es relativamente independiente del resto, de tal modo que sus conclusiones no se invalidarán por las interacciones con las otras partes que no se están incluyendo en el estudio.

(2) Los tratamientos. Hay dos tipos de comparaciones que se pueden hacer: comparaciones de variables discretas (ejemplo, fuentes energéticas) y comparaciones de variables continuas (ejemplo, niveles de energía). En algunos casos, ambos tipos de variables pueden estar presentes como, por ejemplo, la comparación entre amilosa y amilopectina, a diferentes proporciones, y sus efectos sobre la síntesis de proteína microbiana (Olivo *et al.*, 1979).

En nuestro ejemplo de los terneros de doble propósito, la decisión podría ser de ofrecerles una ración en X cantidad durante las horas en que el ternero permanece en la corraleta después de la separación de la madre. En este caso, se trata de dos tratamientos discretos, pues el otro tendría que ser el "testigo" (sin concentrado). Sin embargo, hay que tener cuidado que realmente se trata de 0 *vs.* X cantidad de concentrado, pues podría más bien tratarse del subsistema tradicional de cría *vs.* un subsistema con suplementación en el supuesto caso que el concentrado esté causando una reducción voluntaria del consumo de leche por amamantamiento.

Especialmente en la literatura antigua, y con cierta persistencia hoy en día, se observan ejemplos de experimentos en que se comparan dos niveles de algún factor, por ejemplo, energía. Uno de los niveles es el testigo y el otro, uno superior. Aquí, se trata de una variable continua pero con experimentos de este tipo el progreso en el conocimiento, específicamente en la detección del nivel más apropiado se hace interminable. Uno de los niveles tal vez sea significativamente mejor que el otro; un experimento siguiente compararía este "mejor" con otro nivel X; etc., etc. Peor aún, puede suceder que el "testigo" y el tratamiento con suplemento no sean diferentes; el investigador concluye que no vale la pena seguir evaluando el suplemento, aunque si hubiese usado un nivel diferente tal vez su conclusión sería diferente.

Lo anterior conduce a la recomendación general que, en el caso de variables continuas, se procure establecer por lo menos cinco niveles de la variable (cinco tratamientos), que permitiría no sólo un análisis discriminatorio (varianza) sino también un análisis de tendencias (regresión, correlación). En experimentos de alimentación de rumiantes, en las condiciones actuales de desarrollo de conocimiento en los países latinoamericanos, muchas veces es preferible tener una idea general sobre donde puede estar el nivel óptimo de uso de un suplemento, que tratar de ser puntual y detectar que justamente 2.4 kg de ese suplemento es el óptimo.

El recordado Profesor H.L. Lucas, Jr., biometrista de la Universidad Estatal de Carolina del Norte, recomendaba que, en un principio, las repeticiones por experimento debe ser mínimas, que es más importante usar muchos tratamientos para poder observar todo el espectro de respuestas a las variaciones alimentarias, al modo de ofrecimiento, etc., manteniendo cierta ortogonalidad entre los tratamientos. Después, si se quiere precisar el mejor tratamiento, la curva de respuesta obtenida en el primer experimento sería la guía idónea (H.L. Lucas, comunicación personal, 1974).

Existen varios ejemplos de experimentos en que se ha tomado el cuidado de seleccionar cuatro, cinco o más niveles de tratamiento. Algunos de éstos se mencionarán en secciones posteriores. El punto que se desea resaltar aquí es que el propósito de seleccionar varios niveles es el obtener una visión lo más amplia posible de los efectos de una o más variables. ¿Qué implica esto? En algunos casos, será necesario que uno de los extremos signifique la imposición de un nivel cuyos efectos sean tan drásticos, que lleguen a ocasionar estrés en los animales a tal grado que se obtengan mermas en la producción, pérdida de peso o, aún, riesgos de muerte. Un ejemplo es el trabajo de Flores (1973) en El Salvador, evaluando diferentes niveles de pulpa de café en la ración de novillos. Si bien puede justificarse esta estrategia a nivel experimental, ella no tendría sentido a nivel de finca, donde la responsabilidad ya no es exclusivamente la de generar

conocimiento sino también la de evitar consecuencias contraproducentes al interés y subsistencia del productor. De allí que, a nivel de finca, debe ejercerse el máximo cuidado de limitarse a experimentos de naturaleza "conservadora".

### (3) El diseño experimental.

La regla básica aquí es: Consulte con un estadístico. A veces, en casos de experimentos complicados y de larga duración es necesario también consultar con un economista. Sin embargo, se pueden adelantar algunas reglas: Si el experimento se hace en finca este debe tener un diseño lo mas simple posible, de tal manera que pueda "absorber" alguna intervención de buena fé que haga el productor y se pueda aún analizar los resultados.

H.L. Lucas (1974, comunicación personal), recomendaba que el diseño debe tener algún patrón factorial. 't Mannelje *et al.* (1976) están de acuerdo y añaden que estos arreglos factoriales tienen la ventaja de la repeti-

ción interna y en este caso el factor importante es el número total de animales que contribuyen a cada comparación de tratamientos. Como nota especial, es necesario mantener en cuenta que los animales que constituyen un grupo en una parcela o un corral no se constituyen en repeticiones (Grassland Research Institute, 1961, citado por 't Mannelje *et al.*, 1976)

En el CATIE, a fin de ahorrar requerimientos de animales se empleó, en diseños irrestrictos al azar, arreglos factoriales incompletos de tal forma que no se usaban las combinaciones intercaladas de las dos variables en estudio pero manteniendo ortogonalidad (Ruiz y Ruiz, 1978; Lozano *et al.*, 1980). En el Cuadro 2 se presenta una ilustración del concepto. Si bien esto significa un ahorro de 48 a 50% de los tratamientos, por otro lado se pierde precisión en la medición de las interacciones. Si se espera que éstas no sean importantes o muy fuertes, se pueden usar estos diseños.

**Cuadro 2. Arreglo factorial de tratamientos con dos factores y cinco niveles por factor, versión incompleta.**

% de EM suplida por banano	% del N total suplido por gallinaza				
	0	20	40	60	80
0	X		X		X
5		X		X	
15	X		X		X
25		X		X	
50	X		X		X

Fuente: Ruiz y Ruiz, 1978

También se usan diseños de superficie de respuesta. Es más, los mismos arreglos factoriales se prestan para generar superficies de respuesta, toda vez que existan dos o más variables independientes. Pimentel Gomes (1985) define como superficie de respuesta a la representación geométrica de una ecuación polinomial donde figuran dos o más variables independientes. Hay diseños que se han utilizado primordialmente para generar superficies de respuesta y así visualizar mejor las relaciones e interrelaciones entre los estímulos (tratamientos) y las respuestas; así, Vohnout y Jiménez (1975) emplearon un rotatable de composición central para estudiar la suplementación de novillos con banana verde a diferentes cargas.

La ventaja principal de los diseños rotables de composición central o factoriales fraccionados o Guadalupe, es que ahorran tratamientos en comparación con los factoriales completos correspondientes, pero la eficiencia de aquellos diseños es menor, son menos robustos, son altamente susceptibles si se aplican a la experimentación con el productor y son difíciles de analizar e interpretar.

### **3. Procedimientos en la implementación y ejecución del experimento.**

#### **a. Los animales**

Estos constituyen el único medio de expresión de los efectos de los tra-

tamientos en experimentos de crecimiento y engorda. Por ello, deben tomarse una serie de cuidados en su selección y manejo experimental.

(1) **El genotipo/fenotipo de los animales.** La selección de los animales puede estar influenciada por el objetivo del experimento. En términos generales, el objetivo puede clasificarse en dos tipos:

- Referente a la calidad comparativa de los tratamientos.
- Referente a la discriminación y cuantificación de los efectos de los tratamientos.

En el primer caso, se busca sólo distinguir tendencias en los efectos de tratamientos. El interés del investigador está centrado en comparaciones cualitativas entre los tratamientos y compara en forma relativa la respuesta animal. No está interesado en el valor absoluto de esa respuesta *per se*. En este caso, se puede utilizar cualquier tipo de animal siempre y cuando guarden homogeneidad entre ellos o se tome la precaución de estratificarlos.

En el segundo caso, más ligado al establecimiento de relaciones cuantitativas entre insumo y producto (consumo y ganancia de peso, por ejemplo) es importante que el animal sea representativo de los presentes en el sistema a ser afectado. Sin embargo, aquí hay que hacer una salvedad. Puede ser que el sistema a ser afectado sea uno del pequeño pro-

ductor de una región X, cuyos animales son criollos, pequeños y de baja capacidad de respuesta a estímulos nutricionales. Ignorando interacciones raza x nutrición, en un principio sería mejor usar animales con capacidad de respuesta a los tratamientos y, una vez definido el mejor tratamiento, aplicarlo en otra prueba, junto con el tratamiento del productor, quizás a nivel de finca, a fin de cuantificar la respuesta en condiciones reales.

### (2) Edad de los animales.

Obviamente, en experimentos nutricionales que afectan el desarrollo de los animales se requiere de animales jóvenes. Estos son más sensibles a diferencias en calidad alimenticia que los animales ya maduros. En los países tropicales se considera muchas veces que un novillo de dos años es joven. En un trabajo de Clavo (1974) se muestran diferencias tan notables en eficiencia de conversión de ali-

mentos a favor de los animales de un año de edad a pesar de su menor ganancia de peso (Cuadro 3).

En el caso de experimentos de engorda, ya la edad no es tan crítica y la selección de los animales se hace con un criterio más económico que biológico. Especialmente cuando el sistema a generar va a ser aplicado en centros de engorda comercial, es necesario conocer las preferencias locales y de los mataderos. Estos pagan mejor en función del peso de la canal que esperan obtener. Siendo así y conociendo que existe una correlación positiva entre peso de la canal y la edad (además del peso vivo del animal) es mejor seleccionar animales más viejos (Levi *et al.*, 1967). Una ilustración de un caso extremo es un experimento hecho en Turrialba donde se llegó a engordar vacas de desecho de 8.5 años de edad inicial, obteniéndose ganancias de 0.73 a 0.95 kg/animal/día con valores de conversión

**Cuadro 3. Comparación de novillos de un año vs. dos años de edad alimentados con 1.79 kg MS de melaza, 0.6 kg MS de bagazo y urea aportando 54% del N total.**

	Edad	
	12 meses	24 meses
No. animales	15	33
Peso inicial, kg	194	292
Peso final, kg	278	390
Ganancia diaria, kg	0.654	0.762
Conversión del alimento	8.6	10.7

Fuente: Clavo, 1974.

40% más altos que los observados en novillos o toretes jóvenes. Sin embargo, se obtuvo un aumento de casi 60% en el peso de la canal, donde la mayor parte (80%) fue debido a un aumento en carne magra (Herrera, 1974).

**(3) Historia nutricional previa.**

Este es otro factor normalmente ignorado por los nutricionistas pero que tiene gran influencia en el desempeño del animal. Aquí, se refiere a dos aspectos claramente distinguibles:

- Penuria nutricional y crecimiento compensatorio
- Calidad alimentaria

No se pretende discutir estos aspectos en detalle pues no corresponde a un documento de metodología

de investigación. Basta ilustrar la magnitud de la variación que se puede introducir si no se corrigen o controlan estos factores. En el Cuadro 4 se ilustra el fenómeno del crecimiento compensatorio.

El trabajo de Hancock *et al.* (1987) ilustra que el sistema de alimentación previo al experimental puede tener influencias en los parámetros de desempeño del animal. El Cuadro 5 indica que, si bien el tipo de pasto no afectó la ganancia de peso ni el consumo en corral, sí tuvo efectos significativos sobre las características de la canal.

**(4) Tipo del animal.** Especialmente en la opinión del engordador comercial, es preferible seleccionar animales altos y largos pues mues-

**Cuadro 4. Ganancia compensatoria (kg/animal/día) en novillos con peso inicial de 209 kg y peso final de 489 kg.**

Tratamiento	Período, semanas			Días para alcanzar el peso final
	1 - 12	13-24	25 hasta sacrificio	
Sin restricción nutricional	1.21	1.27	1.06	230
Restricción durante las primeras 12 sem.	0.48	1.52	1.24	262
Restricción durante las primeras 24 sem.	0.51	0.59	1.49	298

Fuente: Hironaka y Kozub (1973)



tran mejores ganancias de peso que el tipo convencional o compacto. Este conocimiento popular está plenamente comprobado experimentalmente (Macedo, 1978).

En el caso de experimentos de crecimiento o engorde a nivel de finca, es posible calificar a cada individuo según su condición física y usar esta calificación para distribuir bloques o para ajustar los resultados por covariancia. Se podrían formar clases como magro, regular, bueno y gordo, y expresarlas numéricamente de tal manera que, si se desea, se pueda originar valores intermedios.

**(5) Raza.** Hay abundante evidencia en la literatura acerca del efecto de la raza sobre la ganancia de peso (Alleoni *et al.*, 1980; Ochoa, 1973; Muñoz *et al.*, 1970). En términos generales el ganado europeo presenta mejor desempeño que el cebú cuando la calidad de la alimentación es moderada a alta; los mestizos ganan de 10% a 12% más que la raza pura.

**(6) Sexo.** Sobre este punto la revisión de literatura de Ruiz *et al.* (1984a) indica que los animales enteros ganan de 15% a 16% más que los castrados y estos a su vez muestran una superioridad de 12% sobre las novillas. También, hay una tendencia a que la ganancia de peso de animales castrados poco antes del período de engorda sea similar a la de los animales enteros.

**(7) La adaptación.** En la medida en que sea mayor la diferencia

entre los regímenes de alimentación experimentales y el régimen previo, mayor será la necesidad de someter a los animales a un período de adaptación. Este debe consistir en un programa de sustitución progresiva del sistema de alimentación previo al experimental. Usualmente este proceso toma siete a 14 días, o aún menos si el nuevo régimen no es muy diferente del anterior. La revisión de Preston y Willis (1970) sobre este tema indica que es necesario un período de 14 días aún si el cambio dietético es significativo. El proceso de adaptación también cumple con habituar al ganado a su nuevo microambiente (instalaciones, manejo y gente) y permite aplicar vermífugos.

**(8) Alimentación en grupo vs. individual.** Esta decisión que tiene que ver con las facilidades disponibles y la conveniencia de precisión estadística. Sin embargo, es conveniente tomar en cuenta que las inferencias que se hagan pudiesen ser un tanto diferentes al cambiar de un manejo en grupo a uno individual; Neville y Mc Cullough (1968) indican que con vacas se consigue 10% menos de ganancia de peso cuando se alimentan en grupo que cuando se hace individualmente, aún cuando se tome recaución de que el consumo en ambos casos sea igual.

**(9) Frecuencia y nivel de alimentación.** Ligado a lo anterior están la frecuencia y la cantidad de alimento ofrecido al animal. Si los animales se alimentan en grupo, la variabilidad entre ellos aumenta

**Cuadro 5. Efectos del sistema de alimentación previo sobre el desempeño de novillos engordados en corral.**

Sistema previo	Ganancia de peso kg/día	Consumo kg/día	Canal kg	Calidad <sup>1</sup>
<i>Festuca arundinacea</i>	1.38	8.62	218 <sup>a</sup>	12.4 <sup>a</sup>
<i>Bromus inermis</i> + <i>Trifolium pratense</i>	1.25	8.67	251 <sup>b</sup>	13.5 <sup>b</sup>
<i>Dactylis glomerata</i> + <i>Trifolium pratense</i>	1.29	8.60	238 <sup>b</sup>	13.2 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Calidad: 10-12=Regular. 13-15=Buena

<sup>a,b</sup> Cifras dentro de la misma columna con letras diferentes difieren significativamente (P<0.05)

Fuente: Hancock *et al.*, 1987.

debido a la competencia natural (jerarquía social), que impide que algunos animales puedan consumir a capacidad y descansar tanto como los dominantes. Pero si el alimento se ofrece con frecuencia (tres o más veces al día) este efecto disminuye. En ciertos tipos de ensayo, por ejemplo, en el caso de alimentos poco gustados, como la pulpa de café, o en el caso de raciones con alta proporción de melaza, aún cuando se ofrezca este una vez al día, la frecuencia de consumo es alta y puede asegurarse que en estos casos no ocurre interferencia de los animales dominantes sobre el consumo voluntario.

Con respecto a la cantidad de alimento a colocar en el comedero, esto depende del objetivo del experimento. En la mayoría de los casos, el parámetro "consumo voluntario" es fundamental y en ese caso, se pro-

cure cumplir con la condición *ad libitum* (Ruiz *et al.*, 1984b). En este sentido, es común proveer 10% a 15% más que el consumo observado el día anterior, pesando y analizando cada día el alimento ofrecido y rechazado. Sin embargo, Minson *et al.* (1976) criticaron esta práctica aduciendo que en ella se nota una alta selectividad (esto obviamente en el caso de forrajes) y que llega a un punto de imposibilitar el establecimiento de relaciones verdaderas entre el consumo voluntario y el alimento de composición conocida. Esto es verdad aún en el caso de la pulpa de café (Flores, 1973) y, naturalmente, con gramíneas maduras, aunque éstas sean finamente picadas. En su lugar, Minson *et al.* (1976) prefieren usar ensayos de consumo de 10 días de duración, dando un exceso de alimento el primer día y manteniendo este mismo exceso en el comedero hasta la reco-

lección del rechazo al final de la prueba. De esta manera han logrado un rechazo de solamente 5-7% del total de alimento ofrecido. En ambientes tropicales o en el caso de alimentos muy fermentables, la saliva del animal provoca una rápida fermentación del alimento en el comedero, haciendo necesario el hacer recolecciones frecuentes. En el CATIE, la práctica ha sido la de recolectar diariamente el rechazo.

#### 4. Los parámetros

En experimentos con animales en crecimiento y engorda, los parámetros de respuesta animal de máximo interés son la ganancia de peso y el consumo voluntario de alimento. Adicionalmente, se requiere conocer la cantidad y composición del alimento ofrecido y rechazado así como información sobre los animales: peso, edad, sexo, raza y tiempo que ellos requirieron para estabilizar su consumo (Ruiz *et al.*, 1984b).

En el caso de experimentos de engorda, es conveniente incluir, en la medida que lo permitan las facilidades del matadero, parámetros que describan el rendimiento y calidad de la canal. En este aspecto, se recomienda obtener el peso de la canal en caliente o en frío, el área del *longissimus dorsi* a nivel de la 13<sup>ava</sup> costilla, grosor de la grasa de cobertura, "marmoleo" y alguna calificación de la calidad. Esto por supuesto, es

dependiente de la utilidad de estos parámetros en la práctica pues en la mayoría de los países latinoamericanos no existe un sistema de calificación y diferenciación monetaria de la calidad de la canal.

#### 5. Información técnica necesaria para el desarrollo de sistemas de alimentación

El texto que sigue se basa principalmente en los escritos de Ruiz (1977; 1983) que contienen procedimientos para la obtención de datos necesarios para el desarrollo de sistemas de alimentación para animales en crecimiento y engorda.

##### a. Relaciones insumo-insumo

Con este término se designa al desarrollo de relaciones matemáticas (ecuaciones de regresión o correlación) o un simple listado de datos en cuadros de doble entrada donde se cuantifique en qué medida el consumo de un alimento o un nutriente afecta el consumo de otro alimento o nutriente. Para propósitos de ilustración, se muestran las Figuras 1 y 2. La Figura 1 que indica cómo el consumo de proteína influye positivamente en el consumo voluntario de melaza; mientras que la Figura 2 relaciona el consumo de fibra con el consumo voluntario de melaza, notándose aquí que esta relación es diferente si se trata de un forraje succulento o uno relativamente inerte. Las funciones

resultantes serán de utilidad más tarde al tratar de diseñar un sistema de alimentación.

### b. Relaciones insumo-producto

Este es el tipo de relación que más comúnmente se encuentra en la literatura en forma de cuadros, gráficas y/o ecuaciones. Por ejemplo, en la Figura 3 se muestra la dependencia de la ganancia de peso y la eficiencia de conversión de alimentos sobre el nivel de consumo de proteína. En la opinión del autor, es preferible desarrollar ecuaciones que relacionen el insumo (o insumos) con el producto (o productos), especialmente si lo que se desea es desarrollar una serie de sistemas de alimentación entre los que pueden seleccionarse el óptimo (biológico o económico) o el de mantenimiento o los de mínimo costo/beneficio. Nótese en la Figura 3 que la ecuación para la eficiencia de conversión de la proteína a ganancia de peso no es un ajuste a datos observados de este parámetro. Simplemente fue generada al dividir la función por los diferentes valores correspondientes de X. Este es un subterfugio para facilidad de cálculo. Con los valores observados y los predichos por la curva es posible calcular el  $R^2$  si se desea. Según esta misma figura, el consumo de proteína debería restringirse a 280 g/100 kg PV si se desea la máxima eficiencia biológica. El máximo retorno económico probablemente no se dará a este mismo nivel sino, más bien, a uno inferior.

### c. Buscando reducción de costos

Las Figuras 1, 2 y 3 se escogieron no sólo para ilustrar los conceptos de insumo-insumo e insumo-producto sino también para ilustrar la conveniencia de tener una referencia de la forma en que la respuesta del animal varía en una gama amplia de variación del insumo, incluyendo una idea del potencial de máxima respuesta biológica. Con esta información es posible ahora entrar a una fase de investigación en que prime el criterio de reducción de costos. Como ejemplo, se cita el caso de la sustitución de fuentes de proteína por la urea, más barata por unidad de nitrógeno pero menos eficiente que una proteína para producir ganancia de peso (Ruiz y Ruiloba, 1978b).

Otra vía que se puede explorar para reducir costos es la de aumentar la eficiencia con que un ingrediente se utiliza para la ganancia de peso. Como ilustración, se cita el trabajo de Herrera (1974) en el que se partió de un sistema intensivo de alimentación con melaza y se sustituyó partes variables de ésta con una fuente de almidón, cuidando que todas las combinaciones fueran isoenergéticas e isonitrogenadas.

Mediante la solución y optimización de ecuaciones de ingreso neto se obtienen los niveles de insumos a ser usados (Ruiloba y Ruiz, 1978b).

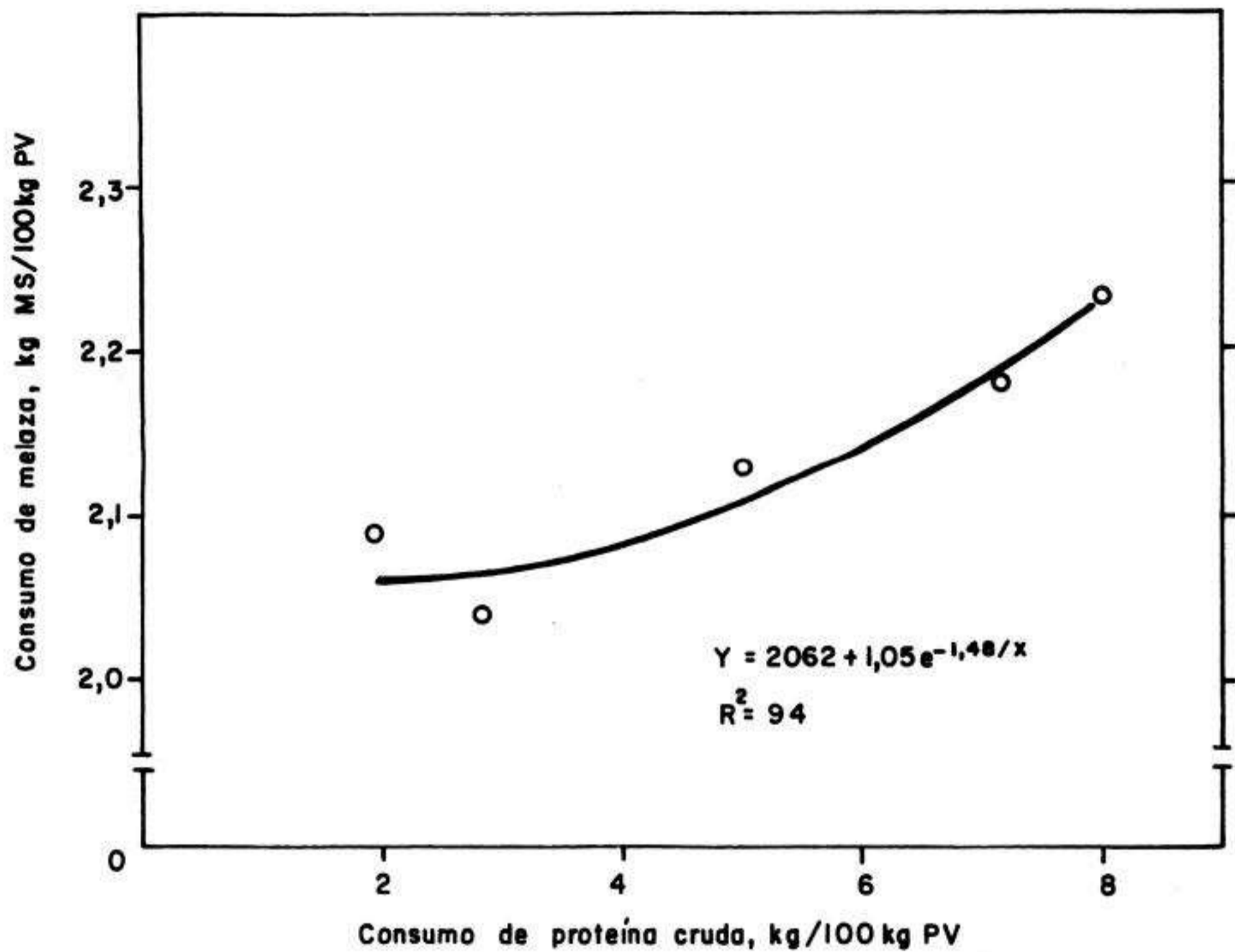


Fig. 1 Efecto del consumo de proteína sobre el consumo voluntario de melaza

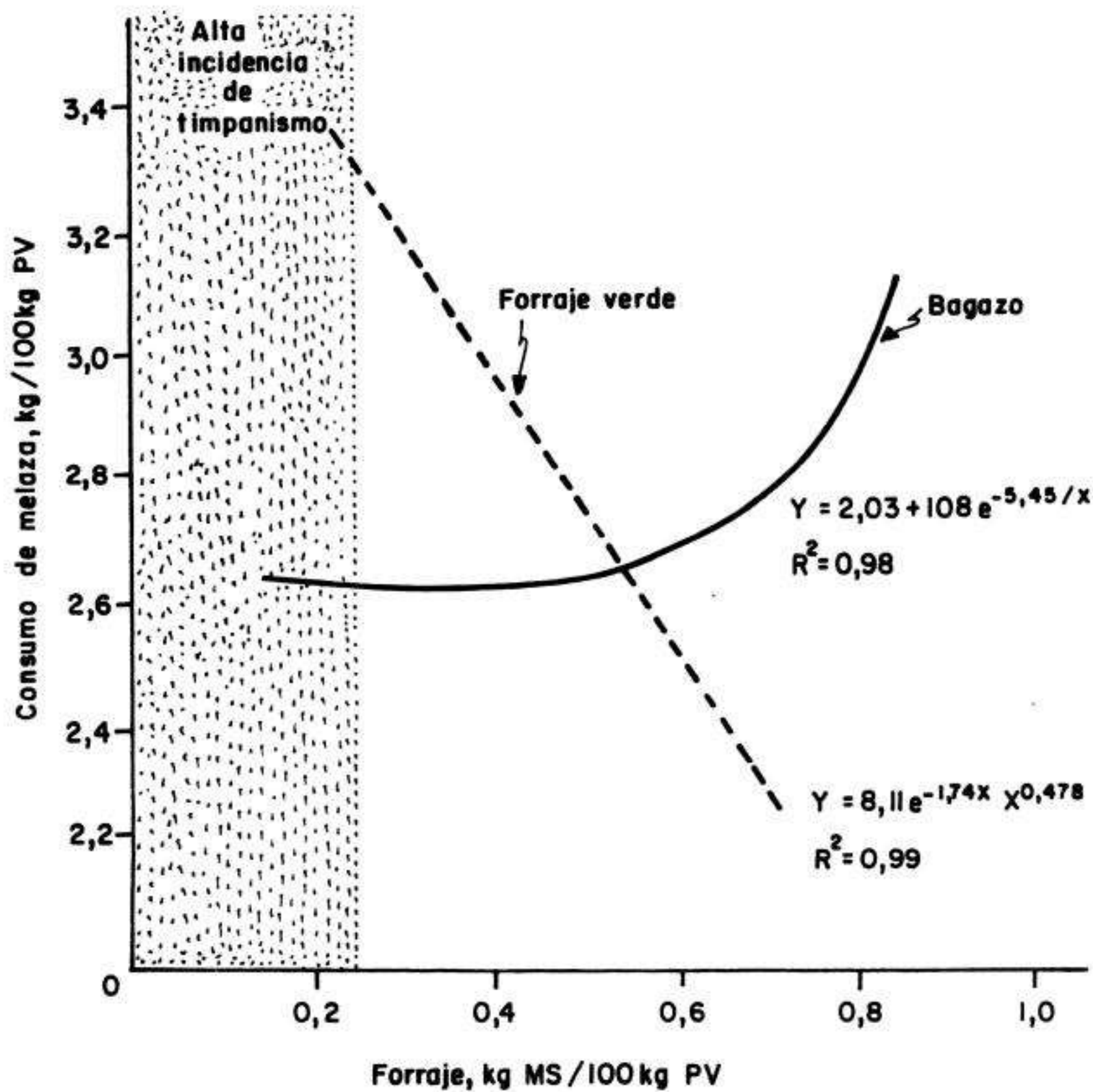


Fig. 2 Efecto del consumo diario de forraje sobre el consumo diario de melaza (80° Brix)

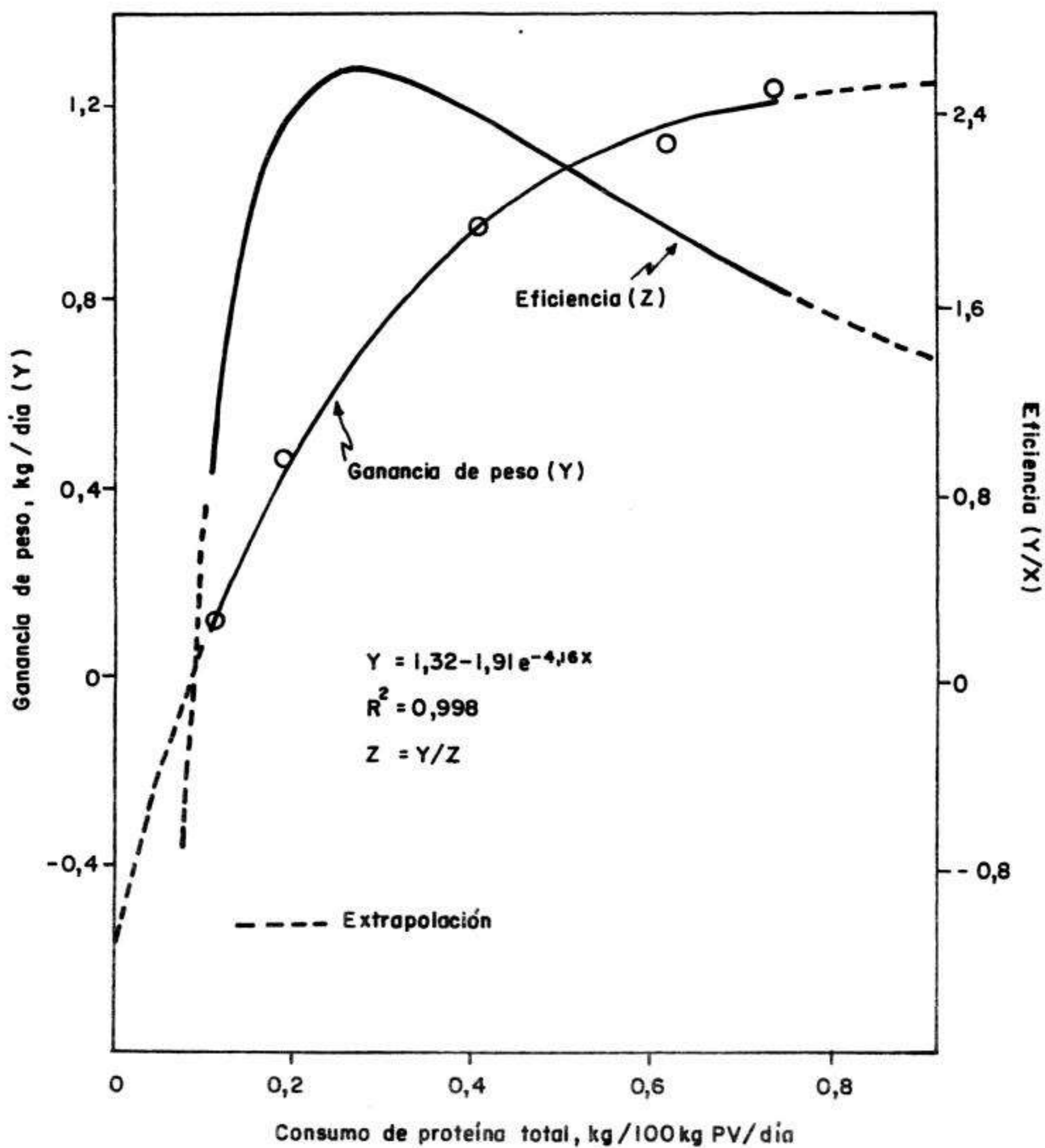


Fig. 3 Ganancia de peso y eficiencia proteica en función del consumo de proteína en toretes (300-400 kg PV) alimentados con altos niveles de melaza

#### **d. Síntesis de un sistema de alimentación**

Si se ha generado la información identificada hasta aquí y se tiene, además, información sobre precios de los insumos, es un simple ejercicio el seleccionar por programación lineal, o por simple observación de los gráficos o por cálculo de derivados de las funciones biológicas (convertidas a relaciones económicos), los niveles de los insumos más adecuados según el objetivo y orientación del programa de investigación. El sistema sintetizado debe contener información sobre los insumos y recursos a ser usados, las cantidades y características, descripción del tipo de animal a ser usado indicando peso inicial aproximado, tiempo de alimentación, eficiencia de conversión y alguna indicación de eficiencia económica. Ejemplos de este ejercicio se muestran en Ruiz (1977) y Ruiloba y Ruiz (1978b).

#### **e. Validación**

Es recomendable someter a prueba práctica los sistemas de alimentación desarrollados antes de entregarlos a difusión. Un trabajo que incluye la validación de cuatro sistemas de engorde de novillos es el de Ruiloba *et al.* (1978b), en el que se comparó por Chi-cuadrado el desempeño esperado y el observado, de cuatro sistemas de alimentación, encontrándose un error de 1.4 a 16.3%, valores que son bajos si se considera las variantes de clima, genética animal y manejo.

#### **6. Referencias**

- ALLEONI, G.F.; BOIN, C.; TROVO, J.B. DE F.; BONILHA NETO, L.M.; BEISMAN, D.A. 1980. Efeito da raça de bovinos na ingestão, digestibilidade, ganho de peso e rendimento de carcaça. *Boletim de Indústria Animal* 37: 185.
- CATIE. 1985. Informe final del proyecto Sistemas de Producción Animal. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica. 255 p.
- CLAVO, N. 1974. Respuesta a diferentes niveles de urea por novillos alimentados con melaza y bagazo de caña de azúcar. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., IICA/CATIE. 45 p.
- FLORES, F. 1973. Respuesta bioeconómica de novillos en engorda alimentados con diferentes niveles de pulpa de café ensilada y proteína. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., IICA/CATIE. 63 p.
- HANDCOCK, D.L.; WILLIAMS, J.E.; HENDRICK, H.B.; BEAVER, E.E.; LARRICK, D.K.; ELLERSIECK, M.R.; GARNER, G.B.; MORROW, R.E.; PATERSON, J.A.; GERRISH, J.R. 1987. Performance, body composition and carcass characteristics of finishing steers as influenced by previous forrage systems. *Journal of Animal Science* 65:1381.



- HERRERA, E.E. 1974. Engorda de vacas de desecho con subproductos de la caña y diversos niveles de almidón de banano. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., IICA/CATIE. 46 p.
- HIRONAKA, R.; KOZUB, G.C. 1973. Compensatory growth of beef cattle restricted at two periods. *Canadian Journal of Animal Science* 53: 709.
- LEVI, D.; SOLLER, M.; SHILO, A. 1967. The effect of age, live weight and rate of gain on dressing percentage and nonsaleable fat content of Israel-Fresian bull calves. *Animal Production* 9:115.
- LOZANO, E.; RUIZ, M.E.; RUIZ, A. 1980. Desarrollo de subsistemas de alimentación de bovinos a base de rastrojo de frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.). III. Producción de carne. *Turrialba* 30:153.
- MACEDO, L.A.C. DE. 1978. Desempenho de bovinos de corte de diferentes conformações, alimentados em confinamento. Tesis Mag. Sc. Porto Alegre, Brasil, Fundação para o Desenvolvimento de Recursos Humanos. 90 p.
- MINSON, D.J.; STOBBS, T.H.; HEGARTY, M.P.; PLAYNE, M.J. 1976. Measuring the nutritive value of pasture plants. *In Tropical Pasture Research: Principles and Methods*. Ed. by N.H. Shaw, W.W. Bryan. Hurley, Berkshire, England, CSIRO Bulletin 51, Commonwealth Agricultural Bureaux. p. 308.
- MORLEY, F.H.W.; SPEDDING, C.R.W. 1968. Agricultural systems and grazing experiments. *Herbage Abstracts* 38:279.
- MUÑOZ, F.; MORCIEGO, S.; MARTIN, J.L.; WILLIS, M.B. 1970. El comportamiento de toros de diferentes razas, cebados con miel/urea *ad libitum*, harina de pescado y pastoreo restringido. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 4:169.
- NEVILLE JUNIOR, W.E.; McCULLOUGH, M.E. 1968. Feed requirements of beef cows. *Journal of Animal Science* 27:295 (Compendio).
- OCHOA, C. 1973. Efecto del nivel de proteína y bagazo de caña sobre el crecimiento de toretes alimentados con melaza. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., IICA/CATIE. 46 p.
- OLIVO, R.; RUIZ, M.E.; MARCILESE, N. 1979. *In vitro* rumen microbial growth in media containing different proportion of starch/sucrose and of amylose/amilopectin. *In Annual Meeting of the American Society of Animal Science, 71st. University of Arizona, Tucson, 1979.* p. 394 (Compendio)
- PALADINES, O. 1986. Mediciones de respuesta animal en ensayos de pastoreo: ganancia de peso. *In Evaluación de Pasturas con Animales. Alternativas Metodológicas*. Ed. por C. Lascano. E. Pizarro. Cali, Colombia, CIAT. p. 99.

- PIMENTEL GOMES, F. 1985. Curso de Estadística Experimental, 11 ed. Piracicaba, São Paulo, Brasil, Universidad de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 466 p.
- PRESTON, T.R.; WILLIS, M.B. 1970. Intensive beef production. New York, EE.UU., Pergamon Press. 544 p.
- RUILOBA, ELIZABETH DE; RUIZ, M.E. 1978. Alimentos potenciales para el ganado en Panamá. I. Subproductos y desechos de origen Animal. *Ciencia Agropecuaria (Panamá)* 1:45.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. 1979. Alimentos potenciales para el ganado en Panamá. II. Subproductos y desechos de origen vegetal. *Ciencia Agropecuaria (Panamá)* 2:51.
- RUILOBA, M.H.; RUIZ, M.E. 1978. Producción de carne durante la época seca a base de subproductos. I. Niveles de proteína suplementaria y melaza. *Ciencia Agropecuaria (Panamá)* 1:59.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_.; PITTY, C. 1978a. Producción de carne durante la época seca a base de subproductos. Niveles de proteína y sustitución de proteína verdadera por urea. *Ciencia Agropecuaria (Panamá)* 1:77.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 1978b. Producción de carne durante la época seca a base de subproductos. III. Integración de componentes y validación de sistemas de alimentación de engorde. *Ciencia Agropecuaria (Panamá)* 1:87.
- RUIZ, A.; RUIZ, M.E. 1978. Utilización de la gallinaza en la alimentación de bovinos. III. Producción de carne en función de diversos niveles de gallinaza y almidón. *Turrialba* 28:215.
- RUIZ, M.E. 1977. New animal feeding systems based on the intensive use of tropical by-products. *In First International Symposium, Feed Composition, Animal Nutrient Requirements, and Computerization of Diets.* Ed. by P.V. Fonnesbeck, L.E. Harris, L.C. Kearl. Logan, Utah, EE.UU., Utah State University. p. 660.
- RUIZ, M.E. 1983. Sugar cane molasses for fattening steers. *In Beef cattle science handbook, v. 19.* Ed by F.E. Baker. Colorado, EE.UU., Westview Press. p. 937.
- RUIZ, M.E.; THIAGO, L.E.L. DE S.; COSTA, F.P. 1984a. Alimentação de bovinos na estação seca: Principios e procedimentos. EMBRAPA-CNPGC, Campo Grande, M.S., Brasil, Documento 20. 81p.
- RUIZ, M.E.; RUIZ, A.; PEZO, D. (Eds.). 1984b. Estrategia para el uso de residuos de cosecha en la alimentación animal: Memorias de una reunión de trabajo celebrada en el Centro Agronómico Tropi-

cal de Investigación y Enseñanza. Turrialba, C.R., 19-21 de marzo 1980. Ottawa, Ontario, CIID. Publicación IDRC-224s. 159 p.

t MANNETJE, L.; JONES, R.J.; STOBBS, T.H. 1976. Pasture evaluation by grazing experiments. *In* Tropical pasture research: Principles and methods. Ed by N.H. Shaw, W.W. Bryan. Hurley, Berkshire, England, CSIRO Bulletin 51, Commonwealth Agricultural Bureaux. p. 194.

VACCARO, LUCIA De. 1986. Mediciones de la respuesta animal en ensayos de pastoreo: *In* Evaluación de Pasturas con Animales. Alternativas Metodológicas. Ed. por L. Lascano, E. Pizarro. Cali, Colombia, CIAT. p. 127.

VOHNOUT, K.; JIMENEZ, C. 1975. Supplemental by-products feeds in pasture-livestock feeding systems in the tropics. Symposium on tropical forages in livestock production systems. American Society of Agronomy, Special Publication 24:71.

# DISEÑOS EXPERIMENTALES EN LA NUTRICION DEL GANADO LECHERO

*Charles J. Wilcox<sup>1</sup> y Harold H. Van Horn<sup>1</sup>*

## 1. Introducción

Toda investigación con animales presenta problemas especiales para el investigador, existiendo algunos que son específicos de la investigación en nutrición de rumiantes. Los animales son caros, y su mantenimiento antes, después y durante el experimento es oneroso. Debido a ésto, los experimentos deben diseñarse cuidadosamente para que sean eficientes y conduzcan a resultados sólidos. Es muy fácil conducir un experimento del cual no se logrará obtener conclusiones útiles, con el agravante de que estos resultados pudieron haber sido predichos. Efectivamente, aún hoy día, se inician ensayos cuya posibilidad de brindar información útil es muy escasa o cercana a cero.

Antes de iniciar cualquier ensayo, el investigador debe delinear el análisis estadístico que realizará, incluyendo las fuentes de variación, grados de libertad y pruebas de significancia. Necesita también tener una buena estimación de la varianza del error para cada una de las variables de respuesta, y deberá focalizar el experimento en una o dos de las variables de respuesta más importantes. Además de los problemas que el investigador enfrenta por el alto costo de los animales, es difícil realizar experimentos con un gran número de animales, encuentra una relativamente amplia variación en muchas de las variables de respuesta (aún entre animales bajo el mismo tratamiento), y se producen pérdidas de animales durante el curso del experimento. El científico eficiente a menudo tiene poco control sobre

---

<sup>1</sup> Ph.D., Professor, Dairy Science Department, University of Florida, Gainesville, FL, U.S.A.

los primeros dos aspectos, pero debe ser capaz de hacerle frente a los últimos.

Los experimentos con animales pueden dividirse en aquellos de tipo continuo y los de recambio, reflejando la forma de asignar los animales a los tratamientos. Algunos experimentos involucran ambos tipos. El ensayo continuo es aquel en el que el animal queda en el mismo tratamiento durante todo el experimento; en el de recambio, el animal es sometido a dos o más tratamientos.

## **2. Variación en los parámetros de respuesta**

A menudo, las diferencias entre tratamientos en ensayos continuos se prueban estadísticamente comparando la variación de las medias de tratamientos con la variación entre animales dentro del tratamiento. La covarianza es el mecanismo más importante para reducir la varianza del error en estos casos. La magnitud de la reducción depende de la correlación entre la variable de respuesta (dependiente) y la(s) covariable(s) (independientes). Aún con covarianza, los términos de error son muy grandes. Planteado de una manera sencilla, esto significa que para la mayoría de las respuestas medidas, los animales que reciben el mismo tratamiento varían tremendamente en respuesta. Los coeficientes de digestión en ensayos de colección total son una excep-

ción, pues las estimaciones obtenidas con diferentes animales para el mismo alimento varían relativamente poco.

Una medida común de la variabilidad del error es el coeficiente de variación, CV (el error estándar dividido por la media del experimento, multiplicado por 100). Para producción de leche en vacas lecheras, el CV puede ser 20% para registros de 305 días o 15% para ensayos de 150 días. En ensayos más cortos, el CV puede ser de 8 a 10%. Sin embargo, en cualquier ensayo es posible encontrar valores mayores o menores por varias razones. El efecto de la magnitud del error sobre el número de animales necesarios en cada grupo de tratamiento se presenta en el Cuadro 1.

Ciertamente, algunos fenómenos biológicos son mucho más variables que otros. Nótese la variabilidad en los CV presentados en el Cuadro 2. Es importante ponderar la importancia biológica de los diferentes efectos. Ciertamente un cambio de 10% del molibdeno en plasma no tiene la misma significancia biológica que un cambio de 10% de las proteínas plasmáticas o un incremento de 10% en producción de leche.

En el Cuadro 3 se presentan las fluctuaciones en la producción de leche en una vaca durante un período de 6 días.

Estos valores sugieren que, en bases relativas, las vacas Holstein y Jersey varían similarmente pues sus CV son casi los mismos. En unidades

**Cuadro 1. Animales requeridos en cada uno de los dos grupos de tratamientos para detectar diferencias de varias magnitudes<sup>1</sup>.**

Diferencia entre medias %	Coeficiente de variación, %					
	5	8	10	12	16	20
5	17	41	>50	---	---	---
10	5	11	17	24	41	>50
15	3	6	8	11	19	29
20	3	4	5	7	11	17
25	2	3	4	5	7	11
30	2	3	3	4	6	8

<sup>1</sup> Protección tipo I = 95%; protección tipo II = 80%; prueba de t de dos colas.  
Fuente: Cochran y Cox (1962).

**Cuadro 2. Coeficientes de variación (CV) para los constituyentes de sangre y plasma de ovejas.**

Variable de respuesta	CV	Variable de respuesta	CV
Hemoglobina <sup>1</sup>	10	Calcio en plasma	21
Hematocrito	11	Fósforo en plasma	14
Eritrocitos	11	Molibdeno en plasma	60
Cobre en plasma	21	Vitamina A en plasma	19
Proteínas plasmáticas	9		

<sup>1</sup> Para las unidades ver Goodrich *et al.* (1968).

**Cuadro 3. Variación diaria de producción de leche y su composición, durante un período de 6 días.**

Respuesta	Jersey		Holstein	
	CV	DE	CV	DE
Sólidos no grasos, %	1	0.138	2	0.128
Grasa, %	10	0.567	11	0.448
pH	1	0.042	1	0.046
Acidez	6	0.008	1	0.009
Proteína, %	5	0.164	4	0.127
Cloro, %	5	0.006	7	0.031
Producción de leche, lb	8	1.913	8	3.040

<sup>1</sup> DE = Desviación estándar.  
Fuente: Wilcox y Krienke (1964).

absolutas, las Holstein pueden variar más o menos que las Jersey, como lo indica la DE. En gran proporción, estas diferencias son debidas a efectos de escala, como por ejemplo la correlación entre la media y la varianza.

### 3. Diseños de recambio

El grupo de diseños experimentales de sobrecambio incluye los de reversión y los cuadrados latinos. Los animales se someten a dos o más tratamientos y para la prueba de significancia no se incluye en el error la variación animal. De hecho, no existe un verdadero término de error ya que no hay verdaderas repeticiones en

estos diseños. El cuadrado medio residual contiene un conjunto complejo de interacciones confundidas, como también al error verdadero. La suposición de que no existen interacciones parece irreal. Sin embargo, la ventaja de este tipo de diseño es que el término de error es usualmente más pequeño que el de ensayos continuos, y a menudo mucho menor.

Con la disponibilidad actual de computadoras y programas versátiles, la mayor desventaja de los diseños de recambio (poco número de tratamientos permitido) no es ya válida. En el Cuadro 4 se muestra la asignación de vacas y tratamientos en un experimento de recambio conducido en la Universidad de Florida.

**Cuadro 4. Asignación al azar de los diferentes corral-vaca a las secuencias de tratamientos en un experimento de recambio.**

C-V <sup>1</sup>	ST <sup>1</sup> Período			C-V	ST Período			C-V	ST Período		
28	1	2	4	1	1	4	8	23	1	6	12
17	2	3	5	18	2	5	9	8	2	7	1
29	3	4	6	20	3	6	10	30	3	8	2
22	4	5	7	5	4	7	11	12	4	9	3
21	5	6	8	26	5	8	12	6	5	10	4
10	6	7	9	7	6	9	1	13	6	11	5
33	7	8	10	3	7	10	2	25	7	12	6
16	8	9	11	2	8	11	3	19	8	1	7
15	9	10	12	34	9	12	4	24	9	2	8
27	10	11	1	9	10	1	5	14	10	3	9
35	11	12	2	31	11	2	6	4	11	4	10
11	12	1	3	36	12	3	7	32	12	5	11

<sup>1</sup> C-V = corral-vaca; ST = secuencia de tratamientos  
Fuente: Roman-Ponce *et al.* (1975).

Este experimento involucró a 36 vacas en 36 corrales, 12 tratamientos (factorial 2 x 2 x 3) y 3 períodos de 4 semanas. Fue uno de recambio en el que cada vaca recibe tres tratamientos. Ningún tratamiento siguió a otro más de una vez, y cada tratamiento aparece con cada uno de los otros tratamientos una vez, pero no más de dos. Debido a la característica de bloques incompletos del diseño, la estimación de los efectos de tratamientos, animales y períodos requirió de un análisis de varianza por cuadrados mínimos, y la consecuente solución de una matriz muy grande. En este ejemplo, la matriz fue de 48 x 48. Este es un diseño muy eficiente, como lo indican los CV que se muestran en el Cuadro 5.

Si se asumiera en un futuro experimento del mismo tipo y magnitud que el CV para producción de leche va a ser nuevamente 3%, se tendría un 80% de probabilidad (protección error tipo II) de detectar una diferencia de 0.3 kg entre dos tratamientos como significativa al 5% (protección error tipo I). Desafortunadamente, a menudo se obtienen CV para producción de

leche de 8 a 15% en ensayos continuos. El fisiólogo encara una situación cercana a lo imposible si pretende detectar diferencias entre medias de tratamientos para algunas hormonas circulantes. Los CV para corticoides encontrados en la Universidad de Florida promediaron 61% (3 013 muestras en 103 animales), con algunas hormonas alcanzando CV superiores al 100% (Adkinson *et al.*, 1976).

#### 4. Parcelas divididas

Frecuentemente los investigadores utilizan un diseño alternativo para detectar diferencias entre tratamientos. Este diseño es un tipo particular de parcela dividida, en el cual los animales quedan en el mismo tratamiento (ensayo continuo) con mediciones repetidas a intervalos regulares durante el experimento. De esta manera, los tratamientos y animales se clasifican en forma cruzada a través del tiempo (recambio). Por supuesto, se examinan las diferencias entre las medias de los tratamientos pero, debido a que la variabilidad entre animales se usa para probar la varia-

**Cuadro 5. Coeficientes de variación para las respuestas de producción del experimento del Cuadro 4<sup>1</sup>.**

Rendimiento de leche	3	% de grasa	12
Leche corregida al 4% grasa	4	% de sólidos totales	4
Leche corregida/sólidos tot.	4	Consumo de alimentos	3
Rendimiento proteína	4	Peso corporal	3

Fuente: Roman-Ponce *et al.* (1975)

<sup>1</sup> Los valores en el cuadro son porcentajes.



bilidad entre las medias de tratamientos, el diseño a menudo no es suficientemente sensible para esta prueba. Sin embargo, las diferencias en tendencias (interacciones de tratamientos por tiempo) se pueden probar muy eficientemente. No es raro que el objetivo central del investigador sea el examinar interacciones de tiempo. Esta prueba es muy sensible, por estar asociada con un gran número de grados de libertad para las interacciones y sus términos de error, al igual que un término de error relativamente pequeño.

Las investigaciones que se pueden beneficiar del examen de tendencias y de medias incluyen ensayos de producción de leche, crecimiento de terneros, ensayos fisiológicos en los que la respuesta en el tiempo (quizás el retorno a un nivel base) es un punto de interés y muchos otros. Sin embargo, existen problemas en el análisis de este tipo de parcela dividida, como señalaran Gill y Hafs (1971) y Gill (1979). Quizás el principal problema con estos diseños es que muchos investigadores (estadísticos inclusive) no reconocen este tan particular arreglo de tratamientos, la asignación de animales y la forma de tomar medidas como parcelas divididas y, consecuentemente, analizan sus datos incorrectamente. Esto puede llevar a resultados desastrosos en ambos sentidos, sea reconociendo como significativas diferencias entre tratamientos, cuando de hecho no hay evidencia para ello (error tipo I), o bien dejando de reconocer importantes diferencias en tendencias entre tratamientos, las

cuales de hecho existen (error tipo II). Desafortunadamente, todo esto puede ocurrir en un mismo experimento.

Además de lo anterior, muchas de las suposiciones concernientes a la varianza del error, particularmente la de independencia y homogeneidad, son severamente forzadas en experimentos que involucran mediciones repetidas y en experimentos que involucran grandes cambios dentro de animales. Los errores asociados con mediciones repetidas están frecuentemente correlacionados. Tales correlaciones alteran las pruebas de significancia pero no impiden realizar varias pruebas correctamente. Con varias mediciones repetidas, existen diferentes correlaciones, que pueden diferir unas de otras (existe una matriz heterogénea de varianzas y covarianzas), al punto que no existe una única correlación compuesta válida. En ensayos donde se encuentra un rango amplio en las mediciones, como por ejemplo en ensayos de crecimiento a largo plazo, o ensayos fisiológicos en que se produce un gran cambio después del tratamiento, una varianza común del error no puede existir (el error es heterogéneo). Los genetistas reconocen esto como un efecto de escala, ya que el promedio y la varianza están correlacionados, normalmente en forma positiva. De allí que el investigador debe actuar para remover la heterogeneidad (usualmente utilizando una transformación de datos) o reconocer que sus pruebas de significancia están sesgadas (muchos resultados significativos correlacionados positivamente).

## 5. Uso de líneas monocigóticas

Esta técnica se ha utilizado durante muchos años en la investigación con humanos y con animales. Con animales de laboratorio, involucra el uso de líneas muy consanguíneas; en humanos y animales domésticos mayores se utilizan principalmente gemelos monocigóticos (genéticamente idénticos). Se ha producido mucha información relevante con esta técnica; sin embargo, los investigadores deben ser conscientes de las ventajas y desventajas de la técnica antes de comenzar a usarla. El tema se ha vuelto particularmente relevante hoy día debido a la posibilidad de producir gemelos, trillizos, etc., genéticamente idénticos, mediante la partición de huevos fertilizados y su trasplante subsecuente.

Un punto crítico al decidir investigar con animales genéticamente idénticos, es el valor de eficiencia (E) de los gemelos. Este representa el número de pares de animales seleccionados al azar que un juego de gemelos monocigóticos puede reemplazar en un experimento, sin pérdida de sensibilidad experimental. El valor puede ser tan bajo como 1, significando que un juego de gemelos monocigóticos reemplazará solamente dos animales. En este caso, el investigador podría estar mal orientado al utilizarlos, considerando el alto costo actual de obtener animales monocigóticos. Sin embargo, el valor E puede ser tan alto como 72, tal y como se observa en el Cuadro 6. En este caso, un juego de gemelos monocigóticos

puede reemplazar 144 animales en un experimento.

En la literatura pueden encontrarse estimaciones adicionales del valor E de gemelos. Para determinar cuán confiables son, como por ejemplo sus límites de confianza, basta conocer el valor mismo y cuántos gemelos fueron la base para su estimación (Martin y Wilcox, 1968).

## 6. Análisis de datos binarios

A menudo, el nutricionista se enfrenta a la situación en que la variable de respuesta es de tipo categórico, quizás ocurriendo sólo en dos categorías (0 y 1 ó 1 y 2). En este caso los datos se llaman binarios y su distribución es binomial. Nuevamente esto representa una situación especial y los investigadores deben estar conscientes de los problemas especiales que involucra antes de iniciar el experimento. Para su análisis estadístico, el lector puede referirse a Harvey (1982) o Rutledge y Gunsett (1982). El número de animales necesarios para cada uno de los dos grupos de tratamientos se presentan en el Cuadro 7.

## 7. Evaluación del comportamiento reproductivo en experimentos de nutrición

No es raro el evaluar el comportamiento reproductivo de animales sometidos a experimentos de nutrición. Aunque ello no sea el objetivo pri-

**Cuadro 6. Compendio de valores de eficiencia de gemelos (E) para ganado lechero y humanos.**

Variable (ganado) <sup>1</sup>	E	Variable (ganado) <sup>1</sup>	E	Variable (humano) <sup>2</sup>	E
Prod. leche	22	Frag. glób. rojos	15	Urea en suero	2
Prod. grasa	54	Calcio en sangre	1	Acido úrico	2
Prod. caseína	50	Magnesio en sangre	19	Bilirrubina	2
% grasa en leche	15	Fósforo en sangre	15	Glucosa 1 hr	3
% caseína	10	Azúcar en sangre	1	Fosfato alcalino	4
Caseína/grasa	13	Acetona total	1	Fósforo	3
Persistencia	4	Temperatura corp.	37	Presión diastólica	2
Tiempo de pastoreo	72	Tasa respiración	15	Colesterol total	5
Peso corporal	26	Consumo mat. seca	8	Triglicéridos	3
Tasa crecimiento	13	Mat. seca fecal	5	Lipoprot. alta dens.	4
Conteo glob. rojos	4	Iodo en grasa leche	4	Lipoprot. baj.dens.	5
Vol. glob. rojos	8	Conc. espermática	8	Lipoprot. m.b.dens.	3
Hemoglobina	13	Conteo espermático	8	Coef. intelectual	5

<sup>1</sup> Fuente: Hancock (1954).

<sup>2</sup> Fuente: Biggers (1986)

**Cuadro 7. Animales requeridos en cada uno de los dos grupos de tratamientos para detectar diferencias en varias magnitudes, con datos binarios<sup>1</sup>.**

Frecuencia, %		Animales por grupo	Frecuencia, %		Animales por grupo
Grupo 1	Grupo 2		Grupo 1	Grupo 2	
10	15	764	40	45	1 162
10	20	237	40	50	426
			40	60	116
20	25	1 172			
20	30	332	50	55	1 644
			50	60	426
30	35	1 455			
30	40	395	60	65	1 549
30	45	153	60	70	395

<sup>1</sup> Protección tipo I = 95%; protección tipo II = 80%; prueba de t de dos colas.

Fuente: Fleiss (1973)

mario del experimento, a menudo existe preocupación de que un nuevo tratamiento (procedimiento de manejo, ración, etc.), aunque deseable en otro sentido, puede ser detrimental para el comportamiento reproductivo. Por desgracia, la mayoría de los parámetros de comportamiento reproductivo son extremadamente variables (Cuadro 8), y raras veces se pueden detectar diferencias reales e importantes.

### 8. Comentarios finales

Existe gran cantidad de diseños disponibles para lograr satisfacer las necesidades del investigador en nutrición animal. El conocimiento de los diseños y su análisis, al igual que la biología básica del problema, son requisitos importantes, debido a lo costoso de la investigación y a los problemas típicos de trabajar con animales grandes. La disponibilidad de computadoras electrónicas ha sido particularmente beneficiosa en años recien-

tes. La selección del diseño, la definición de las mediciones y la frecuencia con que deben ser tomadas, el número de animales a utilizar en el experimento, y la extensión del período experimental, generalmente involucran una serie de compromisos. El investigador inteligente sacrifica eficiencia en aquellas comparaciones y respuestas en las cuales tiene un mínimo de interés, para maximizar la eficiencia en otras de mayor importancia. El conocimiento de las suposiciones básicas del análisis de varianza, particularmente en relación con la varianza del error, es también fundamental. Indudablemente, se usarán con mayor frecuencia las líneas monogóticas en la investigación animal conforme sus costos decrezcan; su eficiencia para evaluar variables de respuesta de interés es crítica. Los datos binarios y los intentos por evaluar el comportamiento reproductivo en pruebas nutricionales, constituyen retos especiales para los investigadores.

**Cuadro 8. Promedios y coeficientes de variación (CV) para características reproductivas del ganado lechero.**

Característica	Promedio	CV
Edad al primer parto, meses	29	16
Parto/primer servicio, días	92	38
Servicio/concepción, días	35	154
Días abiertos	123	43
Largo de gestación, días	280	2
Intervalo entre partos, días	400	13

Fuente: Da Silva (1976).

## 9. Referencias

- ADKINSON, R.W.; THATCHER, W.W.; WILCOX, F.C. GWAZAUSKAS, F.C.; HEAD, H.H. 1976. Detection and characterization of differences in plasma corticoid response to treatments. *Journal of Animal Science* 59:747.
- BIGGERS, J. D. 1986. The potential use of artificially produced monozygotic twins for comparative experiments. *Theriogenology* 26:1.
- COCHRAN, W.G.; COX, GERTRUDE M. 1962. *Experimental Designs*. 2 Ed. New York, EE.UU., Wiley. 611 p.
- Da SILVA, H.M. 1976. Genetic and environmental aspects of reproductive efficiency and vital statistic of Florida dairy cows. Ph. D. Thesis. Gainesville, Florida, EE.UU. The University of Florida. 173 p.
- FLEISS, J.L. 1973. *Statistical methods for rates and proportions*. New York, EE.UU., John Wiley and Sons. 223 p.
- GILL, J.L.; HAFS, H.D. 1971. Analysis of repeated measurements of animals. *Journal of Animal Science* 33:331.
- \_\_\_\_\_. 1979. Combined significance of nonindependent tests for repeated measurements. *Journal of Animal Science* 48:363.
- GOODRICH, R.D.; BRADLEY, B.P.; TILLMAN, A.D. 1968 Importance of initial blood and plasma values. *Journal of Animal Science* 27:247.
- HANCOCK, J. 1954. Studies of monozygotic cattle twins. X. General summary. *New Zealand Journal of Science and Technology* 35:189.
- HARVEY, W.R. 1982. Least-square analysis of discrete data. *Journal of Animal Science* 54:1067.
- MARTIN, F.G.; WILCOX, C.J. 1968. Confidence limits for twin efficiency values. *Journal of Dairy Science* 51:463.
- ROMAN-PONCE, H.; VAN HORN, H.H.; MARSHALL, S.P.; WILCOX, C.J.; RANDEL, P.F. 1975. Complete rations for dairy cattle. V. Interactionn of sugar cane bagasse quantity and form with soybean meal, urea and sterea. *Journal of Dairy Science* 58:1320.
- RUTLEDGE, J.J.; GUNSETT, F.C. 1982. Analysis of categorical data in the animal sciences. *Journal of Animal Science* 54:1072.
- WILCOX, C.J.; KRIENKE, W.A. 1964. Variability and interrelationships of composition and yield of daily milk samples. *Journal of Dairy Science* 47:638.

## RECOMENDACIONES SOBRE SISTEMAS DE ALIMENTACION

*Manuel E. Ruiz<sup>1</sup>, Charles J. Wilcox, Danilo Pezo, Richard Taylor,  
Carlos Chaves, Oswaldo Rosero*

### **1. Marco conceptual**

Se recomienda que se tome como base los principios y pasos metodológicos que se proponen en el documento "Desarrollo de Sistemas de Alimentación: Marco Conceptual, de M. E. Ruiz, y que aparece en este mismo capítulo. A manera de extracto de estas propuestas se plantea lo siguiente:

- a. Que la metodología para el desarrollo de sistemas de alimentación animal incluya los pasos necesarios que aseguren: 1) La ubicación del sistema objetivo dentro de un contexto ambiental mayor, 2) La orientación del experimento y 3) La identificación de los recursos e insumos disponibles.
- b. La definición del macro-ambiente debe incluir:
  - Elementos biológicos
  - Elementos físicos
  - Elementos sociales y culturales
  - Elementos políticos
  - Elementos económicos
- La identificación de restricciones del ambiente y del sistema de producción, las necesidades de éste y los recursos de producción.
- c. Las guías contenidas en el marco conceptual se delínean como sigue:
  - El investigador debe estar consciente de las tendencias y políticas de producción agropecuaria de largo plazo.
  - También debe estar consciente que cualquier evento que modifique las condiciones económicas muy probablemente afectará la naturaleza y factibilidad de las recomendaciones tecnológicas.
  - El programa de investigación de un país dado, o de una región dentro o entre países, debe, en prime-

---

<sup>1</sup> Coordinador del grupo de trabajo.

ra instancia, identificar los límites de los ecosistemas contenidos en el ámbito geográfico pertinente. Tales ecosistemas deben caracterizarse a fin de identificar aquellos de uso potencial para la producción animal.

- La caracterización de los ecosistemas debe incluir información sobre: 1) Factores climáticos (por ejemplo, precipitación total y su distribución en el año, temperatura y otros); 2) Factores edáficos (tales como fertilidad, características físicas del suelo, topografía).
- En cuanto a los sistemas de producción contenidos en los ecosistemas, éstos también deben caracterizarse y clasificarse según producto o funciones objetivo.
- Dentro del sistema de producción, y tomando en cuenta que el interés primordial es el subsistema de alimentación, el proceso de caracterización debe continuar a este nivel. Además, se tendría que definir las restricciones del subsistema y sus interacciones con otros subsistemas.
- Al desarrollar tecnologías, cuya justificación es la eliminación o reducción de los impedimentos a la producción, es necesario efectuar evaluaciones económicas tanto *ex ante* como *ex post*.

## 2. Crecimiento y engorde

El grupo propone los mismos planteamientos presentados en el documento base "Metodología para en-

sayos de producción: Crecimiento y engorde", escrito por M.E. Ruiz y que aparece en este capítulo. Además, se hacen las siguientes adiciones:

### a. Con respecto a la asignación de tratamientos a animales

Según la experiencia de los participantes en el grupo, frecuentemente se aplican tres procedimientos para la asignación de tratamientos a los animales:

- (1) Se ordenan los animales según su peso, luego se sortean los tratamientos en el primer grupo de animales (cuyo número es igual al número total de tratamientos). El orden en que quedan los tratamientos en este primer grupo de animales se mantiene para el siguiente grupo y así sucesivamente. Este procedimiento no es correcto pues la posición que el animal ocupa en cada grupo de hecho determina el tratamiento que va a recibir, lo que atenta contra el principio de la aleatoriedad, así como determinará que los diferentes tratamientos tendrán pesos totales diferentes.
- (2) Se ordenan los animales según su peso, luego se forman subgrupos cuyo número de animales es igual al número de tratamientos. Dentro de cada grupo se hace una asignación al azar de los tratamientos. Este procedimiento es aceptable aunque no es óptimo según criterio del grupo.

- (3) El procedimiento preferido es la asignación de tratamientos al azar a todos los animales, sin preocuparse de que los pesos de los grupos queden balanceados en términos del peso total o promedio.

#### **b. Con respecto al pesaje de los animales**

Existen varios procedimientos para pesar los animales:

- (1) Ayunar durante varias horas (24, 48 ó 72) y luego pesar.
- (2) Pesar dos o tres días consecutivos, sin ayuno.
- (3) Pesar sólo una vez sin ayuno.

Según la experiencia de los investigadores, no se gana mucha precisión pesando dos o tres días consecutivos, ni sometiendo a los animales a ayuno; por lo tanto, el procedimiento (3) es considerado como el más práctico y suficientemente adecuado. Lo que sí debe primar en el pesaje de los animales es que éste se ejecute cada vez bajo el mismo manejo (la misma hora, la misma persona haciendo las lecturas en la romana, etc.). También debe recordarse que la principal fuente de error es la apreciación personal al momento de pesar al animal.

#### **c. Con respecto a las mediciones de respuesta**

En los experimentos de crecimiento y engorde las mediciones o variables de respuesta de mayor interés son: Ganancia de peso, peso absoluto, consumo voluntario, eficiencia de con-

versión alimentaria y, cuando corresponda, rendimiento y calidad de la canal. En casos especiales puede ser necesario tomar datos de la tasa de pasaje, llenado ruminal y otros.

Si solamente se obtienen los pesos inicial y final, la única alternativa para calcular la ganancia diaria es restando uno del otro y dividiendo el resultado por el número de días transcurridos entre pesajes. Sin embargo, se recomienda que se hagan pesajes intermedios pues esto permite:

- Reajustes de la alimentación, especialmente si los tratamientos se definen como cantidades por cada 100 kg de peso vivo por día.
- Comparaciones de las ganancias de peso tanto en el período experimental total como en fases de este período.
- Medir la tasa de crecimiento o engorde con menos error que la simple medición del peso inicial y el final.
- Detectar desviaciones importantes del crecimiento lineal (períodos experimentales cortos) esperado. En caso que ocurra curvilinearidad, ésta se puede evaluar, ya sea con modelos no lineales (la función de Brody) o lineales (regresiones polinomiales).

#### **d. Con respecto al número mínimo de animales por tratamiento**

Para su estimación se necesita conocer la variabilidad existente en las variables o mediciones de respuesta,



por ejemplo, el coeficiente de variación (CV). Para una discusión más detallada acerca de la importancia del CV, se refiere al lector al documento de Wilcox y Van Horn, que aparece en este capítulo. Sin embargo, el investigador debe estar consciente de que el CV está afectado a su vez por la duración del experimento y el mismo número de animales por grupo (Cuadro 1).

Es obvio que mientras más largo sea el período de evaluación se necesitarán menos animales. La disminución en el valor del CV a medida que aumenta la duración del ensayo resulta del hecho que los pesos medios (y las ganancias) de los animales al decorrer el tiempo, son relativamente mayores que los aumentos en la variabilidad.

De la literatura se pueden obtener valores para los CV de otros parámetros de crecimiento, como altura a la cruz, perímetro torácico y perímetro abdominal. En el Cuadro 2 se presenta el efecto de la duración del experimento sobre el número de animales que se requieren en cada uno de

los tratamientos, para detectar una diferencia de 20% entre tratamientos.

Se nota que se requiere menos animales a medida que el experimento tenga una mayor duración. Se llama la atención al hecho que es más difícil detectar diferencias cuando se usa altura a la cruz o perímetro torácico, que cuando se usa peso corporal. El uso de perímetro abdominal requiere la menor cantidad de animales.

### 3. La interfase nutrición-reproducción

#### a. Suplementación mineral-reproducción

Se recomienda identificar carencias minerales en los suelos, los forrajes y los tejidos animales, por región. Para ello, se puede utilizar la técnica de mapeo sistemático descrita por McDowell *et al.* (1984). En caso de existir limitaciones de laboratorio, los análisis mínimos a realizar serían los de forrajes y tejidos animales. De

**Cuadro 1. Cambios en el coeficiente de variación en función del número de animales por grupo y la duración del ensayo.**

Animales por grupo	Duración del ensayo, días				
	28	84	168	224	365
3	40	24	19	17	15
5	36	22	16	15	13
7	34	21	15	14	14

Fuente: Paladines (1984).

**Cuadro 2. Número de animales requerido para detectar una diferencia de 20% entre tratamientos, en función de la duración del experimento.**

Respuesta	Semanas de experimentación			
	6	8	10	12
Peso vivo	25	20	14	10
Altura a la cruz	62	33	23	17
Perímetro torácico	38	31	20	14
Perímetro abdominal	18	13	11	9

Fuente: Eaton *et al.* (1959)

presentarse dificultades para la obtención de muestras de tejidos a nivel de finca, se recomienda realizar el muestreo a nivel de matadero, siempre y cuando se pueda determinar la procedencia y el plano nutricional en que se mantuvo los animales. Los muestreos deben hacerse en dos épocas del año (hacia el final de las épocas seca y lluviosa). Se ha observado que la respuesta a la suplementación mineral durante la época lluviosa es más pronunciada que durante la época seca, lo que tiene una relación directa con los requerimientos nutricionales.

La suplementación con los minerales que se detecten por debajo de los niveles críticos se pueden realizar utilizando fórmulas completas o bien minerales específicos administrados directamente al animal. Las variables a evaluar son la tasa de parición en las hembras y la ganancia de peso en los machos.

#### **b. Efecto de la alimentación en la reproducción**

En la evaluación del efecto del tipo de alimentación sobre el comportamiento reproductivo de los animales, es importante considerar el número de partos y la condición corporal de la vaca o novilla al asignar los animales a los diferentes tratamientos. La respuesta reproductiva de los mismos puede estar influenciada, positiva o negativamente, por estas variables.

#### **c. Interacciones ambiente-nutrición en la respuesta reproductiva del animal**

La existencia de interacciones ambiente-nutrición-reproducción deben ser consideradas al momento de planear los experimentos. Si, por ejemplo, en una determinada región la frecuencia de partos es mayor en

cierta época del año la aplicación de los tratamientos deberá tener en cuenta esta tendencia natural.

#### **d. Detección de pubertad**

La detección de la pubertad, únicamente con base en la observación de las manifestaciones del celo puede introducir errores, debido a la manifestación de celos no acompañados de ovulación y posterior formación de un cuerpo lúteo funcional. Al respecto Nelsen *et al.* (1985) observaron que alrededor de un 15% de las novillas prepúberes presentan celos no acompañados de ovulación. La magnitud de este tipo de comportamiento no se ha estudiado en el trópico, por lo que se considera importante que al menos se palpe las novillas a intervalos mensuales, para poder relacionar las manifestaciones de celo con el inicio de la pubertad.

### **4. Ganado lechero**

Las mismas recomendaciones que se hicieron en la Sección 2 (Crecimiento y engorde), con respecto a las mediciones de respuesta, aplican a la mayoría de las situaciones en la experimentación con ganado lechero. Esto es cierto toda vez que se trate de animales jóvenes en que precisamente se miden peso corporal, altura a la cruz, y otros parámetros.

En lo que respecta a las vacas lecheras, las recomendaciones se podrían resumir como sigue:

#### **a. Parámetros a medir**

- (1) Consumo y composición del alimento.
- (2) Cantidad y persistencia de la lactancia.
- (3) Composición de la leche y sus propiedades, particularmente grasa, sólidos no grasos, sólidos totales, proteína, lactosa, conteo de células somáticas, caseína y acidez.
- (4) Características organolépticas.
- (5) Resíduos tóxicos (pesticidas, aditivos químicos, contaminantes).
- (6) Peso o condición corporal.

#### **b. Fuentes de variación**

Además de los tratamientos impuestos a la vaca, se reconoce que los siguientes factores tienen influencia marcada sobre la respuesta a medir y que, por lo tanto, se deben tomar las precauciones debidas.

- (1) Razas o cruces.
- (2) Edad.
- (3) Estatus nutricional (la condición corporal o el peso vivo pueden ser indicativos) e historia nutricional.
- (4) Estado de la lactancia y/o preñez.
- (5) Condición de amamantamiento.

(6) Método de ordeño (manual, mecánico, tipo de galera) y frecuencia de ordeño.

(7) Frecuencia en la toma de datos.

### **c. Condiciones experimentales**

Este punto también guarda similitud con lo indicado en la Sección 2 y los puntos tratados en el documento base sobre crecimiento y engorde. Particularmente se enfatiza la importancia de la atención del investigador sobre el diseño estadístico apropiado, la duración del experimento, el número de animales y el período de adaptación, tanto antes como entre períodos.

## **5. Aspectos estadísticos adicionales**

### **a. Recomendaciones sobre observaciones perdidas y categorías (celdas) perdidas**

Raras veces los investigadores que usan animales de especies mayores pueden conducir un experimento que sea totalmente balanceado. A menudo no es posible obtener un número igual de animales para cada categoría y, aún cuando se comience con un experimento balanceado, es frecuente que un animal se enferme, se dañe, rehuse a comer o que, por alguna otra razón, falle en proveer la información experimental que se esperaba. En muestreos continuos de sangre, puede que el catéter deje de funcionar o que

se pierda. También puede suceder que los asistentes fallen en ceñirse al protocolo de muestreo, que se pierdan muestras en el laboratorio o que no se tenga suficiente muestra para hacer todos los análisis.

Si hay homogeneidad en todos los aspectos, un experimento balanceado es lo más eficiente; pero, por todas las posibilidades citadas anteriormente, pueden ocurrir observaciones perdidas o clases desiguales, e inclusive, algunas categorías pueda que aparezcan vacías (celdas vacías). Aún cuando las situaciones indicadas ocurran, es posible obtener información valiosa; pero para ello es necesario tener mucho cuidado con el análisis estadístico de los datos.

El análisis estadístico primario es por medio del método de análisis de varianza por cuadrados mínimos (Harvey, 1960). Existen otras alternativas pero éstas no se incluyen en este documento. Para hacer un análisis de varianza por cuadrados mínimos se requiere hacer las suposiciones usuales, incluyendo aquellas que se refieren al error (Snedecor y Cochran, 1980). Además, es necesario suponer que no hay relación entre el número de observaciones en una categoría y su media (es decir, el número y la media son independientes entre sí). En general esta suposición es razonable si la pérdida de observaciones no es consecuencia directa de los tratamientos.

El objetivo es obtener estimaciones no sesgadas por la influencia desproporcionada de otros efectos en

el modelo. Con un balance perfecto, las estimaciones de tales efectos son, generalmente, independientes entre sí (ortogonales); esto no es así cuando hay desproporcionalidad. Se puede demostrar fácilmente que, si hay varios niveles del tratamiento A, que se combinan con el tratamiento B, y si el número de observaciones en cada categoría AB no es igual, entonces las medias aritméticas de A están sesgadas (por B) y que las medias aritméticas de B están sesgadas por los efectos de A. De allí que se requiere un ajuste simultáneo para cada uno de ellos por medio del análisis de varianza por cuadrados mínimos.

Si A y B son efectos fijos y están combinados, y si algunas de las celdas AB no tienen datos, se presenta una situación especial, asociada con la estimación de la interacción AxB. En muchos casos, y dependiendo de la estructura exacta de los datos y las suposiciones acerca del modelo, es posible que no se pueda estimar algunas o todas las medias por cuadrados mínimos. Esta situación ha sido tratada por Henderson y McAllister (1978), incluyendo las implicaciones que tiene el contar con celdas vacías. Debido a las implicaciones indeseables que tiene esta situación, algunos paquetes computarizados no tienen (a propósito) la capacidad de estimar por cuadrados mínimos las medias involucradas (ejemplo, Barr *et al.*, 1979) y se refieren a ellas como "no estimables". En general, el método de Harvey (1977) permite la estimación de esas medias, pero con la advertencia de los peligros que representa.

## **b. Recomendaciones para el análisis de datos binarios**

En muchos casos, la(s) variable(s) de respuesta ocurren sólo en dos clases o categorías (por ejemplo, 0 ó 1). A este tipo de datos se les conoce como datos binarios. Los investigadores en producción animal tienen una larga tradición en el análisis de estos datos, iniciada aún antes de los trabajos clásicos de Lush. Aunque el análisis estadístico de estos datos requiere de consideraciones especiales, actualmente su análisis no presenta mayor dificultad. Existe una gran cantidad de literatura científica acerca de cómo hacer el análisis de este tipo de datos (Harvey, 1977; Barr *et al.*, 1979; Harvey, 1982; Rutledge y Gunsett, 1982), además de computadoras modernas que pueden realizarlos fácilmente.

**(1) Uso de pruebas de Chi-cuadrado.** Las pruebas de Chi-cuadrado se han utilizado para determinar la significancia estadística de los efectos (Snedecor y Cochran, 1980). Sin embargo, estas pruebas no se prestan de manera conveniente a los complejos modelos matemáticos usados en la actualidad, a pesar de la disponibilidad de computadoras.

Los investigadores han recurrido a menudo al agrupamiento de cuadros multidimensionales de Chi-cuadrado en tablas de doble entrada, los cuales pueden ser fácilmente analizados. A pesar de ello, una revisión de Rutledge y Gunsett (1982) sugiere que esta estrategia es peligrosa.

**(2) Análisis por cuadrados mínimos.** Una alternativa para el análisis de datos binarios consiste en hacer un análisis de varianza por cuadrados mínimos. La ventaja de este análisis es la de permitir el uso de modelos matemáticos complejos, que contienen variables continuas y discretas, así como efectos fijos y efectos aleatorios. Los datos se codifican, como 0 ó 1 (o cualquier otra codificación comparable), con lo que el análisis se puede hacer sin complicación. De gran importancia es el hecho que las estimaciones de los efectos, sean estos discretos o continuos, no estén sesgadas, al menos en el grado que la estructura de los datos y el modelo matemático permiten.

Se debe tener cuidado con este método al considerar las pruebas de significancia. La suposición de homogeneidad del error puede no ser válida en casos con frecuencias extremas y/o grupos de datos muy pequeños. No se espera que la heterogeneidad del error sea muy grande con grupos grandes de datos y frecuencias intermedias. En general, la heterogeneidad del error lleva a pruebas de significancia muy liberales (muchos resultados significativos; una Protección Tipo I menor que la esperada). En casos en que no se obtenga significancia estadística se hace innecesario continuar haciendo análisis estadísticos, pues no se esperaría obtener significancia con pruebas más conservadoras, y ya se dispondría de estimaciones no sesgadas de los efectos. Cuando se requiera de pruebas de significancia más correctas se puede recurrir a análisis más conservadores.

Harvey (1982) demostró que el análisis de varianza por cuadrados mínimos ponderados puede corregir parcialmente los problemas de heterogeneidad del error. En algunos modelos, el análisis por el método de cuadrados mínimos es suficiente, pues éste pondera en forma automática los valores de las subclases, de acuerdo al número de observaciones de cada subclase. Para análisis más complejos, como el ajuste de variables independientes continuas dentro de subclases, el análisis de varianza por cuadrados mínimos ponderados es el indicado. El programa de Harvey (1977) permite realizar dicho análisis. Un análisis de varianza por cuadrados mínimos, un tanto modificado, también puede realizarse con un programa para SAS (Barr *et al.*, 1979).

**(3) El método logarítmico-lineal.** Un enfoque alternativo en el análisis de datos binarios es el método logarítmico-lineal, que utiliza estimaciones de máxima probabilidad. Su revisión y descripción fue hecha por Rutledge y Gunsett (1982). Una desventaja de este enfoque es su restricción general a modelos jerárquicos. Cuando se incluyen interacciones en el modelo, todas aquellas de menor orden y los efectos principales deben incluirse. Se recomienda que los investigadores en nutrición y en ciencia animal en general, estén familiarizados con este tipo de enfoque. Sin embargo, los experimentos con animales, cuyas variables de respuesta son de tipo binario, se prestan mejor al análisis por el método ordinario de cuadrados mínimos o por el método ponderado.

## 6. Areas prioritarias de investigación

Con base en la experiencia del grupo y los documentos analizados, se considera necesario hacer investigación en los siguientes aspectos:

### a. Crecimiento y engorde

- Determinación de los CV para ganancia de peso y medidas corporales en pre-rumiantes y rumiantes.
- Estimación del peso relativo del contenido ruminal y maneras de controlarlo en el caso que se pruebe que es importante.

### b. Interfase nutrición-reproducción

- Evaluar el efecto de los minerales sobre la reproducción en la regiones tropicales de Latinoamérica, más específicamente fósforo, cobre, cobalto, zinc, manganeso y selenio. Al respecto, ya existen tablas de composición mineral de la mayoría de los pastos tropicales y en algunos países se ha trabajado en las deficiencias de estos minerales en los suelos (McDowell *et al.*, 1984).
- En experimentos acerca del efecto de la suplementación mineral sobre la reproducción es importante considerar la respuesta de los animales en función de la edad (novi-

llas y vacas), ya que existe evidencia acerca de una mejor respuesta a la suplementación en las novillas (Conrad y Mendes, 1965; Stonaker *et al.*, 1975; Lebdoejo, 1977).

- Se considera que los CV generados en áreas sub-tropicales y templadas para los diferentes parámetros reproductivos no necesariamente son extrapolables al trópico, por lo que se recomienda su estimación bajo condiciones tropicales. Esta información permitirá un mejor diseño de los experimentos, sobre todo en lo que se refiere al número de animales por tratamiento.
- La introducción y evaluación de sistemas para evaluar la condición corporal de los animales y su relación con la eficiencia reproductiva.

### c. Producción de leche

- Determinación de los CV para producción de leche y otros parámetros relacionados.
- Estudios sobre el período mínimo de acostumbramiento requerido para poder considerar los animales adaptados a las dietas experimentales.
- Determinar la importancia de los efectos residuales en estudios continuos.

## 7. Referencias

- BARR, A.J.; GOODNIGHT, J.H.; SALL, J.P.; HELWIG, J.T. 1979. SAS User's Guide. 1979 ed. Statistical Analysis System Institute, Inc. Cary, North Carolina, EE.UU. 921 p.
- CONRAD, J. H.; MENDES, M. O. 1965. Estudo comparativo do uso de suplementos minerais e fontes de proteína sobre a percentagem de nascimento de bezerros. Reporte do Escritorio Teórico de Agricultura Brasil-Estados Unidos. A Granja, Revista dos Criadores. Brasil.
- EATON, H.D.; GOSSLER, D.G.; LUCAS JUNIOR, H.L. 1959. Effect of duration of experiment on experimental errors in calf nutrition growth studies. *Journal of Dairy Science* 42:1398.
- HARVEY, W.R. 1960. Least squares analysis of data with unequal subclass numbers. U.S. Department of Agriculture, ARS 20-8. Washington, DC., EE.UU.
- HARVEY, W.R. 1977. User's guide for LSML76. Ohio State University. Columbus, Ohio. (mimeografiado). 76 p.
- HARVEY, W.R. 1982. Least-square analysis of discrete data. *Journal of Animal Science* 54:1067.
- HENDERSON, C.R.; McALLISTER, A.J. 1978. The missing subclass problem in two-way fixed models. *Journal of Animal Science* 46:1125.
- LEBDOSOJKOJO, S. 1977. Mineral supplementation of grazing beef cattle in the eastern plains of Colombia. Ph.D. Thesis Gainesville, Florida, EE.UU. University of Florida. 227 p.
- McDOWELL, L.R.; CONRAD, J. H.; ELLIS, G. L.; LOOSLI, J. K. 1984. Minerals for grazing ruminants in tropical regions. Gainesville, Florida, EE.UU. Department of Animal Science, Center for Tropical Agriculture y U.S. Agency for International Development. 86 p.
- NELSEN, T. C.; SHORT, R. E.; PHELPS, D. A.; STAIGMILLER, R. B. 1985. Nonpuberal estrus and mature cow influences on growth and puberty in heifers. *Journal of Animal Science* 61:470.
- PALADINES, O. 1984. Mediciones de la respuesta animal en ensayos de pastoreo: ganancia de peso. In *Evaluación de Pasturas con Animales. Alternativas Metodológicas*. Ed por C. Lascano, E. Pizarro. Cali, Colombia, RIEPT, Centro Internacional de Agricultura Tropical. p. 99.
- RUTLEDGE, J.J.; GUNSETT, F.C. 1982. Analysis of categorical data in the animal sciences. *Journal of Animal Science* 54:1072.
- SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. 1980. *Statistical Methods*. 7 ed. Ames, Iowa, EE.UU., The Iowa State University Press. 507 p.
- STONAKER, H. H.; SALAZAR, J.; BUSHMAN, D. H.; GOMEZ, J.; VILLAR, J.; OSORIO, G. 1975. Proceedings of a seminar on potential to increase beef production. CIAT. Publication Series CE. No. 10. p. 63.



## DISCUSION DE LAS RECOMENDACIONES DEL GRUPO DE TRABAJO No.5

*Moderador: Dr. Roberto Quiroz*

### **MARIA KASS**

En un experimento para medir producción de leche, ¿durante cuantos días es necesario muestrear la leche para determinar su composición?

### **C. WILCOX**

Creo que lo que el investigador debe hacer es definir cuáles de las variables de respuesta son las más importantes en su trabajo, y enfocar su esfuerzo en ellas. Si se decide que es producción de leche, se debe diseñar un experimento para ese propósito. Ahora, si en el transcurso del experimento el investigador se da cuenta de que no podrá detectar diferencias en el porcentaje de grasa, porque este parámetro es más variable que producción de leche, tiene dos alternativas. La primera, sacrificar la medición de grasa; la segunda, rediseñar el experimento de tal modo que pueda medir mejor diferencias en el tenor graso (usar más animales). Los otros constituyentes de la leche no son tan variables como el contenido de grasa o

la misma producción de leche, siendo posible diseñar un experimento para medir cambios en todos ellos, excepto grasa.

### **J. ZORRILLA**

¿No se consideraron los sistemas de producción de lana, dentro de este tema? Hago la pregunta porque esta es una actividad importante en algunas partes de América Latina, y considero conveniente incluir recomendaciones específicas a ella. En ese sentido, tengo una consulta de tipo conceptual, encaminada a conocer su opinión en cuanto a la posibilidad de aceptar cierto grado de compromiso entre una respuesta con una significancia estadística a niveles de confiabilidad alta *vs.* ventajas económicas de esa misma respuesta. Por ejemplo, los ensayos en los que la variable de respuesta es de carácter reproductivo, requieren un número elevado de repeticiones para satisfacer las exigencias estadísticas; sin embargo, cambios pequeños en la tasa de parición tienen un gran impacto económico.

## M.E. RUIZ

Con respecto a la observación del Dr. Zorrilla, el programa original incluía el tratamiento de aspectos de producción de lana. Lamentablemente por problemas fuera de nuestro control, la persona designada no pudo asistir a la reunión, y no fue posible conseguir quien le sustituyera en el corto plazo que nos quedara para hacerlo.

En relación a qué tanto debemos atender los resultados de un análisis estadístico, cuando quizás sea más importante tomar consideraciones de tipo económico, hay que recordar que el análisis estadístico es simplemente una herramienta para hacer alguna inferencia o llegar a alguna conclusión. No es la única herramienta que deberíamos usar. Por otro lado, las comparaciones estadísticas usualmente se hacen sobre respuestas biológicas, y el que una diferencia biológica no sea significativa, no quiere decir que la diferencia económica no lo sea. Si el análisis estadístico no muestra diferencias entre dos tratamientos, o dos sistemas y sin embargo el análisis económico sí muestra que hay una diferencia (y quizás el análisis estadístico muestra tan sólo una tendencia en la misma dirección que el beneficio económico) pudiese ser que realmente no existan diferencias entre tratamientos y que la superioridad económica en realidad tampoco existe. En contraste, si la estadística mostró que no hay diferencias, tanto biológicas como económicas entre tratamientos, siempre existe el riesgo de

equivocarnos. Lo que quiero decir es que debemos usar todos los elementos de juicio para llegar a hacer una recomendación, especialmente cuando estemos en la fase final de nuestro programa de investigación, cuando estamos prestos a hacer una recomendación tecnológica al productor.

## C. WERNLI

Concuerdo plenamente con lo que ha dicho el Dr. Ruiz, y entiendo la inquietud del Dr. Zorrilla. Es frecuente que establezcamos un diseño experimental y concluyamos que no hay diferencias estadísticas al nivel universalmente aceptado de 5%; sin embargo, creo que no debemos ser tan estrictos en nuestro juicio de extrapolación de resultados. Es correcto por una parte, que si fijamos el 5% debemos respetarlo y no podemos sacar ninguna conclusión de ahí, aún si una diferencia es muy económica, como dice el Dr. Ruiz. Pero discrepo que realmente tengamos que fijarnos límites tan estrechos, particularmente cuando los recursos son limitados y el medio necesita de conclusiones, aunque sean un poco menos aproximadas o más groseras. Creo que lo que cabría hacer en estos casos es buscar los niveles de probabilidad a los cuales realmente nuestro experimento se traduce en resultados significativos, y hablar y proyectar en esos términos nuestra diferencia. En otras palabras, si no hay diferencias al 5%, las busco al 10, al 15, al 20 o al 25%. Por supuesto, hay que justificar por qué se contrasta al nivel que se hizo (no se usó suficiente número de

animales, hubo muchas parcelas perdidas, etc.). Usar una probabilidad de 20% significa que mi experimento, si lo quiero proyectar a nivel de estación experimental o a nivel de productores, en la misma forma en que lo realicé, de cada 100 casos, 80 alcanzarán los mismos resultados, y por ello deduzco que los resultados económicos serán también válidos en 80% de ellos.

#### **D. GONZALEZ**

Un tema que me preocupa es la expresión de resultados de consumo en las diferentes etapas de crecimiento y engorde. ¿Abordaron ustedes el problema de la expresión del consumo? Si no lo hicieron, creo que sería recomendable el que se exprese por kilogramo de peso y se de el peso de los animales. Así quien quiera calcular consumo por peso metabólico lo puede hacer.

Una de sus recomendaciones es la de pesar los animales sin ayuno, advirtiendo que, en un experimento en el que se pesa frecuentemente, las diferencias en el llenado del rumen, tienden a balancearse. ¿Aplica esto también durante el crecimiento temprano? Por ejemplo, en el caso que se esté trabajando con terneros, que durante el transcurso del experimento pasan de la etapa de pre-rumiante a la de rumiante, o que se esté evaluando una dieta para estimular este tipo de desarrollo, ¿aplicarían también la misma recomendación respecto al pesaje?

#### **M.E. RUIZ**

Con respecto al consumo voluntario hay algo escrito en uno de los documentos base presentados. La verdad es que en el grupo no le dedicamos mucho tiempo al tema sobre cómo expresar consumo voluntario, simplemente decidimos que es un parámetro que debe ser medido y queda implícito que la expresión del consumo debería ser por cada 100 kg de peso vivo.

Respecto a experimentos en que se incluyen terneros que están pasando de un estado de monogástrico a uno de poligástrico, o en los que precisamente se está estudiando su cambio a poligástrico, tampoco abordamos el tema. Siempre pensamos en animales en crecimiento pero sin incluir esa fase inicial de monogástrico. Personalmente, pienso que en experimentos en que se incluya la evolución de un estado monogástrico a uno poligástrico, se debería aplicar un ayuno de 24 horas previo a cada pesaje.

#### **R. QUIROZ**

Con respecto al pesaje de los animales en ayuno o no, existe la alternativa de estimar el volumen del tracto digestivo con marcadores, y hacer las comparaciones entre tratamientos luego de ajustar por el contenido de alimento en el tracto. En lo que respecta a coeficientes de variabilidad en parámetros reproductivos, hemos encontrado que estos no son tan altos como se espera, y en trabajos en fincas en Panamá hemos detectado diferencias al 5%.

Quisiera preguntar al Dr. Wilcox, ¿cuánto más eficiente es un diseño de reversión doble ("switchback") que uno de reversión simple?

### **C. WILCOX**

En relación con los coeficientes de variación, al menos para producción y composición de leche, los diseños de reversión simple o doble son muy similares, aunque puede que exista una diferencia muy pequeña entre ellos que al momento no recuerdo. Le sugiero revisar el trabajo original de Lucas (*Journal of Dairy Science*

43:193) para que compare la magnitud del error en este tipo de diseños y los cuadrados latinos. Una de las ventajas de los diseños con períodos múltiples, sobre aquellos que sólo consideran dos períodos, se encuentra en su mayor número de grados de libertad para el error. Los diseños de reversión y los cuadrados latinos son notorios por los pocos grados de libertad que dejan para el error. El diseño que se encuentra en el documento presentado en esta reunión, tiene 36 vacas, tres períodos y un alto número de grados de libertad para el error.

## CAPITULO VI

### EXPERIMENTACION EN FINCAS

#### GRUPO DE TRABAJO No. 6

Dr. Rolain Borel  
Dr. Carlos Lascano  
Dr. Gastón Pichard  
Dr. Roberto Quiroz  
Dr. Francisco Romero  
Dr. José Zorrilla

# PROPUESTA METODOLOGICA PARA LA INVESTIGACION PECUARIA EN FINCAS DE PRODUCTORES

*José Zorrilla Ríos<sup>1</sup>*

*"Los investigadores piden que los productores cambien sus procedimientos, aunque ellos mismos no dan señales de modificar los suyos".*

## **1. Introducción**

El presente manuscrito considera una propuesta metodológica enfocada al trabajo experimental pecuario realizado directamente en la finca del productor. El documento está estructurado en dos secciones. La primera es de carácter filosófico y conceptual del enfoque de investigación en sistemas de producción pecuaria; la segunda considera aspectos metodológicos de la investigación pecuaria en fincas de productores.

Filosóficamente implica la aceptación del concepto de anacronismo entre las actitudes asumidas, en for-

ma tradicional, en las estaciones experimentales para tratar de incidir en un sistema productivo pecuario, y se pronuncia en favor de la conceptualización de fomentar y practicar un mayor contacto entre el investigador y el productor mismo, que les permita formar una asociación cooperativa de apoyo y complementación mutua. Metodológicamente, pretende compartir escasas experiencias personales y limitados apoyos bibliográficos disponibles al autor, referentes a la posible metodología experimental pecuaria aplicable a las condiciones de fincas de los productores, bajo un enfoque de sistemas de producción. Pretende ser un documento de trabajo y no un trabajo documentado.

---

<sup>1</sup> Ph. D., Investigador del INIFAP, México

## 2. Aspectos filosóficos

Se considera una realidad el reconocimiento creciente, por parte de la comunidad científica dedicada a la investigación pecuaria, de la necesidad de dirigir mayores esfuerzos al proceso de generación y transferencia de tecnología agropecuaria bajo una conceptualización integral de los sistemas productivos en los que se pretende incidir (Trigo *et al.*, 1982). Este enfoque obliga a los investigadores interesados en esta nueva corriente, a aceptar nuevos retos conceptuales tanto de carácter filosófico como metodológico.

Hace cien años se fundaron las primeras estaciones experimentales en los Estados Unidos de Norteamérica (Acker y Koch, 1987). Se establecieron bajo la estructura metodológica y filosófica implantada en Europa. Esta estructura respondía a las necesidades imperantes en aquel entonces. En aquella época, se requería generar información básica que ayudara a resolver las limitantes productivas, ya que no existía información disponible que se pudiera validar y transferir directamente al productor. Las estaciones experimentales, operando bajo conceptos rígidos y enfoques muy definidos, cumplieron ampliamente con sus objetivos.

A la fecha, las estaciones experimentales agropecuarias en América Latina mantienen, por lo general, esa misma concepción metodológica y filosófica de hace cien años, a pesar de que

las condiciones imperantes en la actualidad, no sólo por el cúmulo de información tecnológica disponible, sino también por los sistemas de producción operantes, distan mucho de aquellas que prevalecieron hace un siglo.

La tecnología agropecuaria disponible a la fecha puede tener su aplicación inmediata en sistemas de producción. Sin embargo, debe ser validada e integrada en los sistemas de producción que se quiera impactar. Las estaciones experimentales no representan sistemas de producción. Los diseños y procedimientos metodológicos empleados en las estaciones experimentales son, en la mayoría de los casos, inadecuados para abordar problemas en fincas de productores, por la gran variabilidad y poco control que sobre la misma se tiene. Esto obliga a los investigadores interesados en desarrollar actividades en fincas de productores, con un enfoque de sistemas de producción, a ceder en parte la rigurosidad científica empleada en los ensayos realizados en las estaciones experimentales, a cambio de una mayor congruencia entre su esfuerzo y las necesidades de los productores a los que está dirigida la investigación. La pérdida de precisión experimental bajo estas condiciones, obliga al registro de mayor información, no necesariamente relacionada directamente con el fenómeno en estudio. Esto generalmente se traduce en un mejor conocimiento de los múltiples factores que afectan al sistema productivo en estudio, así como sus interacciones.

Las actividades en finca de productores no son una sustitución de las actividades que se desarrollan en las estaciones experimentales. Son complemento de éstas, con ventajas y limitaciones en ambos casos. Algunos de los criterios definidos para distinguir entre la conveniencia o propiedad de conducir una actividad experimental en la estación o en la finca del productor contemplan que, si el grado de interacción esperada entre la tecnología en prueba y el medio ambiente de una finca no es alto, ésta podría conducirse directamente con productores, apoyados con servicios normales de extensión. Igualmente, si se cuenta con suficiente información de apoyo sobre tecnologías similares, las innovaciones podrían conducirse directamente en fincas de productores, sin que necesariamente tuviesen que probarse previamente en estaciones experimentales.

Un análisis del número y tipo de experimentos pecuarios conducidos en los últimos diez años en finca de productores, con un enfoque de sistemas de producción, demostraría el grado de evolución tan elemental en que se encuentra este tipo de actividades. El reto que tenemos los investigadores en producción animal radica en la prontitud con que estemos dispuestos a imprimir un mayor énfasis en las actividades de adopción y transferencia de tecnología.

### **3. Aspectos metodológicos**

Se consideran dos aspectos relacionados a la implementación de

actividades cooperativas en fincas de productores. El relacionado con procedimientos a seguir en la elección de fincas, y aquel relacionado con la implementación de actividades de investigación, transferencia y/o divulgación de tecnología una vez seleccionada una finca.

#### **a. Procedimientos para la selección de finca**

Los procedimientos más comúnmente utilizados para seleccionar la finca o fincas potencialmente adecuadas para llevar a cabo una actividad cooperativa, se podrían incluir en dos grandes grupos: 1) los que señalan como pre-requisito el conocer los posibles estratos de productores que componen el entorno en estudio y, con ello, pretenden seleccionar fincas representativas, y 2) los que aceptan la validez de los estudios de caso como una herramienta de trabajo y que intrínsecamente aceptan cualquiera que pudiese ser la representatividad de la finca con la que se trabaje. Esta opción no implica que no sea necesario el conocer, eventualmente, a qué estrato de productores corresponde la finca en cuestión. Se diferencia del procedimiento anterior básicamente en el hecho de que el inicio de actividades en la finca no estaría supeditado al requisito de conocer su grado de representatividad como antelación a su aceptación. Bajo este concepto, hay que tener cuidado de no caer en el error de forzar una situación tal que la innovación tecnológica desarrollada



en el Estudio de Caso, trate de imponerse al resto de fincas con características similares.

El presente documento considera algunos procedimientos aceptados o aceptables, a juicio del autor, para conducir actividades de investigación, transferencia y divulgación de nuevas prácticas tecnológicas dentro de sistemas de producción en fincas. No se harán mayores comentarios en lo referente a la estrategia más recomendable para seleccionar las fincas de productores. Quedará a cargo de los participantes en la mesa de trabajo discutir las ventajas y limitaciones de una u otra alternativa y la posible recomendación final.

#### **b. Definición de los problemas de investigación**

Knipscheer (1985) cataloga, en forma generalizada, las actividades de definición de problemas de investigación agropecuaria que se realizan en finca de productores, en cuatro grandes categorías, con base en el criterio que predomine en la percepción y enfoque de los problemas: 1) De los productores, 2) Del gobierno, 3) Del investigador y 4) El de nadie.

Las actividades en finca de productores que se caracterizan por un predominio del criterio del productor en la elección y priorización de los temas de investigación, implican que el investigador se identifica plenamente con el productor y comparte su punto de vista. Esta condición conlleva

la posibilidad de que el investigador realice una actividad que no sea totalmente compatible con su mandato laboral. Uno de los mayores riesgos en los que se puede incurrir, cuando se acepta esta alternativa, es la falta de conocimiento por parte del productor para utilizar al máximo el potencial que puede tener la actividad de investigación, así como sus limitaciones y posibles consecuencias. Por eso la asistencia y cooperación del investigador en este momento juega un papel muy importante.

La segunda categoría corresponde a proyectos gubernamentales. Con frecuencia se cuestiona si estas actividades son realmente trabajos en finca de productores o simplemente la evaluación de la respuesta de los productores a una tecnología dada (impuesta en la mayoría de los casos), dentro de todo un programa de innovaciones tecnológicas a diferentes niveles. Si bien es cierto que este tipo de programas cuentan con ventajas como el de constituir compromisos a mediano y largo plazo, disponer de financiamiento y apoyo técnico, y permitir un seguimiento evaluatorio con cierta facilidad, características todas ellas que tienden a garantizar su éxito, también es cierto que promueven ideas preconcebidas de necesidades tecnológicas, no necesariamente acordes con la realidad. Los dirigentes de estos proyectos, en su afán por demostrar la efectividad de sus planes originales, introducen elementos manipuladores como el subsidio a ciertos productos y/o actividades, que distorsionan significativamente

el grado de efectividad de las tecnologías en prueba.

La tercera categoría de identificación de problemas productivos es aquella que se basa en el predominio del criterio del investigador. Frecuentemente estos programas adolecen de una conceptualización sin vinculación con las necesidades de los productores y son motivados por intereses científicos y/o académicos personales. El investigador, al estar familiarizado con las posibilidades que le ofrecen las metodologías convencionales de investigación, aquellas que se utilizan en condiciones controladas de estación experimental, manifiestan la tendencia a permitir que las facilidades existentes en las fincas de los productores sean las que determinen el tipo de investigación a conducir.

El último tipo de conceptualización de problemas se refiere a aquel en el que no hay problemas identificados inicialmente. El objetivo de estos estudios es conocer mejor los sistemas productivos de interés para detectar los problemas que limitan la productividad de los mismos. El poco conocimiento que, por lo general, tienen los investigadores sobre los sistemas productivos a los que pretenden influenciar, se convierte en una valiosa justificación para la conducción de este tipo de actividades. Bajo estas condiciones, la identificación de investigadores y productores en un entorno de intereses comunes es el resultado más positivo de las actividades de investigación en finca de productores.

### **c. Tipo de experimentos en finca de productores**

Knipscheer (1985) reconoce tres tipos de experimentos que se pueden conducir en la finca de los productores: 1) Aquellos manejados por el investigador, 2) Los conducidos por el productor y 3) Los promocionales o demostrativos. En los experimentos bajo responsabilidad directa del investigador, predomina la información de tipo técnico. La información factible de obtener en experimentos conducidos por los productores incluye cierta dosis de parámetros de comportamiento de los mismos productores, al caracterizarse por incluir tratamientos propuestos por ellos. En las actividades demostrativas, las recomendaciones tecnológicas están claramente definidas desde el principio, siendo las respuestas de aceptación por parte de los productores el principal criterio evaluatorio.

Finalmente, para Knipscheer (1985), las bases que definen el tipo de experimentación a conducir en finca están representadas por una clara conceptualización del problema a investigar, de la población a la que va dirigida esta investigación, y de los objetivos y propósitos de la misma. Dado que estos aspectos lógicamente variarán de finca en finca, resulta particularmente difícil proporcionar normas metodológicas de aplicación general.

### **d. Diseño de experimentos pecuarios en finca de productores**

Para Van Eys (1985) la selección de una o varias fincas de productores

es el primer paso a seguir. Idealmente, estos sitios deberán ser representativos del estrato de productores al que se pretenda beneficiar. En la práctica, otros factores tales como el deseo de cooperación por parte del productor, vías de acceso, costos, etc., juegan un papel muchas veces de mayor peso real que la representatividad, y no menos válido que ésta. Esto hace que un criterio aleatorio en la selección de fincas sea raras veces posible de lograr. Lo que sí debe realizarse en todos los casos es una descripción detallada del sistema productivo imperante en la finca cooperante y los factores agroeconómicos que la gobiernan.

Estas características de los ensayos en finca de productores implican una tendencia a ser excluyentes de productores conservadores, o con pocos recursos. Si el desarrollo de nuevas tecnologías pecuarias o su validación es un proceso que se realiza dentro de un enfoque de sistemas de producción, su aplicación no se verá limitada a la finca en la que se llevó a cabo, sino que tendrá una aceptación más general.

#### **e. El control experimental**

Los ensayos en finca de productores son, por definición, actividades enfocadas hacia los productores y conducidas de tal forma que les beneficien a través del uso más eficiente de los recursos disponibles. Además, las modificaciones introducidas deben ser comprensibles y factibles de ser

implementadas y evaluadas por el productor, términos que le sean familiares.

Dentro de este contexto, se podría aceptar que la intervención del investigador y del productor en la planeación, ejecución y control del ensayo es en forma conjunta, aunque pueden adquirir diferentes preponderancias según la etapa de implementación. En la etapa de identificación de limitantes, la participación deberá ser por igual. En la planeación en sí de la experimentación a llevar a cabo, el criterio del investigador podrá prevalecer, sobre todo en lo referente a las alternativas a probar. La conducción rutinaria del experimento recae en mayor grado en el productor para que finalmente, el investigador vuelva a tomar liderazgo en la interpretación de resultados y enfoque de nuevas acciones a partir de las experiencias generadas (Kategile, 1985)

#### **f. Estadística y los ensayos pecuarios en finca de productores**

El análisis estadístico de información biológica cuantitativa es considerado como un proceso rutinario y necesario. El tamaño recomendado de la muestra experimental está determinado por la variabilidad asociada a al variable en estudio y el grado o nivel de confianza aceptado.

La experimentación en finca de productores, bajo un enfoque de sistemas de producción, se enfrenta con

frecuencia al problema de que la variabilidad asociada a un factor determinado es muy difícil de estimar, en virtud del sinnúmero de interacciones que tienen lugar en el sistema como un todo. Esto hace que los procedimientos estadísticos convencionales, empleados en experimentos en estaciones experimentales, tengan severas limitaciones e incluso resulten en ocasiones carentes de significado cuando se pretenden utilizar en condiciones de fincas de productores.

Para el análisis de ensayos agrónomos en finca de productores, se recomienda la obra de Hildebrand y Poey (1985). Algunos de los procedimientos estadísticos indicados podrían tener aplicación en ensayos de producción pecuaria. Otra obra que merece ser mencionada, por estar dirigida a metodología estadística relevante al enfoque de sistemas es la editada por el Commonwealth Agricultural Bureaux (1975). Procedimientos estadísticos tales como regresión múltiple, superficies de respuesta, análisis de componentes principales y aquellos que manipulan variables y respuestas múltiples en forma simultánea, incluyendo simulación, todos ellos factibles de manejarse en la actualidad gracias al desarrollo tecnológico de las computadoras, son algunos de los principales procedimientos considerados en dicho documento (Commonwealth Agricultural Bureaux, 1975).

### **g. Criterios de evaluación**

Cook (1985) considera tres criterios para evaluar ensayos en finca de

productores: 1) Efectividad técnica, 2) Beneficios económicos y 3) Compatibilidad sociocultural.

El criterio de evaluación de efectividad tecnológica incluye una estimación cualitativa y cuantitativa de la respuesta obtenida en la productividad biológica con la adopción del cambio tecnológico, así como su compatibilidad con los recursos disponibles por el productor. Este criterio adquiere especial relevancia en casos de sistemas de producción pastoril, en los que las nuevas tecnologías intentan mejorar la habilidad del productor para utilizar sus recursos naturales productivos disponibles, con un criterio conservacionista tendiente a estabilizar y recuperar recursos naturales en vías de deterioro.

El efecto económico esperado, con la introducción de tecnología innovativa, es un aspecto importante a considerar en la evaluación de ensayos con productores. Sin embargo, debe tenerse cuidado de no otorgarle demasiado peso a las relaciones convencionales de costo/beneficio, ya que éstas frecuentemente ignoran beneficios colaterales que se obtienen. En un esfuerzo de contrarrestar en cierto grado esta posible deficiencia, debe tomarse en cuenta la actitud formal o informal que el productor asuma ante los efectos de la innovación tecnológica. Una evaluación del ensayo con base en los logros obtenidos, en comparación con los objetivos planteados inicialmente, también puede servir de base.

Una de las formas más claras de medir el grado de compatibilidad entre el sistema productivo al que se intenta influir y la propuesta tecnológica, es su grado de adopción por parte del productor. En este aspecto, es muy importante registrar las modificaciones que la tecnología en prueba pueda sufrir en manos de los productores, una vez que estos la implementan en sus fincas.

### **3. Ejemplos metodológicos de ensayos en finca de productores**

A continuación se presentan dos ejemplos de trabajos de investigación en componentes en sistemas de producción doble propósito (carne y leche) en el trópico.

#### **a. Suplementación a vacas en producción**

(1) **Selección de fincas.** Se aceptó el criterio de trabajar con el productor cooperante.

(2) **Identificación de limitantes.** Se procedió a la identificación y priorización de factores limitantes de común acuerdo con el productor.

(3) **Familiarización con el sistema productivo.** Antes de iniciar el ensayo, se describió el sistema operativo cotidiano en práctica.

(4) **Tratamientos.** Control vs. innovación.

Control = práctica rutinaria  
Innovación = suplementación con harina de pescado.

(5) **Distribución de animales a tratamientos.** Bloques al azar, con base en la fecha de parto.

(6) **Manejo.** Sin alterar el manejo rutinario. Pastoreo común. Suministro de suplemento al momento de la ordeña (una al día), según tratamiento.

(7) **Mediciones.** Producción de leche vendible una vez por semana. Actividad ovárica y/o estado reproductivo. Peso vivo quincenal de becerros menores de seis meses. Mortalidad de becerros. Consumo individual (promedio diario) de suplemento, calculado con base en el volumen total de compra de suplemento, dividido entre el número de raciones totales en el período experimental.

(8) **Análisis.** Anova: comparación de medias, con tratamientos y bloques como fuentes de variación.

(9) **Beneficios.** Directos: económicos. Indirectos: estado físico de los animales. Grado de adopción de la práctica innovativa.

#### **b. Evaluación de nuevo germoplasma en fincas de productores.**

(1) (2) y (3). Igual que en el ejemplo anterior.

(4) **Procedimiento.** Establecimiento del área mínima requerida para pastorear únicamente los becerros la-tantes menores de seis meses, durante el período comprendido entre la ordeña de la mañana y el encierro tradicional del medio día.

(5) **Mediciones.** Además de las mencionadas en el ejemplo anterior, se aumentaron las agronómicas y las de incidencia de parásitos en becerros, y se eliminó la de consumo de suplemento.

(6) **Beneficios.** Similares al ejemplo anterior.

#### 4. Referencias

- ACKER, D.C.; KOCH, B.A. 1987. Significant accomplishments in livestock research during the past 100 years. *Journal of Animal Science* 64:660.
- COMMONWEALTH AGRICULTURAL BUREAUX. 1975. Developments in field experiment design and analysis. Ed. por V.J. Bofinger, J.L. Wheeler. Oxford, U.K. Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, Bulletin 50. 196 p.
- COOK, R.H. 1985. Criteria for evaluation. *In* Research methodology for livestock on-farm trials. Proceedings of a workshop. Aleppo, Syria, March, 1985. Ed. by Th. L. Nordblom, A. El Kairm Hamid Ahmed, G.R. Potts. Syria. ICARDA-IDRC. p.297.
- HILDEBRAND, P.E.; POEY, F. 1985. On-farm agronomic trials in farming systems research and extension. Boulder, Colorado, EE.UU. Lynne Rienner Publishers. 162 p.
- KATEGILE, J.A. 1985. Levels of farmer participation. *In* Research methodology for livestock on-farm trials. Proceedings of a workshop. Aleppo, Syria, March, 1985. Ed. by Th. L. Nordblom, A. El Kairm Hamid Ahmed, G.R. Potts. Syria. ICARDA-IDRC. p. 289.
- KNIPSCHEER, H.C. 1985. Definition of research problems. *In* Research methodology for livestock on-farm trials. Proceedings of a workshop. Aleppo, Syria, March, 1985. Ed. by Th. L. Nordblom, A. El Kairm Hamid Ahmed, G.R. Potts. Syria. ICARDA-IDRC. p. 277.
- TRIGO, E.J.; PIÑEIRO; M.E., CHAPMAN, J. 1982. Assigning priorities to agricultural research: A critical evaluation of the use of programs by product-line and production systems. *Agricultural Administration (U.K.)* 10: 23.
- VANEYS, J.E. 1985. On-farm design. *In* Research methodology for livestock on-farm trials. Proceedings of a workshop. Aleppo, Syria, March, 1985. Ed. by Th. L. Nordblom, A. El Kairm Hamid Ahmed, G.R. Potts. Syria. ICARDA-IDRC. p. 283.

# RECOMENDACIONES SOBRE ASPECTOS RELACIONADOS CON LA EXPERIMENTACION EN FINCAS.

*Francisco Romero<sup>1</sup>, Carlos Lascano, Gastón Pichard, Roberto Quiroz, José Zorrilla, Rolain Borel*

## 1. Introducción

Uno de los aspectos más relevantes en la investigación con el enfoque de sistemas es la experimentación realizada a nivel de finca, ya sea para validar resultados de investigación conducida en las estaciones experimentales o para generar información más específica a ecozonas escogidas para la generación y transferencia de tecnologías.

En la investigación en sistemas de producción animal, la investigación y validación de tecnologías a nivel de finca tiende a ser más complicada que en el caso de la investigación agronómica, no sólo por lo largo de los ciclos de producción, en comparación con los cultivos, sino también por el número reducido de animales de que disponen los pequeños productores.

Por otro lado, la disponibilidad de recursos de las instituciones involucradas en la investigación con este enfoque es limitado, lo que obliga a priorizar los experimentos, así como el número y tipo de análisis de laboratorio a realizar.

El objetivo del presente trabajo es presentar una guía sobre aspectos que deben considerarse en la planificación de la investigación en nutrición animal a ser realizada en fincas, especialmente en aquellas de pequeños y medianos productores.

## 2. Determinación de los factores limitantes

El diagnóstico estático y dinámico son herramientas utilizadas para caracterizar los sistemas de fincas

---

<sup>1</sup> Coordinador del grupo de trabajo.

existentes dentro de una región. Permiten también la identificación y conocimiento de los principales factores limitantes de la producción, para los cuales se buscarán soluciones, ya sea mediante la adaptación de tecnologías existentes en otras regiones o mediante la generación de nuevas a través de la investigación.

Los factores que más inciden sobre la productividad a nivel de finca y región son generalmente biológicos y socio-económicos. A pesar de la importancia de los aspectos socio-económicos, en este escrito se discutirán únicamente los aspectos relacionados con los componentes biológicos y, dentro de ellos, se tomará como ejemplo la experimentación en nutrición, asumiendo que el equipo técnico, de acuerdo con los productores, ha definido que éste es un aspecto sobre el cual se debe trabajar.

#### **a. Experimentos en fincas vs estaciones experimentales**

Una de las críticas más frecuentes contra la generación de información en estaciones experimentales, es que éstas están, por lo general, situadas en topografías diferentes (los productores en la ladera y las estaciones en los valles de tierra plana), con suelos de mayor fertilidad (las evaluaciones se realizan en terrenos que anteriormente han sido utilizados en ensayos de fertilización, o se incluyen niveles de fertilizantes imposibles de ser utilizados por los finqueros) y se

utiliza maquinaria y equipo (tractores, arados, picadoras de forraje, embaladoras, etc.) que no están al alcance de los productores.

Sin embargo, todo programa de investigación y extensión con el enfoque de sistemas requiere de información acerca de algunos componentes, que muchas veces sólo es posible generar a nivel de estación experimental. Por lo tanto, la investigación realizada en las fincas y en las estaciones experimentales son complementarias y no excluyentes una de la otra.

El conducir experimentos para la evaluación nutricional de forrajes, subproductos de cosecha o agroindustriales a nivel de fincas pequeñas y medianas es particularmente difícil. Se pueden distinguir aquí limitantes de tipo técnico y aquellas relacionadas directamente con los productores. Las limitantes técnicas se refieren a la dificultad de conseguir suficientes animales de la misma categoría (vacas recién paridas, toretes en crecimiento) para ser asignados a los diferentes tratamientos, así como balanzas para pesar animales. Ocurre lo mismo con la evaluación de pastos y leguminosas herbáceas, cuando se pretende estimar la productividad animal, debido a que es difícil que los productores puedan sembrar suficiente área del germoplasma a evaluar y además se tenga un tratamiento testigo.

De no existir una estación experimental con condiciones representativas de la zona donde se quieren



utilizar los resultados, se puede recurrir a la alternativa de buscar la colaboración de productores con más recursos de tierra, animales y capital, que permitan utilizar su finca para conducir estas evaluaciones.

Con respecto a las limitantes relacionadas con los productores, éstas se refieren, principalmente, a aquellas situaciones donde los tratamientos experimentales son alterados por los productores, ya sea porque deciden eliminar tratamientos extremos donde los animales producen menos que lo normal, o por que juntan todos sus animales en el mejor tratamiento, desapareciendo así la posibilidad de realizar comparaciones entre tratamientos.

### 3. Caracterización de los recursos disponibles

Una vez definido que es en fincas de productores donde se realizarán los experimentos o validación de alternativas de producción, es necesario caracterizar adecuadamente los animales y los recursos alimentarios disponibles.

#### a. Caracterización de los animales

Además de definir el estado fisiológico de los animales, es importante conocer el estado nutricional de los mismos. Lo que se requiere es estimar si bajo esas condiciones de alimen-

tación los animales están catabolizando sus reservas corporales para poder producir, o si existe un déficit proteico o mineral que estuviese limitando la productividad. Esta caracterización se puede hacer con base en indicadores externos y/o internos.

(1) **Parámetros externos.** Los indicadores externos del animal que deben considerarse son: la condición corporal, el peso y el estado reproductivo.

Estudios recientes han demostrado que las reservas corporales en ganado de carne y leche (condición corporal) durante determinados estados fisiológicos, definen en gran medida la producción, reproducción y salud general de los bovinos (Lowman *et al.*, 1976; Perkins *et al.*, 1985). Para la estimación visual de estas reservas se han desarrollado, tanto en el Reino Unido como en los Estados Unidos, escalas de calificación basadas en la acumulación de grasa entre el hueso de la cadera y la última costilla, y alrededor de la base o cabeza de la cola. La mayoría de estas escalas de calificación y su correlación con estados productivos y de salud han sido elaboradas utilizando razas especializadas, bajo sistemas de manejo y alimentación muy diferentes a los del trópico. Nicholson y Sayers (1987) han trabajado con ganado *Bos indicus* en Africa. Ellos analizaron la repetibilidad y reproducibilidad de este método, utilizando una escala de nueve puntos en vez de los cinco que se utilizan en los climas templados, concluyendo que el método es de gran

utilidad para determinar rápidamente cambios en las reservas corporales. Sin embargo, es recomendable que se evalúe este tipo de clasificaciones bajo condiciones tropicales y en animales de doble propósito.

El peso vivo de los animales es otro parámetro que ayuda a estimar la historia nutricional de los animales. Sin embargo, es difícil poder tomar este tipo de información a nivel de finca pues rara vez se cuenta con balanzas adecuadas. Por lo tanto, es necesario buscar métodos alternativos para estimar el peso vivo. Una solución podría ser la estimación del peso por medio de la medición del perímetro torácico con cintas que han sido adecuadamente calibradas, tal y como se ha hecho para razas específicas en los países desarrollados. El funcionamiento a nivel tropical de cintas ya calibradas es cuestionable, por lo que es necesario conducir trabajos de calibración de este tipo de cintas para condiciones del trópico.

Respecto al estado reproductivo, Taylor y Chaves (ver su contribución en esta publicación) indican que si la cantidad y calidad del forraje disponible a los animales durante el año no son limitantes, la frecuencia de encontrar problemas reproductivos es muy baja.

**(2) Parámetros internos.** Bajo condiciones de clima templado se ha utilizado el "perfil metabólico" como un mecanismo de diagnóstico temprano en la detección de niveles anormales de algunos metabolitos, hor-

monas y minerales en sangre, que podrían influir en la productividad de los animales (Rowlands, 1980). También se pueden obtener muestras de hígado, huesos, pelo y heces según las sustancias y minerales que se quieran determinar, tal y como señala Rosero en esta misma Guía Metodológica.

McDowell *et al.* (1985) discuten acerca de el efecto de las deficiencias y toxicidades de los minerales sobre la producción y reproducción del ganado pastoreando forrajes tropicales. Los minerales más frecuentemente determinados en los perfiles metabólicos son: fósforo inorgánico, calcio, magnesio y cobre (Gibson *et al.*, 1987).

La concentración de metabolitos en la sangre está directamente correlacionada con las hormonas que participan en el control del metabolismo animal. Oetzel *et al.* (1988), sugieren que las hormonas sanguíneas son mejores indicadores del estado nutricional que los metabolitos regulados por ellas. Dentro de éstas se pueden citar: la insulina, el glucagón, la tiroxina, los glucocorticoides y la hormona del crecimiento (Herbein *et al.* 1985; Riis y Madsen, 1985). Los metabolitos e indicadores sanguíneos comúnmente determinados son: hematocrito, hemoglobina, glucosa, cuerpos cetónicos, ácidos grasos libres, proteína total, albúmina, globulina y urea-nitrógeno (Rowlands, 1980).

Son pocos los trabajos de investigación que se han realizado o publicado sobre este aspecto en condiciones

tropicales. Los niveles "normales" de estos metabolitos y su valor como indicador del estado nutricional, podrían no ser similares a los de animales de razas especializadas de carne o leche manejados bajo condiciones típicas de climas templados. Es por ello que este es un campo importante de investigación, a fin de lograr de desarrollar un "perfil metabólico" para condiciones tropicales. Al respecto, Guzmán y Morales (1980), trabajando con vacas cebú en los llanos orientales de Colombia (Cari-magua), encontraron una relación importante entre la época del año, el estado fisiológico y el peso de las vacas con la concentración en sangre de proteína total, hemoglobina, hematocrito, glucosa y urea.

## **b. Caracterización de la producción animal**

Las salidas del componente pecuario dentro de un sistema de finca se pueden expresar como producción de carne, producción de leche, producción de lana o pelo, y los servicios (tracción, transporte) prestados por los animales.

Los parámetros que se consideraron más adecuados para estimar la producción de carne en las fincas son: cambios en el peso vivo, relación edad/peso y rendimiento en canal.

**(1) Producción de carne.** Como se indicara, la determinación de la ganancia de peso en animales adultos frecuentemente se dificulta por la

falta de balanzas en las fincas, limitándose algunos proyectos a obtener el peso al nacimiento con balanzas portátiles. Una alternativa posible sería el buscar la colaboración de personas (comerciantes de ganado, carniceros o productores) con amplia experiencia en estimar "a ojo" el peso vivo, especialmente de aquellos que tienen la oportunidad de calibrar sus estimaciones en las balanzas de las subastas, plazas o mataderos de ganado. Para evitar variaciones debidas a diferentes personas, es conveniente que, en la medida de lo posible, sea la misma persona quien estime los pesos a través del tiempo o de todo el experimento. La frecuencia con que se realicen estas estimaciones debe estar en función de los objetivos del trabajo pudiendo ser quincenales, mensuales o bimensuales.

En la práctica, la mayoría de los investigadores pesan los animales cada 28 días (Paladines, 1984). En estas caracterizaciones debe considerarse la época del año para tener información, por ejemplo, de cuánto es la pérdida de peso durante la época seca y determinar la necesidad (bio-económica) de implementar estrategias de alimentación para este período.

La determinación de la producción de carne de una finca por medio del rendimiento en canal es difícil, porque la mayoría de los productores venden sus animales a comerciantes u otros ganaderos y, pocas veces se tiene la opción de conocer cuál es el rendimiento en canal de los animales. La

estimación de la producción a través de la relación peso:edad es poco confiable, porque para que la diferencia entre dos animales sea atribuible únicamente al nivel nutricional se debe asumir que las otras fuentes de variación han permanecido constantes e iguales en ambos casos.

**(2) Producción de leche.** Es frecuente expresar la producción de leche como producción diaria por vaca, producción por hato, producción vendible y producción total por finca. La conveniencia de usar una u otra forma de expresión es dependiente de los objetivos del trabajo. En algunos casos será suficiente coleccionar la información de leche vendible total, y en otros (evaluaciones de diferentes genotipos) se requerirá la producción de leche por vaca. La estimación de la producción total de leche por finca, en explotaciones de doble propósito, involucra el pesaje de los terneros antes y después de ser amamantados (Vaccaro, 1984).

**(3) Producción de lana o pelo.** En estos casos se debe caracterizar no sólo la producción de lana, sino también la calidad de la misma.

**(4) Animales de trabajo.** A nivel de finca es difícil estimar el gasto energético de los animales de trabajo. Sin embargo, es importante conocer si existen animales que son utilizados para tiro o para carga, y con qué frecuencia e intensidad se les utiliza.

#### **4. Caracterización de los recursos alimenticios**

La caracterización del estado nutricional de los animales, así como sus niveles de producción, es importante para determinar si los recursos alimentarios de la finca se están utilizando adecuadamente, si es necesario el diseño de una estrategia de utilización más adecuada o si es necesaria la implementación de nuevas tecnologías que permitan una mayor disponibilidad y calidad de estos recursos a lo largo del año.

Una vez caracterizados adecuadamente los animales y su nivel de producción es necesario caracterizar los recursos alimenticios que son o podrían ser utilizados por los productores.

##### **a. Inventario de recursos alimenticios**

Se sugiere realizar un inventario forrajero tanto a nivel de finca como de región. A nivel regional se recomienda realizar un sondeo con los productores para determinar las especies forrajeras (tanto herbáceas como arbóreas) presentes y conocer acerca de posibles preferencias personales por alguna de ellas. Es importante recabar información acerca de lo que los productores piensan de estas especies (si hay pastos buenos sólo para leche o para carne, forrajes que no son utilizados porque transmiten olor o sabor a la leche, etc.).

Con base en ese inventario se deberá constatar la presencia o no de factores tóxicos o detrimentales de la calidad (factores anticualitativos). Esta búsqueda de información se hace a nivel de productores, profesionales calificados y por medio de revisiones bibliográficas.

En estos inventarios regionales deben considerarse también aquellos alimentos que son externos a la finca pero que se encuentran disponibles en la zona, como concentrados y subproductos agrícolas o agroindustriales. Es necesario determinar la calidad, precio y costo de transporte ya que estos factores son determinantes en la posible utilización de estos recursos a nivel de finca.

La caracterización de los recursos alimenticios a nivel de finca debe iniciarse con la elaboración, conjuntamente con el productor, de un croquis de la finca, en el que se indiquen las partes donde se encuentran localizados los recursos forrajeros (cerdas vivas, pseudo tallo de banano, caña, pasto de corte, número y tamaño de los apartos, etc). Es importante en este punto conocer el por qué de la distribución de estos recursos en las diferentes partes de la finca (para evitar el viento en el verano o las inundaciones en invierno).

Debe determinarse la composición botánica de los potreros y la dominancia de las especies, así como la condición de las pasturas. La presencia de especies con potencial para propagarse rápidamente deberá to-

marse en cuenta, especialmente cuando éstas tienen un menor rendimiento y valor nutritivo que los pastos predominantes en la fincas, ya que a corto plazo podrían sustituir las especies deseables, reduciendo los niveles de producción de estas fincas. Es importante considerar también el efecto de la época del año en que se esté realizando la evaluación, ya que los atributos de las pasturas pueden ser fuertemente influenciados por ésta.

La evaluación de la condición de las pasturas es subjetiva, por lo que es conveniente que el equipo evaluador realice evaluaciones conjuntas iniciales, con el fin de calibrar sus estimaciones visuales. Con experiencia, es posible determinar si una pastura está en buen estado o, por el contrario, se aprecia un deterioro de la misma que, de continuar, resultaría en la degradación y sustitución de las especies deseables por malezas.

#### **b. Tipo de mediciones a realizar**

Se sugiere que se hagan mediciones relacionadas con el valor pastoral de los potreros, la disponibilidad de forraje, la producción anual de biomasa y el crecimiento estacional.

El valor pastoral es un término utilizado en América del Sur, que corresponde al número de unidades animal-día que, en una determinada estación del año, puede soportar un potrero sin deteriorarse a largo plazo, produciendo la mayor cantidad de carne, leche o lana por unidad de área.

Para esto es necesario llevar registros donde se indique, para cada potrero, el número y peso de los animales y los días de permanencia. Es necesario también estimar la disponibilidad de biomasa en los apartos. Estas estimaciones podrían hacerse una sola vez durante las diferentes épocas del año y en los períodos de transición entre épocas. En el caso de forrajes de corte o aquellos que son diferidos para su posterior utilización en las épocas de escasez de pasto, es necesario conocer cuál es su producción anual de biomasa comestible y su crecimiento estacional.

En relación con las evaluaciones de calidad de los recursos alimenticios a nivel de finca, existe diferencia entre el material ofrecido y el consumido por el animal. La magnitud de estas diferencias en pastoreo es función, principalmente, de la disponibilidad de forraje por animal. De acuerdo a las facilidades disponibles, se pueden realizar análisis de calidad del forraje en oferta o del seleccionado por los animales.

Las muestras del material ofrecido se pueden tomar simulando lo que consumen los animales en pastoreo. Para ello, se observa a los animales pastorear poniendo atención en lo que están seleccionando y, simultáneamente, se obtiene manualmente las muestras a analizar. Mendoza y Lazcano (1984) indican que este método puede sobreestimar el valor nutritivo de los forrajes de alta calidad y subestimar el de los de inferior calidad.

La composición botánica y calidad del forraje consumido se puede estimar también mediante la utilización de animales fistulados al esófago. La validez de los resultados depende del número y manejo que se de a estos animales, así como de la época en que se realizan los muestreos. Una de las limitantes en el empleo de esta técnica es la factibilidad de contar con animales fistulados, su cuidado a nivel de finca, familiarización con las áreas donde se llevarán a cabo las evaluaciones y facilidades para el transporte de las extrusas hasta el lugar de análisis. Información más detallada sobre este tópico puede encontrarse en el trabajo de Cohen (1979).

### c. Análisis de laboratorio

Los análisis de laboratorio que se recomiendan para la determinación del valor nutritivo de los diferentes recursos incluyen materia seca (MS), materia orgánica (MO), nitrógeno total (N), pared celular y digestibilidad *in vitro* de la MS (DIVMS), MO (DIVMO) o pared celular. De no ser posible realizar los análisis anteriores, se recomienda como mínimo la determinación de MS, N, DIVMS y pared celular. Aunque la expresión de  $N \times 6.25$  (PC) adolece de serias limitaciones (como asumir que todo el nitrógeno está en forma proteica), su uso generalizado hace que muchos técnicos y ganaderos entiendan mejor este concepto que el de nitrógeno total, aspecto que debe ser considerado al momento de confrontar resultados o alternativas con otros técnicos o productores.

Con respecto a los minerales, se recomienda el análisis de calcio y fósforo. Los otros elementos deberán determinarse cuando se sospeche de deficiencias o toxicidades en la región de interés.

La frecuencia con que se deben realizar estos análisis depende del grado de variación que se espere en el atributo determinado. Por ejemplo, se sabe que las mayores variaciones en DIVMS y PC en forrajes tropicales ocurren entre épocas y no tanto dentro de ellas. Lo anterior, aunado al costo alto de los análisis, constituyen la base para recomendar que se deben realizar sólo cuando existan condiciones de clima o manejo contrastantes

#### **d. Estimaciones de eficiencia**

Riesco y Seré (1984) definen eficiencia como la relación entre el efecto logrado y el esfuerzo o los recursos que se utilizaron para lograrlo. A medida que los recursos son más escasos, como en las fincas de pequeños y medianos productores, el concepto toma más importancia. A pesar de que en este documento se han enfatizado los aspectos relacionados con nutrición animal, no se debe olvidar el contexto total de la finca y el productor, ya que el maximizar la eficiencia en uno de sus componentes, no necesariamente implica lo mismo a nivel de la finca como un todo. Debe también ser considerado que la mayor eficiencia biológica no siempre coincide con la mayor eficiencia socio-económica.

En el estudio de las relaciones animal-forraje, se recomienda determinar la carga animal, la producción de carne por unidad de área, la producción de leche por área y la producción conjunta de carne y leche por unidad de área, según sea la orientación del sistema de producción bovina presente en la finca. Estas estimaciones deberán realizarse para cada época y/o año.

### **5. Descripción del sistema de manejo alimentario**

Una vez caracterizados los animales, los recursos alimenticios y las relaciones entre ellos, es importante caracterizar el manejo alimentario de la finca en términos del tipo de suplementos utilizados, su asignación a las diferentes categorías animales y las opiniones del productor con respecto a estos recursos.

Los suplementos se pueden categorizar en energéticos, proteicos y minerales. Es importante conocer la cantidad y frecuencia con que se suministran al ganado. En el caso de suplementos energéticos y proteicos, es necesario pesar la cantidad total ofrecida por animal y tomar muestras para la determinación de materia seca, digestibilidad y proteína. Es importante notar que se debe también pesar la cantidad rechazada para tener una estimación de la cantidad consumida. En situaciones donde se suplementan las vacas durante el

ordeño, es relativamente fácil obtener esta información; la situación se complica cuando se suplementa en grupo, o cuando se suplementa con heno o rastrojos de cosecha, que se tiran en el suelo para el consumo de todas las categorías de animales, haciendo imposible estimar la cantidad no consumida debido a la contaminación con heces y tierra y al pisoteo.

Es importante conocer también la asignación de los recursos alimentarios a las diferentes categorías animales a través del año. En algunos casos se pueden diferenciar pasturas, forrajes (caña de azúcar), o residuos de cosechas a ser utilizados durante la época seca. Es importante identificar y comprender las interacciones entre los componentes agrícola y pecuario a fin de que sean consideradas en el diseño de alternativas mejoradas de producción.

La elaboración de una encuesta o sondeo entre los productores, con el propósito de conocer sus opiniones acerca de las principales limitantes en la producción, manejo y asignación de recursos alimenticios es de gran relevancia. Esto permitirá definir adecuadamente las prioridades con que serán atacados los problemas a solucionar.

## **6. Pruebas de componentes en fincas**

### **a. Objetivo de estas pruebas**

Con estas pruebas se pueden determinar las adaptaciones que se de-

ben hacer a las tecnologías generadas con la investigación en componentes, conducida por el investigador en las estaciones experimentales o en fincas con muy poca participación por parte de los productores.

Es a este nivel donde se define el rendimiento o nivel de producción que se puede alcanzar, cuando la tecnología propuesta es manejada por el productor, una vez hechas las adaptaciones requeridas. También permiten evaluar la utilidad que pueden obtener los productores al implementar una o varias de las tecnologías propuestas.

La posibilidad de adopción de la tecnología por parte de los productores puede ser prevista en este momento, ya que estará en función de la aceptación y el impacto que produzca. El impacto es generalmente visto como aumentos en los beneficios económicos a través de aumentos directos en la productividad, pero también existen beneficios indirectos que deben considerarse como la estabilidad y sostenibilidad del sistema de producción.

### **b. Financiamiento**

En ocasiones un grupo de campesinos está dispuesto a colaborar con sus fincas para que en ellas se implementen pruebas en componentes, no porque estén convencidos del beneficio de ello, sino porque ven esto como una oportunidad para obtener ventajas económicas. Es por ello que no se recomienda que la financiación



total de la prueba recaiga completamente sobre el proyecto, pues podría suceder que al terminarse el aporte del proyecto (en dinero o especie), el productor no esté interesado en continuar colaborando. Por otro lado, es posible llegar a un tipo de arreglo, donde los técnicos ponen algo de los insumos y los productores hacen aportes de mano de obra, preparación del terreno, siembra de forrajes, etc. Caso especial son aquellas técnicas que requieran de muy largo plazo en su evaluación (como el efecto del reciclaje de nutrientes sobre la producción de pasto en un sistema silvopastoril), donde es justo que se llegue a un tipo de arreglo diferente con el campesino.

### c. Recolección de la información

Los técnicos, en colaboración con los productores, son los responsables de recolectar la información. Tan pronto como ésta se encuentre disponible es conveniente que se almacene en una forma que permita luego su procesamiento y análisis. La disponibilidad actual de microcomputadoras en varias instituciones y la utilización de hojas electrónicas ha facilitado enormemente el almacenamiento y manejo de datos, así como su posterior análisis estadístico.

### d. Análisis de la información

Las técnicas para la evaluación bio-económica de alternativas a nivel de finca han sido ampliamente discutidas por varios investigadores

(Avila, Henao, citados por Oñoro, 1989). De igual manera, Oñoro (1989), y Quiroz *et al.* (1989) han descrito los métodos estadísticos disponibles para el análisis de datos de investigación en sistemas. Ellos señalan la importancia de las técnicas de muestreo, análisis de regresiones, regresiones por pasos ("stepwise") y componentes principales, como herramientas que permiten la identificación de variables que pueden explicar el comportamiento de los parámetros de producción y productividad de la finca. Los ejemplos y estudios de caso presentados en estas publicaciones deben ser revisados por los investigadores que deban realizar este tipo de trabajos.

## 7. Referencias

- COHEN, R.D.H. 1979. Factors influencing the estimation of the nutritive value of the diet selected in the oesophagus. *Journal of Agricultural Science* 93:607.
- GIBSON, J.R.; FIELD, A.C.; WIENER, B. 1987. Concentrations of blood constituents in genetically high and low milk production lines of British Friesian and Jersey cattle around calving and in early lactation. *Animal Production* 44:183.
- GUZMAN, V.H. MORALES, G.A. 1980. Parámetros sanguíneos de

- vacas cebú bajo diferentes prácticas de manejo y producción: Perfiles metabólicos de secadera e hidraminios o vaca inflada. *In* Memorias IV Conferencia Mundial de Producción Animal. Ed. por L.S. Verde; A. Fernández. Buenos Aires, Argentina. Asociación Argentina de Producción Animal. p. 524.
- HERBEIN, J.; AIELLO, R.; ECKLER, L.; PEARSON, R.; AKERS, R. 1985. Glucagon, insulin, growth hormone and glucose concentrations in blood plasma of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 60:320.
- LOWMAN, B.G.; SCOTT, N.A.; SOMERVILLE, S.H. 1976. Condition scoring of cattle. The East of Scotland College of Agriculture, Bulletin No. 6. 31 p.
- McDOWELL, L.R.; CONRAD, J.H.; ELLIS, G.L.; LOOSLI, J.K. 1985. Minerals for grazing ruminant in tropical regions. Gainesville, Florida, EE.UU. Department of Animal Science, Centre for Tropical Agriculture y US Agency for International Development. 86 p.
- MENDOZA, P.; LASCANO, C. 1984. Mediciones en la pastura en ensayos de pastoreo. *In* Evaluación de pasturas con animales. Alternativas metodológicas. Ed. por C. LASCANO; E. PIZARRO. Cali, Colombia. Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales, CIAT. p. 143.
- NICHOLSON, M.J.; SAYERS, A.R. 1987. Repeatability, reproducibility and sequential use of condition scoring of *Bos indicus* cattle. *Tropical Animal Health and Production* 19:127.
- OETZEL, G.; BERGER, L.; HOFFMAN, W.; PARRET, D.; PARKER, A. 1988. Assessment of protein and energy status of ewes. *Nutritional Reports International* 37:1245.
- OÑORO, P. 1989. Evaluación bioeconómica de alternativas en fincas. *In* Informe de la VIII Reunión General de RISPAL. Ed. por M.E. Ruiz, A. Vargas. Guatemala, Guatemala. 17-21 de octubre de 1988. IICA-RISPAL, San José, Costa Rica. p 415.
- PALADINES, O. 1984. Mediciones de respuesta animal en ensayos de pastoreo: Ganancia de peso. *In* Evaluación de pasturas con animales: Alternativas metodológicas. Ed. por C. Lascano, E. Pizarro. Cali, Colombia. Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales, CIAT. p. 99.
- QUIROZ, R.; AMEZQUITA, MARIA CRISTINA; GUERRA, P.; QUIEL, J. 1989. Utilización de la información generada a través de la investigación en Sistemas de Producción Animal. Ed. por M.E. Ruiz, A. Vargas. Guatemala, Guatemala. 17-21 de octubre de 1988. IICA-RISPAL, San José, Costa Rica. p. 347.

- PERKINS, B.L.; SMITH, R.D.; SNIFFEN, C.J. 1985. Body condition scoring: A useful tool for dairy herd management. Dairy Management, Cooperative Extension. New York State, Cornell University. Fact Sheet: 150.00.
- RIESCO, A.; SERE, C. 1984. Análisis económico de resultados de las pruebas de pastoreo. *In* Evaluación de pasturas con animales: Alternativas metodológicas. Ed. por C. Lascano; E. Pizarro. Cali, Colombia. Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales, CIAT. p. 201.
- RIIS, P.; MADSEN, A. 1985. Thyroxine concentration and secretion rates in relation to pregnancy, lactation and energy balance in goats. *Indexes of Endocrinology* 107:421.
- ROWLANDS, G. 1980. A review of variations in the concentration of metabolites in the blood of beef and dairy cattle associated with physiology, nutrition and diseases, with particular reference to the interpretation of metabolic profiles. *World Review of Nutrition and Dietetics* 35:172.
- VACCARO DE, LUCIA. 1984. Mediciones de la respuesta animal en ensayos de pastoreo: Vacas lecheras y de doble propósito *In* Evaluación de pasturas con animales: Alternativas metodológicas. Ed. por C. Lascano; E. Pizarro. Cali, Colombia. Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales, CIAT. p. 127.

## DISCUSION DE LAS RECOMENDACIONES DEL GRUPO DE TRABAJO No.6

*Moderador: Dr. Roberto Quiroz*

### **D. PEZO**

Cuando el grupo habló de caracterizar el componente animal en términos del nivel de producción, se mencionó la necesidad de medir cambio de peso. Sin embargo, cuando se trabaja en fincas, son muy pocas las que tienen una balanza, donde puedan hacerse estas mediciones. ¿Se discutió la posibilidad de usar cintas morfométricas para predecir peso?

### **F. ROMERO**

Consideramos varias alternativas, y la que parece más atractiva, de acuerdo a la disponibilidad de recursos en las fincas, es el uso de las cintas. Pensamos sin embargo, que alguien tiene que empezar a calibrar estas cintas, porque las que hay disponibles fueron desarrolladas para otro tipo de animales en otras condiciones. Otra alternativa podría ser la observación visual. Existen personas dedicadas a la compra y venta de animales con muy buena experiencia en la estima-

ción visual del peso, que podrían ser contratados para que ayuden en ese sentido.

### **G. PICHARD**

Sí. El grupo consideró que debería investigarse esa posibilidad, la cinta morfométrica, los "body condition scores" que nos comentaba el Dr. Taylor y otras medidas de altura que pudiesen hacerse.

### **M.E. RUIZ**

Quiero añadir un comentario sobre el uso de la estimación visual del cambio de peso. La manera como se plantea es más o menos de la misma manera como se plantea la estimación de oferta forrajera; esto significa el establecer curvas para hacer las correcciones necesarias y el empleo de personas que están acostumbradas a hacer estimaciones visuales del peso de los animales. El uso de la cinta siempre va a presentar problemas, a menos

que tratemos con fincas con ganado bastante homogéneo racialmente.

Poco se mencionó en la presentación sobre el tipo de experimentos a realizarse a nivel de finca. Sé que es tarea difícil el discutir cómo hacer investigaciones de nutrición a nivel de finca en el tiempo que han tenido para ello. En la presentación me dió la impresión de que el grupo concluyó que, en la medida de lo posible, es preferible hacer investigación a nivel de finca que en estación experimental. Suena bien, pero a nivel de investigación en componentes pudiera tener sus limitantes. Voy a ilustrar un poco esto. He visto casos de experimentación en finca en que el experimento ha sido tan complicado y tan lleno de controles como los que se hacen en cualquier estación experimental. Por ejemplo, en el sur de Colombia hay experimentos en fincas pequeñas, donde se están evaluando medio centenar de variedades de frijol y al mismo tiempo varias combinaciones frijol-maíz. El arreglo de campo y el propósito del experimento son cosas que el productor no entiende. Más aún, él está prohibido, prácticamente, de participar en esta actividad; y esto es obvio, un experimento tan complicado requiere un control absoluto por parte del investigador. Entonces pienso que este tipo de experimento, en el que se trata de producir información básica, es preferible que se haga en estación experimental. Por supuesto, si las condiciones ecológicas, edafológicas, etc., de las fincas son muy diferentes a las de la estación, hay que hacerlo en fincas, aunque quizás sin complicar mucho

las cosas, ya que una de las ventajas de la investigación en finca es lograr la participación del productor. Si no se logra eso, se pierde una buena oportunidad para avanzar más rápido, no sólo en la generación de información sino también en la transferencia de los productos de esa investigación.

## **F. ROMERO**

En el grupo no entramos a discutir en detalle acerca de los tipos de experimento que se deben hacer o no en fincas. En cuanto a si la investigación debe hacerse preferentemente en fincas, quiero dejar en claro que no. Hay que reconocer que algunos trabajos deben hacerse en estación experimental, y otros se pueden hacer en fincas. Por supuesto, en el caso que las estaciones experimentales no sean representativas de las condiciones donde se espera hacer la extrapolación de resultados, la investigación se deben tratar de hacer en las fincas. También debemos tener claro que la investigación, dependiendo de sus objetivos, requiere de diferentes grados de control. Si la investigación requiere mucho control y se dispone de facilidades, preferiblemente hacerla en la estación experimental; si la investigación permite un menor control trataríamos de hacerla fuera de la estación.

## **D. GONZALEZ**

Me preocupa la idea de reevaluar las Tablas del NRC o cualquier otra. Si alguien por ahí aplica las normas del NRC y las reevalúa, y por otro lado alguien aplica las del ARC y las

reevalúa, y por allá alguien aplica las francesas y también las reevalúa, creo que quedaríamos en la misma situación, siempre estarían privando criterios diferentes. Tampoco es posible crear nuestras propias tablas por las limitaciones que todos conocemos. Tenemos que tomar una decisión sobre cuáles tablas adoptar, porque no podemos ni adoptar todas ni reevaluar todas.

Me dio la impresión que el grupo tendió a enfocar la problemática de la investigación en fincas hacia el pequeño productor. ¿No consideraron el posible papel del productor grande en la investigación en fincas?

### **G. PICHARD**

Respecto al uso de tablas de requisitos nutricionales, no pretendemos su reevaluación ni que se vayan a calcular nuevamente los requisitos. Lo que hicimos fue un llamado a que sólo se consideren como marco de referencia, y a tener una actitud extremadamente crítica respecto a los valores que en ellas se señalan. Es sabido que todas las tablas contienen márgenes de seguridad, que son elaboradas con animales en condiciones de alimentación de normal a muy buena y que, en general, fueron diseñadas en países en los cuales los niveles de producción son elevados y donde los animales no están sometidos a situaciones de estrés (pérdida de peso durante el período seco, limitaciones de agua, largas caminatas diarias para obtener 200 gramos de materia seca, etc.). El punto es que como nutricionistas, cuando

estemos revisando los sistemas de producción, especialmente en ecosistemas muy marginales, debemos ser muy críticos en el uso e interpretación de estas tablas.

Hay cosas que podemos hacer en la finca del pequeño productor y que, cuando se hagan, debemos asegurar las probabilidades de obtener resultados acordes con el objetivo del experimento. Si eso se puede lograr en la finca del productor, sugerimos hacerlo ahí en la medida de lo posible. Esto es válido especialmente en el caso de los forrajes, porque hay una gran variedad de microclimas y de suelos en las zonas marginales donde los pequeños productores se encuentran. Ahora, con experimentos más complejos, como tasa de crecimiento que requiere de cortes cada siete días, hemos buscado a productores grandes, insertos dentro de las comunidades de los pequeños productores, y han sido ellos quienes nos han dado facilidades de maquinaria y de energía eléctrica para poder operar estufas y cosas de ese tipo, que son justamente lo que nos permite hacer esa clase de investigaciones. Reconocemos en los productores grandes una ayuda muy importante, cuando ellos están en zonas que, desde el punto de vista agroecológico, son comparables a las del pequeño productor.

### **O. ROSERO**

En el caso específico de la nutrición mineral, hay ocasiones en que es imprescindible el diagnóstico de determinadas regiones donde se sospe-

cha la carencia o toxicidad de cualquier elemento traza. Ese experimento obligatoriamente tendríamos que hacerlo a nivel de fincas. Por otro lado, hay también estudios más sofisticados, como el chequeo de los requisitos de fósforo, que obligatoriamente tendríamos que hacerlo a nivel de estación experimental con animales homogéneos, uso de radioisótopos, balances metabólicos, etc.

### **G. PICHARD**

En el grupo se consideró que hay distintos niveles de participación del productor en esta relación con el investigador. Y es posible, como decía el Dr. Rosero, que el único contacto con el productor sea la visita para obtener una muestra, en lo que es trabajo de prospección, y eso sería un extremo del trabajo en finca con la mínima participación del productor. Pero de ahí vamos a la experimentación con plena participación del productor, existiendo todo un espectro intermedio.

### **M. E. RUIZ**

Quiero insistir en que cuando se trata de hacer experimentos en fincas, en los que tengan que aplicarse puntillosamente normas de alimentación, de digestibilidad y muchos otros deta-

lles de tipo metodológico, lo más probable es que en la mayoría de los casos no se pueda realizar el trabajo; y si se hiciera, se estaría llegando a un punto en que la diferencia entre las condiciones que debe reunir el experimento a nivel de productor, poco se van a diferenciar de las condiciones que reúne en una estación experimental.

Viendo todo el proceso de investigación en producción animal, pongo a consideración del grupo lo siguiente. A medida que uno se acerca al desarrollo de una recomendación final (una tecnología, subsistema o un sistema), mayor será la importancia de la participación del productor, o sea, se va tornando más importante el realizar el experimento a nivel de finca. Por el contrario, en la medida que se requiera desarrollar datos muy básicos, más importante va a ser el que esa investigación se haga en la estación, donde se puede ejercer mucho más control. En ese sentido, quizás no me estaría preocupando tanto de evaluar los requisitos utilizando las fincas. En éstas me preocuparía más de evaluar las relaciones de causa-efecto, a relaciones de insumo-producto, pero yendo a la finca con una proposición. En otras palabras, estoy planteando que a nivel de finca más bien se hagan experimentos de comprobación y no de generación de información básica.





La Red de Investigación en Sistemas de Producción Animal de Latinoamérica (RISPAL) tiene como objetivo principal el apoyo a las instituciones, proyectos e investigadores miembros en el desarrollo de metodologías de investigación agropecuaria con enfoque de sistemas. Se creó con base en tres Convenios del Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID) con el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) y el Instituto Nacional de Investigación Agrícola y Agroindustrial (INIAA).

La Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA) es una corporación sin fines de lucro, creada con el objetivo de estimular la investigación, el estudio y la enseñanza de la producción animal, orientados al desarrollo pecuario de la América Latina. Para ello, ALPA y sus asociaciones filiales promueven el intercambio de información entre sus socios y de éstos con la comunidad científica en general; además, coopera en la promoción de ideas, esfuerzos y grupos organizados afines con sus postulados.



RISPAL



ALPA