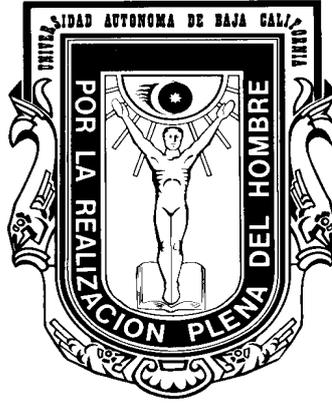


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL



**INFLUENCIA DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y DILUCIÓN DE LA
SOLUCIÓN DETERGENTE SOBRE LA DETERMINACIÓN DE FIBRA
DETERGENTE ÁCIDA (FDA), CELULOSA Y LIGNINA EN
INGREDIENTES UTILIZADOS PARA RUMIANTES**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS
DE PRODUCCIÓN ANIMAL**

**PRESENTA
JOSÉ ALONSO GALEANA**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ENRIQUE G. ÁLVAREZ ALMORA**

MEXICALI, B. C.

DICIEMBRE DE 2009

La presente tesis titulada “**Influencia del método de extracción y dilución de la solución detergente sobre la determinación de fibra detergente ácida (FDA), celulosa y lignina en ingredientes utilizados para rumiantes**”, realizada por el C. **José Alonso Galeana**; fue dirigida y asesorada por el **Dr. Enrique G. Álvarez Almora**, siendo aceptada, revisada y aprobada por el Consejo Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Consejo Particular

PRESIDENTE

Dr. Enrique Gilberto. Álvarez Almora.

SECRETARIO

Dr. Alejandro Plascencia.Jorquera

SINODAL

M.C. Juan Rodríguez García

“POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE”

Ejido Nuevo León, Mexicali Baja California, México; Diciembre de 2009

AGRADECIMIENTOS

- Al consejo de Ciencia y tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado con el cual me fue posible realizar esta maestría.
- A la Universidad Autónoma de Baja California, al Instituto de Ciencias Agrícolas por permitirme seguir con mi superación personal y académica.
- Al Dr. Enrique Álvarez Almora por ser el director del presente trabajo, por sus enseñanzas y por su amistad.
- Al M.C. Juan Rodríguez García y al Dr. Alejandro Plascencia por su valiosa cooperación en el presente trabajo, por su amistad y por ser excelentes maestros.
- Al Ph. D. Gerald Huntington y Carrie por facilitarme el uso de su laboratorio para el análisis de muestras de este experimento.
- A los Drs. Miguel Cervantes Ramírez y Soto por sus apoyo brindado durante mi estancia en esta casa de estudios.
- A las encargadas del laboratorio de nutrición animal Esmeralda Rodríguez y Graciela Ortiz por su colaboración en los análisis de laboratorio de este experimento, al igual que a Sandra Rojas por su apoyo y amistad.
- A los Srs. Delfino Torres, Regalado, Fernando, Bernardo y muchos más trabajadores del ICA que me brindaron su ayuda y amistad durante mi estancia.
- A los alumnos y compañeros, que por mencionar algunos Juan Augusto, Juan Octavio, Jesús Valdés, Martín Carmona entre muchos más con quienes compartí momentos inolvidables, gracias por ofrecerme su amistad.
- A mis padres, hermanos, familiares, amigos y personas que han colaborado económica y moralmente para lograr esta meta y todas las anteriores que me permitieron llegar hasta este momento. Muchas gracias por su invaluable apoyo.

DEDICATORIAS

A Dios por darme la vida y fortaleza para llegar a este momento.

A mis padres Cirilo Alonso L. y Cecilia Galeana V. por darme la vida, por enseñarme a trabajar, y a luchar por metas que me propuesto en mi formación y preparación para entender y afrontar la vida, y por todos los esfuerzos que juntos han logrado para sacarme adelante.

A mi hermana Gabriela Alonso G. y hermanos Sebastián Alonso G., Magdaleno Alonso G., Alberto Alonso G., Victorino Alonso G. y Élfedo Alonso G. por su apoyo económico, moral y afecto, por impulsarme a lograr mis metas.

Y a toda mi familia, amigos y personas, que han estado junto a mí y que han colaborado económica y moralmente para que yo lograra escalar cada uno de los peldaños anteriores para ahora lograr estar aquí

.

RESUMEN

DETERMINACIÓN DE FIBRA DETERGENTE ÁCIDA (FDA), CELULOSA Y LIGNINA MEDIANTE LA DILUCIÓN DE LA SOLUCIÓN FDA EN DIFERENTES INGREDIENTES DE ALIMENTOS PARA RUMIANTES

Para evaluar la extracción de FDA usando el procedimiento de Chai y Udén (1998) para extraer FDN, se comparó con los procedimientos de Goering y Van Soest (1991) y Komareck (1992) en un total de 25 muestras integradas por dos gramíneas tropicales, cinco gramíneas templadas, tres leguminosas, seis concentrados, cuatro pajas fibrosas, tres muestras duodenales y dos heces. La segunda fase comprendió el impacto del tamaño de partícula y la diferente dilución sobre los valores de FDA. La tercera etapa consistió en la comparación del método de Komareck con el estándar de Goering y Van Soest para medir secuencialmente celulosa y lignina. El procedimiento de Chai y Udén (**CHAI**; 1998) convencionalmente usado para cuantificar fibra detergente neutra, fue adaptado para extraer FDA en el presente estudio. Esta modificación consistió en diluir la solución estándar FDA de Van Soest (1964) en concentraciones del 50, 75, y 100% con agua destilada. El método de Van Soest (1967), se tomó como el procedimiento estándar para análisis de FDA y lignina detergente ácida (LDA). La modificación de Komarek et al., (**AKM**; 1993) se usó también como referencia para los análisis de FDA y se usó para extraer secuencialmente celulosa y lignina.

Los resultados se analizaron por separado en las diferentes fases. En la primera se utilizó un diseño completamente al azar, donde los tratamientos fueron la combinación de diluciones y métodos; los datos se analizaron por separado para cada tipo de ingrediente. En la segunda, utilizando el mismo diseño completamente al azar los tratamientos se establecieron por la

combinación de los factores tamaño de partícula y nivel de dilución. La tercera etapa se analizó con el mismo diseño estadístico, por separado para cada tipo de ingrediente. Al comparar las diferencias absolutas y relativas con dependencia en la concentración de la solución FDA, se observó mayor variación para el método de CHAI cuando la concentración de la solución únicamente fue del 50%. Se encontraron diferencias ($P < 0.01$) cuando al considerar el tipo de ingrediente en los métodos de CHAI y AKM, en cambio con la concentración de la solución no se percibieron diferencias ($P > 0.01$). Por lo tanto, disminuir la concentración de la solución en análisis de FDA no provoca tanta variación como la causada por el tipo de ingrediente.

La intensidad del molido y la dilución de la solución FDA no afectaron ($P > 0.05$) la extracción secuencial de celulosa y lignina; sin embargo, las muestras que fueron tratadas con el 75% de la concentración de la solución, mostraron un coeficiente de variación más alto respecto al 100% de la concentración. Lo anterior reafirma que al disminuir la concentración de la solución FDA se posibilita un mayor impacto negativo de factores como tamaño de la muestra o por diferenciales en la composición química de los ingredientes.

Palabras claves. Celulosa, Dilución de la solución FDA, Extracción, Fibra detergente ácida, Lignina.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
SUMMARY.....	vi
CONTENIDO.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1. Concepto de la fibra.....	4
1.1. Atributos de la fibra.....	6
1.2. Fibra de la dieta y su significado nutricional.....	8
2. Clasificación de los carbohidratos.....	11
2.1. Por su composición química.....	11
2.2. Por su utilización, digestión y solubilidad.....	22
3. Postulados de los sistemas analíticos para la evaluación de los alimentos.....	25
3.1. Sistema proximal o de Weende.....	25
3.2. Sistema detergente o Método de Van Soest.....	28
4. Bases para modificar el sistema detergente.....	30
4.1. Causales de modificación.....	30
4.1.1. Interferencia de los componentes intrínsecos.....	30
4.1.2. Peligrosidad y costo de los reactivos.....	33
4.2. Criterios para seleccionar un método.....	36
4.2.1. Variabilidad de los resultados.....	36
4.2.2. Extracción diferencial de otros componentes.....	38
4.3. Factores que modifican la extracción de la fibra detergente.....	40
4.3.1. Tamaño de la muestra.....	40
4.3.2. Reactivos y su concentración.....	41
4.3.3. Tamaño de la partícula.....	43
MATERIALES Y METODOS.....	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	61

LITERATURA CITADA.....	62
APÉNDICE.....	68

LISTA DE CUADROS

No.	Pág.
Cuadro 1. Valores de fibra detergente ácida (FDA) y diferencias absolutas y relativas respecto al método estándar de Van Soest (VSO ; 1967) para los diferentes tipos de muestras usando el procedimiento de Chai y Udén (CHAI ; 1998) y Komarek (AKM ; 1993).....	50
Cuadro 2. Medias de mínimos cuadrados de los valores de fibra detergente ácida (FDA) y sus respectivas diferencias (absoluta y relativa) con dependencia en la concentración de la solución FDA (50, 75 y 100%) en los dos procedimientos de análisis (Chai y Udén, CHAI ;1998 y Komarek, AKM ; 1993).....	51
Cuadro 3. Promedios de los valores de fibra detergente ácida (FDA) obtenidos con cada uno de los métodos (Van Soest, VSO ; 1967, Chai y Udén, CHAI ; 1998 y Komarek, AKM ; 1993) y las diferentes concentraciones (50, 75 y 100%) de la solución FDA utilizados en el presente experimento.....	53
Cuadro 4. Probabilidades de F ligadas a los componentes del modelo para explicar la variación en los valores de fibra detergente ácida (FDA) y sus diferencias respecto al Método Van Soest (1967) y significancia de los contrastes establecidos para los tratamientos.....	55
Cuadro 5. Influencia de la intensidad del molido (Gruoso, C o Fino, F) y la concentración de la solución fibra detergente ácida FDA (50, 75 y 100%) sobre la extracción de FDA, celulosa y lignina en gramíneas de clima tropical, concentrados, pajas y muestras de heces.....	58

LISTA DE FIGURAS

No.	Pág.
Figura 1. Coeficiente de variación en la extracción de fibra detergente ácida (FDA) de varios ingredientes de alimentos provocado por el tamaño de partícula (Grueso y Fino) y la concentración de la solución FDA al 75%.....	59
Figura 2. Coeficiente de variación en la extracción de fibra detergente ácida (FDA) de varios ingredientes de alimentos provocado por el tamaño de partícula (Grueso y Fino) y la concentración de la solución FDA al 100%.....	60

INTRODUCCIÓN

La concentración de la fibra ha sido una medida útil para describir y estimar el valor energético de los alimentos para rumiantes. Uno de los más importantes métodos en el análisis de fibra es el sistema detergente, el cual fue propuesto en los 60's por Peter Van Soest, Investigador del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en la unidad de Beltsville (MD, USA). Una histórica descripción del desarrollo del sistema detergente ha sido previamente publicada por Udén *et al.* (2005). Inicialmente el método original fue desarrollado para determinar fibra detergente ácida (FDA) y fibra detergente neutro (FDN) en muestras de forrajes. Posteriormente este sistema se ha aplicado a una amplia variedad de alimentos, lo que provocó ciertas modificaciones al procedimiento, como fue la adición de amilasa y sulfito de sodio, necesarios en concentrados energéticos y proteicos respectivamente (Van Soest, *et al.*, 1991, Cherney *et al.*, 1989, Krueger *et al.*, 1999) o la pre-extracción con acetona en alimentos con alto contenido de lípidos (Van Soest, *et al.*, 1991, Undersander *et al.*, 1993), así como la eliminación de reactivos riesgosos para la salud como el decalin y 2-ethoxietanol (Golding, *et al.*, 1985). Otras modificaciones se han realizado con el objetivo de simplificar el procedimiento como en el caso del sistema Ankom Technology Corp. con el cual se logra analizar mayor número de muestras en menor tiempo, además de ser menos laborioso (Komarek, 1993). Sin embargo este sistema tiene la desventaja de ser muy costoso y difícil la adquisición del equipo en países subdesarrollados, además de que indiscriminadamente este método es utilizado para análisis de FDN y FDA usando el mismo equipo, material y procedimiento a excepción de los reactivos.

Chai y Udén (1998) en la búsqueda de un método más sencillo, pero sobre todo más económico, propusieron una modificación al sistema detergente para extraer FDN que consiste en diluir la concentración de la solución FDN estándar de Van Soest et al. (1991), quienes lograron extraer los componentes fibrosos de forrajes hasta con el 25% de la concentración de la solución. Sin embargo, se ha observado que las variantes o modificaciones de los procedimientos son una fuente importante de variación, por lo que es necesario garantizar exactitud y precisión de los resultados en cada una de las modificaciones propuestas.

El objetivo general de este trabajo es proponer una modificación al método de Van Soest basada en el procedimiento publicado por Chai y Uden (1998) para extraer FDA, celulosa y lignina, utilizando tres niveles de dilución de la solución detergente ácida.

Los objetivos específicos fueron:

- Evaluar las concentraciones del 50 y 75% de solución original FDA de Van Soest (1963) para extraer la fracción fibrosa indigestible en muestras representativas de gramíneas templadas y tropicales, leguminosas, concentrados proteicos y energéticos y en muestras de metabolismo digestivo.
- Comparar la capacidad de extracción de celulosa y lignina en residuo obtenido con el procedimiento tradicional de FDA de Van Soest (1963), el método de ANKOM y las diferentes diluciones de FDA.

HIPOTESIS

Los valores de fibra detergente ácida (FDA) no serán diferentes cuando son obtenidos a menor concentración de la solución FDA, por lo tanto con diluciones de hasta un 50 % de la solución original de FDA de Van Soest (1967) se obtendrán valores similares de FDA, celulosa y lignina.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Concepto de fibra

El concepto de fibra ha evolucionado a través de los años inicialmente la fibra fue vista como una porción sin valor nutritivo en los alimentos (Thaer, 1809; Henneberg, 1859. Citados por Van Soest, 1967). Hipsley (1953) fue el primero en usar el término *fibra de la dieta* para describir a los componentes indigestibles que constituyen la pared celular de la planta. De Vries, *et al.* (1999) mencionan que el uso del término *fibra de la dieta* fue un intento claro para diferenciarla de algunos constituyentes fibrosos de los alimentos como la celulosa, hemicelulosa y lignina que por entonces se les consideraba medidos por el método de fibra cruda. Burkitt *et al.* (1972) y Trowell (1974) desarrollaron el concepto de fibra dietaría en humanos para describir los “componentes de la pared celular de plantas que son resistentes a la hidrólisis por enzimas digestivas de los mamíferos”. Más tarde Trowell *et al.* (1976) ampliaron la definición de fibra dietaría para incluir todos los polisacáridos, tal como gomas y mucílagos provenientes de la pared celular de la planta. Estas definiciones que limitan el término de fibra dietaría a los componentes de los alimentos que no pueden ser digeridos por las enzimas de animales mamíferos, puede ser excesivamente restringido para animales rumiantes o herbívoros, los cuales tienen una relación simbiótica con microorganismos digestivos y otras adaptaciones de la fisiología digestiva que aumenta significativamente la digestión de la fibra dietaría (De Vries, *et al.*, 1999; Mertens, 2003).

En la definición que AOAC se basa para aprobar los métodos oficiales para análisis de fibra desde 1981 es la siguiente: "*Fibra dietaría consiste de los restos comestibles de la célula de la planta, polisacáridos, ligninas y sustancias asociadas resistentes a (hidrolisis) digestión por las enzimas del sistema digestivo de los humanos*" (AACC., 2001).

Mertens (1985) propuso que la fibra dietaría para herbívoros es definida como la "porción de los alimentos indigestible o lentamente indigestible que ocupa espacio en el tracto gastrointestinal". Sin embargo para eliminar de la fibra dietaría la ceniza indigestible, esta definición deberá ser modificada a "materia orgánica de los alimentos indigestible o lentamente digestible que ocupa espacio en el tracto gastrointestinal", para incluir únicamente la materia orgánica (Mertens, 2003). Esta definición excluye los polisacáridos de la pared celular de la planta que son rápidamente fermentados (tal como pectinas) y polisacáridos solubles que no ocupan espacio en un ambiente líquido (tal como fructanos y gomas), pero incluye los complejos polisacáridos lentamente fermentables en el tracto digestivo de los herbívoros (tal como celulosa y hemicelulosa). Esencialmente, esta definición de fibra dietaría está más restringida para describir la fibra dietaría insoluble, la cual son los componentes de los alimentos que tienen variable digestibilidad y afectan la digestibilidad de la materia orgánica o la digestibilidad de la materia seca total de alimento en dietas para rumiantes. En cambio la fibra dietaría soluble que es rápidamente fermentable tiene similar digestibilidad que los componentes del contenido celular de la planta. La fibra de la dieta insoluble afecta la tasa de pasaje y digestibilidad en las dietas de todos los animales; el

hecho de que ocupa espacio en el rumen y requiere de mayor masticación para reducir el tamaño de partícula para pasar a través del tracto gastrointestinal, hace que sea más interesante que la fibra dietaria soluble (Van Soest *et al.*, 1991).

1.1. Atributos de la fibra

Los atributos específicos de los componentes fibrosos de los forrajes están comprendidos en el término de fibra detergente neutro efectiva (FDNe) que se define como la capacidad de la fibra para mantener un aceptable porcentaje de grasa en la leche y la salud del animal (Zinn y Ware, 2007).

Los rumiantes en general y en particular el ganado productor de leche requieren adecuadas cantidades de fibra insoluble para propiciar un adecuado proceso de rumia y digestión de celulosa (Van Soest *et al.*, 1991) y mantener un nivel aceptable de grasa en la leche (3.5 - 4%). Estos mantienen el pH del rumen y microorganismos celulolíticos que característicamente producen la más adecuada relación de acetato:propionato, necesarios para el metabolismo normal de los lípidos en la vaca. Así el tiempo diario de rumia es directamente proporcional al consumo de FDN.

La FDN está mejor relacionada con consumo y llenado gastrointestinal que alguna otra medida de fibra (FDA, FC), ya que sólo esta recupera los carbohidratos insolubles de la pared celular, incluyendo hemicelulosa (Mertens, 1985; Van Soest *et al.*, 1991).

La cantidad y calidad de la fibra tiene importantes efectos sobre el ambiente del rumen y sobre la eficiencia microbiana deseable. Incluso más allá del tamaño de partícula y niveles adecuados de FDN en la dieta, factores adicionales de capacidad buffer, intercambio de cationes y tasa de fermentación son características importantes de los alimentos y propiedades de la fibra que deben ser consideradas. La tasa de fermentación neta, tipo y cantidad de carbohidratos fibrosos y no fibrosos, junto con N y fuente de proteína interactúan para afectar la función del rumen y la eficiencia microbiana (Varga *et al.*, 1998).

La característica más importante del alimento, además del tamaño de partícula, que contribuye en la funcionalidad del rumen es la capacidad buffer (Mertens, 1996). Esta depende de la capacidad de intercambiar cationes de la fibra y en algún grado, sobre la tasa de fermentación de proteína a amonio. Los grupos de iones intercambiables de la pared celular de las plantas incluyen carboxilos, aminos, hidroxilos alifáticos libres e hidroxilos fenólicos, los cuales tienen alguna afinidad para unirse a iones metales. Los microorganismos que están cargados negativamente a la pared celular de la planta reconocen las partículas fibrosas a través de su superficie intercambiable y forman conexiones las cuales requieren cationes divalentes. El intercambio de cationes es la capacidad de la fibra para unir iones metales sobre su superficie. Estos iones metal (K^+ , Ca^{++} , Na^+ y Mg^{++}) son intercambiados por iones de H^+ , así evitando caídas fuertes del pH ruminal.

La capacidad buffer de los alimentos deriva en parte de los efectos físicos que ellos provocan al rumen y sobre el proceso de rumia, porque la fermentación de carbohidratos conduce inevitablemente a la producción de grandes cantidades de ácidos grasos volátiles (AGV); su supresión por absorción y el reciclamiento de iones minerales son procesos esenciales en el mantenimiento del pH y ambiente normal del rumen. La fibra es la de más lenta digestión entre las fracciones solidas y contribuye en un mayor grado al mantenimiento del ambiente en rumen. Alimentos más rápidamente fermentables producen ácidos orgánicos a más rápidas velocidades, comprometiendo así el sistema buffer a mayor grado (Mertens, 1997 y Righi, *et al.*, 2008).

Los forrajes de leguminosas maduras son los ingredientes más eficientes en la dieta para suministrar capacidad buffer; el ensilado de maíz tiene solo una tercera parte de la capacidad buffer de la alfalfa (Van Soest 1991).

1.2. Fibra de la dieta y su significado nutricional

La fibra es un componente esencial que debe ser considerado en la dieta de los rumiantes. La principal fuente de fibra en la dieta de los rumiantes son los forrajes. Se ha demostrado ampliamente que la cantidad y forma física de la fibra dietaría son importantes en la ración del ganado productor de leche y carne para mantener apropiadamente la función del rumen, estatus de salud del animal y el contenido de grasa en leche (Allen, 1997; Armentano y Pereira 1997).

Inicialmente la definición de la FDNe fue desarrollada para formular raciones que mantuvieran un aceptable porcentaje de grasa y la salud del animal. Mertens (1997) define la FDNe como la "fracción del alimento que estimula la masticación y contribuye a la estratificación bifásica del contenido ruminal" y la fibra detergente neutro físicamente efectiva (FDNfe) como la "fracción del alimento que tiene la capacidad de mantener eficientemente el porcentaje de grasa en la leche".

La principal característica física relacionada con la FDNe es el tamaño de partícula. Si el alimento como fuente de fibra es cortado o molido finamente puede no ser efectiva para promover la salud del rumen. Es bien sabido que dietas deficientes en fibra pueden causar daños a la pared celular del rumen tales como inflamación y laceración de la mucosa e hiperparaqueratosis. La eficiencia de la fibra para mantener la salud del rumen está relacionada positivamente con el tamaño de partícula. Las partículas finamente molidas pasan rápidamente a través del sistema digestivo y pueden no reunir los requerimientos de fibra efectiva en rumiante (Parish, 2007). Mertens (1986), propuso que la FDNfe debería ser cuantificada como el porcentaje de FDN de alimento en base seca que queda sobre un cedazo con malla de 1.88 mm después de que este es sacudido. El sentido de esto es porque las partículas más pequeñas abandonan rápidamente el rumen y proveen poco estímulo a la masticación. De esta manera la respuesta medible del animal asociada con la FDNfe es la actividad de masticación; así, la FDNfe de un alimento es el producto de su concentración de FDN y su factor de eficiencia física (Fef). El valor de Fef varía de cero, cuando la FDN no es eficiente

para estimular la actividad de masticación a uno, cuando la FDN es completamente eficiente en promover la masticación ($FDN_{fe} = F_{ef} * FDN$) (Mertens, 1997).

Zinn y Ware (2007) y Mertens, 1997) mencionan que las cualidades físico-químicas de la fibra incluyen principalmente: tamaño de partícula, densidad, y fragilidad o facilidad para reducir el tamaño de partícula a través de la masticación y la digestión. Kononoff, (1995) menciona que al incrementar el nivel y tamaño de partícula en la dieta se incrementan la actividad de la masticación, el flujo de saliva, el pH del rumen, la proporción acetato:propionato y los niveles de grasa en la leche.

La importancia de estimular la masticación es para aumentar el flujo de saliva, que tienen capacidad tampón del pH ruminal. Suficientes niveles de fibra efectiva en la dieta son importantes para estimular la masticación y rumia, y consecuentemente mantener adecuados niveles de pH ruminal. El tiempo empleado para la masticación y rumia depende del contenido en pared celular, de tal manera que a mayor contenido en fibra, mayor tiempo de masticación, y en consecuencia, mayor secreción de saliva (Yang and Beauchemin, 2007). Además, la forma de presentación del forraje juega un papel fundamental en la cantidad de saliva segregada, siendo mayor en el heno, intermedio en el ensilado y pasto, y bajo en forrajes en forma de pellet. El tamaño de partícula también afecta el tiempo de masticación y rumia, con el consecuente efecto sobre la producción de saliva.

Cuando el pH se encuentra por debajo de 5.7 se reduce dramáticamente el consumo de materia seca. Esto sucede cuando los niveles de fibra efectiva en la dieta son bajos, sobre todo en las dietas para ganado de engorda donde la fuente principal de alimento son los granos. Cuando bajos niveles de pH son mantenidos por largos periodos de tiempo puede cambiar la población microbiana del rumen, favoreciendo las bacterias que producen altos niveles de ácido láctico y entonces podrá ocurrir acidosis aguda o subaguda, las cuales son un gran problema para la industria lechera en términos de pérdida en la eficiencia productiva, incrementando costos por tratamiento de animales enfermos y reduciendo la longevidad de las vacas (Yang y Beauchemin, 2007).

La FDNfe recomendada para mantener un pH ruminal de 6.0 es 22% de la MS en dietas para vacas lecheras (Mertens, 1997). El NRC (1996) propone hasta el 25 % de FDNe puede ser requerida en ganado de carne para mantener un adecuado pH ruminal. Las dietas altas en grano con bajos componentes fibrosos a menudo reducen el pH del rumen. Los requerimientos de FDNe en dietas energéticas que se consideran necesarios para mantener el pH por encima de 5.7 son de 8% como mínimo. Se ha observado que el pH por debajo de ese valor reduce dramáticamente el consumo voluntario de materia seca.

2. Clasificación de los carbohidratos.

2.1. Por su composición química

Los carbohidratos son el principal depósito de energía fotosintética en plantas y comprenden aproximadamente del 50-80% de la materia seca de los

forrajes y cereales (Aps, 1996). Las características nutritivas de estos son variables dependiendo de la composición de los azúcares y el tipo de enlace. La clasificación química de los carbohidratos de la dieta está basada sobre el tamaño molecular, así como el grado de polimerización (DP), tipo de enlace (α o no α) y carácter de los monómeros individuales. Esta clasificación divide a los carbohidratos en tres principales grupos, azúcares (DP1-2), oligosacáridos (DP3-9) y polisacáridos (DP \geq 10). Los azúcares comprenden (i) monosacáridos, (ii) disacáridos, (iii) polialcoholes (azúcares-alcoholes). Los oligosacáridos son ambos (a) malto-oligosacáridos (α -glucanos), principalmente resultante de la hidrólisis del almidón y (b) no α -glucanos, tal como rafinosa y estaquiosa (α -galactósidos), fructo y galacto-oligosacáridos. Los polisacáridos pueden ser divididos en almidón (glucanos α -1:4 y 1:6) y polisacáridos sin almidón (NSPs), de los cuales los mayores componentes son los polisacáridos de la pared celular de las plantas, tal como celulosa, hemicelulosa y pectina, pero también incluyen las gomas, mucilagos e hidrocoloides de las plantas (Englyst y Hudson, 1996, Cummings y Stephen, 2007, Hall, 2007).

Las características nutritivas de los carbohidratos depende de la composición de las moléculas de azúcares y de los enlaces con polifenoles de lignina y otros factores fisicoquímicos y de capacidad de los animales para romper las uniones glucosídicas entre los carbohidratos de la planta y entre estos y otras sustancias (Van Soest, 1994, Cummings y Stephen, 2007).

Azúcares El término “azúcares” es convencionalmente usado para describir los mono- y disacáridos en los alimentos. Muchos azúcares en las plantas están unidos por enlaces glucosídicos para formar moléculas más complejas como disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Estos enlaces unen las moléculas de azúcares o estas con otros componentes como fenoles, lípidos o alcaloides, ácidos nucleídos, péptido, etc. Los complejos moleculares de mayor interés en nutrición animal por su acción inhibitoria y toxicidad son azúcares unidos a fenoles, terpenos o alcaloides.

La forma más estable de los azúcares son cíclica o en forma de anillo con 5 carbonos (furanosa) o 6 carbonos (piranosa). La fructosa, arabinosa y ribosa ocurren invariablemente como furanosas con enlaces glucosídicos. De esta manera la fructosa de 6 carbonos es furanosídica, mientras la xilosa de 5 carbonos es piranosídica. Los enlaces furanosídicos son considerados más débiles que las piranosas, con el resultado de que las furanosas son hidrolizadas relativamente por ácidos débiles y representan sitios débiles en los polisacáridos que los contienen.

Almidón El almidón es el polisacárido más importante de almacenamiento en plantas. Este es clasificado algunas veces con los carbohidratos solubles por sus propiedades de gelatinización y parcial solubilidad en agua caliente. Existen dos tipos de polímeros en almidón: la amilasa lineal consiste de cadenas glucopiranosídicas con enlaces α 1-4 y las ramificadas de cadenas amilopécticas. La ramificación ocurre en el sexto carbono para formar cadenas laterales unidas

con enlaces α 1-4. La proporción de amilasa y amilopectina de los cereales varía con la madurez.

Los dos tipos de enzimas que hidrolizan el almidón son α y β amilasa. La primera rompe las cadenas de almidón aleatoriamente y degrada amilasa y amilopectina. La segunda es una exoenzima que rompe las unidades finales de las cadenas; degrada amilasa, pero es limitada a la periferia de la amilopectina. La amilasa y amilopectina pueden encontrarse en forma cristalizada, lo que dificulta el rompimiento de las moléculas. La aplicación de calor favorece la hidrólisis de gránulos de almidón cristalizados. La temperatura a la cual esto sucede se le conoce como temperatura de gelatinización. La amilasa tiene una mayor fuerza cristalina por lo que requiere más altas temperaturas de gelatinización que la amilopectina. La gelatinización del almidón incrementa la tasa de digestión, la cual puede incrementar la eficiencia del uso de nitrógeno no proteico. Sin embargo los tratamientos de calor al almidón pueden tener efectos negativos y positivos (Englyst *et al.*, 1982; citado por Hall, 2007).

La ineficiencia de utilización del almidón en rumiantes se puede relacionar con el efecto negativo de carbohidratos rápidamente fermentables en rumen, por lo que se producen grandes cantidades de ácido láctico que impactan en el cambio del pH.

Celulosa. Es la celulosa el polisacárido más abundante de la pared celular en todos los forrajes (Delmer, 1999). Este es un polímero de glucosas unidas por

enlaces glucosídicos β -1,4. Son moléculas individuales extremadamente grandes organizadas en paquetes dentro de microfibrillas (Harfield, 1993). La celulosa esta combinada con mayor o menor cantidad de lignina, hemicelulosa, cutina y minerales formando la matriz estructural de pared celular de las plantas.

La disponibilidad nutricional de la celulosa varía de totalmente indigestible a completamente digestible, debido principalmente al grado de lignificación. La lignina es aceptada generalmente como la entidad primaria responsable para limitar la digestión de los forrajes (Barnes y Mertens, 1979; Traxler, 1997). Sin embargo adicionalmente a lignificación hay otros factores inhibitorios y limitantes en los que se incluye el grado de silificación, cutinización y propiedades intrínsecas propias de la celulosa (Van Soest, 1994).

La hidrólisis enzimática de la celulosa es un proceso complejo que requiere la acción cooperativa de un número de proteínas. Tres tipos de enzimas están involucradas en la hidrólisis de la celulosa. La endocelulasa que es producida por todos los microorganismos celulolíticos y es referida también como endo β -1,4-Glucanasa; β -1,4-Glucan-glucanohidrolasa, Carboximetilcelulasa (CMCasa) o Cx-celulasa. Esta enzima es más activa en la celulosa engrosada ácida y en la carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato, pero no degrada eficientemente la celulosa cristalina. Esta produce celodextrinas, celobiosa y glucosa. (Enari, 1983; citado por Mackie y White, 1991).

La hexocelulasa o β -1,4-Glucanasa; β -1,4-Glucan-celobio hidrolasa, avicelasa o C1-celulasa o celobiohidrolasa, es una enzima que es más activa en la celulosa cristalina pero es ineficaz en la carboximetilcelulosa, produce a partir de la celulosa unidades de celobiosa. La β -1,4-Glucosidasa está presente en todos los microorganismos, hidroliza los β -1,4-Glucosidos como la celobiosa, salicina y esculina, a glucosa o a glucosa más residuos aromáticos. La celodextrinasa una enzima común en las bacterias ruminales hidroliza los polímeros solubles de glucosa de cadena larga a seis o siete residuos de celobiosa, celotriosa o ambas (Huang y Forsberg, 1988; citado por Mackie y White, 1991).

Una de las restricciones para la degradación ya sea enzimática o por sistemas químicos es el amplio enlazamiento de hidrógeno que ocurre en las microfibrillas que dan a la celulosa una naturaleza cristalina, en la que con el fin de que la degradación ocurra éstos enlaces tienen que ser separados. La cristalinidad de la fibra es un factor limitante para la hidrólisis de los carbohidratos complejos, por otro lado la degradación es rápida en las regiones no cristalinas y se hace más lenta cuando son atacadas las regiones cristalinas (Hatfield, 1989). El sistema enzimático que ha sido caracterizado en la degradación primaria de los polisacáridos complejos, incluyen celulasas, hemicelulasas, xilanasas y glucanasas mixtas unidas. Los microorganismos ruminales poseen sistemas complejos de enzimas que degradan la celulosa incluyendo β -1,4-D-Glucanasas, esta complejidad es un reflejo de la estructura compleja y conformación rígida de los sustratos lignocelulolíticos (Teather y Ohmiya, 1992).

Hemicelulosa. La hemicelulosa es el polisacárido más complejo de las plantas y el más difícil para comprender. La fracción es una mezcla de polisacáridos complejos con variada composición, a menudo con el más común enlace β 1-4 en la base de polímeros principalmente xilanos, aun que es sus ramificaciones pueden presentarse otros tipos de enlaces glucosídicos. Estas también se adhieren por puentes de hidrogeno a la superficie de las microfibrillas de celulosa mejorando la resistencia de la pared celular. Además está unida covalentemente a los polisacáridos pépticos (Aman, 1993).

La hemicelulosas está formada por monómeros de carbohidratos como hexosas (D -glucosa, D -manosa, D -galactosa), pentosas (D -xilosa, D -arabinosa), deoxiexosas (L -ramnosa) y ácido urónicos (D -ácido glucorónico, 4-D-metil-D-ácido glucorónico) (Cho, *et al.*, 1997). Por su elevada ramificación y poseer grupos polares en los diversos azúcares son fácilmente solubles en agua (Machado, 1997 y Mejía, 2007). El tipo y frecuencia de ramificaciones varía con la especie y estado de desarrollo de la planta. Las hemicelulosas de hojas y tallos de gramíneas y leguminosas parecer ser principalmente arabinoxilanos con asociadas uniones a ácidos glucorónicos y probablemente lignina. Las cadenas de xilanos pueden estar unidas a lignina mediante éster glucorinidicos o directamente a lignina. Los enlaces entre arabinosa y xilosa son 1-3, mientras el ácido urónico puede tener enlaces 1-2, 1-3 o 1-4.

Algunos de los enlaces en hemicelulosa como los éster y 1-3 glucosídicos son susceptibles a agregados alcalinos. Las uniones de éster son hidrolizados

mediante saponificación, y 1-3 glucosídicos son divididos a través de la eliminación de β y la formación de una unión insaturada. Los últimos son particularmente vulnerables incluso a medios alcalinos suaves. Ambos tipos de enlaces se presentan en pectinas y hemicelulosas. Por lo tanto, el método tradicional de extracción alcalina debe producir una degradación extensa.

La digestión de la hemicelulosa es un asunto complejo por su diversificada composición con varios azúcares y enlaces glucosídicos. Además, el carácter de la hemicelulosa difiere conforme se comparan varios forrajes o tipos de células de la pared vegetal. Las enzimas hemicelulolíticas están presentes en líquido ruminal filtrado y tienen la habilidad de romper una variedad de enlaces, éstos son producidos por algunas bacterias ruminales y protozoos ciliados (Van Soest, 1982). El mismo autor señala que todas las enzimas identificadas son del tipo endo que atacan al azar a las cadenas glucosídicas; tales enzimas atacan a las cadenas laterales de la hemicelulosa como D-Glucosiduronidasa que ataca los enlaces D-(1-2) en los glucuronoxilanos y la L-Arabinofuranosidasa que hidroliza el enlace 1-3 en puntos laterales en los arabinoxilanos.

Hespell y Whitehead (1990) indican que la compleja naturaleza química de los xilanos necesitan un número de enzimas microbiales para hidrolizar y metabolizar estos polisacáridos. Las primeras enzimas involucradas en la degradación de los xilanos son las xilanasas, enzimas que atacan al azar las cadenas glucosídicas produciendo una mezcla de xilosa, xilobiosa y xilooligosacáridos de cadena larga, siendo estos últimos aun más degradables. Existe además una xilodextrinasa que

puede romper la xilobiosa y cadenas largas de oligosacáridos, además están presentes una xilosidasa que degrada xilopentosas, algunos microorganismos poseen una fosforilasa que rompe y asimila xilooligosacáridos y xilobiosa permitiendo la producción de energía para la fermentación.

Las xilanasas incluyen la β -D-Xilanasa una endoenzima que ataca los oligómeros pero no los xilanos o la xilobiosa, estas enzimas degradan eficientemente los xilanos lineales, los no ramificados son lentamente o incompletamente degradados. El progreso de la hidrólisis de los xilanos es al menos parcialmente dependiente de la acción de la arabinosa para remover los grupos laterales (Van soest, 1982). La digestibilidad de la hemicelulosa está relacionada negativamente con el grado de lignificación, e incluso esta relación es mayor a la de otras fracciones lignificadas.

Pectinas. La pectina usualmente es considerada por ser un polisacárido (rhamnogalacturonas) rico en ácido galacturónico que se encuentra en la lámina media de la pared celular de las plantas (Aman, 1993; Harfield, 1993). Estos polisacárido consisten de cadenas formadas de ácido galacturónico con simple o compleja distribución de galactosa, arabinosa y ramnosa. El polisacárido de rhamnogalacturona es un polímero formado por unidades de ácido D-galacturónico unidos por enlaces α -1-4, con carbohidratos intermedios de romanopyranosa con enlaces α ,1-2 y β ,1-4, además de contener ramificaciones con moléculas de galactopyranosa β ,1-4, arabinofuranosa α ,1-5, arabinanas α ,1-

5, α ,1-3, o α ,1-2, galactanas β ,1-4, o arabinogalactanas β ,1-3, α ,1-3 o α ,1-2. El grupo ácido a demás esta combinado con calcio y esterres metil (Hatfield, 1989).

Los métodos de aislamiento tienden a alterar su estructura por la pérdida de grupos metil y cadenas laterales de arabinosa que son muy susceptible acido débil. La remoción de los grupos metil tiende a incrementar la solubilidad del ácido péptico, al igual que la separación de calcio con solvente de quelatos (Ca^{+2}). La pectina es disuelta por detergente neutra y así no recuperada con los componentes de la pared celular. Sin embargo debido a su completa disponibilidad para la digestión, esta no ha tenido un gran interés para su cuantificación.

Lignina. Es un polímero aromático tridimensional que rodea las microfibrillas de la celulosa y se une a la hemicelulosa con algunas uniones covalentes (Gadd, 2001 y Hatakka, 2001). La unidad básica de la lignina es el fenilpropano. La sustitución sobre los anillos aromáticos de los monómeros y la proporción de estos precursores varían dependiendo del origen botánico y determinan el tipo de lignina. Las ligninas de monocotiledones, como cereales y pastos, están compuestas por unidades de coniferil alcohol y trans-sinapil alcohol y por eso se conocen como guaiacyl o syringyl ligninas, aunque también contienen ciertas cantidades de p-coumaril alcohol que es un precursor de p-hidroxifenil (Hut-Helsinki, 2004).

El tipo de guaiacyl a syringyl lignina cambia con la maduración del forraje, y la digestibilidad de la pared celular de forrajes maduros es más baja que en aquellos inmaduros, esto es razonable para asumir que la composición de la lignina afecta la digestibilidad de la pared celular. Todos los pastos tienen ligninas que están acetiladas por ácido p-coumárico y también incorporan ferulatos que se entrecruzan con la lignina y con carbohidratos y tienen un impacto negativo con la disponibilidad de los polisacáridos para su utilización por los de microorganismos ruminales de los animales (Ralph, 1999). La lignina es completamente indigerible por animales rumiantes y su determinación sirve para predecir la digestibilidad en materia seca y energía de un alimento (Brunow, 2001 y Cho, 1997).

La relación negativa que al parecer existe entre la concentración de lignina y la digestibilidad del forraje se centra únicamente en los componentes de la pared celular y no a la materia orgánica total. Su efecto negativo sobre la digestibilidad de los polisacáridos de la pared celular parece estar ejercida por la protección de estos a la hidrólisis mediante las enzimas digestivas. Esto puede ser debido a que la lignina evita que las enzimas logren estar en contacto con el polisacárido (Jung y Allen, 1995).

El efecto de lignina sobre digestibilidad ha sido mostrado con mayor grado en gramíneas que en leguminosas (Barnes y Mertens, 1979). Sin embargo esto puede ser un reflejo del método analítico empleado para cuantificar lignina (ADL) el cual muchas veces subestima el contenido de lignina en gramíneas (Jung et al., 1993 y Hatfield et al., 1994). Este efecto de la lignina sobre la digestión de la

fibra en forrajes al parecer disminuye cuando su concentración aumenta (Van Soest, 1967, Jung y Vogel, 1986). Esta fuerte correlación negativa encuentra más consistencia cuando los datos se basan en la inclusión de muestras de forrajes a diferentes rangos de madurez, diferentes especies y partes de la planta (Jung y Allen, 1995)

2.2. Por su utilización, digestión y solubilidad

De acuerdo a su tasa de degradación y absorción los carbohidratos son llamados digeribles, digestibles o disponibles que engloba los monosacáridos y disacáridos (azúcares) y a los polisacáridos del tipo de los α -glucanos (almidón). Los carbohidratos no digestibles o no disponibles engloba los polisacáridos estructurales o fibrosos de las plantas como la celulosa, hemicelulosa, pectina, gomas y mucilagos a los que se suma la lignina (Asp, 1996). Sniffen *et al.* (1992) clasifica a los carbohidratos de los alimentos en fracciones basados sobre sus tasas de digestión: Fracción A son los azúcares simples y ácidos orgánicos, es la fracción más rápida fermentable en el rumen; Fracción B presentan una tasa de fermentación intermedia y corresponde al almidón; Fracción B₂ es lentamente fermentable por las bacterias del rumen que requieren únicamente nitrógeno como fuente de energía y corresponde a los polisacáridos disponibles de la pared celular y puede ser determinada por la sustracción de la fracción C de FDN corregida por cenizas, una vez corregida por las proteínas asociadas.; Fracción C representa la fracción de la pared celular indigestible (Russell, et al.1992). Esta fracción corresponde a la lignina x 2.4; que corresponde al material residual después de 72 h de digestión in vitro de las muestras (Mertens, 1997). El contenido de lignina

es aproximadamente de 5-25% de la pared celular de los forrajes; las leguminosas tienen un mayor contenido que las gramíneas (Sniffen *et al.* 1992 y Van Soest, 1982).

Estas fracciones son calculadas a partir del contenido de carbohidratos no estructurales (CNE), carbohidratos estructurales (CE) y la fracción indigestible de la fibra. La FDN incluye hemicelulosa, celulosa y lignina (Goering y Van Soest 1970). Los CNE que representan la Fracción A (azúcares simples) y la Fracción B (almidón y pectina) representan los carbohidratos que son solubles en solución detergente neutra y pueden ser estimados de 100 menos proteína, una vez que FDN es corregido por proteína, lípidos y cenizas en los alimentos. Los CNE pueden ser directamente medidos de acuerdo a MacGregor *et al.* (1983), citado por Sniffen *et al.* (1992). Los CNE calculados de forma directa tienen por lo general valores satisfactorios, sin embargo los alimentos que contienen grandes cantidades de pectina tendrán algunas veces valores más bajos de CNE. Dada la proporción de almidón y pectina en los CNE, la Fracción A puede ser determinada por diferencia. La Fracción B₂ (CE disponibles) puede ser determinada al sustraer los carbohidratos de la Fracción C de la FDN libre de ceniza y que ha sido corregida por contaminación de proteína (Sniffen *et al.*, 1992).

Los azúcares que representan la fracción A normalmente son bajos en las dietas de los rumiantes y estos son rápidamente fermentados por los microorganismos ruminales (Van Soest., 1982). El almidón que es el mayor componente de los granos de cereales y forrajes es rápidamente fermentable en el

rumen. Sin embargo algunos granos secados pueden contener significantes cantidades de almidón insoluble, el cual es lentamente digerido (Van Soest., 1982). Las pectinas que son importantes compuesto en leguminosa, productos de semillas, pulpa de cítricos y remolacha son rápidamente fermentables por las bacterias ruminales que pueden utilizar amoníaco o péptidos como fuente de nitrógeno (Russell *et al.*, 1992).

Usando los análisis químicos descritos anteriormente, Sniffen *et al.* (1992) propone emplear las ecuaciones siguientes para calcular las fracciones de los carbohidratos en alimentos:

$$\text{CHO (\%DM)} = 100 - \text{PC(\%MS)} - \text{EE(\%MS)} - \text{CENIZA(\%MS)}$$

$$\text{CC (\%CHO)} = 100 * (\text{NDF(\%DM)} * 0.01 * \text{LIGNIN(\% NDF)} * 2.4) / \text{CHO(\%DM)}$$

$$\text{CB}_2 \text{ (\%CHO)} = 100 * ((\text{NDF(\%DM)} - \text{NDIP(\%CP)} * 0.01 * \text{CP(\%DM)} - \text{NDF(\%DM)} * 0.01 * \text{LIGNIN(\% NDF)} * 2.4) / \text{CHO(\%DM)})$$

$$\text{CNSC(\%CHO)} = 100 - \text{B}_2(\%CHO) - \text{C(\%CHO)}$$

$$\text{CB}_1(\%CHO) = \text{STARCH(\%NSC)} * (100 - \text{B}_2(\%CHO) - \text{C(\%CHO)}) / 100$$

$$\text{CA(\%CHO)} = (100 - \text{STARCH(\%NSC)}) * (100 - \text{B}_2(\%CHO) - \text{C(\%CHO)}) / 100$$

Donde CP(%DM) = Porcentaje de proteína cruda en base materia seca;
 CHO(%DM) = porcentaje de carbohidratos; FAT(%DM) = porcentaje de lípidos;
 ASH(%DM) = porcentaje de ceniza; NDF(%DM) = porcentaje de fibra detergente neutro; NDIP(%DM) = porcentaje de proteína insoluble detergente neutro;
 LIGNIN(%NDF) = porcentaje de lignina; STARCH(%NSC) = porcentaje de almidón de los carbohidratos no estructurales; CA(%CHO) = porcentaje de carbohidratos que son azúcares simples; CB₁(%CHO) = porcentaje de carbohidratos que es

almidón + polisacáridos no estructurales (pectina, galactanos, fructanos, betaglucanos); $CB_2(\%CHO)$ = porcentaje de carbohidratos que es fibra disponible; y $CC(\%CHO)$ = porcentaje de carbohidratos que es fibra indisponible

3. Postulado de los sistemas analíticos para la evaluación de alimentos

3.1 Sistema Proximal o de Weende.

El sistema de Weende o análisis proximal (Henneberg y Stohmann, 1859) ha sido generalmente usado para estimar la calidad y valor nutritivo de los alimentos para humanos, animales no rumiantes y rumiantes por más de 100 años (Van Soest, 1994, Jung, 1997 y McCleary, 2003). Según Van Soest (1994) el sistema proximal tuvo origen cerca de 1800, y su fundamento se basó en los conceptos de fibra de esa época, la cual refería el término a una entidad no nutricional e indigestible de los alimentos y que pudo haber sido la extracción alcalina, las primeras formas de análisis de la fibra cruda moderna.

Los análisis realizados mediante este sistema son los siguientes: 1. materia seca (MS) a 100°C, 2. Extracto etéreo (EE) o lípido, el residuo seco es extractado con éter, 3. Fibra cruda (FC) el residuo EE es llevado a digestión por 30 min en ácido sulfúrico al 1.25%, seguido por 30 minutos en hidróxido de sodio al 2.25%. El residuo insoluble es secado, pesado e incinerado; la materia orgánica insoluble es reportada como FC. La determinación de nitrógeno (N) y ceniza se realizan en muestras separadas. El extracto libre de nitrógeno (ELN) de la materia seca no es considerado por sumar EE, FC, ceniza y proteína cruda (PC) ($PC = \text{nitrógeno} \times 6.25$).

Este sistema es la base para calcular los nutrientes digestibles totales (NDT) de los alimentos, por lo que asume lo siguiente:

1. EE recupera lípidos y grasas los cuales contienen 2.25 veces la energía de carbohidratos.
2. Todo el nitrógeno esta en proteína la cual contiene el 16 % de nitrógeno.
3. La fibra cruda recupera todo el material estructural y fibroso menos digestible del alimento.
4. El ELN representa los carbohidratos altamente solubles.

Ninguna de esas asunciones al parecer son tan ciertas y el grado de error varia considerablemente para cada una de estas estimaciones. Para el caso de EE incluye ceras y pigmentos de poco valor y no recupera jabones en las heces, que son la principal forma en que los ácidos grasos son excretados. Además, los forrajes no contienen triglicéridos y los galactolípidos de sus hojas contienen menos energía que el factor 2.25 empleado para su cálculo. El error involucrado en este análisis es relativamente de menor importancia, a menos que los lípidos sean un componente elevado en el alimento, ya que este componente puede tener poca importancia en análisis de forrajes u otros alimentos para rumiantes.

Una inconsistencia adicional se hace presente al usar el factor (6.25) para estimar la PC. Esto se debe a que los tejidos de las plantas contienen una variedad de compuestos nitrogenados que pueden ser divididos dentro de proteínas, ácidos nucleídos , nitrógeno no proteico (NNP) soluble en agua y muchas fracciones insolubles asociadas con lignina cruda. El contenido de

nitrógeno en proteínas de plantas varía de 15 a 16%, además de que la proteína verdadera en forrajes solo es el 70% del nitrógeno total y poca o nada del nitrógeno fecal, así que la aplicación del factor 6.25 a todo el nitrógeno del alimento constituye un error que es reflejado principalmente en el cálculo de ELN.

La magnitud de este error depende del contenido de nitrógeno en la dieta. El error es más serio en análisis de muestras fecales donde poca proteína verdadera por lo general es encontrada y los principales constituyentes nitrogenados son de origen bacteriano o productos de reacción Maillard con solo 7-11% de nitrógeno. Por lo tanto el ELN contiene los errores acumulados de todas las demás determinaciones. El más grande de estos errores es debido a la solubilización y pérdida de mucha lignina y hemicelulosa en la porción de fibra cruda. Incluso la celulosa no es recuperada completamente y su solubilidad en los diferentes partes de la planta es diferente. Generalmente la solubilidad de lignina en gramíneas es mayor que en leguminosas. El efecto de este error es el causal de la menor digestibilidad aparente del ELN que de la FC en un gran número de forrajes. En un estudio realizado por Van Soest (1975) este efecto se observó en gramíneas templadas, gramíneas tropicales y pajas (62, 74 y 100% de número de muestras analizadas).

La estimación de los componentes fibrosos de los alimentos es determinado como fibra cruda (CF), la cual se obtiene mediante un método gravimétrico. Bajo esta química analítica, una muestra es digerida secuencialmente en solución básica y ácida. El residuo resultante fue pensado originalmente para representar la

porción indigestible del alimento. En la actualidad esto se compone primariamente de celulosa y proporciones variables de polisacáridos no celulósicos y lignina en la muestra. Sin embargo, este método subestima seriamente el contenido total de pared celular del alimento y recupera únicamente una porción de pared celular y lignina.

3.2 Sistema detergente o Método de Van Soest

Debido a las inconsistencias notadas en el análisis de fibra cruda del sistema proximal, en los años 60's Van Soest desarrolló el sistema detergente como una alternativa para cuantificar los componentes fibrosos, principalmente de forrajes, logrando así convencer a la comunidad científica de reemplazar el sistema de Weende o Proximal por su sistema detergente.

Al reemplazar fibra cruda (FC) y extracto libre de nitrógeno (ELN) por los conceptos Fibra Detergente Neutro (FDN), Fibra Detergente Acida (FDA) y lignina, fue posible explicar más claramente respuestas nutricionales en términos de digestibilidad y consumo en rumiantes.

El sistema detergente separa y fracciona rápidamente la materia seca del alimento dentro de dos fracciones (tabla 2), basado sobre la disponibilidad de los carbohidratos del alimento (Sollenberger y Cherney, 1995 citado por Givens *et al.*, 2002), por lo que resulta en una estimación más razonable que la hecha para FC y tiene en cuenta la predicción de otros componentes estructurales para la valoración de la calidad del forraje (Van Soest, 1994).

El método FDN solubiliza el contenido celular (azúcares, almidón proteína, grasas, pectinas) mediante una solución detergente neutro (lauril sulfato de sodio, borato de sodio decahidratado, fosfato de hidrógeno disódico 2-ethoxyethanol y sulfito de sodio, pH 7.0) y recupera la pared celular (celulosa, hemicelulosa y lignina), mediante filtración (Goering y Van Soest, 1970).

El análisis de FDN aísla a los componentes insolubles más importantes de la fibra en los forrajes, sin embargo no mide todos los componentes de la pared celular ya que solubiliza las pectinas. Los principales atributos nutricionales de la extracción detergente neutra es que separa los alimentos en dos mayores fracciones que son claramente diferentes en su digestibilidad y consumo por rumiantes y herbívoros, y en muchos casos también por los no rumiantes (Mertens, 2003).

Van Soest (1964, 1967) reconoció que un inadecuado entendimiento del significado y uso de la fibra previno el desarrollo de este método para reemplazar FC. Por lo que la FDN es un mal estimador del contenido de pared celular en leguminosas por el contenido de pectinas en estas. Lo mismo en alimentos procesados donde existe una alta cantidad de proteínas dañadas por el calor. Estos defectos de la FDN para estimar el contenido de pared celular ciertamente son un problema si alguien está interesado en esta fracción como estructura biológica, pero estas inconsistencias no son de trascendencia si el interés es estimar la fibra como la fracción completamente indigestible del alimento (Van Soest, 1994).

El análisis de FDA recupera solamente celulosa y lignina después de que las muestras son digeridas en una solución detergente ácida (bromuro de cetil trimetil-amonio con H_2SO_4 1N) el cual hidroliza la hemicelulosa. Debido a que la FDA no recupera hemicelulosa, no es usado para medir la fibra total de los forrajes, sin embargo este método es útil para análisis secuenciales, ya que logra solubilizar las proteínas ligadas a la pared celular que interfieren en la cuantificación de la celulosa, lignina, cutina y sílice (Van Soest et al., 1991)

La oxidación de lignina con $KMnO_4$ o H_2SO_4 (72% de concentración) permiten recuperar únicamente celulosa y ceniza insoluble, por lo tanto al incinerar el residuo el valor de celulosa es determinado por diferencia (Goering y Van Soest, 1970).

4. Bases para modificar el sistema detergente

4.1 Causales de modificación

La fibra dietaria es una entidad nutricional que solo puede ser verdaderamente medida por el proceso digestivo del animal. En el laboratorio, métodos químicos o enzimáticos son desarrollados para medirla, pero su exactitud y relevancia están basadas en que tanto la fibra analíticamente medida iguala su definición nutricional. De esta manera, el desarrollo de métodos para medirla debe estar basado sobre una definición aceptable.

Un gran número de pequeñas modificaciones del protocolo de Van Soest (1963) para la determinación de componentes fibrosos en los alimentos han sido realizadas en gran parte del mundo. Todas las modificaciones hechas tienen la finalidad de mejorar la exactitud y variabilidad en los valores producidos, así como contribuir a la rapidez y simplicidad del procedimiento.

4.1.1 Interferencia de los componentes intrínsecos

Los componentes que con mayor grado interfieren en análisis de constituyentes de la fibra (FDN y FDA) son el almidón, las proteínas ligadas, los lípidos y las pectinas. Por lo tanto muchas modificaciones se han basado en mejorar la filtración del residuo, eliminar o disminuir la interferencia de proteínas, almidones y lípidos con el contenido fibroso, así como eliminar el uso de reactivos peligrosos para la salud humana y contaminación del ambiente.

En el procedimiento original de Van Soest y Wine (1967) la solución estaba compuesta de detergente aniónico (lauril sulfato de sodio) al 3% de concentración, el cual forma complejos solubles con proteínas; un agente quelante (EDTA) para prevenir interferencia por iones divalentes; ethoxyethanol para ayudar en la solución de almidones; y borato y fosfato como búfer del pH neutro para prevenir la hidrólisis de hemicelulosa (Robertson y Van Soest, 1981. Citado por Mascarenhas-Ferreira, 1983).

El decalin fue incluido en este procedimiento como agente antiespumante, pero más tarde un estudio (Van Soest, 1973) mostró que el decalin incrementaba los valores de fibra, además de dificultar el filtrado del residuo. Golding, et al. (1985) reportaron valores más altos de FDN con el uso del decalin y además de no ser necesario si la ebullición de la muestra es controlada al momento de la digestión por lo que recomendaron no usarlo en procedimientos de FDN y FDA.

El sulfito de sodio también fue utilizado en el procedimiento original por su capacidad para ayudar a solubilizar las proteínas al romper los puentes de disulfuro y los enlaces de compuestos aromáticos. Pero más tarde fue eliminado debido a que se comprobó que los valores de FDN resultaban más bajos (más del 3 %), (Robertson y Van Soest 1981, Golding *et al.*, 1985, Hintz et al., 1996. Citados por Kruenger, 1999). Kruenger, (1999) además menciona que también en análisis secuenciales los valores de FDA y LDA resultan ser más bajos con la adición de sulfito de sodio.

En un estudio posterior Mertens (2002) propuso nuevamente la adición de sulfito de sodio al procedimiento de FDN, con la finalidad de disminuir la contaminación por proteína ya que esta puede generar valores de FDN mas altos en los alimentos, especialmente en alimento procesados mediante calor. La adición de sulfito de sodio redujo los valores de FDN de 1 a 4 unidades porcentuales en algunos alimentos (forrajes y harina de semillas). Sin embargo en alimentos procesados donde mucha de la proteína es dañada por el calor, tal como destilería de la cervecería o granos, los valores de FDN fueron cerca de 11 unidades porcentuales más bajos con la adición de sulfito de sodio. Sin embargo Mertens (2002) coincide con Kruenger (1999) al concluir que la adición de sulfito de sodio no es recomendable en análisis secuenciales por que los resultados son subestimados debido a la capacidad de este de extraer parte de lignina y compuestos fenólicos.

Uno de los problemas más comunes encontrado en análisis para la determinación de FDN y FDA está relacionado en el paso de la filtración. Estos problemas normalmente son causados por el alto contenido de almidón, mucilagenos, o gomas que exceden la capacidad de solubilidad de la solución detergente (Robertson y Van Soest, 1881; Mascarenhas-Ferreira, 1983; Chai y Udén, 1998).

Por tal motivo muchas modificaciones al procedimiento FDN se han realizado con la finalidad de mejorar la solubilidad del almidón, y de esta manera disminuir la variabilidad de valores en componentes fibrosos. En la mayoría de

estas modificaciones las muestras son incubadas a bajas temperaturas por largos periodos (20-35°C / 16 hrs aproximadamente) con la inclusión de amilasa. Como las amilasas desempeñan otras actividades a parte de degradar el almidón, se ha observado que incubaciones por largos periodos con amilasa puede degradar componentes de hemicelulosa resultando en valores más bajos de FDN (Robertson y Van Soest, 1981; Mascarenhas-Ferreira, 1983; Van Soest *et al.*, 1991).

Robertson y Van Soest, (1981) al comparar la inclusión de dos amilasas (amilasa de *Bacillus subtilis* y α -amilasa estable al calor) para la extracción de FDN encontraron que las dos fueron efectivas para hidrolizar el almidón, sin embargo la amilasa de *Bacillus subtilis*, presento valores más bajos, principalmente en salvado de trigo. Por lo que recomendaron el uso de α -amilasa la cual es estable a temperatura de ebullición e hidroliza eficientemente el almidón con menor tiempo de incubación, además tiene aprobación de la AOAC (Numero A3306 in dietary fiber kit; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)

4.1.2 Peligrosidad y costo de los reactivos

Algunas modificaciones se han implementado al procedimiento de FDN en busca de eliminar el uso de reactivos peligrosos o sustituirlos por algunos menos riesgosos para la salud humana, además de cada vez buscar procedimientos analíticos más económicos. Algunas de estas modificaciones por mencionar son la eliminación de sulfito de sodio (Robertson y Van Soest, 1977, Hintz *et al.*, 1996.

Citados por Kruenger, 1999), el decalin (Golding *et al.*, 1985) y 2-ethoxyethanol de este procedimiento (Cherney *et al.*, 1989).

Inicialmente el 2-ethoxyethanol fue usado en análisis de FDN para inhibir parcialmente efecto del decalin sobre la filtración y facilitar la solubilización del almidón de algunos tipos de muestras. A partir de la eliminación del decalin el uso de 2-ethoxyethanol comenzó a ser más cuestionable, además de ser un reactivo riesgoso para la salud, provocando depresión nerviosa, daños al riñón, anemia, atrofia testicular y defectos fetales (Gulati *et al.* 1984, Smyth *et al.* 1941, Citados por Cherney, *et al.*, 1989).

Cuando Cherney *et al.* (1989) realizaron un estudio para reevaluar el uso de 2-ethoxyethanol en el procedimiento de FDN concluyeron que su eliminación no incrementaba las dificultades de filtración y que por lo tanto su uso no era necesario en el procedimiento, además de poseer un potencial riesgo para la salud, por lo que recomendaron la eliminación de este reactivo.

Golding *et al.* (1985) también recomendaron la eliminación de acetona para análisis de FDN en henos ya que no encontraron diferencias al no usarla, además de que esta es altamente flamable, puede causar deshidratación de la piel; su inhalación puede causar dolor de cabeza, excitabilidad, irritación bronquial y en grandes cantidades narcosis. Aunque también comentan que es necesario realizar más investigaciones para evaluar el efecto de su omisión con los valores de FDN en otros forrajes.

Mascarenhas-Ferreira, (1983) menciona que algunas modificaciones del método donde se usan altas concentración de enzima, como en el caso de la modificación propuesta por Giger *et al.* (1981) que propone el uso de 250 mg de amilasa por muestra hacen el análisis más caro. Por lo que recomienda usar la modificación de Robertson y Van Soest (1981); donde únicamente añaden 2 mg de α -amilasa por muestra. Además el uso de amilasas solamente se recomienda en muestras de alimentos energéticos (granos de cereales) para favorecer la hidrolisis del almidón, mejorar el filtrado del residuo y evitar sobreestimaciones de la fibra.

Mascarenhas-Ferreira (1983) mostraron que es posible cuantificar FDN en muestras de forrajes y granos disminuyendo la cantidad de reactivo y muestra hasta un 50 % (50 ml, 0.5g) sin que existan diferencias significantes. Por lo que con esto se logra minimizar los costos del análisis.

Una modificación más que logra entre otros objetivos disminuir los costos del análisis es la modificación de Chai y Udén (1998) que logran extraer FDN en diferentes tipos de forrajes con la dilución del 75% de la solución FDN sin diferencias significativas.

4.2 Criterios para seleccionar un método

4.2.1 Variabilidad de los resultados

Los métodos para estimar la fibra deben estar comprometidos entre el concepto teórico y la utilidad de los métodos químicos usados para aislar y medir fracciones secuenciales que están íntimamente relacionadas. El método usado para aislarlas, en efecto definen un tipo específico de fibra; por lo tanto, esto sugiere que los métodos deben seguirse exactamente para obtener resultados que sean válidos y reproducibles (Undersander *et al.*, 1993).

Como el método FDN fue originalmente designado para cuantificar la fibra en los forrajes ha adquirido la reputación de ser variable y difícil de usar con otros alimentos. Sin embargo, parte de esa variabilidad está relacionada con las modificaciones y procedimientos alternativos (Mañas *et al.*, 1994, Gustavsson y Martinsson, 2004, Clóvis *et al.*, 2008). Es un hecho que los laboratorios algunas veces modifican los métodos de fibra por conveniencia o rapidez (acortando pasos) sin entender como esos cambios afectan los resultados. Para evitar efectos en la determinación de fibra es importante entender que las condiciones y los pasos de los métodos deben ser seguidos tal como lo describen los métodos estándar o las modificaciones oficiales.

Después de que la muestra ha sido digerida en solución química o enzimática el residuo es aislado y medido gravimétricamente (pesando el residuo) o químicamente (hidrolizando el residuo y midiendo los componentes individuales como azúcares o lignina). Un primer factor que afecta la reproducibilidad

gravimétrica es la exactitud y precisión de la balanza. Por lo que se recomienda que esta sea rutinariamente mantenida y estandarizada, además de ser calibrada y checada para su exactitud cada vez que se use. Mertens (2003) menciona que se han observado inexplicables sesgos consistentes para todos los pesos tomados en una misma sesión de pesado, por lo que propone el uso de blancos para corregir estos sesgos y mejorar la precisión y exactitud de resultados en muestras analizadas, sobre todo de pesos pequeños (tal como lignina o material fibroso, < 10% de MS).

Cherney *et al.* (1985) citado por Mertens (2003) demostró que la variación en los resultados de fibra son afectados también por la cantidad de muestra analizada. Este efecto aumenta cuando la cantidad de muestra analizada disminuye, especialmente cuando los pesos son < 0.3 g.

Goering y Van Soest (1970) reportaron que pesar materiales calientes directamente de la estufa en vez de transferirlos a un desecador es más rápido y menos laborioso, y además más exacto. Esta exactitud de pesar materiales calientes es mejor en parte debido a la ausencia de errores con el inadecuado mantenimiento y uso de los desecadores.

La clave para medir FDA es la estandarización del ácido 1N, preparación de las muestras apropiadamente y remojar adecuadamente el residuo fibroso después de la digestión con agua caliente para eliminar lo mejor posible el ácido y los solubles detergentes ácido.

Recientemente se ha observado que muestras de alimento que contienen más de 10% de grasa pueden dar valores de FDA más altos. Por lo tanto, la versión más reciente de este método de la (AOAC, 1990. Official Method 973.18) fue modificada para realizar pre-extracción con acetona o breve calentamiento de la muestra en etanol para remover la grasa en alimentos que contenga más de 10 % de grasa (Van Soest, 1991 y Mertens, 2003).

El uso de amilasa estable al calor para remover almidón y sulfito o proteasas para eliminar nitrógeno tiene significativo impacto sobre la determinación de FDN y FDA. Estos también afectan la estimación de los carbohidratos solubles que son calculados por diferencia. Métodos de FDN que usan tratamientos de amilasa y sulfito de sodio resuelven muchos de los problemas asociados con la determinación de fibra, y además con apropiadas modificaciones pueden ser usados para medir fibra en materiales que contienen proteína, almidón, pectina y grasa (Mertens *et al.* 1991)

4.2.2 Extracción diferencial de otros componentes

El método de FDA fue designado oficialmente (AOAC, 1990. Official Method 973.18) para ser un paso preparatorio en la extracción de lignina (ADSL). La razón específica por la cual lignina fue determinada usando ácido sulfúrico es que FDA también prepara el residuo para determinar lignina usando permanganato (ADPL); típicamente ADPL da valores más altos que ADSL.

La solución detergente neutro disuelve pectina, gran cantidad de sílice y taninos mientras que detergente ácido recupera sílice, complejos de proteína-taninos y pectinas en un grado parcial. El residuo detergente ácido es usualmente más bajo en proteína que el residuo detergente neutro. Esto se debe a que la proteína es removida del residuo fibroso por el detergente catiónico bromuro cetil trimetilamonio para minimizar la contaminación de lignina con nitrógeno, además de no tener pérdidas de lignina débiles a la solución alcalina. También son removidas las hemicelulosas ácido-solubles pero no las pectinas. Así el contenido de hemicelulosa es estimado por diferencia (FDN-FDA). La precipitación de pectinas en ácidos fuertes puede ser la razón por la que algunos alimentos que contienen altas proporciones de pectina (alfalfa inmadura, pulpa de cítricos) resultan en valores más altos de FDA que FDN (Mertens, 2003). La sílice tiene el mismo efecto porque es soluble en solución DN e insoluble en la solución DA (Van Soest, 1991).

Tratamientos secuenciales no pueden ser aplicados universalmente porque hay casos específicos en los cuales las fracciones de interés pueden ser perdidas en el proceso. En particular, la sílice, ceniza insoluble ácida, algunos taninos, nitrógeno insoluble detergente ácido son mejor estimados directamente de FDA.

En el caso de taninos un doble análisis secuencial puede ser desarrollado en el cual FDN es seguida por FDA y paralelamente FDA seguido por FDN. La presencia de taninos insolubles está indicada por los valores más altos de la

secuencia FDN-FDA, comparados con la secuencia de FDA-FDN. Los valores de lignina de esas dos secuencias son comparados en los dos residuos.

Aunque no es un oficial método de la AOAC, hay circunstancias como las mencionadas anteriormente donde puede ser deseable medir FDA secuencialmente (FDAs) después de extracción de FDN. La FDA determinada secuencialmente (sADF) es un tanto menor que FDA determinada por el método oficial, porque la solución elimina algunos componentes que no son removidos completamente bien por detergente ácido, tal como pectinas, tanino o complejos fenólicos ácidos.

Hintz et al. (1996) determinó secuencialmente FDA del residuo de FDN (RDN) que fue aislado usando α -amilasa con o sin sulfito de sodio. Cuando la FDA fue determinada de (RDN) , sin sulfito de sodio, los valores fueron de 1 a 3 unidades porcentuales más bajos que la FDA medida usando el método oficial, y estas diferencias se incrementaron de 2 a 4 unidades porcentuales cuando la FDA fue determinada de (RDN) usando α -amilasa y sulfito de sodio

4.3 Factores que modifican la extracción de la fibra detergente

4.3.1 Tamaño de la muestra

A menudo es deseable analizar secuencialmente FDN, FDA, lignina y ceniza insoluble de una muestra individual. En ocasiones, particularmente en estudios donde se involucra la tasas de digestión de los componentes de la pared celular o análisis de muestras pequeñas, el peso de la muestra puede ser un

limitante en análisis secuenciales. Según Cherney (1984) no es muy conocido el peso mínimo de muestra que puede ser usado para obtener valores relevantes en análisis secuenciales de los constituyentes de la fibra. Sin embargo menciona que Van Soest y Robertson (1980) observaron cierto efecto del peso de la muestra sobre componentes fibrosos de forrajes analizados secuencialmente.

Cherney (1984), al comparar el efecto del peso de la muestra en análisis secuenciales de fibra, observo que aunque no hay una fuerte influencia del peso de la muestra sobre los valores de componentes fibrosos (FDN, FDA, hemicelulosa, celulosa, lignina y ceniza insoluble) si existe una clara variación, la cual es mayor a medida que los pesos de las muestras son más pequeños. Muestras tan pequeñas como 0.3 g dieron estimaciones de exactitud y precisión razonable para los diferentes constituyentes fibrosos. Peso de muestras de 0.10 a 0.30 g fueron relativamente exactas, pero presentaron más variabilidad. Sin embargo los pesos por debajo de 0.10 g de muestra pueden ser inapropiadas para este tipo de análisis.

4.3.2 Reactivos y su concentración

En busca de simplificar y economizar el análisis para FDN Mascarenhas-Ferreira (1983) comparó el efecto de extraer FDN en muestras de forrajes y granos disminuyendo la cantidad de solución FDN hasta un 50% (50 ml) de la solución original de Van Soest (1963) (100 ml), así como la cantidad de muestra en el mismo porcentaje 50% (0.5 g) y encontraron que es posible disminuir al 50% la cantidad de muestra y cantidad de solución ND sin observar diferencias

significantes en los valores para FDN. Más tarde Chai y Udén (1998) observaron que con diluciones de hasta el 75% de la solución FDN es posible obtener valores de FDN muy similares comparados con la solución estándar (100%) de Van Soest (1991) en un amplio rango de muestras analizadas como gramíneas, leguminosas, pajas, heces de rumiantes y no rumiantes. Únicamente encontraron diferencias en muestras con alto contenido de proteína (harina de carne 57% PC y harina de gluten de maíz 65.7% PC) las cuales presentaron diferencias significantes. Incluso estas diferencias se observaron aun cuando la concentración de la solución fue del 75%, por lo que los autores recomiendan únicamente usar la solución estándar de Van Soest (1963) (concentración del 100%) con la inclusión de sulfito de sodio para extraer FDN en concentrados con alto contenido de proteína.

Chai y Udén (1998) también mencionan que en estudios preliminares Robertson (sin publicar) obtuvo valores similares de FDN en diluciones tan bajas de la solución de hasta el 25%. Hasta ahora no existen otras publicaciones verídicas encaminadas para conocer el efecto de la dilución de las soluciones FDN y FDA sobre la variabilidad de los resultados al extraer otros componentes fibrosos en diferentes ingredientes de las dietas para rumiantes. Es probable que en algunos laboratorios del mundo se encuentren ahora realizando análisis para FDA con algunas modificaciones, específicamente con dilución de la solución para análisis de fibra, pero es muy poca la información válida referida, y además que explique las variantes de la extracción de residuos secuenciales utilizando tales modificaciones

4.3.3 Tamaño de partícula

Se ha observado que el tamaño de partícula tiene efecto sobre la digestión de los componentes estructurales de la pared celular. Ehle (1980) observó que los valores de la pared celular total y fracciones de la pared celular (hemicelulosa, celulosa y lignina) en muestras fecales de humano y cerdos son más bajas a medida que el tamaño de la partícula es más pequeño. Butcher (1975) reportó valores de FDN más bajos en muestras de trigo finamente molidas. La reducción en los valores de fibra fue atribuido a la extracción de aleurona del contenido celular la cual fue dañada al molido. Heller *et al.* (1977) midieron el efecto del tamaño de partícula sobre valores de fibra en salvado de trigo, cascarilla de cacahuate y pericarpio de maíz purificado y observaron que para salvado de trigo y cascarilla de cacahuate los valores de FDN fueron reducidos significativamente cuando el tamaño de la partícula fue más pequeño, pero los valores de FDA no mostraron cambios significantes. El contenido fibroso del pericarpio de maíz no mostró ninguna influencia por el tamaño de partícula.

Ehle (1984) observó que el tamaño de la partícula de muestras de diferentes forrajes analizados tiene efectos significativos en el contenido de pared celular y en los diferentes componentes estructurales de esta. Para el caso de heno de alfalfa observó valores de pared celular que fueron de 70 a 30%, hemicelulosa de 16 a 11%, celulosa de 38 a 16% y lignina de 16 a 4% de acuerdo al tamaño de partícula > 5.6 , < 0.6 respectivamente. Esto puede ser debido a que a medida que el tamaño de partícula es más pequeño la proporción de hojas en la muestra aumenta. Para el caso de zacate bromo (*Bromus inermis*) los valores

para contenido de pared celular fueron de 66.2% a 60.7% y 79.3% a 68.8%, hemicelulosa 31.1% a 30.2% y 34.2% a 36.1%, celulosa 29.1% a 25.8% y 36.4% a 27.5%, y lignina 6.0% a 4.7% y 8.7% a 5.2% para forraje tierno y forraje maduro, con un tamaño de partícula de >8mm a <.7mm respectivamente. En este caso los valores para pared celular y los diferentes componentes tuvieron diferencias más pequeñas comparadas con los valores para alfalfa. Esto puede ser debido a que la relación existente de hojas-tallo en gramíneas maduras es menor que en leguminosas. En este mismo trabajo se comparó la influencia del tamaño de partícula en ensilado de maíz, ensilado de sorgo, pasto ovillo (*Dactylis glomerata* L) y trigo, los cuales mostraron efectos similares a medida que el tamaño de partícula se redujo

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Nutrición Animal del Instituto de Ciencias Agrícolas de la UABC, Mexicali BC, México y en el laboratorio de Nutrición Animal del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Estatal de Carolina del Norte, USA.

Metodología del experimento

Se utilizaron un total de 25 muestras representativas de los siguientes siete tipos de ingredientes: gramíneas templadas y tropicales, leguminosas, pajas, concentrados, quimo duodenal y heces. Para estos dos últimos grupos, dos provienen de dietas altas en concentrado y dos de dietas a base de forraje. Todas las muestras fueron molidas a 1mm y homogeneizadas finalmente en un molino cafetero (120 cc).

En la primera etapa del presente estudio, efectuado en el laboratorio de Nutrición Animal de North Carolina State University se comparó la extracción de fibra detergente ácido (FDA) entre el método de Komareck (1993), al utilizar el extractor ANKOM para fibra y el de Chai y Udén (1998) adaptando el procedimiento para usar la solución FDA. La adopción del Método de Komareck (1992) como procedimiento de referencia en esta etapa se debe a que desde hace varios años es considerado como tal en varios de los centros de investigación dedicados a la evaluación de forrajes y pasturas, por lo cual ha sido físicamente

sustituido el equipo en la extracción de FDA por el método de Goering y Van Soest (1970) considerado hasta hace algunos años el original.

Debido a que la extracción secuencial de celulosa y lignina aplicando el método de Chai y Udén (1998) no es posible realizarlo cuando se usa papel filtro para recuperar el residuo, en esta fase del trabajo únicamente se estimó con el método AKM la influencia del índice de dilución sobre la extracción de FDA

Diluciones. La solución FDA fue preparada de acuerdo a Goering y Van Soest (1967). La dilución 50% se preparo aforando a 1 litro con agua destilada a 500 ml de la solución FDA estándar contenida en un matraz volumétrico. La dilución 25% se preparo aforando a 1.0 litro con agua destilada a 750 ml la solución FDA estándar contenida en un matraz volumétrico.

Fase 2. A consecuencia de los resultados en la primera fase del experimento, se diseño una segunda etapa en la que se empleó únicamente el Método de Komareck (1992). Por una parte el método, de Chai y Udén (1998) sin filtración mediante crisoles Gosch (ASTM 40-60) imposibilita la estricta recuperación total del residuo del filtro, por tanto el análisis secuencial es inexacto. Por otro lado, se convino con los investigadores de NCSU eliminar la dilución 50% debido a la consistente tendencia a elevarse tanto la variabilidad de los resultados como los valores de FDA por el aritmético incremento en el residuo, por lo que la fase de extracción secuencial de celulosa y lignina se realizo únicamente con las concentraciones 100 y 75% usando el método Komareck (1992). Adicionalmente,

por los resultados de la fase 1 se observó la inconveniencia de usar muestras tan finamente molidas por el molidor de café Braun[®], por lo que se rediseñó el ensayo de la segunda fase para incluir el factor tamaño de partícula (1 mm vs <1 mm). Lo anterior a causa de la elevada variación presentada en la mayor cantidad de tipos de muestras cuando la dilución supera al 25% y el tamaño de partícula es menor de 1 mm. En esta etapa se trabajó únicamente con 13 muestras debido a que algunas habían sido ya en su totalidad procesadas en el molino cafetero. Posterior a la extracción de FDA, se realizó el análisis secuencial para determinar celulosa y lignina en cada una de las combinaciones de los tratamientos.

Fase 3. La tercera etapa y última del estudio se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, en este laboratorio está aun en funcionamiento el equipo para determinar FDA, celulosa y lignina siguiendo el procedimiento de Goering y Van Soest (1967).

Variables de respuesta. Las variables de respuesta estimadas en los diferentes laboratorios al usar los procedimientos de Goering y Van Soest (1967), Chai y Udén (1998) y de Komareck (1992) fueron a) FDA, b) celulosa y, c) lignina

Análisis estadístico

El experimento se analizó utilizando el procedimiento GLM de SAS 9.1, con el modelo estadístico siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \xi_{ij},$$

Donde Y_{ij} = media de la muestra individual, μ = media general, α_i = efecto del tratamiento, β_j = efecto del tipo de muestra y ξ_{ij} = efecto residual. Se utilizaron comparaciones ortogonales para evaluar los efectos principales, incluyendo sus diferencias absolutas y porcentuales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 1 se presentan los valores promedio de FDA y las diferencias absolutas y relativas respecto al método estándar de Goering y Van Soest (**VSO**, 1967), para los diferentes tipos de ingredientes al utilizar el procedimiento de Chai y Udén (**CHAI**; 1998) y Komarek (**AKM**; 1993). Independientemente de las diferentes concentraciones de la solución FDA utilizadas, los valores de FDA son más altos para el método CHAI que para el AKM, pero al considerar las diferencias respecto al control estas fueron mayores para CHAI que para el método AKM. Aunque no se encontró información donde se compare la capacidad de extracción de FDA usando los métodos de CHAI y AMK, Gustavsson y Martinsson (2004) compararon la capacidad de extraer FDN con estas dos modificaciones (Chai y Udén, 1998 y Komarek, 1993) y el método de Van Soest (1991) en muestras de trébol rojo (*Trifolium pretense*) y Timothy (*Phleum pratense*) y encontraron en ambas muestras diferencias en las dos modificaciones (CHAI vs AKM). Aunque los valores más altos fueron reportados al utilizar el sistema AKM, no compararon la variación generada por cada uno de los métodos como en el presente estudio.

Varias pueden ser las causas de las diferencias en los resultados de la aplicación de un método distinto. Algunos autores han basado la comparación de los métodos que buscan modificar el sistema original de Van Soest (1991) específicamente sobre el resultado del sistema de filtración. En este sentido Ferreira y Mertens (2007) compararon dos sistemas de filtración (bolsas ANKOM[®] vs crisoles ASTM 40-60) para analizar FDA en muestras de diversos tipos de

ensilados de maíz y reportaron que existió un residuo mayor al usar los crisoles, lo cual se tradujo en un mas alto valor de FDA ($P < 0.01$) con el método de Van Soest (1991). Undersander *et al.* (1993) menciona que en diferentes laboratorios se realizan pequeñas modificaciones al protocolo estándar del sistema detergente, pero se omite la variación provocada por estas alteraciones, por lo que es recomendable detallar los procedimiento o modificaciones empleadas en los reportes de análisis de FDN y FDA

Cuadro 1. Valores de fibra detergente ácida (FDA) y diferencias absolutas y relativas respecto al método estándar de Van Soest (**VSO**; 1967) para los diferentes tipos de muestras usando el procedimiento de Chai y Udén (**CHAI**; 1998) y Komarek (**AKM**; 1993).

Tipo de ingrediente	Valores para FDA			Diferencias de FDA para CHAI		Diferencias de FDA para AKM	
	VSO	CHAI	AKM	Absolutas	Relativas	Absolutas	Relativas
G.Templadas ¹	21.4	25.66	22.25	-4.26	-18.63	-0.86	-8.33
G. Tropicales	29.86	36.70	31.03	-6.84	-22.51	-1.16	-4.48
Leguminosas	26.3	33.39	30.24	-7.09	-27.07	-3.94	-14.99
Concentrados	12.93	18.71	16.25	-5.78	-90.23	-3.32	-50.70
Pajas	48.56	58.76	51.22	-10.20	-20.78	-2.66	-5.33
Duodenal	21.06	25.89	18.49	-4.83	-23.83	2.56	10.68
Heces	35.33	47.53	38.48	-12.20	-34.50	-3.16	-8.91

¹ G=gramíneas

En el Cuadro 2 se presentan los valores promedio de FDA y diferencias absolutas y relativas obtenidas por los métodos CHAI y AKM con los diferentes niveles de dilución, independientemente del tipo de ingrediente. Nuevamente los valores de FDA fueron superiores cuando se utilizó el método CHAI, pero también sus diferencias absolutas y relativas respecto al control, al compararse con el

método AKM. Puede observarse como este último método, comparado con el CHAI, mostro mayor consistencia en los resultados al utilizarse diferentes diluciones. Lo anterior se deriva de que el método CHAI provoca mayor variabilidad en los valores de FDA al diluir hasta el 50% la concentración de la solución FDA, por lo cual las medias y las diferencias absolutas y relativas respecto al control son superiores en comparación a las observadas en las concentraciones del 75 y 100%. En contraste, con el método AMK no se aprecia tal variabilidad en las medias ni en las diferencias absolutas ni relativas para las distintas diluciones. Otro aspecto importante a señalar, es que la variabilidad detectada tiene una relación estrecha con el tamaño de partícula, como lo enfatizan varios autores (Butcher, 1975; Heller *et al.*, 1977; Ehle, 1983; Ehle, 1980); en este sentido métodos como el AKM resaltan la importancia de esto al señalarlo como una restricción del método la necesidad de moler a 1.0 mm (Komarek, 1993), pero el método CHAI no lo menciona, por lo que es posible esto incremente su variabilidad en los resultados.

Cuadro 2. Medias de mínimos cuadrados de los valores de fibra detergente ácida (FDA) y sus respectivas diferencias (absoluta y relativa) con dependencia en la concentración de la solución FDA (50, 75 y 100%) en los dos procedimientos de análisis (Chai y Udén, **CHAI**;1998 y Komarek, **AKM**; 1993).

Concentración de la solución FDA (%)	Valores de FDA		Diferencias de FDA para CHAI		Diferencias de FDA para AKM	
	CHAI	AKM	Absolutas	Relativas	Absolutas	Relativas
50	37.98 ^a	29.82	-10.06 ^b	-48.92	-1.90 ^{ab}	-5.61 ^{ab}
75	33.92 ^a	28.38	-6.00 ^a	-25.18	-0.46 ^a	-0.42 ^a
100	33.80 ^a	30.93	-5.88 ^a	-27.71	-3.01 ^b	-29.14 ^b

^{a, b}. Medias con la misma literal son estadísticamente iguales (P > 0.05).

En el Cuadro 3 se presentan los valores promedio de FDA para cada uno de los tipos de ingredientes utilizados en el presente estudio, obtenidos con cada uno de los métodos y diluciones evaluados. Como se puede notar, en general fue mayormente posible detectar diferencias sobre los valores de FDA al comparar los diferentes métodos, que al evaluar el impacto de las diluciones de la solución. Asimismo, es evidente que los coeficientes de variación están muy relacionados con el tipo de ingrediente analizado, apreciándose superiores para concentrados y las gramíneas templadas y tropicales. Las muestras en las mostraron menor variación fueron las obtenidas de las pruebas de metabolismo y digestión. Con estos resultados es claro que la variabilidad dentro del tipo puede enmascarar el efecto tanto de la dilución, como del método. Según el análisis la variación que provoco la dilución fue mayor que la provocada por el método, de tal forma que con el modelo estadístico utilizado no fue posible detectar diferencias entre las medias por tipo y nivel de dilución, como se aprecia en la primera parte del Cuadro 3. En cambio, la significancia de las diferencias si fue detectada entre los métodos comparados.

Cuadro 3. Promedios de los valores de fibra detergente ácida (FDA) obtenidos con cada uno de los métodos (Van Soest, **VSO**; 1967, Chai y Udén, **CHAI**; 1998 y Komarek, **AKM**; 1993) y las diferentes concentraciones (**50, 75 y 100%**) de la solución FDA utilizados en el presente experimento.

Tipo de ingrediente	Concentración de la solución FDA (%)			Método			R ²	CV ²
	50	75	100	CHAI	VSO	AKM		
G.Templadas ¹	23.56	22.18	23.56	25.66	21.39	22.25	0.65	9.24
G. Tropicales	33.91	31.47	32.23	36.7 ^a	29.87 ^b	31.03 ^{ab}	0.81	7.09
Leguminosas	31.19	29.13	29.62	33.39 ^a	26.31 ^b	30.24 ^{ab}	0.91	4.65
Concentrados	16.49	14.80	16.60	18.71 ^a	12.93 ^b	16.25 ^{ab}	0.83	10.51
Pajas	54.07	51.94	52.53	58.76 ^a	48.56 ^b	51.22 ^b	0.92	3.69
Duodenal	22.38	21.50	21.55	25.89 ^a	21.05 ^b	18.89 ^c	0.99	2.15
Heces	41.72	40.07	39.54	47.53 ^a	35.33 ^c	38.48 ^b	0.98	2.52

¹Gramineas

² Coeficiente de variación

Entonces como se observa en el Cuadro 4, si queremos pensar en el resultado de variar las concentraciones de ADF para extraer la fibra, realmente no provoca tanta variación como la que provoca el tipo de ingrediente. Esto es consistente en la comparación de los procedimientos CHAI y AKM para extraer FDA, donde su valor de R^2 (~0.68) es aceptable al incluir las variables tipo de ingrediente y nivel de dilución, pero en ninguno de los dos casos permite detectar posibles diferencias provocadas por la diferente dilución (contrastes ortogonales 100 vs RST y 50 vs 70; Cuadro 4). Cuando Chai y Udén (1998) evaluaron la capacidad de extraer FDN en los distintos ingredientes de alimento usando distintas concentraciones de la solución FDN (100, 50, 25 y 0) encontraron que el tipo de ingrediente tuvo efectos significativo ($P < 0.01$) en los valores del residuo fibroso, reportando que fueron las muestras con elevado contenido de proteína (<35% PC) las que presentaron incompleta extracción con las diferentes concentraciones de la solución. El efecto del tipo de ingrediente sobre la variabilidad de la extracción de los componentes fibrosos es también reportado por Cassida *et al.* (2007) al relacionarlo con la concentración de pectina, que forma precipitaciones de geles detergentes cuaternarios que finalmente dificultan la filtración y lavado del residuo fibroso, elevándose los valores de FDA, sobre todo cuando no se realizó previamente extracción de FDN.

Cuadro 4. Probabilidades de F ligadas a los componentes del modelo para explicar la variación en los valores de fibra detergente ácida (FDA) y sus diferencias respecto al Método Van Soest (1967) y significancia de los contrastes establecidos para los tratamientos.

Procedimiento ¹	Modelo	R ²	Tipo de ingrediente	Nivel FDA ²	Contrastes	
					100 vs Resto ³	50 vs 75 ⁴
CHAI	<.0001	0.688	<.0001	0.2396	0.3766	0.1493
AKM	<.0001	0.666	<.0001	0.6111	0.4128	0.5776
FDADIFFC	<.0001	0.377	0.0022	0.0006	0.0379	0.0009
PCTDIFFC	0.0024	0.293	0.0018	0.1965	0.4527	0.1011
FDADIFFK	<.0001	0.450	<.0001	0.0039	0.0054	0.0552
PCTDIFFK	0.0011	0.314	0.0032	0.0221	0.0066	0.6317

¹CHAI = Método de Chai y Udén, 1998; AKM = Método Komarek, 1993; FDADIFFC = Diferencias absolutas para CHAI; PCTDIFFC = Diferencias relativas para CHAI; FDADIFFK = Diferencias absolutas para AKM; PCTDIFFK = Diferencias relativas para AKM.

²Concentración de la solución FDA (50,75 y 100%)

³Concentración de la solución FDA del 100% vs 75 y 50%.

⁴Concentración de la solución FDA del 50% vs 75%.

En las Figuras 1, 2 y 3 (Apéndice) se aprecia la tendencia de la recuperación de FDA en los tres niveles de concentración (50, 75 y 100%) de la solución FDA. Cuando la concentración fue menor los valores de FDA se incrementan, esto se debió a una incompleta hidrólisis de los componentes fibrosos de la pared celular de la planta. Esta tendencia se notó en los tres tipos de ingredientes analizados (gramíneas templadas y tropicales y leguminosas).

En el Cuadro 5 se observa la influencia de la intensidad del molido y la dilución de la solución FDA sobre la extracción de FDA, celulosa y lignina en gramíneas de clima tropical, concentrados, pajas y muestras de heces al usar el método AKM y compararlo con el método VSO, adoptado como estándar. A excepción de las muestras de heces, en los demás tipos de ingredientes no existió ($P > 0.05$) influencia del molido, ni de la dilución de la solución FDA sobre la extracción de ninguno de los componentes. Solamente en las muestras provenientes de heces se observó un efecto consistente del molido sobre los valores de FDA, CEL y LGN, así como de las diferencias porcentuales respecto de cada uno cuando se utilizó el método VSO. En el resto de los tipos de alimento fue persistente que la alta variación enmascara las diferencias numéricas contenidas en los tratamientos. Como puede apreciarse en la Figura 1 y 2, la variación numéricamente fue mayor cuando las muestras con diferente tamaño de partícula se sometieron a una concentración menor de solución FDA. El mayor coeficiente de variación en los resultados de FDA, CEL y LGN ocurrió en las muestras de concentrado. Lo anterior reafirma dos aspectos: 1) el inconveniente que representa el método AKM para el análisis de dietas con alto nivel de

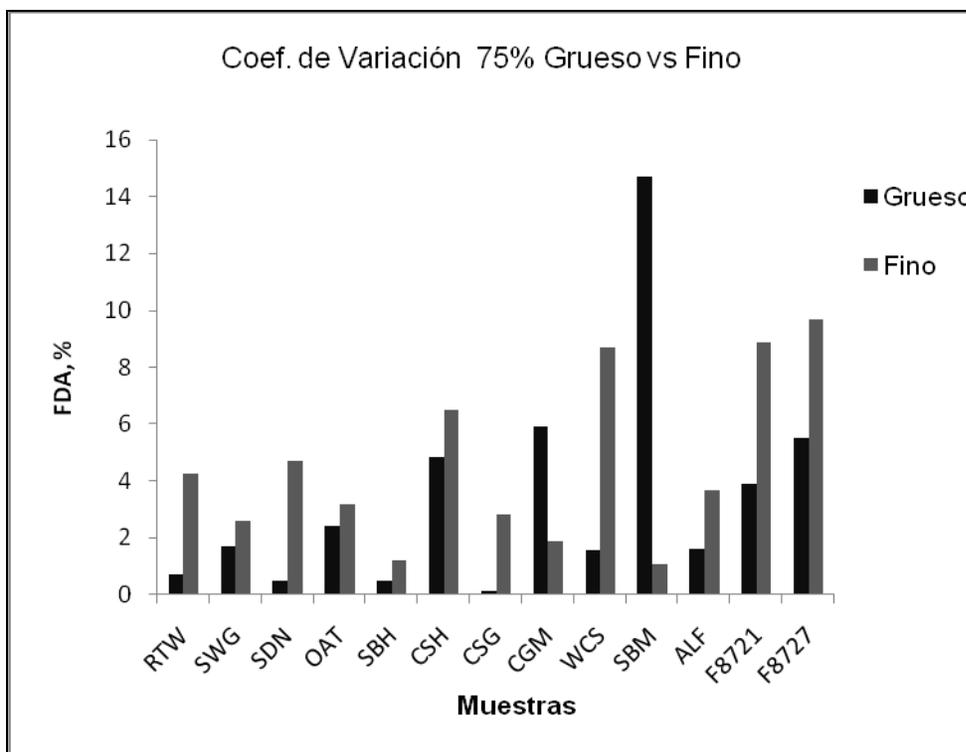
concentrados y por otro 2) que al disminuirse la concentración de FDA se posibilita un mayor impacto negativo de factores como tamaño de la partícula o por diferenciales en la composición química de los ingredientes (Butcher, 1975; Ehle, 1980, 1984; Cassida, 2006). Por el contrario las gramíneas tropicales y leguminosas, registraron casi un tercio de la variación observada en los concentrados. Es posible que esta variación sea inherente a diferencias sustanciales en la composición dentro de los tipos de ingredientes, puesto que la selección obedeció más bien a sus características de adaptabilidad y metabolismo de crecimiento, al considerado plantas de clima templado (C_3) o tropical (C_4), antes que haber “preseleccionado” por su composición fibrosa o proteica.

Cuadro 5. Influencia de la intensidad del molido (Grueso, **C** o Fino, **F**) y la concentración de la solución fibra detergente ácida FDA (**50, 75 y 100%**) sobre la extracción de FDA, celulosa y lignina en gramíneas de clima tropical, concentrados, pajas y muestras de heces.

Variables¹	C75	C100	F75	F100	CV²	C vs F	75 vs 100
Gramíneas tropicales							
	n = 16²						
FDA	39.2	38.5	36.6	36.1	30.1	0.66	0.92
CEL	33.3	32.6	31.7	31.6	28.0	0.78	0.93
LGN	4.0	3.7	3.6	3.2	50.2	0.63	0.73
DFDA	-2.7	-0.7	3.7	5.2	158.4	0.00	0.14
DCEL	-6.1	-4.1	-1.6	-1.1	-261.1	0.39	0.76
DLGN	8.5	16.8	18.7	27.7	78.8	0.16	0.24
Concentrados							
	n = 12						
FDA	15.6	14.5	17.4	16.2	102.1	0.85	0.91
CEL	12.4	11.7	13.0	12.6	94.8	0.91	0.94
LGN	3.1	2.5	4.3	3.4	136.0	0.71	0.80
DFDA	-3.4	9.2	-0.7	5.9	991.7	0.99	0.56
DCEL	4.3	12.5	8.2	9.0	403.5	0.99	0.83
DLGN	-15.7	37.2	-26.3	28.2	570.1	0.62	0.02
Pajas							
	n = 12						
FDA	50.9	50.6	51.2	47.8	24.0	0.86	0.80
CEL	41.4	42.0	42.0	38.7	12.2	0.66	0.66
LGN	7.5	6.8	8.4	7.8	11.2	0.85	0.89
DFDA	-3.1	-2.3	-3.8	2.8	-594.2	0.70	0.52
DCEL	-16.3	-17.7	-17.8	-9.1	-49.0	0.44	0.42
DLGN	36.5	44.3	33.4	42.0	88.7	0.90	0.69
Heces							
	n = 8						
FDA	43.7	40.9	34.7	33.8	4.9	0.00	0.23
CEL	31.1	29.7	25.2	24.3	5.0	0.00	0.31
LGN	9.9	9.0	7.9	7.8	5.5	0.10	0.21
DFDA	-9.3	-2.3	13.1	15.4	109.3	0.00	0.23
DCEL	-8.3	-3.4	12.3	15.3	122.9	0.00	0.31
DLGN	-3.5	6.2	17.2	18.0	57.8	0.01	0.25

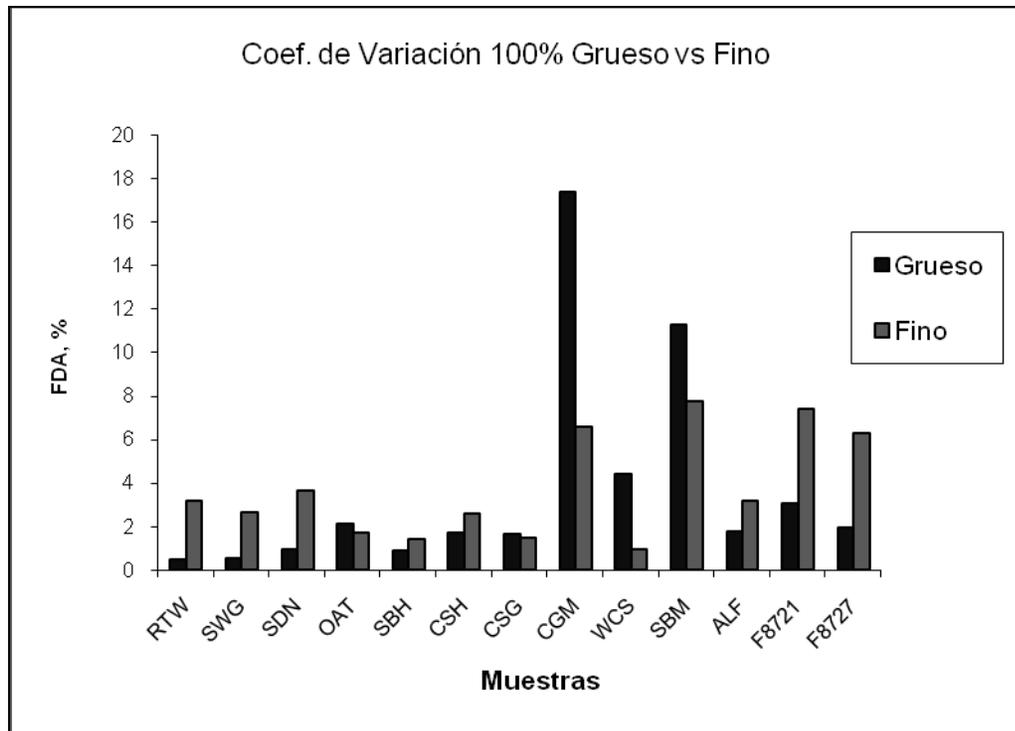
¹FDA = Fibra detergente ácida, CEL = Celulosa, LGN = Lignina, DFDA = Diferencias de FDA, DCEL = Diferencia de celulosa, DLGN = Diferencia de lignina

²Numero de observaciones



RTW – Cascarilla de arroz SBH – Cascarilla de soja WCS – Semilla de algodón
 SWG – Switchgrass CSH – Cascarilla de semilla de algodón SBM – Harina de soja
 SDN – Pasto sudan CSG – Ensilado de maíz ALF – Heno de alfalfa
 OAT – Heno de avena CGM – Harina de gluten de maíz F8721, F8727 – Muestras fecales

Figura 1. Coeficiente de variación en la extracción de fibra detergente ácida (FDA) de varios ingredientes de alimento provocado por el tamaño de partícula (Grueso y Fino) y la concentración de la solución FDA al 75%.



RTW – Cascarilla de arroz SBH – Cascarilla de soja WCS – Semilla de algodón
 SWG – Switchgrass CSH – Cascarilla de semilla de algodón SBM – Harina de soja
 SDN – Pasto sudan CSG – Ensilado de maíz ALF – Heno de alfalfa
 OAT – Heno de avena CGM – Harina de gluten de maíz F8721, F8727 – Muestras fecales

Figura 2. Coeficiente de variación en la extracción de fibra detergente ácida (FDA) de varios ingredientes de alimento provocado por el tamaño de partícula (Grueso y Fino) y la concentración de la solución FDA al 100%.

CONCLUSIONES

En el presente estudio los resultados demuestran que la modificación del método de Chai y Udén (**CHAI**; 1998) para FDN adaptado para FDA provoca una mayor variabilidad en los análisis de FDA. Esto se aprecia al comparar las medias en ambos métodos.

Las diferencias absolutas y relativas fueron mayores en el método CHAI comparado contra la modificación propuesta por Komarek (**AKM**; 1993). Por lo tanto si se quiere pensar en disminuir la concentración de la solución en análisis de FDA, realmente no provoca tanta variación como la provocada por el tipo de ingrediente. Por esta razón, es importante conocer el potencial de la variación provocada por el tipo de ingrediente cuando se usa en el análisis cualquier modificación del método estándar.

Al disminuir la concentración de la solución FDA se posibilita un mayor impacto negativo de factores como tamaño de partícula o por diferenciales en la composición química de los ingredientes.

LITERATURA CITADA

- AACC. Report. 2001. The definition of dietary fiber. *Cereal Food World*. Vol 46:112-126.
- Arana, M. 1997. Why forage fiber quality is important. Cooperative Extension. University of California Davis.
- Asp, N. –G. 1996. Dietary carbohydrates: classification by chemistry and physiology. *Food Chemistry*. Vol. 57. No. 1:9-14.
- Balch, CC. 1971. Proposal to use time spent chewing as index to extent to which diets for ruminants possess the physical property of fibrousness characteristics of roughages. *Br. J. Nutr.* 36:383.
- Barnes, R. F. and Marten, G. C. 1979. Recent developments in predicting forage quality. *J. Animal Sci.* 84 :1554-1561
- Burkitt D. P. Walker, A. R. and Paiter, N. S. 1972. Effect of dietary fiber on stools and transit time, and its role in the causation of disease. *Lancet* 2:1408-1412.
- Butcher, J. 1975. Effects of aleurone cell damage on water fiber values as determined by the neutral detergent technique. *J. Sci. Food Agric.* 26:345.
- Cassida K. A., Turner K. E., Foster J.G. y Hesterman O. B. 2007. Comparison of detergent fiber analysis methods for forages high in pectin. *Animal Science and Technology*. 135:283-295.
- Chai, W. and Udén, P. 1988 An alternative oven method combined with different detergent strengths in the analysis of neutral detergent fibre. *Animal Feed Sci and Technol.* 74:281-288.
- Cherney D. J. R., Patterson J. A. and Cherney J. H. 1989. Use of 2-Ethoxyethanol and α -amylase in the neutral detergent fiber method of feed analysis. *J. Dairy Sci.* 72:3079-3084.
- Cherney J. H., Volenec J. J. and Nyquist W. E. 1985. Sequential fiber analysis of forage as influenced by sample weight. *Crop Sci.* 25:1113–1115.
- Cho S., DeVries J. W. and Prosky L. 1997. Dietary fiber analysis and applications. Gaithersburg, MD: AOAC.
- Cummings J. H. and Stephen A. M. 2007. Review. Carbohydrate terminology and classification. *European Journal of Clinical Nutrition.* 61:S5-S18.

- De Vries J. W., Prosky L., Li B. and Cho S. 1999. A historical perspective on defining dietary fiber. American Association of Cereal Chemists. Inc. Cereal Food World:367-369.
- Ehle, F.R. 1984. Influence of particle size on determination of fibrous feed components. J. Dairy Sci. 67: 1482-1488.
- Ehle, F. R. 1980. The influence of dietary fibers on fermentation in the large intestine of humans and pigs. Ph.D. Thesis, Cornell Univ.
- Englyst, H. N. and Hudson, G. J. 1996. The classification and measurement of dietary carbohydrates. Food Chemistry. Vol. 57. No. 1:15-21.
- Ferreira, G and Mertens, D. R. 2007. Measuring detergent fibre and insoluble protein in corn silage using crucible or filter bag. *Animal Feed Science and Technology*. 133: 335-340.
- Gadd, G.M. 2001. Fungi in Bioremediation. Cambridge: British Mycological society; pags. 1-20.
- Givens D. I., Owen E., Oxford R. F., and Omed H. M. 2000. Forage Evaluation in ruminant nutrition. Edit. CABI Publishind. NY. USA.
- Goering, H.K. and Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents and some applications). Agriculture Handbook No. 379. Agric. Res. Serv., USDA. Washington, DC. USA.
- Grant, R. J. 1991. Evaluating the feeding value of fibrous feeds for dairy cattle. Cooperative Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln. G91-1034.
- Golding E. J., Carter M. F., and Moore J. E. 1985. Modification of the neutral detergent fiber procedure for hays. J. Dairy Sci. 68:2732-2736.
- Gustavsson, A. -M. and Martinsson, K. 2004. Comparison between modified methods of neutral-detergent fiber analysis. Blackwell publishing Ltd. Grass and Forage Science. 59:186-190.
- Hatakka, A. 2001 Biodegradation of lignin. En: Hofrichter M, Steinbüchel A (eds.). Biopolymers, vol. 1 - Lignin, Humic Substances and Coal. Weinheim: Wiley-VCH; pags.129-180.
- Hatfield, R. D. 1989. Structural polysaccharides in forages and their degradability. Agron. J. 81:39-46.

- Hatfield R. D., Jung H. G., Ralph J., Buxton D. R. and Weimer P. J. 1994. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. *J. Sci. Food Agric.* 65:51.
- Heller S. N., Rivers J. M. and Hackler L. R. 1977. Dietary fiber: the effect of particle size and pH on its measurement. *J. food Sci.* 42:436.
- Hipsley, E. H. 1953. Dietary "fiber" and pregnancy toxemia. *Br. Med. J.* 2:420-422.
- HUT – Helsinki. 2004. Forest Products Chemistry. Chemistry of Cellulose Making: Module II – Basics of Wood Chemistry.
- Jung, H. G. and Allen, M.S. 1994. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Animal Sci.* 73 :2774-2790
- Jung, H. G. and Vogel, K. P. 1986. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. *J. Anim. Sci.* 62:1703.
- Jung H. G., Buxton D. R., Hatfield R. D. and Ralph J. 1993 Forage Cell Wall Structure and Digestibility. P 315. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.
- Komarek, A. R. 1993. An improved filtering technique for the analysis of neutral detergent fiber and acid detergent fiber utilizing the filter bag technique. Ankom Company, publication # 101.
- Krueger C. G., Albrecht K. A., D Reed J. D., Bures E. J. and Owens V. N. 1999. Sodium sulphite effects on recovery and composition of detergent fibre and lignin from forage legumes varying in levels of proanthocyanidins. *J. Sci. Food Agric.* 79:1351-1356.
- Machado, O. 1997. Valor nutricional de los alimentos. Elementos de evaluación y factores de calidad. 1ª ed. Medellín. Universidad de Antioquia.
- Mañas E., Bravo L. and Saura-Calixto F. 1994. Sources of error in dietary fiber analysis. *Food Chemistry.* 50:331-342.
- Mascarenhas-Ferreira A., Kerstens J. and Gast C.H. 1983. The study of several modifications of the neutral detergent fiber procedure. *Animal Feed Sci. Technol.* 19-28.
- McCleary, B. V. 2003. Dietary fiber analysis. *Proceeding of the Nutrition Society.* 62:3-9.
- McCullough, M. E. 1973. Optimum feeding of dairy animals. Univ. Press. Athens. GA.

- Mejía G. I., Segura, S. F., Echeverri, F. R. and Patiño, L. C. 2007. Descripción y discusión acerca de los métodos de análisis de fibra y del valor nutricional de forrajes y alimentos para animales. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Vol 1. Num 14. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Mertens, D. R. 1973. Application of theoretical mathematical to cell wall digestion and forage intake in ruminants. Ph.D. Dissertation. Cornell University, Ithaca, NY.
- Mertens, D. R. 1985. Effect of fiber on quality of dairy cows. Pag 209 in 4ta. Minnesota Nutr. Conf., Univ. Minnesota, St. Paul.
- Mertens, D. R. 1987. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. J. Anim. Sci. 64:1548-1558.
- Mertens, D. R. 1997. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. J. Dairy Sci. 80: 1463-1481.
- Mertens, D. R. 2003. Changes in measuring insoluble dietary fiber. J. Animal Sci. 81:3233-3249.
- Miller, W.J. and O'Dell, G.D. 1991. Nutritional problems of using maximum forage or maximum concentrate in dairy rations. J. Dairy Sci. 52:1144.
- Moore, J.E. and Daniel J. Undersander. 2002. Relative Forage Quality: A proposal for replacement for Relative Feed Value. Proceedings National Forage Testing Association.
- Moore, J.E. and Kunkle, W.E. 1999. Evaluation of equations for estimating voluntary intake of forages and forage-based diets. J. Animal Sci. (Suppl. 1):204.
- Moore, J. E. and Undersander, D. J. 2002. Relative Forage Quality: An alternative to relative feed value and quality index. p. 16-31 In: Proc. Florida Ruminant Nutrition Symposium, January 10-11, University of Florida, Gainesville.
- National Research Council. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington D.C.
- Oba, M. and M. S. Allen. 1999. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. J. Dairy Sci. 82:589-596.
- Parish, J. A and Rhinehart, J. D. 2008. Fiber in beef cattle diets. Mississippi State University Extension Service.

- Parish, J. A. 2007. Effective fiber in beef cattle diets. Beef Production Strategies. Cattle Business in Mississippi. Mississippi State University.
- Poppi, R.E., Minson, D.J. and Hendricksen. 1980. The validity critical size theory for particles leaving the rumen. *J Agric. Sci.* 94, 275-280.
- Rayburn, E.B. 1994. Forage Quality of Intensive Rotationally Grazed Pastures. Extension Memo, Oct. 1994. West Virginia University Extension Service, PO Box 6108, Morgantown, WV 26506-6108.
- Righi, F., Rubini, P., Romeneli, S., Renzi, M., Rossi, F., and Quarantelli, A. 2008. A study of alternative field system for the evaluation of the total mixed ration physical form. *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma (Vol. XXVIII.)*, pag. 181-190.
- Russell, J. B., O'Connor, J. D., Van Soest, P. J., Fox, D. G., and Sniffen, C. J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J. Animal Sci.* 70:3551-3561.
- Senger C. D., Kozloski G. V., Bonnacarrère S. M., Mesquita F. R., Alves T. P. and Castagnino D. S. 2008. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. *Animal feed Science and Technology.* 146:169-174.
- Sniffen, C. J. O'Connor, J. D., Van Soest, P. J., Fox, D. G., and Russell, J. B. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrates and protein availability. *J. Animal Sci.* 70:3562-3577.
- Soita W. H. 2001. The Influence of forage particle size on rumen metabolic responses and nutrient utilization. Tesis Doctoral. Department of Animal and Poultry Science, University of Saskatchewan, Saskatoon. Ottawa ON, Canada.
- Traxler, M. J., Fox, D. G., Van Soest, P. J., Pell, A. N., Lascano, C. E., Lanna, D. P. D., Moore, J. E., Lana, R. P. Vélez, M., and Flores, A. 1997. Predicting forage indigestible NDF from lignin concentration. *J. Animal Sci.* 76:1469-1480.
- Trowell, H. 1974. Editorial: Definition of dietary fiber. *Lancet* 1:503.
- Trowel, H., Southgate, D. A., Wolever, T. M., Leeds, A. R., Gassull, M. A., and Jenkins, D. J. 1976. Letter: Dietary fiber redefined. *Lancet* 1:967.
- Undersander D., Mertens D. R. and Thiex N. 1993. Forage Analysis Procedures. National Forage Testing Association. Omaha, NE. USA.
- Van Soest, P. J. 1964. Symposium on nutrition and forage and pasture: new chemical procedures for evaluating forages. *J. Animal Sci.* 23:838-845.

- Van Soest, P. J. 1967. Development of a comprehensive system on feed analysis and its applications to forages. *J. Animal Sci.* 26:119-128.
- Van Soest, P. J. 1973. Collaborative study on acid-detergent fiber and lignin. *J Assoc. Off. Anal. Chem.*, 56:781-784.
- Van Soest P.J., Robertson G.B. and Lewis B.A. 1991. Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Varga G. A., Dann H. M. and Ishler V. A. 1998. The use of fiber concentrations for ration formulation. *J. Dairy Sci.* 81:3063–3074.
- Weiss, W.P. and Shockey, W. L. 1991. Value of orchardgrass and alfalfa silage fed with varying amounts of concentrates to dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:1933.
- Woodford, S. T. and Murohy, M.R. 1988. Dietary alternation of particle breakdown and passage from the rumen in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 71:687-696.
- Yang, W. Z. and Beauchemin, K. A. 2007. Altering physically effective fiber intake through forage proportion and particle length: chewing and ruminal pH. *J. Dairy Sci.* 90:2826-2838.
- Zinn, R. A. and Ware, R. A. 2007. Forage quality: digestive limitations and their relationships to performance of beef and dairy cattle. University of California, Davis. 22th Annual Southwest Nutrition & Management Conference. February 22-23, 2007. Tempe, Az. 94-54.

APÉNDICE

Cuadro 1. Valores de fibra detergente ácida usando la modificación del método de Chai y Udén (1998) en las diferentes muestras analizadas en el presente estudio.

ID	Forraje	Tipo	FDA		
			50%	75%	100%
RGKKY	Raigrás anual Pry KKY	1	16.37	13.85	13.88
TALLNC	Festuca Cajun Eval 4 - 2004 #1, NCSU	1	39.82	34.57	33.43
CSG	Ensilado de maíz	2	29.69	25.00	25.98
KKY	Pasto Kikuyo Kikuyo Nuevo, Pry KKY	2	31.89	26.55	25.59
SGUC	Pasto sudan Carl Adam, UC	2	43.53	34.66	37.51
GGNC	Pasto grama	2	53.47	46.22	43.97
SWGNC	Pasto Switchgrass Alamo June 23, 2001, NCSU	2	45.52	39.29	38.02
ALFNL	Alfalfa Lab ICA	4	31.07	27.66	29.09
ALFNC	Alfalfa cimarrón 6-13-05 Q16 #375 FD, NCSU	4	39.23	35.59	30.95
TBLNC	Trébol ladino 6-13-05, NCSU	4	38.34	33.31	33.24
WCSMX	Semilla de algodón Lab ICA	6	33.64	29.06	31.34
WCSNC	Semilla de algodón Sharon Freeman, NCSU	6	39.63	34.03	40.01
SBMNC	Harina de soya Sharon Freeman, NCSU	5	11.32	7.87	10.74
YLNWC	Maíz amarillo Sharon Freeman, NCSU	6	4.95	3.49	3.84
WTNL	Grano de trigo Lab ICA	6	3.92	3.25	3.67
CGMNC	Harina de gluten de maíz	6	33.01	22.14	20.96
MRSTW	Paja de arroz macerada Carl Adam, UC	7	60.50	51.79	55.61
RSTWUC	Paja de arroz Carl Adam, UC	7	52.31	54.46	52.42
SBHLNC	Cascarilla de soja Sharon Freeman, NCSU	7	47.82	50.24	50.25
CSHLNC	Cascarilla de semilla de algodón Sharon, NCSU	7	77.94	71.43	67.34
DDKKY	Muestra duodenal Charly, Period #3, Pry KKY	8	30.82	28.54	28.47
DDPHE	Muestra duodenal 01 Period #1, PHEITK	8	17.63	16.15	12.93
DDWCS	Muestra duodenal Bush P1, WCSxFBZ	8	32.32	27.55	31.66
FEA1	Muestra fecal Fidel Period #1, EA1M97	9	55.46	51.21	48.07
FWCS	Muestra fecal Bush P1, WCSxFBZ	9	44.02	42.58	43.82

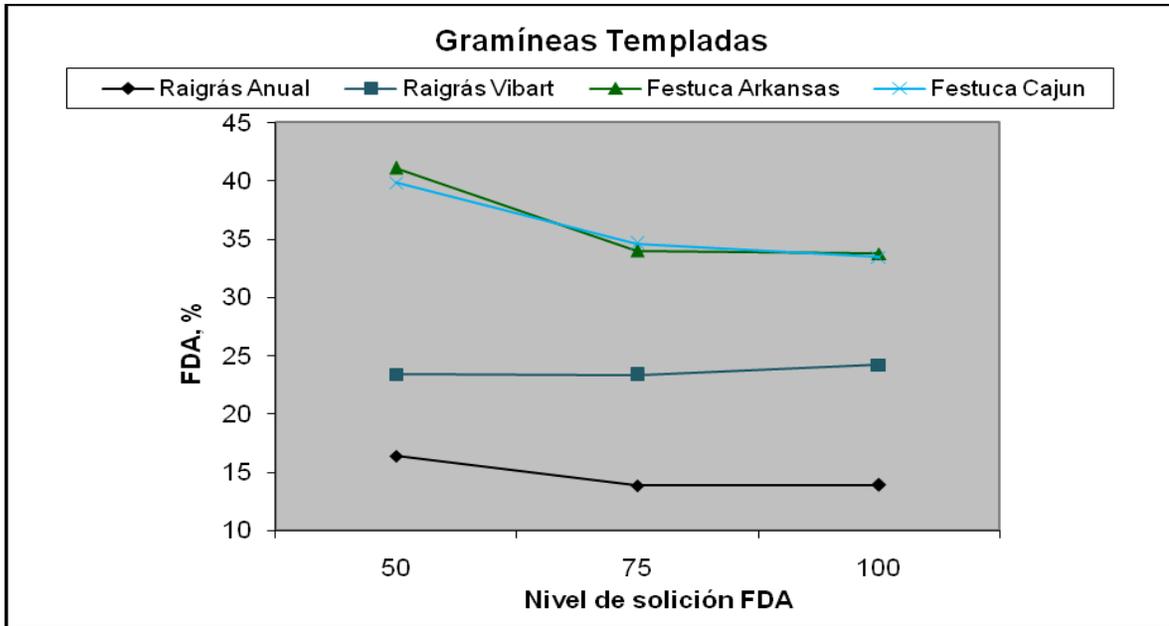


Figura 1. Tendencia de la fibra detergente ácida (FDA) con los diferentes niveles de concentración de la solución FDA en gramíneas templadas.

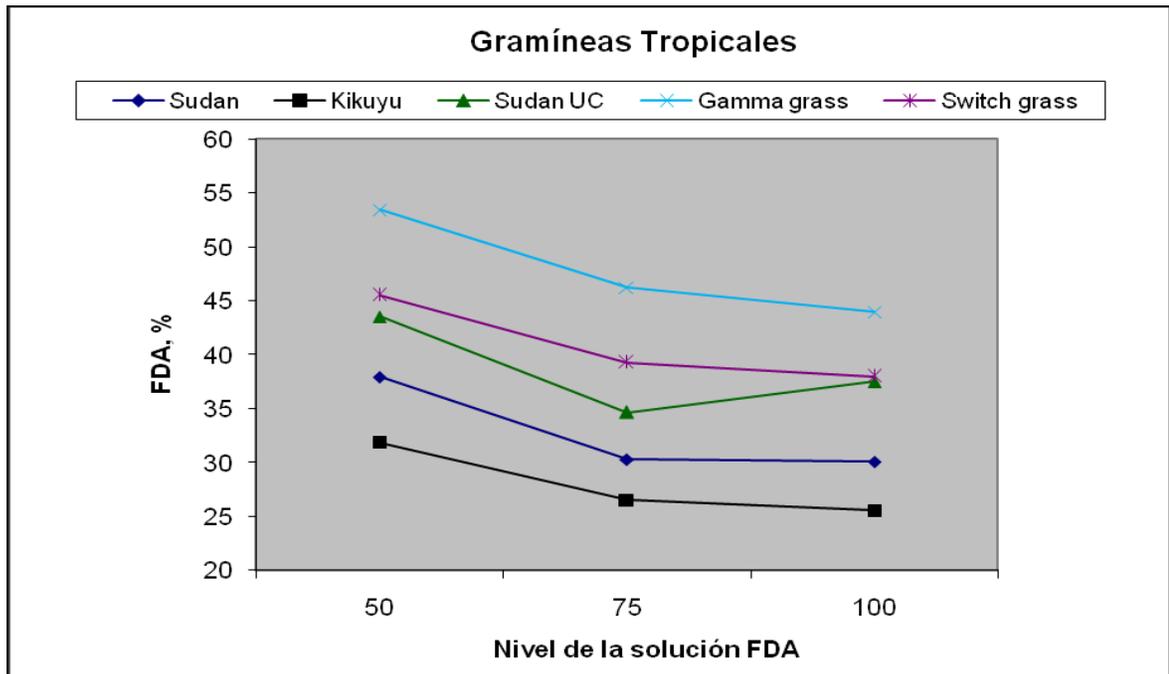


Figura 2. Tendencia de la fibra detergente ácida (FDA) con los diferentes niveles de concentración de la solución FDA en gramíneas tropicales.

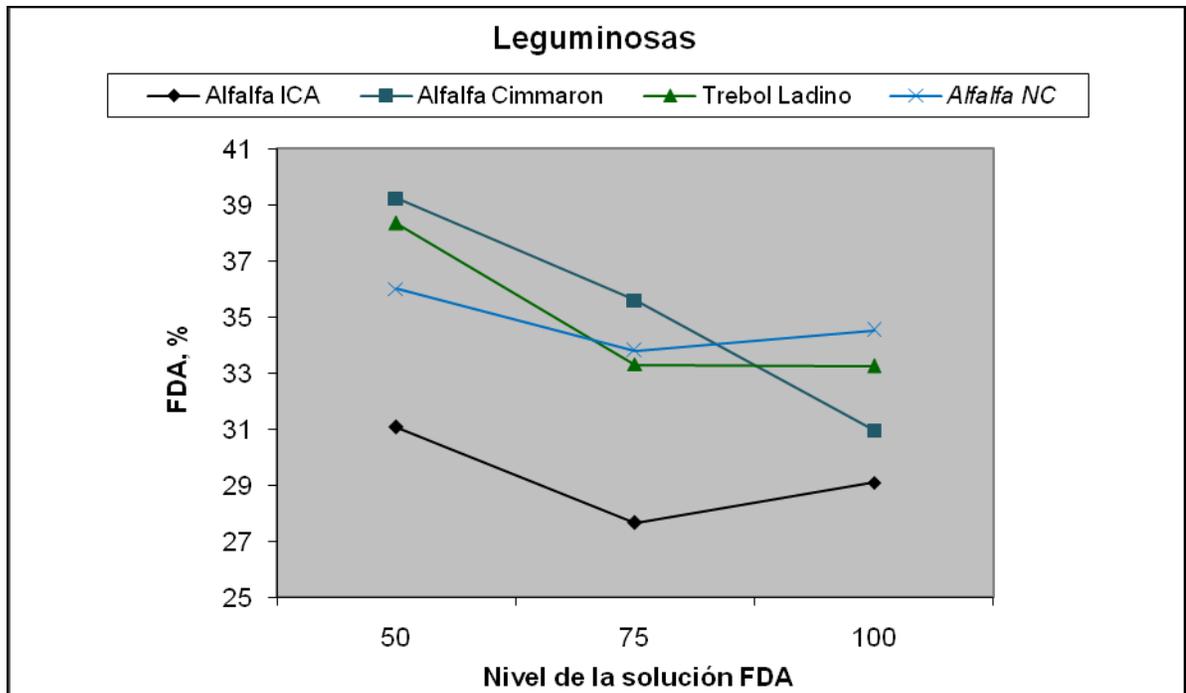


Figura 3. Tendencia de la fibra detergente ácida (FDA) con los diferentes niveles de concentración de la solución FDA en leguminosas.