

**EVALUACION COMPARATIVA DE LA TÉCNICA DE N-ALCANOS PARA
ESTIMAR EL CONSUMO Y DIGESTIBILIDAD DE NUTRIENTES EN FORRAJES
TEMPLADOS Y TROPICALES.**

Tesis que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Área de Nutrición Animal: Forrajes

Presenta:

M.C. Sergio Rosalío López Hernández

Director de la Tesis:

Dr. Enrique Gilberto Álvarez Almora

Dra. Noemí Guadalupe Torrentera Olivera

Dr. Martín Francisco Montaña Gómez

Dr. José Fernando Calderón Cortéz

Dr. Adolfo Pérez Márquez

Diciembre 20, 2012.

Mexicali, Baja California, México.

RESUMEN

Se condujo un experimento para evaluar los diferentes métodos de estimación del consumo de materia seca (CMS), producción fecal (PFMS) y digestibilidad (DMS) en novillos bajo condiciones de confinamiento. Este experimento fue un estudio de digestión conducido con animales en confinamiento, con el objetivo de evaluar la exactitud de las estimaciones del CMS, PFMS y DMS por medio de óxido crómico (Cr_2O_3) y alcanos, dosificados a novillos. Cuatro novillos Holstein-Brahman ($259 \text{ kg} \pm 6.6 \text{ kg}$) fueron alojados en corraletas individuales con acceso a agua y sales minerales. Las dietas diarias de henos de Bermuda y Ballico anual y sus combinaciones fueron proporcionadas en dos porciones iguales a las 0700 y 1900 h. Siete días antes del periodo de colección los novillos fueron dosificados oralmente con Cr_2O_3 y alcano C_{32} en cápsulas de gelatina. Durante el periodo de colección fecal, todas las heces se recolectaron en cajas de plástico cada 3 horas y una muestra del 5% se tomó de cada caja después de haberse mezclado completamente. También se tomaron muestras del recto a intervalos de tres horas para monitorear la variación diaria del óxido crómico. Todas las muestras de heces se colocaron en bolsas de plástico y se congelaron (-18°C) hasta su posterior análisis de laboratorio. Las muestras de las dietas de heno representativas de cada servida se colectaron en bolsas de plástico y almacenadas a temperatura ambiente hasta su análisis. Las determinaciones analíticas incluyeron MS, cenizas, PC, FDN, FDA, LDA, Cr_2O_3 y alcanos. Los datos fueron analizados usando el procedimiento GLM de SAS. Los datos actuales de CMS, PFMS y DMS fueron 5.16 kg/d , 2.34 kg/d y 54.6% , respectivamente. No se encontró diferencia en la tasa de recuperación de los alcanos, durante el periodo de colección de 4 días. Similarmente, el CMS, PFMS y DMS actuales no difirieron ($P > 0.161$) de los valores estimados cuando se usó al alcano C_{32} como marcador externo. Sin embargo, los valores estimados tuvieron que ser ajustados por la tasa de recuperación del marcador. El uso de las muestras compuestas a través del periodo de colección de 4 días brindó las estimaciones más confiables del PFMS y el CMS, sin considerar el tipo de muestra (colección total o muestreo a intervalos) usado en los cálculos.

ABSTRACT

An experiment was conducted to evaluate different methods of estimating forage dry matter intake (DMI), fecal output (DMFO) and digestibility (DMD) in beef steers under indoor conditions. This experiment was a digestion trial conducted with confined animals at the Agricultural Sciences Institute with the objective to evaluate the accuracy of the concurrent estimates of dry matter intake (DMI), fecal output (DMFO), and digestibility (DMD) by means of chromic oxide (Cr_2O_3), and alkanes dosed to beef steers. Four Holstein-Brahman crossbred steers (avg. BW 259 kg \pm 6.6 kg) were allotted to individual pens with access to water and mineral blocks. Daily diets of Bermuda grass and Ryegrass hays were fed at 2.1% BW, as-fed basis, and were supplied in two equal portions at 0700 and 1900. Seven days before the beginning of the collection period, the steers were dosed orally with Cr_2O_3 , and alkane C_{32} in gelatin capsules. During the fecal collection period, total feces were collected in plastic cages every 3 hours and a 5% sample was taken from each cage after thoroughly mixing of the feces. Rectal grab samples were also taken at intervals of three hours to monitoring diurnal variation of chromic oxide. All the fecal samples were placed in plastic bags and kept frozen (-18 °C) pending laboratory analysis. Hay samples representative of each meal were collected in plastic bags and stored at room temperature until analysis. Analytical determinations included DM, ash, CP, NDF, ADF, ADL, Cr_2O_3 , and alkanes. Data were analyzed using the GLM procedure of SAS. Actual DMI, DMFO, and DMD were 5.16 kg/d, 2.34 kg/d, and 54.6%, respectively. No difference was found in the RR of either alkanes or Cr_2O_3 , during the 4-d collection period. Likewise, actual DMI, DMFO, and DMD were not different ($P \geq 0.161$) from the estimated values when using the alkanes C_{32} as external markers. However, estimated values had to be adjusted for the RR of the marker. The use of the pooled samples across the 4-d collection period gave the most reliable estimates of DMFO and DMI, regardless the kind of sample (total collection, or grab) used in the calculations.

Key words: intake, digestibility, steers, n-alkanes.

DEDICATORIA:

A MI FAMILIA,

DONDE QUIERA QUE ESTÉ.

SIEMPRE A MI LADO.

TABLA DE CONTENIDOS

TITULO	i
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
DEDICATORIA	iv
TABLA DE CONTENIDOS	v
LISTA DE TABLAS	vi
CAPITULO I.	1
Introducción.	1
Objetivos.	2
CAPITULO II.	3
Revisión de Literatura.	3
Consumo de materia seca y digestibilidad en la evaluación de alimentos	3
Métodos para estimar el consumo de alimento	6
El ensayo de digestión convencional en confinamiento	7
Diferencias en la masa de forraje	8
Diferencias en la masa del animal	9
Comportamiento en pastoreo	9
Recambio de agua	10
Estimaciones empíricas	11
Técnicas con marcadores	12
Métodos de dosificación de los marcadores	16
Capsulas de liberación prolongada	17
Óxido crómico como marcador en estudios de digestión.	19
El uso de n-alcanos como marcadores nutricionales	23
CAPITULO III.	28
Estimación del consumo y la digestibilidad a través del óxido crómico y la técnica de n-alcanos en novillos Holstein-Brahman en confinamiento.	28
Introducción	28
Material y Métodos	29

Animales y dietas	29
Procedimientos de laboratorio	29
Variables medidas y estimadas	29
Análisis estadístico	33
Resultados y Discusión	35
Contenido de alcanos en el heno y las heces	35
Tasas de recuperación de los marcadores	36
Producción fecal, consumo y digestibilidad de la materia seca	38
Implicaciones / conclusiones	40
Literatura citada	41
CAPITULO IV.	
Discusión General e Implicaciones.	
CAPITULO V.	
Literatura Citada	
Apéndices	

CAPÍTULO I.

Introducción

Programas de mejoramiento de plantas y animales, cálculo de la dieta y los índices de calidad del forraje son sólo algunos ejemplos, dentro de las ciencias agropecuarias, en los que la masa de forraje, el consumo de materia seca (CMS) y la digestibilidad de la materia seca (DMS) son requisitos básicos. Por otro lado, el CMS y la DMS probablemente representan las estimaciones más importantes y útiles del valor nutritivo y la calidad de la producción animal, cuando esta no se puede determinar. Por desgracia, en los ensayos de pastoreo la masa de forraje es difícil de medir, debido a que el cultivo no se puede cosechar sin afectar el rendimiento del animal y los pastos. Del mismo modo, el consumo de alimento real y el valor nutritivo de los forrajes consumidos son también desconocidos.

En un ensayo de digestión en confinamiento convencional, tanto el CMS y la producción de materia seca fecal (PMSF) se puede medir directamente y los coeficientes aparentes de digestión son fáciles de calcular. Sin embargo, la recogida fecal total no siempre es posible, y en ensayos de pastoreo, por ejemplo, ni el consumo animal ni la digestibilidad del forraje consumido se puede medir directamente. En estas condiciones, el uso de marcadores representa el método más ampliamente aceptado para calcular el consumo voluntario de alimentos en los animales y la digestibilidad del forraje (Van Soest, 1994). Los marcadores nutricionales han sido clasificados como internos o externos, dependiendo de la ocurrencia natural de la sustancia en el alimento (Kotb y Luckey, 1972). Ejemplos de marcadores internos son algunos cromógenos, silicatos, ceniza insoluble en ácido, lignina y alcanos de cadena impar. Los marcadores externos incluyen perlas de vidrio, carbón, tierras raras, óxidos metálicos e incluso alcanos de cadena larga (Marais, 2000). Las cápsulas de gelatina, papel, fracciones de fibra y otras sustancias se han utilizado como vehículos para los marcadores en los ensayos de digestión con el ganado, pero recientemente, el uso de cápsulas intraruminales de liberación controlada (CLC) se ha convertido en un método popular

para dosificar óxido crómico y alcanos. Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron:

1. Determinar la tasa de recuperación de óxido de cromo y alcanos de cadena larga a partir de cápsulas de gelatina administradas a novillos alimentados con heno de bermuda y ballico anual.
2. Evaluar la exactitud de las estimaciones concurrentes de consumo de materia seca, la producción de heces y la digestibilidad en un ensayo de digestión en confinamiento.
3. Evaluar el uso de la técnica de n-alcanos para estimar la producción de materia seca fecal y la ingesta de forraje de novillos Holstein-Brahman pastando una pradera de Bermuda y Ballico anual.

CAPITULO II.

El consumo de materia seca y digestibilidad en la evaluación de alimentos.

El valor nutritivo y la calidad del forraje son términos usados con frecuencia en la literatura para la evaluación de ingredientes alimenticios. Sin embargo, la definición precisa de los términos ha variado en la literatura científica y en algunas ocasiones se han sustituido unos con otros. Por ejemplo, Mott y Moore (1985) consideran que la calidad del forraje está en función del valor nutritivo y el consumo voluntario. En este esquema, el valor nutritivo del forraje depende de su composición química, su digestibilidad y la naturaleza de los productos digeridos, mientras que el consumo voluntario es una expresión de la accesibilidad del forraje, la aceptabilidad y su tiempo de retención promedio. Para ellos (Mott y Moore, 1985), la calidad del forraje, el potencial genético del animal y los suplementos alimenticios, así como los factores ambientales, pueden determinar la producción de cada animal en condiciones de pastoreo.

De acuerdo a Buxton y Mertens (1995), la calidad del forraje es una función de la concentración de nutrientes del forraje, su consumo o tasa de consumo, la digestibilidad del forraje consumido y la partición de los productos dentro del animal. Así, la calidad del forraje puede ser expresada como el desempeño relativo cuando los animales consumen forraje *ad libitum* y generalmente es estimada por medios químicos o *in vitro* debido a las limitaciones en costo y tiempo de usar ensayos con animales (Van Soest, 1994).

En otros esquemas (Beever *et al.*, 2000), el valor nutritivo del forraje es definido como su capacidad para promover la producción. Se considera que el valor nutritivo tiene tres componentes principales: la cantidad de forraje que el animal debe comer (consumo voluntario), la concentración de nutrientes en el forraje (contenido de nutrientes) y la capacidad del animal para absorber y utilizar los nutrientes (disponibilidad de nutrientes). La disponibilidad de nutrientes depende principalmente de la digestibilidad del forraje. El valor nutritivo de un

alimento es una forma de expresar su capacidad para proveer los nutrientes requeridos para las funciones animales, tales como mantenimiento, crecimiento, preñez y producción de leche.

Cuando la producción animal no puede ser medida, el consumo voluntario y la digestibilidad de la materia seca (DMS) son las estimaciones más útiles de la calidad del forraje (Sollenberger y Cherney, 1995). Buxton y Martens (1995) estimaron que de la variación total en el consumo de energía animal proveniente de diferentes tipos de forrajes, aproximadamente el 65-75% puede ser relacionado al consumo, 20-30% a diferencias en la digestibilidad y solamente 5-15% a diferencias en la eficiencia metabólica. Basados en estas características, varios índices han sido propuestos para estimar la calidad relativa de los forrajes, entre otros, el índice de calidad del forraje, el índice de valor alimenticio relativo y el índice de calidad del forraje relativo (Moore y Undersander, 2002).

La digestibilidad se refiere a la porción de un ingrediente dado o dieta en el cual su proceso de desaparición está involucrado en la valoración del valor nutritivo (Merchen, 1998). En un estudio de digestión convencional, tanto el consumo como la producción fecal pueden ser medidos con precisión y los coeficientes de digestión pueden calcularse no solamente para la materia seca, sino también para otros componentes si el contenido de estos puede ser determinado en la dieta y en las heces (Schneider y Flatt, 1975). Cuando la digestibilidad es determinada por la simple diferencia entre la MS consumida y la MS excretada, el término se refiere a la digestibilidad aparente *in vivo* (Merchen, 1988; Rymer, 2000) y puede ser calculada por la fórmula:

$$DAMS = [(CMS - PFMS) / CMS] \times 100$$

... donde:

DAMS = Digestibilidad Aparente de la Materia Seca (%)

CMS = Consumo de Materia Seca (g/d base MS)

PFMS = Producción Fecal de Materia Seca (g/d base MS)

...cuando se hacen correcciones para los componentes metabólicos (microbianos y endógenos) en las heces, el término se refiere a la digestibilidad verdadera, calculada por:

$$DVMS = \{[CMS - (PFMS - PM)] / CMS\} \times 100$$

... donde:

DVMS = Digestibilidad Verdadera de la Materia Seca (%)

PM = Productos Metabólicos (MS, g/d)

Para los componentes fibrosos de la dieta, las digestibilidades aparente y verdadera son casi la misma debido a que los componentes metabólicos están casi libres de material fibroso. Pero para otros nutrientes tales como algunos minerales, extracto etéreo y especialmente proteína, la digestibilidad aparente subestima la digestibilidad verdadera debido a la presencia de compuestos nitrogenados encontrados en la dieta, ajenos a la dieta (Van Soest, 1994).

El consumo voluntario de alimento, por otro lado, se refiere a la cantidad total de MS ingerida por un animal dentro de un periodo de tiempo cuando la disponibilidad no es una limitante (Forbes, 1995). En estudios bajo condiciones de confinamiento, la mayoría de los investigadores han cumplido con esto proporcionando un 10-15% más del alimento que el animal consumió el día anterior. Algunos otros ofrecen alimento de manera tal que siempre haya el mismo sobrante para cada animal (Minson, 1981). Bajo condiciones de pastoreo, parece haber una relación cuadrática y asintótica entre la disponibilidad de forraje y el CMS en animales sanos (Blaser, 1986; Dougherty y Collins, 2003). Debido a la importancia del consumo voluntario sobre el desempeño del animal, se ha observado una relación cuadrática similar por Schlegel *et al.* (2000) entre la disponibilidad de forraje y la ganancia diaria promedio de novillos.

Se ha demostrado que la digestibilidad de la dieta y el consumo voluntario están asociados en un arreglo positivo hasta un punto en la DMS y negativamente más allá de ese punto (Conrad *et al.*, 1964; Kahn y Spedding, 1984). Este tipo de

observaciones da soporte a la teoría de que los factores físicos limitan el CMS en dietas de baja calidad, tales como los forrajes, mientras que los mecanismos metabólicos o fisiológicos controlan el CMS cuando dietas de alta calidad, tales como los concentrados, son ofrecidas a los animales rumiantes (Forbes, 1995). Conrad (1966) reportó que, cuando se hicieron ajustes para el peso corporal y la producción fecal, el CMS se correlacionó positivamente con el coeficiente de digestión de la MS por debajo de un valor de 67% y se relacionó negativamente después de este valor para vacas lecheras de producción moderada. Él también estableció que este valor no es estático y puede cambiar bajo diferentes condiciones. En general, a mayores requerimientos de energía, mayor será el coeficiente de digestión por encima del cual el consumo sea controlado por mecanismos fisiológicos o metabólicos. Sin embargo, bajo condiciones de pastoreo hay muchos otros factores que afectan el consumo, y el animal debe ser capaz de compensar no solamente los cambios en el valor nutritivo del forraje, sino también los cambios en la biomasa y estructura de las pasturas (Prache y Peyraud, 2001). El consumo también puede ser afectado por factores tales como aquellos relacionados con las actividades sociales, las condiciones climáticas y probablemente diferentes niveles de contaminación (Young, 1988).

Métodos para estimar el consumo de alimento.

La cantidad diaria de MS consumida por un animal es una medición crítica para hacer inferencias nutricionales sobre los alimentos, estrategias de alimentación y las respuestas subsecuentes del animal (Burns *et al.*, 1994). Una determinación exacta del CMS, usualmente acoplada con una estimación de la DMS, provee las bases para las aplicaciones de la formulación de raciones, predicciones del desempeño animal, comparaciones en la eficiencia de uso del alimento por los animales y el valor nutritivo del forraje. Aunque el consumo es más importante que la digestibilidad en evaluar la calidad del forraje, el progreso en el entendimiento de los factores básicos que afectan el consumo ha sido detenido por nuestra incapacidad para medirlo con exactitud y para separar las

influencias del animal y la dieta sobre el consumo bajo condiciones de pastoreo (Mertens, 1994). Todos los métodos usados comúnmente para estimar el CMS tienen ventajas y desventajas únicas con un error asociado que varía en magnitud (Burns, 1994). En general, estos métodos pueden ser clasificados como directos e indirectos, pero es importante recordar que la única técnica que permite la cuantificación del alimento ingerido por el animal es el ensayo de digestión, como se describe en la próxima sección.

El estudio de digestión convencional en confinamiento.

Los estudios en pastoreo que cuantifican el desempeño animal son el mejor método para medir la calidad del forraje, pero lo arduo del esfuerzo, el tiempo y dinero invertido, limitan su uso. Alternativamente, la calidad del forraje puede ser estimada al determinar el consumo de forraje y la digestibilidad usando animales confinados o métodos de laboratorio (Van Soest, 1994). La meta en un estudio convencional de digestión es medir con exactitud la cantidad de alimento consumido y de heces excretadas por un periodo dado de tiempo. El procedimiento ha sido descrito a detalle por Schneider y Flatt (1975) y puede resumirse de la siguiente manera:

En un estudio de digestión convencional, los animales experimentales son alimentados con las dietas a probar por un periodo preliminar de al menos 10 días para permitir que los residuos de alimentos consumidos previamente al estudio hayan sido eliminados del TGI. Se establecen niveles consistentes de consumo y otras estrategias de alimentación durante el periodo preliminar para ayudar a evitar fluctuaciones drásticas en la excreción. El periodo preliminar es seguido por un periodo de colección de 5 a 10 días. Las heces (y orina, si se desean datos sobre el balance de nutrientes) son colectadas a diario y se preparan muestras compuestas, representativas del total del periodo de colección, para el análisis de laboratorio. Las heces y la orina, en estudios de balance de nutrientes, pueden ser colectadas alojando a los animales en corraletas o jaulas diseñadas para este

propósito. Las heces pueden también ser colectadas en bolsas especiales sujetas a un arnés a los animales experimentales. El consumo de materia seca es medido entonces como la diferencia entre la MS ofrecida y la MS rechazada. La DAMS puede también ser calculada por la fórmula convencional:

$$\text{DAMS} = [(\text{CMS} - \text{PFMS}) / \text{CMS}] \times 100$$

Diferencias en la biomasa de forraje.

Los métodos para estimar el consumo de forraje están basados en los mismos principios del estudio de digestión convencional donde el consumo es medido por una diferencia: consumo de forraje = forraje ofrecido – forraje rechazado. La biomasa de forraje es estimada al inicio y al final del periodo de pastoreo. La diferencia da una estimación de la cantidad aparente de forraje consumido por unidad de área. El consumo calculado por unidad de área es dividido luego por el número de animales y los días por unidad de área, de manera que se pueda obtener un estimación del consumo por animal por día (Meijs, 1982).

Este método, conocido técnicamente como la tasa de desaparición de forraje, tiene varias limitaciones (Burns, 1994). En primer lugar, se asume que la declinación en la biomasa de forraje se debe por completo al consumo por los animales experimentales y generalmente causa una sobre-estimación debido a que el forraje puede desaparecer por otras razones, tales como el pisoteo, el consumo por otros herbívoros y los procesos naturales de la planta (madurez, muerte y descomposición). En segundo lugar, el crecimiento de la planta puede ser considerable durante el periodo de pastoreo. Este problema en la acumulación de forraje es especialmente cuando el periodo de pastoreo es mayor de 2 a 3 días y requiere el uso de jaulas de exclusión cuando el método de pastoreo es continuo. En tercer lugar, y probablemente la limitación más seria de este método es el muestreo intensivo requerido para proveer una estimación adecuada de la masa de forraje combinada con el problema que diferentes técnicas pueden rendir diferentes estimaciones del rendimiento de MS.

Diferencias en el peso del animal.

El pesar los animales para estimar el consumo por periodos cortos de tiempo fue sugerido desde los 1930's (Le Du y Penning, 1982). Para usar este método, los animales son provistos con arneses y bolsas para la colección de heces y un contenedor para la colección de orina. Los animales son pesados y devueltos al pastoreo y se mide cualquier consumo de agua. Después del pastoreo, los animales son pesados de nuevo y la producción de heces y de orina son medidas, así como las pérdidas insensibles en otros animales. Esto tiene limitaciones obvias en la mayoría de las condiciones de pastoreo pero ha sido usado con éxito cuando el comportamiento ingestivo es de interés y los periodos de pastoreo tienen una duración limitada (Burns et al., 1994). Una modificación reciente de este método, llamado el sistema de telemetría para el pesaje del animal, ha sido descrita por Horn (1981). Esta técnica está basada en el uso de transductores de presión sujetos a la base de las pezuñas de los animales en estudio y requiere equipo especial y paquetes computacionales, pero ofrece un gran potencial en estudios de comportamiento animal (Penning y Hooper, 1985).

Comportamiento en pastoreo.

Otro enfoque, para estimar el consumo voluntario de alimento, especialmente útil bajo condiciones de pastoreo, es a través del monitoreo del comportamiento en pastoreo de los animales por el modelo mecánico desarrollado por Hodgson (1982). Con este enfoque, el consumo diario de forraje por el animal en pastoreo (CF) puede ser visto como el producto de tres variables: el tiempo de pastoreo (TP), la tasa de mordiscos durante el pastoreo (TM) y el consumo de forraje por mordisco (CM): $CF = [TP \times TM \times CM]$.

Dos variables adicionales pueden ser calculada por este método: a) el número de mordiscos por día como el producto de TP y TM y b) la tasa de

consumo de forraje, el producto de TM y CM. De acuerdo a este modelo, la variable más importante y que afecta el consumo parece ser el tamaño del mordisco, el cual depende a su vez del volumen por mordisco (capacidad de la boca) y la densidad del forraje consumido, una característica propia de la estructura de la pastura. Algunos autores han mostrado que el animal tiene la capacidad de modificar, hasta cierto grado, el tiempo de pastoreo y la tasa de mordisco para compensar por las deficiencias en el consumo por mordisco (Sollenberger y Burns, 2001).

Este modelo parece ser adecuado para explicar la mecánica del pastoreo, pero la medición exacta de las variables involucradas representa una limitación seria para el uso de este método en la determinación del consumo voluntario. Sin embargo, avances recientes incluyen el uso de un medidor modificado de las masticaciones, originalmente propuesto por Penning (1983). Este dispositivo ha sido usado con animales en pastoreo y provee mediciones del tiempo total de pastoreo, de rumia, de descanso, número de bolos rumiados, movimiento de mandíbulas total y el número de bocados de consumo. Las masticaciones para comer pueden ser calculadas por diferencia entre el movimiento de mandíbulas total y el número de bocados de consumo más las masticaciones de rumia (Burns *et al.*, 1994).

El recambio de agua.

Este método involucra la inyección de agua tritiada a un número de animales en ayunas, los cuales son mantenidos sin agua antes de ser liberados en la pastura (Le Du y Penning, 1982). Se toman muestras de sangre subsecuentes para medir el decremento en radioactividad y su medición está relacionada al volumen de agua total del animal. Se toman también muestras de forraje para determinar su contenido de agua y se asume entonces que el agua del animal viene del forraje. Aparentemente, este es un método poco común para estimar el CMS.

Estimaciones empíricas.

Hay al menos dos enfoques para estimar el CMS de los animales domésticos a través del uso de cálculos empíricos. El primero es el uso de ecuaciones matemáticas ya desarrolladas y disponibles en la literatura. Ejemplos de estas son las ecuaciones de predicción para peces, cerdos, aves, ganado lechero, ganado de carne y ovino desarrolladas por el National Research Council (NRC, 1987) en los Estados Unidos de Norteamérica. Algunas de estas ecuaciones pueden haber sido modificadas recientemente con las modificaciones incluidas en la última edición de los requerimientos de nutrientes de las especies de mayor interés tales como el ganado de carne (NRC, 1996) y el ganado lechero (NRC, 2001). La versión Británica de las ecuaciones es proporcionada por el AFRC (1993). Otros países tienen manuales sobre estos tópicos y hay guías de alimentación que proveen información sobre la mayoría de los animales domésticos.

El segundo enfoque de estas estimaciones empíricas del CMS se refiere al cálculo en reversa de los requerimientos de energía del animal (Baker, 1982). Esto es, el consumo de forraje (CF) es calculado de los requerimientos de energía para mantenimiento (ENm) y la producción de los animales (PA) y los requerimientos totales son equiparados con los de una concentración energética del forraje dada (EF), por la fórmula: $CF = (ENm + PA) / EF$. Este método es atractivo debido a que en la forma más simple, sólo se requiere pesar el producto animal, conservar los registros y los cálculos involucrados. La precisión de la estimación depende por completo de lo adecuado de los estándares de energía y la capacidad para medir la producción animal con exactitud (Baker, 1982). Las estimaciones empíricas pueden ser la manera más común de estimar el CMS en empresas comerciales de producción animal, pero Burns (1994) mencionó que generalmente estas mediciones proveen pocos indicios sobre la biología básica del consumo animal y su entendimiento.

Técnicas con marcadores.

En condiciones de pastoreo, la cantidad de forraje consumido es la principal determinante de la producción de los herbívoros y todavía es uno de los aspectos más difíciles de medir o predecir de la calidad del forraje. Un método que estime adecuadamente el CMS de los animales en pastoreo sigue siendo esencial para utilizar al máximo el valor de los pastos sigue investigándose aunque continua eludiéndonos (Mertens, 1994). Bajo estas condiciones, el uso de algunas sustancias inertes de referencia, conocidas como marcadores, representa el método más ampliamente aceptado para estimar tanto el consumo voluntario de alimento como la digestibilidad del forraje (Van Soest, 1994).

El marcador, indicador, trazador o sustancia de referencia son términos aplicados por los investigadores en nutrición y fisiología a un número de materiales utilizados en las estimaciones cualitativas o cuantitativas de los fenómenos fisiológicos y nutricionales (Kotb y Luckey, 1972). Los marcadores nutricionales son empleados no sólo para las estimaciones de producción fecal, consumo y digestibilidad, sino también la partición de la digestión en varios segmentos del tracto digestivo y para estimar el flujo de la digesta y el tiempo de retención también (Faichney, 1993). Kotb y Luckey (1972) establecieron que para que una sustancia calificara como un marcador en estudios nutricionales deberá: ser inerte y sin efectos fisiológicos o psicológicos; no ser absorbible ni metabolizable dentro del TGI; ser completamente recuperable de alimentos crudos o procesados; no tener un volumen apreciable; mezclarse íntimamente con el alimento de la dieta; distribuirse uniformemente en la digesta; no tener influencias sobre secreción, digestión, absorción o excreción alimentaria, motilidad normal del TGI; no influir sobre la microflora del TGI; tener cualidades que permitan mediciones rápidas y cuantitativas precisas y, tener cualidades físicas y químicas que lo hagan discernible a través del proceso digestivo.

Varios investigadores (Ellis *et al.*, 1980; Owens y Hanson, 1992; Marais, 2000) aceptan que no hay un marcador que cumpla con todas estas características, pero la completa recuperación fecal y la facilidad de medición han sido las características de mayor interés en la búsqueda del marcador nutricional ideal. Ellos han hecho también una amplia clasificación de estas sustancias como marcadores internos y externos. Los marcadores internos son materiales indigestibles que ocurren naturalmente en los alimentos y los marcadores externos son materiales que deben ser añadidos a la dieta o administrados al animal. Usualmente, la DMS es estimada con marcadores internos como la lignina, ceniza insoluble en ácido, FDA indigestible o alcanos de cadena impar, mientras que los marcadores externos tales como los óxidos metálicos, tierras raras y alcanos de cadena par son preferidos para la estimación de la producción fecal de MS (Marais, 2000). En su revisión, Merchen (1988) presenta tres escenarios en los cuales los marcadores nutricionales son considerados útiles:

- A. Cuando el consumo de alimento es conocido, pero no puede realizarse la colección fecal total. En este caso, los marcadores internos o externos pueden ser usados. Los animales son alimentados con dietas conteniendo el marcador o son dosificados oralmente con el marcador a intervalos regulares. Muestras de heces son tomadas conforme son excretadas o directamente del recto. Las muestras fecales deben ser tomadas a intervalos regulares, los cuales son definidos en relación al horario de alimentación o dosificación del marcador para evitar sesgos causados por las variaciones diurnas en la excreción del marcador. Las muestras fecales son luego analizadas para determinar la sustancia marcadora y la producción fecal es calculada por:

PFMS = dosificación diaria del marcador (g/d) / concentración del marcador en heces (g/g MS).

Los coeficientes de digestión pueden ser calculados con la fórmula:

$$DAMS = [(CMS - PFMS) / CMS] \times 100$$

Cuando el marcador no se recupera por completo en heces, la ecuación tiene ser ajustada por la tasa de recuperación (TR), la cual es calculada por:

$$TR = \text{cantidad del marcador en heces (g/d)} / \text{dosificación diaria del marcador (g/d)}$$

La TR es un factor de corrección por la cuantificación incompleta del marcador en heces. Idealmente, una sustancia indicadora debe ser totalmente recuperada en heces de manera que pueda demostrar que es un marcador inerte, no digestible y no absorbible. Sin embargo, tanto los marcadores internos como externos han mostrado diferentes grados de recuperación, haciendo necesario para los nutriólogos la colección de la producción fecal total de al menos unos pocos animales para tener una medición de la TR.

- B. Cuando no se conoce ni el consumo ni la producción fecal, pero se desea estimar la digestibilidad. Esta es una situación común en condiciones de pastoreo que requieren de una estimación del coeficiente de DAMS *in vivo*. En estas circunstancias se debe usar un marcador interno y la digestibilidad de la MS o cualquier otro nutriente puede ser estimada si se determina su concentración en el alimento y las heces. La fórmula general es:

$$\text{Digestibilidad del nutriente} = 100 - [100 \times (\% F_{33} / \% H_{33}) \times (\% H_{\text{nut}} / \% F_{\text{nut}})]$$

Este método es llamado la técnica de proporción y cuando se trata de estimar la DAMS se transforma en:

$$DAMS = [100 - (\text{marcador en alimento} / \text{marcador en heces}) \times 100]$$

Con este método, la colección total de heces no es necesaria (Burns *et al.*, 1994; Rymer, 2000). El principal problema en este caso, así como en el resto de los métodos de laboratorio para estimar el consumo y el coeficiente de digestión, es obtener una muestra representativa del material que el animal está consumiendo en ese momento (Le Du y Penning, 1982). Dos procedimientos básicos para la colección de muestras son el muestreo a mano y el uso de animales fistulados (Cook, 1964; Jones y Lascano, 1992). Ambos

tienen ventajas y desventajas, pero la composición botánica y la complejidad ecológica del pastizal, así como la cantidad de recursos disponibles, debe ser considerada antes de tomar una decisión sobre la colección de muestras en estudios en pastoreo.

- C. Cuando no se conoce el consumo de alimento, ni la producción fecal y se requieren estimaciones de ambos. De nuevo, este es el caso en experimentos bajo condiciones de pastoreo. En tales situaciones, la PFMS es estimada usando un marcador externo (como en la sección A) y la digestibilidad puede determinarse a través del uso de un marcador interno (como en la sección B). Entonces, el consumo puede calcularse como sigue:

$$\text{CMS (g/d)} = \text{PFMS (g/d)} / [1 - \text{DAMS}]$$

Donde el CMS y la PFMS se determinan como en los casos anteriores y [1 – DAMS] representa la fracción indigestible de la dieta.

Cuando esta fórmula es usada para estimar el CMS de los animales en estudios de pastoreo, la producción fecal puede ser medida colocando a los animales bolsas especiales sujetas a arneses mientras que la DAMS del forraje puede estimarse por diferentes métodos que en general pueden clasificarse de la siguiente manera:

1. Técnicas *in vivo*.

Estudio de digestión en confinamiento (Schneider y Flatt, 1975; Cochran y Galyean, 1994).

Técnica *in situ* (Huntington y Givens, 1995; Ørskov, 2000).

Técnica de marcadores (Merchen, 1988; Mayes et al., 1995; Marais, 2000).

2. Técnicas *in vitro*.

Digestion con fluido ruminal (Tilley y Terry, 1963; Stern et al., 1997).

Métodos enzimáticos (Weiss, 1994; Adesogan et al., 2000).

Productos finales de fermentación (Stern et al., 1997; Le Du y Penning, 1982).

3. Técnicas de índices del forraje y fecales.
Nitrógeno fecal (Cordoba et al., 1978; Le Du y Penning, 1982)
Espectroscopia de Reflectancia del Infrarrojo Cercano (Shenk y Westerhaus, 1994).
4. Modelos matemáticos.
Ecuaciones empíricas (Weiss et al., 1992; Moore y Undersander, 2002).
Ecuaciones con bases teóricas (Van Soest, 1994).
5. Otros métodos de laboratorio estiman la DAMS usando relaciones con los componentes químicos del forraje, particularmente las fracciones fibrosas tales como la FDA, FDN y la lignina. Sin embargo, es bueno recordar que ninguna fracción de la fibra está estrechamente relacionada con la DAMS en una amplia variedad de forrajes. Por lo tanto, las muestras deben ser seleccionadas de lugares y especies forrajeras similares a aquellas que van a ser probadas (Coates y Penning, 2000).

Métodos de dosificación del marcador.

Todos los procedimientos con marcadores usan uno de dos tipos de métodos de dosificación. El marcador puede ser administrado ya sea como una sola dosis o puede ser provisto constantemente o frecuentemente por un periodo de días en un intento de alcanzar condiciones de equilibrio (Owens y Hanson, 1992). Típicamente, la dosis única se usa para estimar el volumen de la digesta y el tiempo de retención en partes específicas del TGI y, con esta información, puede calcularse el flujo (y la excreción) de la digesta. La dosificación continua se usa mayormente para medir el flujo instantáneo en un punto específico del tracto digestivo y para estimar la producción fecal. La meta de la dosificación continua o frecuente, o infusión de un marcador es marcar la digesta uniformemente de manera tal que la proporción de la digesta (o producción fecal) con el marcador sea constante. Esto permite calcular la tasa de flujo (MS/d), dividiendo simplemente la tasa de dosificación (g/d) por la concentración del marcador (g/g MS).

Desafortunadamente, las condiciones de equilibrio en la excreción del marcador pueden no existir nunca, sea en condiciones de pastoreo o en confinamiento debido al comportamiento ingestivo y la subsecuente concentración irregular del marcador en el volumen ruminal.

En estudios de pastoreo, si los animales son sujetados, el manejo puede ser estresante y representar una interrupción del pastoreo normal y las actividades de excreción (Burns et al., 1994). Aunque se piensa que hay muchas dificultades con este procedimiento, una ventaja de usar la dosificación diaria es que las propiedades cinéticas del marcador no influyen la estimación de la producción fecal, una vez que se provee un flujo constante del marcador en las heces (Van Soest, 1994).

La variabilidad temporal puede ser compensada parcialmente por una colección más frecuente de las muestras y la administración frecuente del marcador, pero el estrés animal, el esfuerzo y la interrupción de las actividades normales del animal se incrementan proporcionalmente (Burns et al., 1994).

Cápsulas de liberación controlada. El estrés animal producido cuando se manejan los animales para dosificar el marcador y el muestreo puede alterar el comportamiento de consumo, la producción fecal y el consumo de forraje. Debido a esto, las cápsulas de liberación controlada (CLC) fueron desarrolladas como una técnica que resolviera estas dificultades en la dosificación sencilla o doble del óxido crómico (Cr_2O_3), así como la variación diurna en la concentración del marcador en heces (Burns, 1994). Recientemente, las CLC han sido usadas también para dosificar alcanos de cadena par como marcadores externos a bovinos (Berry et al., 2000) y ovinos (Dove et al., 2002). Las cápsulas han sido descritas por Pond (1990) como sigue: "Cada cápsula consiste de un barril plástico y unas alas, un paquete de tabletas conteniendo el marcador fecal, un resorte y un embolo. Las alas están dobladas y se mantienen en su lugar durante la dosificación con una cinta hidrosoluble. Al contacto con el líquido ruminal las alas se desdoblán para disminuir la probabilidad de regurgitación de la cápsula. La liberación del marcador inicia cuando el agua (o líquido ruminal) pasa a través del

fondo de la cápsula y es absorbido por la primera tableta. Esta contiene compuestos hidrosolubles que forman un gel cuando entran en contacto con la humedad. El gel conteniendo el marcador es liberado lentamente a través del fondo de la cápsula por el embolo empujado por el resorte. Cuando se alcanza la etapa de equilibrio (4 a 6 d después de la dosificación) la masa del marcador liberado por la cápsula es igual a la que aparece en heces. Las muestras fecales pueden ser colectadas entre 6 a 20 días en bovinos y 5 a 25 días en ovinos. Estas cápsulas tienen la ventaja de una sola dosificación, proporcionan flexibilidad en el muestreo y reducen la cantidad de trabajo y el estrés animal. Aunque para proveer estimaciones razonables de la producción fecal la tasa de liberación del marcador debe ser constante durante un periodo de tiempo y no ser afectada por la dieta, el animal o el nivel de consumo”.

Al evaluar la utilidad de estos dispositivos, los resultados han sido contradictorios. Por ejemplo, Parker *et al.* (1989) trabajaron con la CLC con cromo y encontraron uniformidad en la liberación de la CLC, casi completa recuperación del Cr en heces y una variación diurna baja en la concentración del marcador en heces cuando las probaron en corderos Romney alimentados con alfalfa verde picada a diario. Sin embargo, los corderos con las CLC tenían un menor CMS Y PFMS que aquellos que no tenían CLC (Parker *et al.*, 1991). Brandyberry *et al.* (1991) probaron la eficacia de bombas de infusión continua y las CLC para administrar tres marcadores externos (Co-EDTA, YbCl₃ y Cr₂O₃) para predecir la PFMS de seis novillos fistulados, alimentados con alfalfa troceada al 2% de su peso vivo. En este estudio, los marcadores alcanzaron el equilibrio después de 4 a 5 días de iniciada la infusión. Así, la concentración en heces fue relativamente estable y las PFMS estimadas, obtenidas de muestras tomadas una vez al día en la mañana o en la tarde no fueron diferentes ($P > 0.10$), pero la tasa de liberación fue solamente del 0.78 de la establecida por el fabricante. Debido a esto, cuando ellos compararon la PFMS actual con la obtenida por el marcador, sin la corrección por la recuperación incompleta del marcador, ellos encontraron que el Cr₂O₃ sobreestima ($P < 0.05$) el valor actual. Los mismos problemas de diferencia en las estimaciones de los valores predichos en la PFMS y CMS fueron

detectados por Buntix *et al.* (1992) y Luginbuhl *et al.* (1994) trabajando con ovinos, pero ellos no aplicaron la corrección para la recuperación fecal incompleta del Cr encontrada en sus estudios. Cuando esto fue posible, como lo indicaron Momont *et al.* (1994), los valores recalculados fueron muy similares a los obtenidos por la colección total de heces. Estos resultados indican que puede ser necesaria la colección fecal total de un subgrupo de animales usados en el estudio para ajustar la PFMS estimada por el marcador (Hatfield *et al.*, 1991).

Milne (2001) estableció que el uso de los n-alcenos como marcadores internos y externos ha sido el método de elección en el campo de la nutrición de rumiantes y las CLC han sido desarrolladas para dosificar a los animales con los alcanos C32 y C36. La exactitud de la estimación basada en las CLC con alcanos y el muestreo a tiempos espaciados fue evaluada con éxito por Berry *et al.* (2000).

De manera similar, Dove *et al.* (2002) estudiaron el efecto del tipo de dieta, el nivel de consumo y la frecuencia de alimentación sobre la exactitud de las estimaciones usando la técnica de alcanos en ovinos. Estos estudios indicaron que la CLC intra-ruminal provee una manera satisfactoria de proporcionar una dosis diaria exacta de alcanos para la estimación de la PFMS, el CMS y la DAMS en rumiantes. En general, la opinión con respecto al uso de las CLC intra-ruminales como una manera de dosificar a los animales con los marcadores es que, potencialmente, ahorran tiempo, trabajo y no interrumpen el comportamiento animal en los estudios en pastoreo. Sin embargo, hay dudas con respecto acerca de la cantidad de marcador que está siendo liberada, de ahí que, la verificación de los resultados de los marcadores por comparación con procedimientos que involucren la colección fecal total es recomendable (Hatfield *et al.*, 1991; Dove *et al.*, 2002).

El óxido de cromo como un marcador en estudios de digestión. Los óxidos y sales de metales trivalentes y tetravalentes tal como el titanio, cromo, cobalto, rutenio y hafnio tienen características de marcadores inertes y han sido usados como tales con grados variables de éxito (Marais, 2000). El más común de estos compuestos es el óxido crómico (Cr_2O_3), el cual fue introducido como un marcador

externo por Edin en 1918 y desde entonces ha sido, probablemente, el más ampliamente usado para estimaciones de digestibilidad y de producción fecal que ninguna otra sustancia (Knafka *et al.*, 1967). El óxido crómico es un polvo verde y denso que tiende a viajar en suspensión en la digesta a una tasa independiente de la fase particulada o de la fase líquida (Merchen, 1988).

El óxido crómico es más apropiado como marcador externo para estimar la producción fecal en ensayos de digestibilidad que en ensayos de tasa de pasaje (Van Soest, 1994). Si se logra una concentración del marcador regular y constante en la producción fecal total, entonces el Cr_2O_3 puede proveer una buena estimación de la digestibilidad de la MS *in vivo* dado que su medición depende de la distribución del Cr_2O_3 en el alimento y su pasaje de manera constante a través del TGI. Los bolos de óxido (CLC) que pueden liberar el respectivo elemento a una tasa constante son una alternativa que puede mejorar las estimaciones del consumo de MS y la digestibilidad y, al mismo tiempo, reducir los costos en tiempo y esfuerzo en los estudios en pastoreo.

Debido a su extenso uso, el óxido crómico ha sido tomado como el marcador de referencia en algunos estudios. Por ejemplo, Titgemeyer *et al.* (2001) compararon la exactitud del óxido crómico (Cr_2O_3) y el dióxido de titanio (TiO_2) en la estimación de las digestibilidades de la MS y producción fecal de novillos alimentados con cuatro dietas a base de grano. En este ensayo, los novillos se adaptaron a la dieta por 9 días y se hicieron colecciones fecales totales por 4 días con el uso de bolsas de colección de heces. Los resultados no mostraron diferencias significativas en el consumo ($P=0.33$) y la digestibilidad ($P=0.07$). La recuperación fecal del Cr_2O_3 y el TiO_2 promediaron 98.4 % y 90% a través de las dietas, respectivamente. Las estimaciones de la producción fecal y la digestibilidad con el uso de Cr_2O_3 no difirieron ($P=0.30$) de las basadas en la colección fecal total. El dióxido de titanio llevó a una sobre-estimación ($P<0.01$) de producción fecal y menores estimaciones ($P<0.01$) de la digestibilidad, ya sea basados en la colección fecal total o en el Cr_2O_3 . Basados en sus resultados, Titgemeyer *et al.* (2001) concluyeron que la variación entre animales y hora del día no pudo influir

las estimaciones de la digestibilidad si se usaron bastantes animales, se implementó un protocolo de muestreo adecuado y la recuperación del marcador fue de 100%.

En experimentos para medir la cinética de la digesta, el flujo y la tasa media de retención a través del TGI, el cromo quelado a etilendiaminotetracetato (Cr-EDTA) es usado como un marcador de fase líquida y el cromo mordantado a constituyentes de la pared celular (Cr-FDN) como un marcador de la fase particulada (Marais, 2000). Sin embargo, deber observarse con precaución cuando el Cr-FDN es usado como marcador de la fase particulada debido a que el cromo puede unirse firmemente a los constituyentes de la pared celular. Esta unión puede afectar la tasa de pasaje de las partículas debido a un incremento en la densidad del alimento (Ehle *et al.*, 1984) y puede causar una reducción en la digestibilidad del material ligado a él (Mader *et al.*, 1984).

Udén *et al.* (1980) condujeron una serie de experimentos para investigar el uso de cromo (Cr) y cerio (Ce) mordantados a la pared celular de las plantas como marcadores de la fase particulada y Co-EDTA y Cr-EDTA como marcadores de la fase líquida. Ellos mordantaron fibra de pasto Timothy y alfalfa y describieron los métodos de preparación de los marcadores y su análisis. Las pruebas de estabilidad del mordantado consistieron en uno o más de los siguientes métodos:

- 1) Reflujo por 1 h en una solución al 2.9% de lauril sulfato de sodio (pH 7),
- 2) Reflujo por 1 h en una solución al 1.8% de EDTA (pH 7),
- 3) Incubación por 12 h a 39°C en HCl 0.1 M,
- 4) Incubación por 12 h a 39°C en HCl 0.01 M y,
- 5) Digestión ruminal *in vitro* por 48 h.

Los resultados del experimento *in vitro* mostraron que el HCl 0.1 M y el tratamiento *in vitro* tuvieron un efecto imperceptible sobre la estabilidad de la fibra mordantada con cromo. Conforme la concentración del Cr mordantado a la fibra se incrementó, la digestibilidad *in vitro* de la fibra disminuyó, volviéndose 96% más indigestible por encima del 8% del Cr en la fibra. La recuperación del cromo se

incrementó cuando los niveles del cromo mordantado aumentaron, alcanzando 98% de recuperación a una concentración del 12%. Los datos obtenidos del experimento *in vivo* confirmaron la absorción insignificante del cromo durante su pasaje a través del TGI. A partir de estos experimentos, los autores sugirieron que la fibra mordantado con cromo cumple con la mayoría de los criterios para un marcador de la fase particulada.

Bruining y Bosch (1992) estudiaron el efecto del tamaño de partícula de Cr-FDN sobre la estimación de la tasa de pasaje de las partículas medida por muestreo fecal de vacas lecheras lactantes y secas y promediaron 2%/h y 4.1%/h, 8.6%/h y 14.9%/h cuando se calculó de Cr-FDN fino (0.6-1 mm) y Cr-FDN extra fina (<0.3 mm), Co-EDTA de las heces y Co-EDTA del rumen, respectivamente. Estos resultados indican que los experimentos, en los cuales se determinó la tasa de pasaje usando Cr-FDN, el tamaño de partícula de la fibra marcada tiene una gran influencia sobre las tasas de pasaje calculadas. Quizás, Cr-FDN sea sólo representativa de la fracción de partículas del rumen del mismo tamaño y densidad del marcador.

Ehle *et al.* (1984) estudiaron el efecto de tres concentraciones de cromo en la solución mordantada (2, 8 o 32% del peso de la pared celular de la alfalfa) sobre la densidad de la partícula y tasa de recambio en vacas lecheras. Ellos encontraron que la densidad y la concentración del cromo de la fibra mordantada de alfalfa influía ($P < 0.05$) en las estimaciones de la tasa de recambio de las partículas. Otra desventaja del Cr-mordantado es el efecto de la extracción química exhaustiva de los contenidos celulares durante la preparación de las paredes celulares. Esta extracción puede alterar el tamaño de partícula y la densidad, así como el ataque de las enzimas digestivas (Ellis *et al.*, 1980).

A pesar de estas críticas, el cromo es aún uno de los marcadores externos más comúnmente usados en estudios de nutrición animal. El consumo de materia seca, la digestibilidad y la tasa de pasaje en diferentes especies ha sido estimado con el uso de cromo por diferentes investigadores (Faichney y White, 1988; Molina *et al.*, 2000). Este interés puede ser debido al hecho de que la producción fecal

total puede ser estimada con un nivel adecuado de exactitud usando el Cr_2O_3 como marcador externo, si se puede alcanzar una tasa constante de excreción fecal del marcador (Van Soest, 1994).

Ahvenjärvi *et al.* (2001), usando paja marcada con Cr y la FDN como marcadores, evaluaron el efecto del muestreo no representativo de la digesta sobre la exactitud de las mediciones del flujo de fibra. Sus resultados apoyan la idea de que la exactitud de las mediciones del flujo de la digesta debe ser adecuada si el marcador indigestible está distribuido homogéneamente en la porción particulada de la digesta.

El uso de los alcanos como marcadores nutricionales. Los alcanos son hidrocarburos alifáticos completamente saturados (Mayes *et al.*, 1995). Aunque componentes menores, los hidrocarburos parecen ser ubicuos a las ceras cuticulares de las plantas superiores. Los hidrocarburos predominantes de la mayoría de las plantas son n-alcanos, los cuales usualmente se encuentran como mezclas, variando en longitud de cadena de 21 a 37 átomos de carbonos. Más del 90% de los n-alcanos de la mayoría de las plantas tiene números impares en los átomos de carbono, teniendo usualmente el nonacosano (C_{29}), hentriacontano (C_{31}) y tritriacontano (C_{33}) las concentraciones más altas en las herbáceas (Dove y Mayes, 1991). La relativa simplicidad del análisis por medio de cromatografía de gases y lo inerte de estos compuestos fueron la principal razón para considerar el uso de los alcanos como marcadores fecales (Mayes y Lamb, 1984; Mayes *et al.*, 1995). Inicialmente fueron propuestos para estimar DMS usando un alcano natural de cadena impar en el forraje como marcador interno y la fórmula:

$$\text{DAMS} = \{1 - [\text{TR}_{33} \times (\text{F}_{33} / \text{H}_{33})]\} \times 100$$

Donde:

DAMS – digestibilidad aparente de la materia seca,

TR_{33} – tasa de recuperación del alcano impar,

F_{33} – concentración del alcano impar en el forraje,

H₃₃ – concentración del alcano impar en las heces.

Mayes *et al.* (1986) desarrollaron un procedimiento de doble alcano para estimar el consumo de forraje de ovinos con o sin suplementación. En este ensayo, los animales fueron dosificados con cantidades conocidas de alcanos de cadena par y el consumo se estimó a partir de la tasa de dosificación diaria y la concentración de la dieta y fecal del alcano par dosificado y un alcano impar natural, adyacente en longitud de cadena. La recuperación fecal de los alcanos dosificados y derivados de la planta es incompleta, pero los alcanos de cadena adyacente (p.e. C₃₂ y C₃₃) han mostrado tener recuperaciones similares en ovinos (Vuich *et al.*, 1991; Dove y Olivan, 1998; Dove *et al.*, 2002) y bovinos (Unal y Garnsworthy, 1999; Berry *et al.*, 2000). Por lo tanto, si este par de alcanos va a ser usado, los efectos de la recuperación incompleta se cancelan uno a otro en el cálculo del consumo por la ecuación:

$$CF = D_{32} / [(H_{33} / H_{32}) \times F_{33} - F_{32}]$$

Donde:

CF - consumo de forraje,

D₃₂ – alcano externo dosificado,

H₃₃ y H₃₂ – concentración en heces del alcano interno (C₃₃) y externo (C₃₂),

F₃₃ y F₃₂ – concentración en el forraje del alcano interno (C₃₃) y externo (C₃₂).

Desde mediados de los 80's el uso de los alcanos como marcadores nutricionales ha ganado popularidad y se ha vuelto el método de elección para estimar el CMS de animales en pastoreo (Milne, 2001). De acuerdo a Mayes y Dove (2000), la técnica del doble alcano para estimar el CMD ofrece ventajas sobre el uso de otros marcadores externos tales como el cromo. La técnica puede dar evaluaciones exactas del consumo de la dieta de los animales en pastoreo. Esto permite proveer estimaciones de la variación entre animales en la digestibilidad de la dieta y brinda estimaciones individuales del consumo de animales alimentados en grupo, lo cual puede ser útil en evaluaciones genéticas.

Puede acomodar la suplementación a los animales, ya sea que los consumos individuales de los suplementos sean conocidos o tengan que ser estimados. El análisis por cromatografía de gases permite que puedan ser estimados tanto los marcadores de las plantas (internos) como los dosificados (externos), al mismo tiempo, lo cual reduce los errores analíticos y los sesgos debido a procedimientos de laboratorio diferentes. Este método puede ser extendido a mediciones de la composición botánica de la dieta si el perfil de alcanos puede ser determinado en el forraje y en las heces.

Sin embargo, la gran variación en el contenido de alcanos encontrado en la MS del forraje de las diferentes especies de plantas (Tabla 1) previene a los investigadores sobre el uso de estándares de aplicación general a través de las diferentes condiciones experimentales (Moshtaghi Nia y Wittenberg, 2002). Aunque estas diferencias pueden reflejar la variación entre los laboratorios en los métodos del análisis de alcanos (Lewis *et al.*, 2003), se han encontrados variaciones en la concentración de alcanos en diferentes partes de las plantas o en las mismas especies crecidas en diferentes lugares o cortadas en diferente etapa de madurez (Dove y Mayes, 1991). Casson *et al.* (1984) y Laredo *et al.* (1991) han sugerido que para obtener estimaciones confiables del consumo de forraje, la concentración de los alcanos naturales debe exceder los 50 mg/kg MS. Las concentraciones de los alcanos naturales C_{27} , C_{29} , C_{31} y C_{33} de algunas especies forrajeras de clima templado son mostradas en la tabla 1.

Otros alcanos no son mostrados en la tabla 1 debido a que su concentración en la MS del forraje es muy baja para ser útil como marcadores y dado que entre todos los alcanos naturales, C_{31} y C_{33} son los más comúnmente usados en la estimación del CMS y la DAMS (Mayes *et al.*, 1995). Las concentraciones de C_{27} , C_{29} , C_{31} y C_{33} están por debajo de este nivel para varias especies forrajeras de clima templado (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración de n-alcános de cadena impar (mg/kg MS) más comunes en especies forrajeras seleccionadas de clima templado.

Especies forrajeras:	Alcanos (mg/kg MS)				Referencias:
	C27	C29	C31	C33	
<i>Lolium multiflorum</i>	40	230	242	57	Dove and Mayes (1991)
<i>Lolium perenne</i>	19	73	137	116	Mayes <i>et al.</i> (1986)
<i>Lolium perenne</i>	36	142	220	99	Malossini <i>et al.</i> (1990)
<i>Lolium perenne</i>	26	190	275	89	Laredo <i>et al.</i> (1991)
<i>Lolium perenne</i>	113	270	256	36	Dove and Olivan (1998)
<i>Lolium perenne</i>	34	93	181	137	Dove <i>et al.</i> (2002)

Sin embargo, más importante que el contenido de alcano del forraje y las heces, como es reportado algunas veces, es la tasa de recuperación de los alcanos involucrados en la relación fecal (H_{33} / H_{32}) en la fórmula para calcular el CMS (Dove y Mayes, 1996). Recuperaciones fecales idénticas de los alcanos del forraje (cadena impar) y los dosificados (cadena par) es un pre-requisito para estimaciones confiables del consumo (Mayes *et al.*, 1986). Desafortunadamente, este no siempre es el caso. Frecuentemente, la tasa de recuperación muestra una relación cuadrática con la longitud de cadena de carbonos de los alcanos ingeridos y dosificados (Mayes *et al.*, 1986; Dove *et al.*, 2002) y algunas veces no hay una relación definida (Piasentier *et al.*, 1995; Moshtaghi Nia y Wittenberg, 2002; Hendricksen *et al.*, 2002). Hasta ahora, no hay una explicación clara de este comportamiento de los alcanos, pero se ha demostrado que desaparecen selectivamente de la digesta en diferentes secciones del TGI (Ohajuruka y Palmquist, 1991; Dove y Mayes, 1991).

Dove *et al.* (2002) evaluaron el nivel y frecuencia de alimentación y el número de CLC intra-ruminales administradas a los ovinos sobre la tasa de liberación de los alcanos C_{28} y C_{32} y la exactitud resultante de las estimaciones del CF y la digestibilidad. Ellos encontraron que una liberación lineal de alcanos

iniciaba después de un periodo de 2 a 3 días y se estabilizaba a los 6 a 7 días a una tasa media de 40.1 mg/d para el C₂₈ y 41.7 mg/d para el C₃₂. Esas recuperaciones estuvieron cercanas a la tasa de liberación esperada de 40 mg/d, establecida por el fabricante. Ellos no encontraron efectos ($P>0.05$) ni de la frecuencia de alimentación, del número de CLC sobre la tasa de liberación del C₂₈ y C₃₂, la tasa de recuperación y la exactitud en la estimación del consumo. No hubo efecto ($P>0.05$) del nivel de alimentación sobre la tasa de liberación de las CLC y las diferencias observadas ($P<0.001$) en las concentraciones fecales de alcanos fueron consistentes con las diferencias en la producción fecal causada por el nivel de alimentación. Como resultado de esto, la exactitud con la cual se estimaron los consumos y digestibilidades no fue afectada por el nivel de alimentación. La conclusión de este estudio fue que las CLC proveían un medio satisfactorio de liberar una dosis diaria y precisa de alcanos, para la estimación del consumo de forraje, la producción fecal y la digestibilidad en ovinos.

Otros autores han usado este método con diferentes grados de éxito, trabajando con otras especies animales tales como vacas lecheras (Unal y Garnsworthy, 1999; Berry *et al.*, 2000), ganado productor de carne (Hendricksen *et al.*, 2002), caballos (Ordakowski *et al.*, 2001) y jirafas (Hatt *et al.*, 1998). La mayoría de ellos han concluido que los n-alcanos tienen buen potencial como marcadores para evaluar el valor nutritivo de los forrajes de los herbívoros.

Exp. Estimación del consumo y digestibilidad de novillos Holstein-Brahman en condiciones de confinamiento.

Introducción

El consumo de materia seca y la digestibilidad representan estimaciones útiles de la calidad del forraje cuando la producción animal no puede ser medida (Sollenberger y Cherney, 1995). Cuando el valor nutritivo, o calidad del forraje, es medida directamente en los animales, este provee una buena estimación del potencial que un alimento dado puede sustentar para las funciones animales de

mantenimiento, crecimiento, lactación y otras necesidades. El valor nutritivo es considerado como el resultado del consumo, la digestibilidad y la eficiencia animal para usar los nutrientes disponibles. De estos factores, el consumo y la digestibilidad cuentan para la mayoría de la variación en el desempeño animal. Por lo tanto, son los indicadores más comunes del índice de calidad del forraje, tal como “el valor alimenticio relativo” y “la calidad relativa del forraje” descritos por Moore y Undersander (2002). En un ensayo de digestión convencional, tanto el consumo y la producción fecal total pueden ser medidos directamente. Los coeficientes de digestión aparente son fáciles de calcular como la diferencia entre el CMS y la PFMS, dividida por el CMS (Merchen, 1988). Desafortunadamente, la colección fecal total no siempre es posible en estudios en pastoreo. Así, ni el consumo animal ni la digestibilidad del forraje consumido puede ser medido. Bajo estas condiciones, el uso de algunas sustancias inertes, conocidas como marcadores, probablemente representan el método más ampliamente aceptado para estimar tanto el consumo voluntario de alimento como la digestibilidad del forraje (Van Soest, 1994).

Kotb y Luckey (1972), Ellis *et al.* (1980) y Owens y Hanson (1992) han hecho una amplia clasificación de estos marcadores nutricionales no absorbibles como internos o externos, dependiendo de su aparición natural. Merchen (1988) y Marais (2000) hicieron una descripción general de las características y propiedades físicas y químicas de los marcadores más comunes. Estos autores indicaron que probablemente ninguno de los marcadores actuales cumpliera con todos los requisitos y que el método de administración juega un importante papel en la exactitud de las estimaciones de la producción fecal y por lo tanto, el CMS y los cálculos de la digestibilidad.

Cápsulas de gelatina, papel, fracciones de fibra y otras sustancias han sido usadas como portadores para los marcadores en estudios de digestión con bovinos. Recientemente, el uso de CLC intra-ruminales ha sido una manera popular de dosificar a los animales con marcadores tales como el óxido crómico y los alcanos de cadena larga para estimar el consumo y la digestibilidad de

animales en pastoreo (Milne, 2001). Aún se requiere información sobre la exactitud de estos métodos.

Por lo tanto, los objetivos del presente experimento fueron:

- a) Determinar la tasa de recuperación del óxido crómico y alcanos de cadena larga administrados a novillos Holstein – Brahman alimentados con henos de Bermuda cv. Cruza II y Ballico anual.
- b) Evaluar el valor de los marcadores para la estimación simultánea de la producción fecal de materia seca, el consumo y la digestibilidad.

Material and Métodos

Se utilizaron 4 novillos Holstein – Brahman con un peso promedio de 259.75 ± 6.6 kg PV, en un experimento con un diseño de cuadro latino 4 X 4. Los cuatro tratamientos consistieron en mezclas de henos de Bermuda cv. Cruza II (Cd) y Ballico anual (Lm) y fueron: 1) 100% Cd; 2) 67% Cd + 33% Lm (Cl); 3) 33% Cd + 67% Lm (Lc) y 4) 100% Lm. Los novillos se mantuvieron en corraletas individuales de 1.2 X 2.4 m provistas con comedero, bebedero y sales minerales a libre acceso. Las raciones se sirvieron en dos porciones iguales de 2.74 kg a las 0800 y 2000 h, en base a una asignación del 2.1% del PV. Todos los henos fueron cosechados de las praderas de las Posta Bovina del ICA – UABC. El forraje de la pradera de *C. dactylon* cv. Cruza II (Bermuda cv. Cruza II) se pastorea durante los meses de verano y otoño, mientras que *L. multiflorum* (Ballico anual) se sobre-siembra en el otoño de cada año en las praderas de Bermuda y es aprovechado durante el invierno y la primavera. Los dos tipos de henos fueron escogidos por ser forrajes utilizados usualmente en la alimentación de bovinos en pastoreo en el Valle de Mexicali, B.C.

A cada novillo se le suministraron 300 mg del alcano C₃₂ en cápsulas de gelatina durante la alimentación de la mañana (Ohajuruka y Palmquist, 1991), verificando su consumo por el animal en cada ocasión; el óxido de cromo se suministró como marcador de la digesta al 0.3% dos veces al día (14.8 g/d)

servido directamente sobre el heno suministrado en el comedero al realizar cada servida, es decir cada 12 hrs, con el propósito de disminuir la variación diurna en la excreción fecal de este marcador (Zinn *et al.*, 2008).

Cada periodo duro 11 días, siete días de adaptación a la dieta y cuatro días de muestreo. Durante el periodo de adaptación los animales tuvieron acceso a un área de descanso anexo a la Unidad Metabólica donde contaban con agua y sales minerales a libre acceso. El día 7 los animales fueron movidos a las jaulas metabólicas para la colección fecal total, mientras continuaba el suministro de la dieta.

Medición y Muestreo.

El peso vivo de los animales se registró el día del inicio de cada periodo. El alimento ofrecido fue registrado y muestreado a diario para el cálculo del CMS durante el periodo de colección fecal. Las heces de cada animal se colectaron cada 3 h en cajas de plástico resellables, previamente identificadas y taradas y al final de cada día de muestreo (1200 h) se mezclaron completamente y se tomó una muestra del 5% del total de heces que comprendió los días 8-11 de cada periodo, dicha muestra se sumó al total de la colecta de heces. Además, del día 8-11 se tomaron muestras de heces para determinar el patrón de excreción fecal del Cr_2O_3 , según el siguiente horario de muestreo: día 8 0730 y 1330 h; día 9 0900 y 1500 h; día 10 1030 y 1630 h y día 11 1200 y 1800 h. Las muestra fecales de cada animal fueron inmediatamente congeladas a -20°C para su análisis posterior.

Las muestras individuales de alimento y heces se y fueron molidas a 1 mm en un molino Wiley hasta su análisis. Las muestras de forraje y heces fueron sujetas a todos o parte de los análisis siguientes: materia seca (secado a 65°C por 48 hrs), cenizas, N Kjeldahl (AOAC, 2000), FDN, FDA y LDA (Van Soest *et al.*, 1991) y cromo (Hill y Anderson, 1958). Para la determinación de n-alcanos una submuestra de las dietas y heces se molieron a 0.5 m.

Las muestras de forraje y heces que se molieron a 0.5 mm se llevaron al Laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Autónoma de Yucatán y se

procesaron y analizaron para determinar su contenido de alcanos por cromatografía de gases, según el método descrito por Dove y Mayes (2003):

1. Se identificó y pesó previamente todos los viales de vidrio donde se saponificarían las muestras molidas a 0.5 mm.
2. Se pesaron las muestras para extracción de alcanos: heces 1 g y forraje 3 g, en los viales previamente tarados e identificados.
3. Se añadió C_{34} (tetratriacontano, Aldrich, CAS 630-05-7) como un estándar interno a cada muestra (0.25 mg en 0.5 mL de heptano) a analizar.
4. Se realizó la saponificación de la muestra agregando 14 mL de hidróxido de potasio (1M en etanol):

KOH etanólico 1M.- Disolver 56 g of KOH (Hidróxido de potasio, Jalmek, CAS 1310-58-3) en 900 ml de EtOH al 95% (Alcohol etílico ACS, Jalmek CAS 64-17-5) mientras se agita sobre un plato caliente, añade lentamente 18-22 mL de agua para ayudar a disolver el KOH. Aforar a un volumen final de 1 L con EtOH al 95%.

5. Se cubrieron los viales y colocaron las muestras con KOH para su saponificación en la estufa a 90°C durante 8 hrs.
6. Transcurrido el tiempo, se retiraron las muestras de la estufa y esperamos a que enfríen durante 30-40 minutos.
7. Una vez enfriados los viales conteniendo las muestras saponificadas, iniciamos la extracción adicionando n-heptano (Jalmek CAS 142-82-5) a cada muestra: 7 mL para heces y 14 mL para forraje, además de 2 mL de agua destilada a cada vial.
8. Se agitaron las muestras en un baño ultrasónico (Branson 5510) durante 5 min y después reposaron por 30-40 min.
9. La extracción de los alcanos se realizó utilizando columnas desechables de 5 mL, empacadas con gel de sílica (silica gel 60 Angstrom, mesh 200-450, partícula de 0.2-0.5 mm; Sigma-Aldrich, CAS 112926-00-8). En el fondo, se colocó un tapón de algodón para evitar la salida del gel de sílica y luego se agregó la sílica, para lograr un buen empacado se golpeó suavemente la columna contra la mesa y se colocó encima otro tapón de algodón,

apretándola al final con un agitador de cristal de tal manera que aun volteando la columna, no se salga la sílica de esta.

10. Una vez preparadas las columnas, se les agregaron 5 mL de heptano a la columna para humedecerla y se inició la extracción cuando la columna se saturó y empezó a gotear el heptano en el frasco.
11. Se removió con pipetas Pasteur desechables (VWR, Cat. 14673-010) la capa superior de color claro/amarillo (sobrenadante) de cada vial y se colocó esta capa sobrenadante sobre la columna de gel de sílica, con el fin de remover los pigmentos de plantas, lípidos y alcoholes de cadena larga de las muestras.
12. Una vez adicionado todo el extracto de la muestra a la columna, se lavó la columna con otros 10 mL de heptano.
13. La solución obtenida en el frasco conteniendo los alcanos de la muestra, se pasó a un matraz para rotoevaporador (Büchi R-114) provisto con un baño de agua (Büchi B480) a una temperatura de 40°C hasta eliminar el heptano por completo (~5 min por muestra).
14. Una vez evaporadas todas las muestras, se adicionaron 1.5 mL de heptano a cada una para redissolver los alcanos extraídos y transferir esta solución a un vial provisto con tapa (Agilent Technologies, Cat. 5182-0714 y 5182-0717, respectivamente) para cromatógrafo de gases.
15. El vial conteniendo la solución de alcanos fue refrigerado inmediatamente hasta su inyección en el CG de la FIQ-UADY para el análisis y cuantificación de los alcanos.

DÍA 3. CROMATOGRAMA.

16. Se inyectó la solución (0.2 mL) en el cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890 N, Detector Selectivo de Masa Network 6C SyS y detector de ionización de flama), provisto con una columna capilar HP5 MS (310°C, 30 m X 0.25 mm grosor X 0.25 µm DI).
17. El gas transportador fue Helio UPA con un flujo de 4 mL/min. Los gases para la flama fueron nitrógeno, hidrógeno y aire sintético, con tasa de flujo de 50, 35 y 350 mL/min, respectivamente.

18. Las temperaturas a emplear fueron: inyector a 280°C, detector de ionización de flama a 340°C y la columna a 170°C por 4 min, con una primer rampa de 30°C/min hasta 215°C, manteniéndose por 1 min y la segunda rampa de 6°C/min hasta 300°C, manteniéndose por 3 min.

Las determinación de las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a cada n-alcano se basó en la comparación con un patrón interno inyectado anteriormente en las muestras, para así conocer el tiempo de retención de los siguientes alcanos: dotriacontano (C₃₂H₆₆), tritriacontano (C₃₃H₆₈) y hexatriacontano (C₃₆H₇₄). Posteriormente, se convirtieron las cantidades de n-alcanos por referencia con el patrón interno tetratriacontano (C₃₄H₇₀) adicionado a las muestras al inicio del análisis. Los datos obtenidos se expresaron en mg de alcano por kg de MS del forraje (Côrtes *et al.*, 2005).

Cálculos y Análisis Estadístico.

Variables Medidas y Estimadas.

La PFMS usando la técnica del cromo y los alcanos se calculó a partir del suministro del cromo en el forraje y las cápsulas de gelatina conteniendo el C₃₂ y la concentración de los marcadores en heces siguiendo la ecuación:

$$\text{PFMS (kg MS/d)} = \text{marcador consumido (g/d)} / \text{marcador en heces (g/d)}$$

La recuperación de los alcanos se determinó como una proporción de los alcanos ingeridos que se excretaron en las heces durante el periodo de colección fecal total, usando la ecuación (Ohajuruka y Palmquist, 1991; Moshtaghi Nia y Wittenberg, 1996):

$$\text{TR} = [(\text{PFMS} \times \text{ALC}_{\text{heces}}) / (\text{CMS} \times \text{ALC}_{\text{dieta}})]$$

Los consumos actuales se registraron diariamente en el método de colección total (*in vivo*). Las estimaciones del consumo de MS basadas en los alcanos se calcularon para las dietas usando la siguiente ecuación (Dove y Mayes, 1991):

$$CF = D_{32} / [(H_{33} / H_{32}) \times F_{33} - F_{32}]$$

Donde:

CF - consumo de forraje,

D_{32} – alcano externo dosificado,

H_{33} y H_{32} – concentración en heces del alcano interno (C_{33}) y externo (C_{32}),

F_{33} y F_{32} – concentración en el forraje del alcano interno (C_{33}) y externo (C_{32}).

La digestibilidad aparente de la materia seca estimada con el alcano natural de cadena impar como marcador interno se calculó (Dove y Mayes, 1991):

$$DAMS = \{1 - [TR_{33} \times (F_{33} / H_{33})]\} \times 100$$

Donde:

DAMS – digestibilidad aparente de la materia seca,

TR_{33} – tasa de recuperación del alcano impar,

F_{33} – concentración del alcano impar en el forraje,

H_{33} – concentración del alcano impar en las heces.

Además, las muestras tomadas a intervalos regulares se usaron para determinar las concentraciones de Cr_2O_3 , las tasas de recuperación y el CMS a través del periodo de colección fecal total.

Análisis Estadístico.

Este experimento correspondió a un diseño en cuadro latino 4 X 4 y los datos fueron analizados para un análisis de varianza por cuadrados mínimos usando el procedimiento GLM de SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2001). Los componentes de la varianza fueron el animal, el periodo y el tratamiento. La suma de cuadrados de los tratamientos fueron separados en efectos de tipo de dieta, método y dieta x método.

Resultados y Discusión.

La tabla 1 muestra el contenido de nutrientes, en base a MS, de las dietas ofrecidas a los novillos durante el experimento. El heno de Bermuda tiene un contenido mayor ($P < 0.05$) de ceniza, N, FDN, FDA y LDA que el heno de Ballico anual, mientras que el contenido de MS fue similar. Sin embargo, los valores de FDN, FDA en *C. dactylon* son menores a los obtenidos por Días *et al.* (2007), mientras que el contenido de proteína en el presente trabajo es menor al encontrado por ellos (8.56 vs. 12.6% PC). Por otro lado, Oliveira *et al.* (2007) trabajaron con *C. nlemfuensis* reportaron niveles similares de FDN, FDA y LDA (61.4, 28 y 3.2%, respectivamente), aunque encontraron mayores niveles de proteína (13.3% vs. 8.56%).

Tabla 1. Contenido de nutrientes de las dietas ofrecidas.

Componente (%)	Tratamiento				CV
	Cd	Cl	Lc	Lm	
Ceniza	2.21 _a	1.94 _a	1.70 _{a,b}	1.37 _b	11.97
MS	95.84	95.36	94.31	94.96	1.03
N	1.37 _a	1.33 _a	1.22 _b	1.82 _b	2.49
FDN	61.24 _a	54.81 _b	49.35 _c	43.29 _d	1.99
FDA	24.71 _a	23.59 _b	22.69 _b	21.53 _c	1.91
LDA	2.94 _a	2.39 _b	2.14 _c	2.03 _c	3.59

CV – Coeficiente de variación.

^{a,b,c,d.} Literales diferentes indican diferencia estadística ($P < 0.05$)

Contenido de alcanos en heno y heces.

La tabla 2 muestra los perfiles de n-alcanos en los henos y en las heces durante el periodo de colección de muestras. El contenido del alcano C₃₂ en todas las dietas fue < 10 mg/kg MS. Estos resultados concuerdan con De Stefani (2010), quien encontró niveles similares de C₃₂ en *Cynodon dactylon*, (6 a 8 mg/kg MS);

Bugalho *et al.* (2004) encontraron 8.1 y 90.9 mg/kg MS para C₃₂ y C₃₃, respectivamente; así mismo los resultados concuerdan con los datos obtenidos para el C₃₃ (114.85 vs. 126.7 mg/kg MS) por Cortes *et al.* (2005), aunque no reportan datos sobre la cantidad de C₃₂ encontrada en *C. dactylon*. Oliveira *et al.* (2007) reportaron contenidos de C₃₃ = 137 mg/kg MS para *C. nlemfuensis*. Por otra parte Bezahib *et al.* (2010) reportan niveles de C₃₂ y C₃₃ (6 y 190 mg/kg MS, respectivamente) para *C. ethiopicus*. Estos últimos, a pesar de ser otras especies, mantienen valores similares en la concentración de C₃₃, uno de los alcanos más abundantes en las plantas forrajeras.

Tabla 2. Perfiles de alcanos encontrados en las dietas y heces de los animales en experimentación (mg/kg MS).

	Alcanos (mg/kg MS)			
	Cd	Cl	Lc	Lm
Dietas				
C ₃₂	8.93	8.64	8.34	8.05
C ₃₃	114.85	98.45	81.54	65.14
Heces				
C ₃₂	130.37	141.45	163.28	169.83
C ₃₃	221.73	209.38	196.21	167.49

Tabla 3. Comparación de diferentes métodos para medir el consumo de materia seca, la digestibilidad y la producción fecal de diferentes dietas.

Variable:	Métodos:			
	<i>In vivo</i>	Alc - sc	Alc - c	Cr ₂ O ₃
Digestibilidad	0.546** (5.092)	0.541** (4.380)	0.536** (3.997)	0.573** (5.096)
Consumo	5.162 (0.799)	5.181 (1.203)	5.202** (1.859)	6.490 (4.543)
Producción fecal	2.344** (6.507)	2.069** (5.225)	2.096** (4.724)	2.954** (4.762)
Digestibilidad de los nutrientes				
N	48.865 (8.333)	54.893 (5.845)	54.395 (5.561)	48.818 (8.306)
FDN	55.936* (4.192)	66.237 (3.330)	65.869 3.731	61.659* (3.822)
FDA	53.193* (3.413)	64.148** (2.023)	63.765* (2.728)	59.275** (1.951)

*(P<0.05), **(P<0.01)

(CV) – coeficiente de variación.

Alc – sc – alcanos sin corregir por recuperación fecal incompleta.

Alc – c – alcanos corregidos por recuperación fecal incompleta.

Tabla 4. Efecto de la dieta sobre parámetros estimados.

Parámetro:	Dietas			
	Cd	Cl	Lc	Lm
Digestibilidad aparente (%)				
CT	0.4703 ^c	0.5233 ^b	0.5729 ^a	0.6178 ^a
Alc – sc	0.4724 ^d	0.5137 ^c	0.5667 ^b	0.6125 ^a
Alc – c	0.4748 ^c	0.5037 ^c	0.5602 ^b	0.6070 ^a
Cr ₂ O ₃	0.4936 ^c	0.5495 ^b	0.6015 ^a	0.6487 ^a
Consumo (kg MS/d)				
CT	5.1866 ^a	5.1710 ^a	5.1559 ^a	5.1362 ^a
Alc – sc	5.1281 ^b	5.1485 ^b	5.1707 ^{a,b}	5.2772 ^a
Alc – c	5.0704 ^b	5.1440 ^b	5.1703 ^b	5.4233 ^a
Cr ₂ O ₃	6.6350 ^a	6.5220 ^a	6.5640 ^a	6.2400 ^a
Producción fecal (kg MS/d)				
CT	2.7482 ^a	2.4641 ^b	2.2021 ^{b,c}	1.9628 ^c
Alc – sc	2.3466 ^a	2.1879 ^a	1.9523 ^b	1.7912 ^b
Alc – c	2.3131 ^a	2.2323 ^a	1.9799 ^b	1.8607 ^b
Cr ₂ O ₃	3.5167 ^a	3.1122 ^b	2.8030 ^c	2.3865 ^d

CT – colección total (*in vivo*)

Alc – sc – alcanos sin corregir por recuperación fecal incompleta.

Alc – c – alcanos corregidos por recuperación fecal incompleta.

^{a,b,c,d}. Literales diferentes indican diferencia estadística (P<0.05)

Si se desea realizar una estimación confiable del CMS, se sugiere que la concentración de los alcanos naturales de cadena impar debe exceder 50 mg/kg MS (Laredo et al., 1991). Esto explica parcialmente porque C₃₃ es el alcano natural más ampliamente usado para estimar el CMS y la DAMS (Mayes *et al.*, 1986; Dove y Mayes, 1991, 1996). La concentración de los alcanos impares en heces fue mayor que en las muestras de las dietas (Tabla 2), como era de esperarse por el mayor contenido de MS. Sin embargo, la presencia de C₃₂ en heces es debido

al suministro de este en las cápsulas de gelatina, dado que las dietas estaban prácticamente desprovistas de C₃₂.

Conclusiones:

- El óxido crómico (Cr_2O_3) sobre-estima el consumo, la digestibilidad y producción fecal de novillos Holstein-Brahman alimentados con henos de Bermuda cv. Cruza II y Ballico anual.
- El uso de n-alcanos permite estimar con precisión el consumo y la digestibilidad de dietas a base de henos de Bermuda cv. Cruza II y Ballico anual.

Literatura Citada.

- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 17th ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA.
- Berry, N.R., M.R.L. Scheeder, F. Sutter, T.F. Krober, and M. Kreuzer. 2000. The accuracy of intake estimation based on the use of alkane controlled-release capsules and faeces grab sampling in cows. *Ann. Zootech.* 49: 3-13.
- Boadi, D.A., S.A. Moshtaghi Nia, K.M. Wittenberg, and W.P. McCaughey. 2002. The nalkane profile of some native and cultivated forages in Canada. *Can. J. Anim. Sci.* 82:465-469.
- Brandyberry, S.D., R.C. Cochran, E.S. Vanzant, and D.L. Harmon. 1991. Technical note: Effectiveness of different methods of continuous marker administration for estimating fecal output. *J. Anim. Sci.* 69:4611-4616.
- Bugalho, M.N., H. Dove, W. Kelman, J.T. Wood, and R.W. Mayes. 2004. Plant wax alkanes and alcohols as herbivore diet composition markers. *J. Range Manag.* 57:259-268.
- Buntix, S.E., K.R. Pond, D.S. Fisher, and J.C. Burns. 1992. Evaluation of the captec chrome controlled-release device for the estimation of fecal output by grazing sheep. *J. Anim. Sci.* 70:2243-2249.
- Burns, J.C., K.R. Pond, and D.S. Fisher. 1994. Measurement of forage intake. Pages 494-532, in *Forage Quality, Evaluation, and Utilization*. G.C. Fahey, Jr., M. Collins,
- D.R. Mertens, and L.E. Moser, eds. Am. Soc. of Agron. Inc; Crop Sci. Soc. Am. Inc; Soil Sci. Soc. Am. Inc., Madison, WI, USA.
- Casson, T., J.B. Rowe, C.W. Thorn, and D. Harris. 1984. The use of natural n-alkanes in medic and clover as indigestible markers. Page 462 in the 18th *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*

- Dove, H., and R.W. Mayes. 1991. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: A Review. *Aust. J. Agric. Res.* 42: 913-952.
- Dove, H., and R.W. Mayes. 1996. Plant wax components: A new approach to estimating intake and diet composition in herbivores. *J. Nutr.* 126: 13-26.
- Dove, H., R.W. Mayes, C.S. Lamb, and K.L. Ellis. 2002. Factors influencing the release rate of alkanes from an intra-ruminal controlled-release device, and the resultant accuracy of intake estimation in sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 53: 681-696.
- Ehle, F.R., F. Bass, B. Barno, R. Martin, and F. Leone. 1984. Particulate rumen turnover rate measurement as influenced by density of passage marker. *J. Dairy Sci.* 67: 2910-2913.
- Ellis, W.C., C. Lascano, R. Teeter, and F.N. Owens. 1980. Solute and particulate flow markers. Page 37 in *Protein Requirements for Cattle*. F.N. Owens, ed. Proc. of an Int. Symp., Oklahoma State University. Stillwater, OK. USA.
- Hatfield, P.G., J.W. Walker, H.A. Glimp, and D.C. Adams. 1991. Effect of level of intake and supplemental barley on marker estimates of fecal output using an intraruminal continuous-release chromic oxide bolus. *J. Anim. Sci.* 69:1788-1794.
- Hendricksen, R.E., M.M. Reich, R.F. Robertson, D.J. Reid, C. Gazzola, J.A. Rideout, and R.A. Hill. 2002. Estimating the voluntary intake and digestibility of buffel-grass and lucerne hays offered to Brahman-cross cattle using n-alkanes. *Anim. Sci.* 74:567-577.
- Laredo, M.A., G.D. Simpson, D.J. Minson, and C.G. Orpin. 1991. The potential of using n-alkanes in tropical forages as a marker for the determination of dry matter for grazing ruminants. *J. Agric. Sci.* 117:355-361.

- Le Du, Y.L.P., and P.D. Penning. 1982. Animal based techniques for estimating herbage intake. Pages 37-75 in *Herbage Intake Handbook*. J.D. Leaver, ed. Br. Grassl. Soc., Berkshire, UK.
- Lewis, R.M., A.M. Magadlela, N.S. Jessop, and G.C. Emmans. 2002. The ability of the n-alkane technique to estimate intake and diet choice of sheep. *Anim. Sci.* 77:319-327.
- Littell, R.C., W.W. Stroup, and R.J. Freund. 2002. *SAS for linear models*. 4th ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.
- Luginbuhl, J.M., K.R. Pond, J.C. Burns, and D.S. Fisher. 1994. Evaluation of the captec controlled-release chromic oxide capsule for fecal output determination in sheep. *J. Anim. Sci.* 72:1375-1380.
- Malossini, F., E. Piasentier, and S. Bovolenta. 1990. N-alkane content of some forages. *J. Sci. Food Agric.* 53:405-409.
- Marais, J.P. 2000. Use of markers. Pages 255-277 in *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. J.P.F. D'Mello, ed. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Mayes, R.W., C.S. Lamb, and P.M. Colgrove. 1986. The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake. *J. Agric. Sci.* 107:161-170.
- Mayes, R.W., H. Dove, X.B. Chen, and J.A. Guada. 1995. Advances in the use of fecal and urinary markers for measuring diet composition, herbage intake, and nutrient utilisation in herbivores. Page 381 in *Recent Developments in the Nutrition of Herbivores*. Proc. 4th Int. Symp. Nutr. of Herbivores. Journet, M., E. Grenet, M.H. Farce, M. Theriez, and C. Demarquilly, eds. Institut National de la Recherche Agronomique. France.
- Merchen, N.R. 1988. Digestion, absorption, and excretion in ruminants. Pages 172-201 in *The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition*. D.C. Church, ed. Waveland Press Inc., IL. USA.

- Milne, J.A. 2001. Research on forage quality: Progress and priorities. Page 357 in Proc. 19th Int. Grassl. Cong., Sao Paulo, Brazil.
- Momont, P.A., R.J. Pruitt, R.J. Emerick, and R.H. Pritchard. 1994. Controlled release chromic oxide and alkaline peroxide lignin marker methods. *J. Range Manag.* 47:418-423.
- Moore, J.E., and D.J. Undersander. 2002. A proposal for replacing relative feed value with an alternative: Relative forage quality. Page 171 in Proc. 11th Am. Forage and Grassl. Counc. Cong., Bloomington, MN, USA.
- Moshtaghi Nia, S.A., and K.M. Wittenberg. 2002. Evaluation of n-alkanes as markers for estimation of dry matter intake and digestibility in steers consuming all-forage or forage-concentrate diets. *Can. J. Anim. Sci.* 82:419-425.
- Muchojev, R.M.C., V.G. Allen, D.C. Mertenz, L.W. Zelazny, and D.R. Notter. 1986. Aluminum, citric acid, nitrilotriacetic acid, and soil moisture effects on aluminum and iron concentrations in ryegrass. *Agron. J.* 78:138-145
- Ojahuruka, O.A., and D.L. Palmkist. 1991. Evaluation of n-alkanes as digesta markers in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 69:1726-1732.
- Owens, F.N., and C.F. Hanson. 1992. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *J. Dairy Sci.* 75: 2605-2617.
- Parker, W.J., S.N. McCutcheon, D.H. Carr. 1989. Effect of herbage type and level of intake on the release of chromic oxide from intraruminal controlled release capsules in sheep. *N. Z. J. Agric. Res.* 32:537-546.
- Piasentier, E., S. Bovolenta, F. Malossini, and Susmel. 1995. Comparison of n-alkanes or chromium oxide methods for estimation of herbage intake by sheep. *Small Ruminant Res.* 18:27-32.
- Pond, K. R., J. M. Luginbuhl, J. C. Burns, D. S. Fisher, and S. Buntix. 1990. Estimating intake using rare earth markers and controlled release devices.

Page 73 in Proc. 45th Southern Pasture and Crop Improvement Conf. Little Rock, Arkansas, USA.

Sandberg, R.E., D.C. Adams, T.J. Klopfeinstein, and R.J. Grant. 2000. N-alkane as an internal marker for predicting digestibility of forages. *J. Range Manag.* 53: 159-163.

SAS Inst. Inc. 2001. Software release 8.2 (TS2MO). Licensed to Virginia Polytechnic Institute and State University. Cary, NC. U.S.A.

Schneider, B.H., and W.P. Flatt. 1975. *The Evaluation of Feeds through Digestibility Experiments.* The University of Georgia Press. Athens, GA, USA.

Sollenberger, L.E., and D.J.R. Cherney. 1995. Evaluating forage production and quality. Pages 97-110 in *Forages. Vol II: The Science of Grassland Agriculture*, 5th ed. R.F Barnes, D.A. Miller, and C.J. Nelson, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

Van Soest, P.J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant.* 2nd ed. Cornell University Press. Ithaca, NY.

Vulich, S.A., E.G. O'Riordan, and J.P. Hanrahan. 1991. Use of n-alkanes for the estimation of herbage intake in sheep. Accuracy and precision of the estimates. *J. Agric. Sci.* 116:319-323.