



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**MANUAL DE PRÁCTICAS
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN NUTRICIÓN Y
PRODUCCIÓN ANIMAL**

**Responsable de la elaboración: Dr. Rubén Barajas Cruz, MC. Diego Jiménez Leyva y
MC. Ernesto Velázquez Elenes**

**Elaboración: Agosto 2015
Actualización: agosto 2018; noviembre 2021**

DIRECTORIO

DR. JESÚS MADUEÑA MOLINA
RECTOR

DR. GERARDO ALAPIZCO CASTRO
SECRETARIO GENERAL

MC. JAIME ELEAZAR BORBOLLA IBARRA
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DR. CARLOS BELL CASTRO TAMAYO
SUBSECRETARIO ACADÉMICO

EPAB. ISABEL QUINTERO OSUNA
SUBSECRETARIO ADMINISTRATIVO

DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO
COORDINADORA DE LABORATORIOS

DR. RUBÉN BARAJAS CRUZ
RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN NUTRICIÓN Y
PRODUCCIÓN ANIMAL

PRÓLOGO

Este manual tiene la finalidad de ser una guía para los estudiantes de posgrado (maestría y doctorado) en aquellas técnicas de laboratorio que se usan en la nutrición animal; la cual como ciencia basa su aplicación en el conocimiento de las demandas nutricionales de los animales en cada uno de sus estados fisiológicos y en la oferta de los nutrimentos para satisfacer estas necesidades en las cantidades y calidad adecuadas, además del estudio de los fenómenos fisiológicos que se presentan con el uso de diferentes y nuevos ingredientes en la alimentación animal, así como de diferentes situaciones que se presentan en la producción animal.

Es importante señalar que durante el desarrollo de las técnicas el estudiante deberá observar las recomendaciones de bioseguridad indicadas para cada técnica, como pueden ser la utilización de guantes y lentes de seguridad, mascarillas contra polvo, lo anterior con el propósito de evitar accidentes o riesgos para la salud y de inculcar las medidas de seguridad.

REGLAMENTO DE BIOSEGURIDAD

Las medidas de la bioseguridad en el laboratorio.

- a. Requisitos para el ingreso al laboratorio.
 - El acceso al laboratorio es restringido. Solo podrán ingresar aquellas personas que tengan alguna actividad definida a realizar (prácticas).
 - El personal y alumnos deberán ponerse bata blanca para ingresar y permanecer en el laboratorio.
 - No introducir ninguna clase de alimentos o bebidas, ni equipos o materiales susceptibles de dañarse o contaminarse.
 - No se deben ingresar animales.
 - Guardar el debido comportamiento y seguir las instrucciones indicadas por el responsable y/o encargado, así como aquellas indicadas en carteles y avisos colocados a la vista.
- b. Normas de comportamiento durante el desarrollo de la práctica:
 - Cumplir con lo dispuesto en el manual de prácticas.
 - Mantener una actitud respetuosa hacia el profesor y los compañeros evitando accidentes.
 - Utilizar adecuadamente instrumental, equipos e instalaciones. En caso del daño del mismo, se deberá reponer o reparar por partes o de los responsables.
 - Avisar de inmediato al profesor y/o responsable en caso de accidente (cortaduras, derrames de líquidos tóxicos o corrosivos, salpicaduras etc).
 - El responsable de la práctica verificará la limpieza y el orden del lugar antes y después de la práctica.
- c. Manejo de los desechos del laboratorio. El manejo de los desechos se realizará de acuerdo a la normatividad oficial vigente establecida para ello:
NOM-087-ECOL-SSA1-2002 Residuos biológicos- Infecciosos.
NOM-052-SEMANART-2005. Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

INDICE

A. Q. P. Materia Seca parcial a 60 – 65 °C	1
A. Q. P. Materia Seca total a 105 °C	3
A. Q. P. Materia Seca determinación por Tolueno	5
A. Q. P. Proteína Cruda	8
A. Q. P. Fibra Cruda	10
A. Q. P. Grasa Cruda	14
A. Q. P. Cenizas	16
A. Q. P. Elemento Libres de Nitrógeno	18
Nitrógeno por medio de Tecator	19
Fibra Insoluble en Detergente Neutro	22
Fibra Insoluble en Detergente Ácido	27
Digestibilidad in situ de alimentos e ingredientes	31
Digestibilidad aparente por colección total de heces	41
Producción de gas en heces in vitro	44
Cenizas Insolubles en Ácido	46

ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL

DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

1. GENERALIDADES.

Todos los alimentos, cualquiera que sea el método de industrialización a que hayan sido sometidos, contienen agua en mayor o menor proporción. Las cifras de contenido en agua varían entre un 60 y un 95% en los alimentos naturales. En los tejidos vegetales y animales, puede decirse que existe en dos formas generales: “agua libre” y “agua ligada”. El agua libre o absorbida, que es la forma predominante, se libera con gran facilidad. El agua ligada se halla combinada o absorbida. Se encuentra en los alimentos como agua de cristalización (en los hidratos) o ligada a las proteínas y a las moléculas de sacáridos y absorbida sobre la superficie de las partículas coloidales.

Los métodos de secado son los más comunes para valorar el contenido de humedad en los alimentos; se calcula el porcentaje en agua por la pérdida en peso debida a su eliminación por calentamiento bajo condiciones normalizadas. Aunque estos métodos dan buenos resultados que pueden interpretarse sobre bases de comparación, es preciso tener presente que a) algunas veces es difícil eliminar por secado toda la humedad presente; b) a cierta temperatura el alimento es susceptible de descomponerse, con lo que se volatilizan otras sustancias además de agua, y c) también pueden perderse otras materias volátiles aparte de agua.

A. MATERIA SECA PARCIAL A 60 – 65 °C

2. MATERIALES Y EQUIPO.

2.1. Reactivos y consumibles:

2.2. Cristalería y equipo:

- Bandeja de aluminio
- Estufa u Horno de secado de aire forzado
- Báscula digital con precisión de 0.001 g

2.3. Equipo de protección:

- Bata de laboratorio

3. MUESTRA:

Alimento, ingredientes alimenticios o heces de animales tanto rumiantes como no rumiantes.

4. PROCEDIMIENTO:

- Todo el proceso debe realizarse en duplicado.
- Use una bandeja de aluminio limpia y seca.
- Pese la bandeja de aluminio vacía con exactitud. **P₁**
- Agregue el material de muestra hasta que llene la bandeja y registre el peso de la bandeja mas la muestra húmeda. **P₂**
- Coloque la bandeja con la muestra húmeda en el horno de convección de aire forzado con temperatura de 60 - 65 °C por un periodo no menor a las 18 horas.
- Luego del periodo indicado con anterioridad, retire la bandeja con la muestra parcialmente seca del horno y colóquela sobre la mesa dejando que se equilibre con la humedad del aire del laboratorio por lo menos durante 30 minutos.
- Pese la bandeja con la muestra parcialmente seca y registre este valor. **P₃**

P₁. Peso de la bandeja vacía

P₂. Peso de la bandeja mas la muestra fresca

P₃. Peso de la bandeja mas la muestra parcialmente seca

P₄. Peso de la muestra fresca (P₂ – P₁)

5. CÁLCULOS:

El contenido de humedad del material se determina por la diferencia de peso entre el material fresco y el material parcialmente seco. Para obtener el contenido parcial de materia seca a 60 – 65 °C, utilice la siguiente ecuación:

$$P_3 - P_1$$

$$\% \text{ de MS} = \frac{\quad}{P_4} \times 100$$

$$P_4$$

El contenido parcial de humedad se obtiene por diferencia:

% de humedad parcial a 60 °C = 100 - % MS a 60 °

REFERENCIAS:

AOAC International. 2000. Official Methods of Analysis. 17th Ed. W. Horwitz, Editor.

De Gracia M. S. y Gallardo A. 2011. Guía para el Análisis Bromatológico de Muestras de Forrajes. Laboratorio de Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Panamá.

Laboratorio de Alimentos I, Departamento De Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM. 2007-2008.

Undersander, D., D.R. Mertens y N. Thiex. 2001. Forage Analyses Procedures. National Forage Testing Association, www.foragetesting.org.

B. MATERIA SECA TOTAL A 105 °C

2. MATERIALES Y EQUIPO.

2.1. Reactivos y consumibles:

2.2. Cristalería y equipo:

- Báscula digital con precisión de 0.0001 g
- Crisol de porcelana o envases de aluminio (50 mm de diámetro y 40 mm de profundidad)
- Desecador
- Pinzas de metal

2.3. Equipo de protección:

- Bata de laboratorio

3. MUESTRA:

Alimento, ingredientes alimenticios o heces de animales tanto rumiantes como no rumiantes.

4. PROCEDIMIENTO:

- Todo el proceso debe realizarse en duplicado.
- Coloque un crisol de porcelana con capacidad de 50 ml en un horno de convección de aire forzado a 105 °C por 16 horas por lo menos. Si las muestras no serán utilizadas para la determinación de cenizas, se pueden utilizar pequeños envases de aluminio no muy profundos con tapa, de aproximadamente 50 mm de diámetro y 40 mm de profundidad.
- Remueva el crisol de porcelana del horno, utilizando pinzas de metal, y lo coloca en un desecador, el cual debe poseer un agente secante en el fondo. Coloque la tapa del desecador sin cerrarlo completamente. Si lo cierra completamente provocara un vacío dificultando la remoción posterior de la tapa. Espere por lo menos dos minutos y proceda a colocar la tapa de manera que cierre herméticamente el desecador. Espere cinco minutos para que se enfríe el crisol.
- Remueva el crisol del desecador con unas pinzas de metal y proceda a registrar su peso. El peso debe registrarse en una balanza analítica con precisión de 0.0001 g. **P₁**
- Sin remover el crisol de la balanza, agregue con cuidado 2 g de muestra y registre el peso con la mayor exactitud hasta de 0.0001 g. **P₂**
- Retire el crisol de la balanza y lo coloca en un horno de convección de aire forzado a 105 °C durante 24 horas. Algunos procedimientos indican un término de 3 horas solamente.
- Al final del periodo de secado, remueva el crisol del horno y lo coloca en un desecador, con las mismas precauciones indicadas con anterioridad. Déjelo enfriar.
- Registre el peso del crisol mas la muestra seca con exactitud hasta de 0.0001 g. **P₃**

P₁. Peso del crisol vacío

P₂. Peso del crisol mas la muestra fresca

P₃. Peso del crisol mas la muestra seca

P₄. Peso de la muestra fresca (P₂ – P₁)

5. CÁLCULOS:

El contenido de humedad del material se determina por la diferencia de peso entre el material fresco y el material seco. Para obtener el contenido de materia seca a 105 °C, utilice la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de MS} = \frac{P_3 - P_1}{P_4} \times 100$$

REFERENCIAS:

AOAC International. 2000. Official Methods of Analysis. 17th Ed. W. Horwitz, Editor.

De Gracia M. S. y Gallardo A. 2011. Guía para el Análisis Bromatológico de Muestras de Forrajes. Laboratorio de Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Panamá.

Laboratorio de Alimentos I, Departamento De Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM. 2007-2008.

Undersander, D., D.R. Mertens y N. Thiex. 2001. Forage Analyses Procedures. National Forage Testing Association, www.foragetesting.org.

C. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD POR DESTILACIÓN CON TOLUENO.

1. GENERALIDADES. Algunas muestras poseen una cantidad variable de compuestos volátiles, los cuales pueden eliminarse si la muestra se calienta a las temperaturas utilizadas para determinar materia seca en hornos de convección de aire forzado. En muchos casos estas pérdidas pueden ser insignificantes, mientras que para otras puede resultar elevada, y se puede sobreestimar el contenido de humedad. Este es el caso de los ensilajes, donde si se coloca el material en un horno convencional se pueden perder los ácidos acético, propiónico y butírico, así como el amoníaco. Igualmente, algunos carbohidratos se pueden descomponer y las proteínas pueden ligarse y formar compuestos insolubles en otros materiales.

Para evitar este tipo de errores en la determinación de humedad se utiliza el método de destilación por tolueno o método de Dean y Stark. En este caso, se toma en consideración que el solvente y el agua son inmiscibles, que el solvente posea un punto de ebullición mayor que el agua, sea menos denso que el agua y seguro de utilizar. Durante la destilación, el tolueno y el agua del material se evaporan y condensan en conjunto, y los ácidos grasos volátiles u otro material volátil permanece en la muestra, disueltos en el solvente orgánico, lo que permite que no se sobreestime el contenido de humedad del material. Algunos autores indican que la humedad remanente, cerca de 3 a 5%, son el equivalente de la pérdida de ácidos grasos volátiles durante el secado convencional.

2. MATERIALES Y EQUIPO.

2.1. Reactivos y consumibles:

- Ácido crómico
- Alcohol
- Tolueno grado analítico

2.2. Cristalería y equipo:

- Manta eléctrica
- Matraz bola de fondo redondo con capacidad de 500 mL
- Destilador Leibig de 500 mm de altura
- Recibidor de humedad tipo Bidwell-Sterling con recibidor de 5 ml de capacidad

2.3. Equipo de protección:

- Bata de laboratorio
- Lentes de protección

3. MUESTRA:

Alimento, ingredientes alimenticios o heces de animales tanto rumiantes como no rumiantes.

4. PROCEDIMIENTO:

- Todo el proceso debe realizarse en duplicado.
- Conecte un balón de fondo redondo con capacidad de 250 mL y un destilador Leibig de 500 mm de altura a un recibidor de humedad tipo Bidwell-Sterling con un recibidor de 5 mL de capacidad. (Ver figura 1)
- Destile una cantidad conocida de agua para determinar la exactitud de la columna hasta 0.01 mL.

- Se limpia el tubo receptor y el condensador con una mezcla de ácido crómico, luego con suficiente agua, luego alcohol y finalmente lo seca al horno para eliminar todo vestigio de agua.
- Pese suficiente cantidad de muestra que le permita extraer por lo menos de dos a cinco mililitros de agua de la muestra. El peso debe ser exacto con una exactitud de 0.0001 g.
- Introduzca la muestra en el balón y agregue suficiente tolueno grado analítico hasta cubrir completamente la muestra.
- Llene el tubo receptor con tolueno, agregándolo por la parte superior del condensador.
- Caliente hasta el punto de ebullición y destile lentamente, aproximadamente dos gotas por segundo, hasta que toda el agua haya sido extraída, y luego eleve la tasa de destilación hasta cuatro gotas por segundo.
- Cuando toda el agua haya sido aparentemente extraída, lo que puede tomar cerca de una hora, lave el condensador adicionando tolueno desde la parte superior y continúe la destilación para ver si se destila alguna cantidad adicional de agua. Si ocurre, repite la operación.
- Si permanecen algunas gotas de agua en el condensador, remuévalas cepillando el interior del condensador con un cepillo saturado con tolueno, lavando igualmente con tolueno.
- Deje que el contenido se enfríe a temperatura ambiente. Fuerce cualquier gota de agua hacia el receptor utilizando un alambre de cobre cubierto con una banda de hule al final. Mida el volumen de agua con exactitud de 0.1 mL, y realice los cálculos para obtener el porcentaje de humedad.



Figura 1. Sistema para determinar materia seca por destilación con tolueno.

5. CÁLCULOS:

El contenido de humedad del material se determina por la diferencia de peso entre el material fresco y el material seco. El contenido de materia seca se determina por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ MS} = \left(1 - \frac{\text{Volumen de agua (mL)}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \times 100\right)$$

REFERENCIAS:

AOAC International. 2000. Official Methods of Analysis. 17th Ed. W. Horwitz, Editor.

De Gracia M. S. y Gallardo A. 2011. Guía para el Análisis Bromatológico de Muestras de Forrajes. Laboratorio de Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Panamá.

Laboratorio de Alimentos I, Departamento De Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM. 2007-2008.

Undersander, D., D. R. Mertens y N. Thiex. 2001. Forage Analyses Procedures. National Forage Testing Association, www.foragetesting.org.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CRUDA (PC) MÉTODO KJENDHAL

1. GENERALIDADES.

En muchas partes este análisis es conocido como el de determinación de proteína cruda, debido a que por convención, el porcentaje de nitrógeno determinado en el análisis se multiplica por el factor 6.25 para obtener el porcentaje de proteína cruda. Este factor está relacionado con el hecho de que la proteína, en términos generales, contiene un 16% de nitrógeno, por lo que el factor se obtiene de la relación 100/16. Sin embargo, es conocido que esto no es tan cierto, puesto que se conoce que el porcentaje de nitrógeno en las proteínas varía desde un 15.5 hasta un 18%, por lo que habría que aplicar un factor diferente para cada tipo de proteína.

2. MATERIAL Y EQUIPO.

2.1. Reactivos y consumibles:

- Papel filtro
- Ácido sulfúrico concentrado
- Agua destilada
- Ácido bórico
- Azul de metileno
- Gránulos de Zinc
- Solución de NaOH al 40%
- Solución 0.1N de ácido clorhídrico

2.2. Cristalería y equipo:

- Digestor Kjendhal
- Matraz Kjendahl
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL

2.3. Equipo de protección:

- Bata de laboratorio
- Lentes de seguridad (Goggles)
- Guantes de látex
- Guantes con aislante térmico

3. MUESTRA:

Alimento, ingredientes alimenticios o heces de animales tanto rumiantes como no rumiantes.

4. PROCEDIMIENTO:

Digestión:

- Pesar aproximadamente 0.5 g de muestra sobre un papel filtro y añadir 3g aproximadamente de catalizador, doblar perfectamente el papel e introducirlo a un matraz Kjendahl de 800 mL.
- Añada 18 mL de ácido sulfúrico concentrado al matraz y poner en el digestor a una temperatura máxima hasta que la solución se clarifique.
- Dejar enfriar.
- El análisis puede suspenderse en este punto en caso de que así sea necesario. Deje los matraces debidamente tapados con tapón de hule.
- Añadir 100 mL de agua destilada y dejar enfriar.

Destilación:

- Colocar 40 mL de solución de ácido bórico en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y añadir 3 gotas de indicador de azul de metileno.
- Nota: Asegurarse que la punta de la manguera se encuentre en el fondo del matraz.
- Ponga unos gránulos de Zinc al matraz Kjendahl.
- Sosteniendo el matraz Kjendahl en posición inclinada, añadir cuidadosamente 50 mL de solución de NaOH al 40% de modo de que resbale por las paredes y se formen dos capas.
- Conectar inmediatamente al destilador, calentar hasta que todo el NH₃ haya sido destilado (125-150 mL son suficientes).
- Retire el matraz Kjendahl cuando empiece a brincar.

Titulación:

- Titular con la solución 0.1N de ácido clorhídrico.

5. CÁLCULOS:

$$\% \text{ de PC} = \frac{\text{mL de HCl gastados} \times \text{N del ácido} \times 0.014 \times 6.25}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

REFERENCIAS:

AOAC International. 2000. Official Methods of Analysis. 17th Ed. W. Horwitz, Editor.

De Gracia M. S. y Gallardo A. 2011. Guía para el Análisis Bromatológico de Muestras de Forrajes. Laboratorio de Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Panamá.

Galyean M. L. 1997. Laboratory Procedures in Animal Nutrition Research. Department of Animal and Food Sciences. Texas Tech University, Lubbock.

Laboratorio de Alimentos I, Departamento De Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM. 2007-2008.

DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA (FC)

1. GENERALIDADES.

La fibra ha sido uno de los componentes del tejido vegetal, en especial de los forrajes, que ha causado gran controversia tanto en su definición como en su determinación. Para la clasificación de los forrajes se utiliza un nivel de 18% de fibra para separar los forrajes de los concentrados o suplementos proteicos y los energéticos. No obstante, se conoce que alimentos con valores superiores de fibra, como el caso del ensilaje, son alimentos de alto valor energético, donde la fibra no es una limitante para su consumo y digestibilidad. Si se utiliza el método de análisis proximal o de Weende la fracción resultante identificada como fibra cruda no está constituida de manera uniforme por compuestos específicos.

2. MATERIAL Y EQUIPO.

2.1. Reactivos y consumibles:

- Ácido Sulfúrico al 1.25%: Esto se logra disolviendo 1.25 g de H_2SO_4 concentrado en 100 mL de agua. La concentración debe verificarse por titulación.
- Hidróxido de sodio al 1.25%: Esto se logra disolviendo 1.25 g de NaOH en 100 mL de agua. Se debe verificar la concentración por titulación.
- Alcohol: Se utiliza alcohol etílico al 95% grado reactivo, así como metanol o propanol.
- Solución limpiadora: Cuando se utilizan crisoles porosos para la filtración es conveniente que periódicamente sean sometidos a una limpieza, dado que partículas de la muestra pueden obstruir parcialmente los poros. La solución se prepara mezclando:
- Solución ácida: Disolver volúmenes iguales de ácido clorhídrico concentrado y agua.
- Solución alcalina: Disolver 5 g de Na_2H_2EDTA , 50 g de Na_2HPO_4 y 200 g de KOH en agua hasta completar un litro.
- Mantenga las soluciones en recipientes de boca ancha con capacidad para dos a tres litros donde puedan sumergirse y mantener los crisoles.
- Agente antiespumante Se puede utilizar alcohol amílico u otra solución comercial con esta propiedad.

2.2. Cristalería y equipo:

- Vaso Berzelius
- Digestor de fibras tipo Goldfish

2.3. Equipo de protección:

- Bata de laboratorio
- Lentes de seguridad (Goggles)
- Guantes con aislante térmico (asbesto)

3. MUESTRA:

Alimento, ingredientes alimenticios o heces de animales tanto rumiantes como no rumiantes.

4. PROCEDIMIENTO:

- Todo el proceso debe realizarse en duplicado.

- Se puede utilizar para este procedimiento la muestra proveniente de la determinación del extracto etéreo, según procedimiento detallado con anterioridad, o la muestra parcialmente seca.
- Coloque en el horno de convección forzada de aire caliente a 105 °C por espacio de cuatro horas un crisol de porcelana tipo Gooch con fondo poroso de 40 a 50 mL de capacidad. Retire del horno y deje enfriar en un desecador.
- En un sistema de filtración por succión coloque un embudo tipo Büchner con una malla de 200 mesh que selle completamente el área de filtración.³⁴
- Coloque en el vaso Berzelius con capacidad de 600 ml aproximadamente 2.0 g de muestra pesada con exactitud de 0.0001 g. **P₃**
- Caliente la solución de H₂SO₄ al 1.25% hasta punto de ebullición y transfiera, con la ayuda de guantes de asbesto y mucho cuidado, 200 ml al vaso Berzelius que contiene la muestra, asegurándose que toda la muestra quede humedecido y no se adhiera a las paredes.
- Mantenga en punto de ebullición aproximadamente un litro de agua destilada.
- Se puede añadir al vaso químico una solución antiespumante, como ejemplo una a dos gotas de alcohol amílico o cualquier otro producto comercial con propiedades antiespumantes.
- Proceda a colocar el vaso sobre las hornillas, encienda el sistema de condensación y enfriamiento de agua, y encienda las hornillas. La temperatura debe ser ajustada de manera que se pueda llevar desde 25 °C hasta punto de ebullición 200 mL de agua en 15 ± 2 minutos. Luego mantenga la temperatura de manera que se logre una ebullición estable, pero leve sin formación de mucha espuma
- Para el caso de varias muestras, se recomienda colocar los vasos a intervalos de cinco minutos. Permita que la solución se mantenga en ebullición durante 30 minutos. Periódicamente rote los vasos de manera que la muestra no se adhiera a las paredes, y se mantenga en solución. En caso de que parte de la muestra se adhiera a las paredes, con una botella lavadora que contiene solución de H₂SO₄ al 1.25 % caliente, lave con cuidado las paredes hasta que toda la muestra permanezca en solución.
- Cuando se está terminando el periodo de reflujó, pase agua caliente por el embudo Büchner, encienda el sistema de succión de manera que se alcance una presión de succión de 25 mm aproximadamente.
- Retire el vaso de la hornilla, con cuidado utilizando guantes de asbesto, decante el líquido sobrenadante sobre el embudo y lave el residuo del vaso utilizando el mínimo de agua caliente, con ayuda de una botella lavadora. Filtre hasta que este seco, y luego proceda a lavar el residuo de cuatro a cinco veces con aproximadamente 40 a 50 mL de agua caliente, cercana al punto de ebullición. Al adicionar el agua de lavado no aplique succión. Este proceso deberá eliminar la mayor cantidad de residuo ácido de la muestra.
- Trasvase el residuo del filtro hacia el vaso Berzelius utilizando solución a punto de ebullición de NaOH al 1.25%. Luego de lavar el filtro, añada suficiente solución de NaOH al 1.25% para completar aproximadamente 200 mL Coloque los vasos a intervalos de cinco minutos y proceda a mantener la solución en ebullición por espacio de 30 minutos.

- Se puede añadir al vaso químico una solución antiespumante, como ejemplo una a dos gotas de alcohol amílico o cualquier otro producto comercial con propiedades antiespumantes. También se pueden utilizar las denominadas perlas de ebullición para evitar el sobrecalentamiento y ebullición brusca de la solución.
- Periódicamente rote los vasos de manera que la muestra no se adhiera a las paredes, y se mantenga en solución. En caso de que parte de la muestra se adhiera a las paredes, con una botella lavadora que contiene solución de NaOH al 1.25 % caliente, lave con cuidado las paredes hasta que toda la muestra permanezca en solución.
- Cuando se está terminando el periodo de reflujo, pase agua caliente por el crisol tipo Gooch, encienda el sistema de succión de manera que se alcance una presión de succión de 25 mm aproximadamente.
- Retire el vaso de la hornilla, con cuidado utilizando guantes de asbesto, decante el líquido sobrenadante sobre el crisol tipo Gooch y lave el residuo del vaso utilizando el mínimo de agua caliente, con ayuda de una botella lavadora.
- Eleve el nivel de vacío y proceda a lavar el residuo una sola vez con aproximadamente 25 a 30 mL de la solución de H₂SO₄ al 1.25% cercana al punto de ebullición, y posteriormente dos veces con aproximadamente 25 a 30 mL de agua caliente, cercana al punto de ebullición. Al adicionar el agua de lavado no aplique succión. Filtre hasta sequedad. En algunos casos se recomienda lavar una vez con alcohol y luego proceder a secar la muestra.
- Coloque el crisol con el residuo en un horno de convección forzada de aire caliente a una temperatura de 110° C durante la noche. Luego de este periodo colóquelos en un desecador para enfriarlos y pese con exactitud de 0.0001 g. **P₂**
- Posteriormente coloque el crisol en un incinerador, cuya temperatura máxima sea de 550 °C ± 10 °C, por espacio de dos horas. Al término de este periodo, deje enfriar el incinerador por debajo de los 250 °C, coloque el crisol en un desecador para enfriarlo y posteriormente registre su peso con exactitud de 0.0001 g. **P₁**
- Se recomienda procesar al menos dos blancos por cada 24 muestras analizadas.
- Determine el contenido de fibra cruda.

5. CÁLCULOS:

P₁. Peso del crisol tipo Gooch más cenizas

P₂. Peso del crisol tipo Gooch más residuo

P₃. Peso de la muestra fresca o parcialmente seca

Para el caso de ajuste por los análisis de los blancos, reste la pérdida promedio de peso (B) obtenida luego del secado e incinerado de los crisoles con los blancos a la pérdida de peso de la muestra analizada. Use la siguiente ecuación:

$$(P_2 - P_1) - B$$

$$\% \text{ de MS} = \frac{\quad}{P_3} \times 100$$

$$P_3$$

REFERENCIAS:

AOAC International. 2000. Official Methods of Analysis. 17th Ed. W. Horwitz, Editor.

De Gracia M. S. y Gallardo A. 2011. Guía para el Análisis Bromatológico de Muestras de Forrajes. Laboratorio de Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Panamá.

Galyean M. L. 1997. Laboratory Procedures in Animal Nutrition Research. Department of Animal and Food Sciences. Texas Tech University, Lubbock.

Laboratorio de Alimentos I, Departamento De Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM. 2007-2008.

DETERMINACIÓN DE EXTRACTO ETÉREO (EE) O GRASA CRUDA (GC)

1. GENERALIDADES.

Al utilizar algún tipo de solvente orgánico se espera que los compuestos grasos o lípidos se disuelvan y puedan ser removidos del material. No obstante, se conoce que otros compuestos, tales como ceras, aceites volátiles, clorofila y pigmentos, que no aportan mucha energía a la nutrición de los animales, también pueden ser extraídos con este procedimiento, por lo que de acuerdo a la cantidad presente de estos compuestos se puede sobreestimar el aporte energético de la fracción de lípidos del alimento evaluado.

El método para la determinación de la fracción de lípidos se basa en la evaporación continua de un solvente orgánico, en muchos casos éter etílico, que luego de condensarse pasa por la muestra extrayendo los materiales solubles.

2. MATERIAL Y EQUIPO.

2.1. Reactivos y consumibles:

- Éter etílico anhidro o éter de petróleo

2.2. Cristalería y equipo:

- Vaso de cristal de 100 mL
- Estufa de secado
- Desecador
- Dedal de porcelana

2.3. Equipo de protección:

- Bata de laboratorio
- Lentes de seguridad (Goggles)
- Guantes con aislante térmico (asbesto)

3. MUESTRA:

Alimento, ingredientes alimenticios o heces de animales tanto rumiantes como no rumiantes.

4. PROCEDIMIENTO:

- Todo el proceso debe realizarse en duplicado.
- Un vaso químico, de aproximadamente 100 mL, diseñado para el aparato Goldfish, se coloca en un horno a 105°C por espacio de dos horas como mínimo. Se deja enfriar en un desecador y se obtiene su peso con exactitud de 0.0001 g. **P₁**
- En el vaso químico se coloca de 30 a 40 mL del solvente orgánico que se va a utilizar. Se recomienda no utilizar solventes cuyo punto de ebullición exceda los 85 °C.
- Para el caso del éter etílico este debe ser anhidro y libre de peróxidos o éter de petróleo.
- Se pesan cerca de 2.0 g de muestra con exactitud de 0.0001 g y se colocan en los dedales de extracción a base de celulosa. **P₃**
- Se puede colocar el dedal con la muestra en el horno a 105 °C por dos horas o secar una porción de la muestra a esta temperatura previa al análisis.
- Coloque el dedal con la muestra dentro del extractor del sistema Goldfish.

- Conecte el vaso al sistema, y active el sistema de enfriamiento para la condensación del éter, eleve y encienda las hornillas. Las hornillas no necesariamente tienen que hacer contacto con el vaso químico.
- Si se establece una tasa de condensación de cinco a seis gotas por segundo, el proceso puede tomar cerca de cuatro horas. Durante este periodo verifique constantemente el volumen de éter y si observa alguna disminución significativa por escape puede añadir, con mucho cuidado, una porción adicional de éter al vaso químico.
- Luego de las cuatro horas, retire el calentador y permita que se seque el dedal. Deje que se enfríe.
- Remueva la muestra con el dedal de celulosa y coloque el tubo de recolección de éter bajo el condensador. Coloque nuevamente el vaso químico y caliente nuevamente hasta que casi todo el éter se haya evaporado del vaso y recogido en el tubo colector.
- Justo cuando todo el éter se ha casi evaporado, retire los calentadores y permita que se enfríen los vasos. Recoja el éter para un uso futuro.
- Complete la evaporación del éter en la cámara extractora de gases a temperatura ambiente hasta que no se sientan los vapores de éter.
- Una vez no se tengan residuos de éter en los vasos, coloque los vasos químicos con los residuos del extracto etéreo en el horno de aire caliente de convección forzada a 105 °C por 30 minutos, retíelos y colóquelos en un desecador. Déjelos enfriar y obtenga el peso del vaso más el residuo con una exactitud de 0.0001 g. **P₂**
- Estime el contenido de extracto etéreo.
- Para el método indirecto, coloque el dedal con la muestra a secar y determine la pérdida de peso.

5. CÁLCULOS:

P₁. Peso del vaso químico vacío

P₂. Peso del vaso químico más el extracto etéreo

P₃. Peso de la muestra fresca o parcialmente seca

El contenido (%) de extracto etéreo se determina por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de EE} = \frac{P_2 - P_1}{P_3} \times 100$$

REFERENCIAS:

AOAC International. 2000. Official Methods of Analysis. 17th Ed. W. Horwitz, Editor.

De Gracia M. S. y Gallardo A. 2011. Guía para el Análisis Bromatológico de Muestras de Forrajes. Laboratorio de Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Panamá.

Laboratorio de Alimentos I, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM. 2007-2008.

DETERMINACIÓN DE CENIZAS

1. GENERALIDADES. El procedimiento para determinar las cenizas requiere que el material se incinere a temperaturas entre los 500 y 600 °C, temperatura a la cual algunos minerales se volatilizan, tales como el yodo y el selenio. Igualmente se recomienda que no se utilice este procedimiento para materiales con alto contenido de azúcares o líquidos.

2. MATERIAL Y EQUIPO.

2.1. Reactivos y consumibles:

2.2. Cristalería y equipo:

- Mufla
- Crisol de porcelana
- Pinzas metálicas
- Desecador
- Balanza con precisión de 0.0001 g.

2.3. Equipo de protección:

- Bata de laboratorio
- Lentes de seguridad (Goggles)
- Guantes con aislante térmico (asbesto)

3. MUESTRA:

Alimento, ingredientes alimenticios o heces de animales tanto rumiantes como no rumiantes.

4. PROCEDIMIENTO:

- Todo el proceso debe realizarse en duplicado.
- El crisol y la muestra seca utilizada para la determinación de humedad a 105 o 135 °C se coloca en un incinerador frío, donde se ha preestablecido como temperatura máxima los 600 °C.
- Si no se ha realizado la determinación de humedad de la muestra y se hará directamente la determinación de cenizas, realice lo siguiente:
- Coloque un crisol de porcelana en un incinerador a 600 °C por espacio de dos horas.
- Retire el crisol del incinerador y déjelo enfriar por aproximadamente 1 hora en un desecador y determine con exactitud su peso hasta 0.0001 g. **P₁**
- Coloque el crisol en una balanza analítica y agregue aproximadamente 2 g de muestra con exactitud de 0.0001 g. **P₂**
- Coloque el crisol con la muestra en el incinerador, cierre la puerta y encienda el incinerador.
- Cuando la temperatura alcance los 600 °C deje las muestras por espacio de dos horas.
- Apague el incinerador y deje que la temperatura descienda por debajo de los 200 °C.
- Con mucho cuidado abra la puerta del incinerador para no crear corrientes de aire y remueva los crisoles hacia un desecador, utilizando pinzas y guantes de asbesto, para que se enfríen. Esto puede durar cerca de una hora.

- Pese los crisoles más las cenizas con exactitud hasta de 0.0001 g y realice los cálculos para obtener el porcentaje de cenizas. **P₃**

5. CÁLCULOS:

P₁. Peso del crisol vacío

P₂. Peso del crisol más la muestra fresca o parcialmente seca

P₃. Peso del crisol más las cenizas

P₄. Peso de la muestra fresca o parcialmente seca (P₂ – P₁)

El porcentaje de cenizas se determina por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{P_3 - P_1}{P_4} \times 100$$

REFERENCIAS:

AOAC International. 2000. Official Methods of Analysis. 17th Ed. W. Horwitz, Editor.

De Gracia M. S. y Gallardo A. 2011. Guía para el Análisis Bromatológico de Muestras de Forrajes. Laboratorio de Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Panamá.

Laboratorio de Alimentos I, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM. 2007-2008.

DETERMINACIÓN DE EXTRACTO LIBRE DE NITRÓGENO (E.L.N)

1. GENERALIDADES.

El cálculo de esta fracción se considera como la materia seca no determinada por la suma del extracto etéreo, fibra cruda, cenizas y proteína ($N \times 6.25$). Compuesto principalmente de carbohidratos altamente disponibles, tales como azúcares y almidón, pero también puede contener hemicelulosa y lignina, especialmente en forrajes.

Contiene los errores acumulados de todas las otras determinaciones. Mayormente debido a la solubilidad y pérdida de lignina y hemicelulosa en la preparación de la fibra cruda. Aún la celulosa no es totalmente recobrada y el comportamiento de diferentes materiales es variable.

2. MATERIAL Y EQUIPO.

3. MUESTRA:

4. PROCEDIMIENTO:

Este valor se estima por diferencia restando de 100 los porcentajes de humedad, proteína cruda, extracto etéreo, fibra cruda y cenizas.

5. CÁLCULOS:

$E.L.N. = 100 - (\% \text{ de Humedad} + \% \text{ de ceniza} + \% \text{ E.E.} + \% \text{ de proteínas} + \% \text{ fibra cruda.})$

REFERENCIAS:

AOAC International. 2000. Official Methods of Analysis. 17th Ed. W. Horwitz, Editor.

De Gracia M. S. y Gallardo A. 2011. Guía para el Análisis Bromatológico de Muestras de Forrajes. Laboratorio de Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Panamá.

Laboratorio de Alimentos I, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM. 2007-2008.

DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO POR MEDIO DEL DIGESTOR TECATOR

1. GENERALIDADES.

2. MATERIAL Y EQUIPO.

2.1. Reactivos y consumibles:

- Kjeltabs
- Urea
- Ácido sulfúrico concentrado
- Agua desionizada
- Ácido bórico
- Hidróxido de sodio (NaOH)

2.2. Cristalería y equipo:

- Matraz de Erlenmeyer de 250 ml
- Guantes de asbesto
- Digestor de proteínas, Foss Tecator 2100
- Destilador, Foss Tecator 2100
- Bomba de aspiración por flujo de agua
- Balanza con precisión de 0.0001 g.

2.3. Equipo de protección:

- Bata de laboratorio
- Lentes de seguridad (Goggles)
- Guantes con aislante térmico (asbesto)

3. MUESTRA:

Alimento, ingredientes alimenticios o heces de animales tanto rumiantes como no rumiantes.

4. PROCEDIMIENTO:

Digestión:

1. Coloque el interruptor de alimentación principal que se encuentra en frente del controlador de la digestión en la posición ON (encendido). Colocar la temperatura a 400 ° C aproximadamente utilizando el programa de control de temperatura. Deje tiempo para que la unidad pueda llegar a la temperatura.

2. Introduzca con cuidado los tubos de digestión en los orificios previstos en el bastidor matraz. Un tubo de digestión se debe establecer en todas las posiciones (incluso si está vacío) para que el colector de escape funcione correctamente.

3. Pesar aproximadamente 0,5 a 1 g de muestra homogénea de forraje en un pedazo de papel pesado. Doblar el papel con cuidado para que la muestra esté bien contenida. Coloque el papel doblado en el tubo de digestión y añadir 2 Kjeltabs a cada tubo. Además, pesar 0.1 g de urea estándar y tratar como el anterior. El blanco consiste en un pedazo de papel y Kjeltabs

doblado y pesado solamente. Correr un estándar de urea y uno en blanco con cada corrida de muestras a analizar.

4. Cuando la unidad ha estado en la digestión por un período de calentamiento adecuado, añadir 15 a 20 ml de ácido sulfúrico concentrado a cada tubo.

5. Después de completar la muestra y adición de reactivos a los tubos de digestión, eleve con cuidado el estante agarrándolo por las asas provistas y colocar en posición sobre la unidad digestora. Como el estante se levanta, cada tubo se apoyará en su borde superior. Con cuidado baje el estante de modo que cada tubo entre en su respectivo agujero y fondo en la base de la unidad.

6. Coloque las placas de extremo en el soporte bastidor del frasco y colocar el colector de escape en la parte superior de los tubos. Gire el suministro de agua en el colector de escape, a la mayor tasa de flujo de agua. Asegurar que el sistema de extracción de humos por aspiración con agua esté funcionando correctamente antes de su uso.

7. Digerir las muestras a 400 ° C aproximadamente durante 1 hora, o hasta que las muestras tienen una apariencia clara, azul-verde. Baje el suministro de agua al colector de escape para un caudal menor después de la primeros 5 a 10 minutos de digestión.

8. Después de la digestión, retire el estante que contiene los tubos (con sistema de extracción de humos todavía unido) del digestor y el lugar en el sistema de bastidor y la bandeja junto al digestor. Evitar que los tubos calientes entren en contacto con una superficie fría o húmeda. Como medida de seguridad, usar guantes y gafas cuando retire el bastidor y los tubos del digestor.

9. Permitir que los tubos se enfríen durante 15 a 20 minutos. Cuando los tubos se hayan enfriado, retire el estante que contiene los tubos de la campana de humos. Coloque el sistema de extracción de humos en el estante proporcionado bajo la campana de humos, y apague el suministro de agua al sistema de extracción de humos. Diluir la muestra digerida con 100 ml de agua desionizada cuando los tubos son lo suficientemente fría como para manejarlos. La dilución se debe hacer antes de que se forme un gel o una torta, pero no antes de que la digesta sea lo suficientemente fría para contener la reacción exotérmica. Asegúrese de que la digesta se haya disuelto completamente.

Destilación:

1. Abra la llave del agua de refrigeración a la Unidad de Destilación de vapor y deje que fluya a través de la unidad completa. La línea de drenaje del generador de vapor debe estar cerrada para la destilación de las muestras, pero el agua debe fluir libremente desde la línea de drenaje de residuos. El sistema ajustará automáticamente el flujo de agua al generador de vapor.

2. Coloque el recipiente de destilación con la muestra digerida en el aparato, girando el tubo para asegurar un sello completo.

3. Insertar al receptor el matraz de Erlenmeyer de 250 ml que contiene 25 ml de ácido bórico (Kjel-Sorb) indicador, asegurándose de que el tubo de suministro está completamente sumergido.
4. Después de cerrar la puerta de protección de seguridad de plástico, añadir aproximadamente 50 ml de NaOH lentamente empujando hacia abajo el mango dispensador alcalino, y permitir que el mango dispensador vuelva a su posición cerrada (el mango dispensador es cargado por resorte y volverá al mango sin aplicación de fuerza).
5. Abra la válvula de vapor para iniciar la generación de vapor. Si lo desea, establecer el tiempo de aproximadamente 6 min.
6. Reunir aproximadamente 175 ml de destilado en el matraz receptor. Durante los últimos 15 a 25 ml de colección, baje con cuidado el frasco de recepción para que el tubo esté por encima del nivel del líquido en el matraz receptor.
7. Cierre la válvula de vapor para detener la generación de vapor. Levante la puerta de protección de seguridad de plástico, y quite el matraz receptor. Use una pequeña cantidad de agua destilada hasta bajó el exterior de el tubo receptor en el matraz receptor.
8. Use guantes para retirar el recipiente de destilación y colocarlo en el soporte de tubos. Después que se ha enfriado durante 10 o 15 minutos, verter cuidadosamente el contenido por el desagüe, diluyendo con una gran cantidad de agua corriente del grifo.
9. Para extraer otra muestra, repita los pasos del 2 al 8.

5. CÁLCULOS:

$$\% \text{ de PC} = \frac{\text{mL de HCl gastados} \times \text{N del ácido} \times 0.014 \times 6.25}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

FUENTES DE INFORMACIÓN.

M. L. Galyean. 1997. Laboratory Procedures in Animal Nutrition Research. West Texas A & M University, Division of Agriculture and Texas A & M Research and Extension Center, Amarillo.

DETERMINACIÓN DE FIBRA INSOLUBLE EN DETERGENTE NEUTRO

1. GENERALIDADES.

Según el método de análisis de la fibra propuesto por Van Soest, el tratamiento del forraje o material vegetal con una solución neutro detergente, permite que todo el contenido celular del material se extraiga y el residuo de la digestión lo constituya la pared celular. En este contexto, el residuo lo componen la celulosa, la hemicelulosa, la lignina, así como otros compuestos que se encuentran ligados a la pared celular, entre los que se incluye parte de los compuestos nitrogenados, que en algunos casos son proteínas y algunos minerales. La fracción orgánica es conocida como fibra detergente neutro.

El procedimiento se puede utilizar en la mayoría de los forrajes, no obstante, cuando la muestra tiene alto contenido de almidón, tales como concentrados, ensilaje de maíz y heces, se recomienda modificar el proceso utilizando una amilasa para facilitar la filtración durante el análisis. El almidón puede quedarse como parte del residuo por lo que se puede sobreestimar el contenido de fibra.

2. MATERIAL Y EQUIPO.

2.1. Reactivos y consumibles:

- **Solución Detergente Neutro:** Mezcle 540 g de sulfato sódico de lauril35, 335 g de EDTA disódico, 123 g de borato sódico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) hasta un volumen de 10 litros de agua destilada. Asegúrese que todo se ha disuelto. En un litro de agua destilada disuelva 82 g de fosfato sódico dibásico (Na_2HPO_4) y mezcle las soluciones. Luego añada a esta solución 180 ml de éter monoetil etilen glicol y lleve hasta un volumen final de 18 litros con agua destilada. El sulfato sódico de lauril se precipita a bajas temperaturas por lo que la solución debe calentarse con agitación hasta que esté todo disuelto y totalmente transparente.

- **Solución de amilasa:**

(a) Disuelva 2 g de la enzima en 90 mL de agua y filtre la solución resultante a través de un filtro #541 y añada a la solución 10 mL de éter monoetil etilen glicol. Guarde la solución en refrigeración a 5 °C. La enzima es obtenida del *Bacillus subtilis*, es de tipo III y con actividad óptima a pH 6.9 y 80 °C.

(b) Prepare una solución amortiguadora de ácido fosfórico disolviendo 60.4 g de KH_2PO_4 y 19.9 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada hasta cinco litros de solución. Ajuste el pH a 5.8. Disuelva 1 mg de α -amilasa en 20 mL de solución amortiguadora de ácido fosfórico inmediatamente antes de ser utilizada.

- **Agente antiespumante:** Se puede utilizar alcohol amílico u otra solución comercial con esta propiedad. Un agente conocido es Decalin o decahidronaftaleno.

- **Solución limpiadora:** Cuando se utilizan crisoles porosos para la filtración es conveniente que periódicamente sean sometidos a una limpieza, dado que partículas de la muestra pueden obstruir parcialmente los poros. La solución se prepara mezclando:

- **Solución ácida:** Disolver volúmenes iguales de ácido clorhídrico concentrado y agua.

- **Solución alcalina:** Disolver 5 g de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$, 50g de Na_2HPO_4 y 200 g de KOH en agua hasta completar un litro.

Mantenga las soluciones en recipientes de boca ancha con capacidad para dos a tres litros donde puedan sumergirse y mantener los crisoles.

Acetona: Utilice acetona grado reactivo.

Papel filtro #410

2.2. Cristalería y equipo:

- Digestor de fibras tipo Goldfisch
- Estufa de aire forzado
- Mufla
- Crisol de porcelana tipo Gooch
- Desecador
- Balanza con exactitud de 0.0001 g
- Vaso Berzelius de 600 mL
- Matraz Erlenmeyer de 100 mL
- Botella lavadora

2.3. Equipo de protección:

- Bata de laboratorio
- Lentes de seguridad (Goggles)
- Guantes con aislante térmico (asbesto)

3. MUESTRA:

Alimento, ingredientes alimenticios o heces de animales tanto rumiantes como no rumiantes.

4. PROCEDIMIENTO.

- Todo el proceso debe realizarse en duplicado.
- Coloque en el horno de convección forzada de aire caliente a 105 °C por espacio mayor de cuatro horas un crisol de porcelana tipo Gooch con fondo poroso de 40 a 50 mL de capacidad.
- Retire del horno, deje enfriar en un desecador y pese con exactitud de 0.0001 g. Esto es necesario si el residuo será utilizado para la determinación de fibra ácido detergente. Si solo es para fibra detergente neutro se puede utilizar papel filtro #410 y un sistema de filtración con embudos unidos a un sistema de succión. El papel filtro debe ser colocado igualmente en un horno a 105 °C por espacio de cuatro horas. Terminado el periodo de secado colóquelo en un desecador para enfriarlo y péselo con exactitud de 0.0001 g. Para este procedimiento se deberá igualmente secar un crisol y pesarlo con exactitud de 0.0001 g. P₃
- Coloque en el vaso Berzelius de 600 mL aproximadamente 1.0 g de muestra pesada con exactitud de 0.0001 g. P₆
- Transfiera 100 mL de la solución detergente neutro al vaso Berzelius que contiene la muestra, asegurándose que toda la muestra quede humedecida y no se adhiera a las paredes.
- Mantenga en punto de ebullición aproximadamente un litro de agua destilada.
- Se puede añadir al vaso Berzelius una solución antiespumante, como ejemplo una a dos gotas de Decalin.
- Proceda a colocar el vaso sobre las hornillas, encienda el sistema de condensación y enfriamiento de agua, y encienda las hornillas. La temperatura debe ser ajustada de manera que se pueda llegar al punto de ebullición rápidamente, esto es elevar de 25 °C a ebullición 100 mL de agua en 4 a 5 minutos. Luego mantenga la temperatura de manera que se logre una

ebullición estable, pero leve. Esto debe permitir el movimiento significativo de las partículas en el vaso sin formación de mucha espuma.

- Para el caso de varias muestras, se recomienda colocar los vasos a intervalos de cinco minutos. Permita que la solución se mantenga en ebullición durante una hora. Periódicamente rote los vasos de manera que la muestra no se adhiera a las paredes, y se mantenga en solución. En caso de que parte de la muestra se adhiera a las paredes o al bulbo de condensación, con una botella lavadora que contiene solución neutro detergente, lave con cuidado hasta que toda la muestra permanezca en solución.

- Con muestras con alto contenido de almidón, agregue inicialmente 50 mL de la solución detergente neutro al vaso con la muestra y lleve a ebullición. Luego de 30 minutos, desde el comienzo de la ebullición, agregue otros 50 mL de la solución detergente neutro y 2 mL de la solución enzimática

(a). Coloque nuevamente el vaso sobre la hornilla y lleve a ebullición por espacio de 30 minutos adicionales. **No puede utilizar el sistema de papel de filtro en este procedimiento.**

- Una modificación a este procedimiento implica lo siguiente: en un Erlenmeyer con capacidad para 100 mL agregue 20 mL de agua junto con un gramo de muestra pesada con exactitud de 0.0001 g. Caliente la mezcla de manera que el almidón se gelatinice, la cual debe completarse una vez la solución alcanza el punto de ebullición. Luego de enfriar, añada los 20 mL de la solución de α -amilasa (b) y mantenga en agitación por 16 horas a temperatura de 40 °C. Finalizada la hidrólisis filtre en papel N°5 y lave completamente con agua destilada de tres a cuatro veces. Transfiera el residuo al vaso Berzelius utilizando el mínimo de solución detergente neutro.

- Cuando se está terminando el periodo de reflujo, pase agua caliente por el crisol o embudo con el papel filtro, encienda el sistema de succión con una presión leve.

- Al término del tiempo de reflujo, lave toda la muestra que pueda estar adherida al bulbo de reflujo y toda aquella que se encuentra en las paredes del vaso. Retire el vaso de la hornilla, con cuidado utilizando guantes de asbesto, decante el líquido sobrenadante sobre el embudo y lave el residuo del vaso utilizando el mínimo de agua caliente, con ayuda de una botella lavadora. Maximice la presión de succión, y luego proceda a lavar el residuo de cuatro a cinco veces con aproximadamente 40 a 50 mL de agua caliente, cercana al punto de ebullición, esto debe remover los residuos de la solución detergente neutro.

- Si se dan problemas en la filtración con las muestras de alto contenido de almidón, añada de uno a dos mililitros adicionales de solución enzimática al residuo, así como 30 mL de agua caliente, con temperatura aproximada de 80 °C. Deje reposar por 10 a 15 minutos. Encienda la succión nuevamente. Proceda a lavar con agua caliente dos a tres veces.

- Proceda a lavar tres o cuatro veces con acetona y filtre hasta a secar la muestra. Asegúrese que en la muestra no se sientan vapores de acetona.

- Coloque el crisol o el papel filtro con el residuo en un horno de convección forzada de aire caliente a una temperatura de 105° C durante la noche. Luego de este periodo colóquelos en un desecador para enfriarlos y pese con exactitud de 0.0001 g. **P₁**

- Posteriormente coloque el crisol o el papel de filtro en un crisol de porcelana, en un incinerador cuya temperatura máxima sea de 550 °C \pm 10 °C, por espacio de dos horas. Al término de este periodo, deje enfriar el incinerador por debajo de los 250 °C, coloque el crisol en un desecador para enfriarlo y posteriormente registre su peso con exactitud de 0.0001 g. **P₂**

- Determine el contenido de fibra detergente neutro por la pérdida de peso.

- Se recomienda procesar al menos dos blancos por cada 24 muestras analizadas, en especial cuando se utiliza el método con la solución enzimática y con papel filtro.

5. CÁLCULOS:

P₁. Peso del crisol o papel filtro más residuo

P₂. Peso del crisol más cenizas

P₃ Peso del crisol o papel solo.

P₄ Peso del residuo (P₁ – P₃)

P₅ Peso de las cenizas (P₂ – P₃)*

P₆. Peso de la muestra fresca o parcialmente seca

Para el caso de ajuste por los análisis de los blancos, reste el promedio de peso (**B**) obtenido luego del secado e incineración de los crisoles con los blancos a los pesos de los residuos y cenizas de la muestra analizada.

El porcentaje de FDN se obtiene por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de FDN} = \frac{(P_4 - B \text{ residuo}) - (P_5 - B \text{ cenizas})}{P_6} \times 100$$

REFERENCIAS:

De Gracia M. S. y Gallardo A. 2011. Guía para el Análisis Bromatológico de Muestras de Forrajes. Laboratorio de Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Panamá.

Galyean, M. L. 1997. Laboratory Procedures in Animal Nutrition Research. West Texas A & M University, Division of Agriculture and Texas A & M Research and Extension Center, Amarillo.

Goering, K., and P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agriculture Handbook No. 379. Washington, DC, USA: Agricultural Research Service, US Department of Agriculture. 20 p.

Laboratorio de Alimentos I, Departamento De Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM. 2007-2008.

Determinación de Fibra Insoluble en Detergente Ácido

1. GENERALIDADES.

Por este procedimiento, la fracción menos digerible de la pared celular, la cual esta compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa, lignina, parte de las proteínas ligadas a la pared celular y el sílice, se separa del contenido celular, que se estima es alta y completamente disponible a los animales. Este procedimiento utiliza un detergente catiónico en una solución de H_2SO_4 que disuelve o remueve los carbohidratos lábiles, proteína que no esta ligada por la reacción de Maillard y lípidos. Se da una limitación en la acción de la solución detergente ácido cuando la muestra posee un contenido de lípidos superior al 5%, por lo que se recomienda la extracción de 1 muestra cuando se excede este porcentaje. Este procedimiento puede repetirse con mayor facilidad que el método de fibra cruda, además que aísla una fracción que básicamente es utilizada con poca eficiencia por los animales.

Con este procedimiento, casi toda la hemicelulosa es hidrolizada, aunque la fracción cristalina de la celulosa no lo es. Adicionalmente, la lignina, presente en esta fracción, no es digerida, por lo que la fracción la constituye lo que se conoce como lignocelulosa. En esta fracción queda retenida igualmente proteína ligada y sílice. La proteína ligada es aquella que en el caso de productos vegetales y de origen animal se ha dañado por efecto del calor al cual fue sometido el producto durante su procesamiento. De esta manera la fracción orgánica es identificada como la fibra detergente ácido. Esta fracción puede posteriormente ser digerida para identificar el contenido de cada uno de sus componentes, a saber celulosa, lignina y sílice. En este procedimiento no deben utilizarse muestras que han sido secadas en horno a temperatura a 60 °C.

2. MATERIAL Y EQUIPO.

2.1. Reactivos y consumibles:

- **Solución Detergente Ácido:** Mezcle 504 ml de H_2SO_4 en 10 litros de agua destilada y añada posteriormente 360 g de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). Finalmente lleve la solución hasta 18 litros.
- **Agente antiespumante:** Se puede utilizar alcohol amílico u otra solución comercial con esta propiedad. Un agente conocido es Decalin o decahidronaftaleno.
- **Solución limpiadora:** Cuando se utilizan crisoles porosos para la filtración es conveniente que periódicamente sean sometidos a una limpieza, dado que partículas de la muestra pueden obstruir parcialmente los poros. La solución se prepara mezclando:
 - **Solución ácida:** Disolver volúmenes iguales de ácido clorhídrico concentrado y agua.
 - **Solución alcalina:** Disolver 5 g de Na_2H_2EDTA , 50 g de Na_2HPO_4 y 200 g de KOH en agua hasta completar un litro.
- Mantenga las soluciones en recipientes de boca ancha con capacidad para dos a tres litros donde puedan sumergirse y mantener los crisoles.
- **Acetona:** Utilice acetona grado reactivo.
- **Papel filtro #410 o #541**

2.2. Cristalería y equipo:

- Digestor de fibras tipo Goldfish
- Estufa de aire forzado

- Mufla
- Crisol de porcelana tipo Gooch
- Desecador
- Balanza con exactitud de 0.0001 g
- Vaso Berzelius de 600 mL
- Matraz Erlenmeyer de 100 mL
- Botella lavadora

2.3. Equipo de protección:

- Bata de laboratorio
- Lentes de seguridad (Goggles)
- Guantes con aislante térmico (asbesto)

3. MUESTRA:

Alimento, ingredientes alimenticios o heces de animales tanto rumiantes como no rumiantes.

4. PROCEDIMIENTO:

- Todo el proceso debe realizarse en duplicado.
- Coloque en el horno de convección forzada de aire caliente a 105 °C por espacio mayor de cuatro horas un crisol de porcelana tipo Gooch con fondo poroso de 40 a 50 mL de capacidad. Retire del horno, deje enfriar en un desecador y registre su peso con exactitud de 0.0001 g. Se puede utilizar papel filtro #410 o #541 y un sistema de filtración con embudos unidos a un sistema de succión. El papel filtro debe ser colocado igualmente en un horno a 105 °C por espacio de cuatro horas. Terminado el periodo de secado colóquelo en un desecador para enfriarlo y péselo con exactitud de 0.0001 g. Para este procedimiento se deberá igualmente secar un crisol y pesarlo con exactitud de 0.0001 g. **P₃**
- Coloque en el vaso Berzelius de 600 mL aproximadamente 1.0 g de muestra pesada con exactitud de 0.0001 g. **P₆**
- Transfiera 100 mL de la solución detergente ácido al vaso Berzelius que contiene la muestra, asegurándose que toda la muestra quede humedecida y no se adhiera a las paredes.
- Mantenga en punto de ebullición aproximadamente un litro de agua destilada.
- Se puede añadir al vaso químico una solución antiespumante, como ejemplo una a dos gotas de alcohol amílico o cualquier otro producto comercial con propiedades antiespumantes como el Decalin.
- Proceda a colocar el vaso sobre las hornillas, encienda el sistema de condensación y enfriamiento de agua, y encienda las hornillas. La temperatura debe ser ajustada de manera que se pueda llegar al punto de ebullición rápidamente, esto es elevar de 25 °C a ebullición 100 mL de agua en 4 a 5 minutos. Luego mantenga la temperatura de manera que se logre una ebullición estable, pero leve. Esto debe permitir el movimiento significativo de las partículas en el vaso sin formación de mucha espuma.
- Para el caso de varias muestras, se recomienda colocar los vasos a intervalos de cinco minutos. Permita que la solución se mantenga en ebullición durante una hora. Periódicamente rote los vasos de manera que la muestra no se adhiera a las paredes, y se mantenga en solución. En caso de que parte de la muestra se adhiera a las paredes o al bulbo de

condensación, con una botella lavadora que contiene solución ácido detergente, lave con cuidado hasta que toda la muestra permanezca en solución.

- Cuando se esta terminando el periodo de reflujo, pase agua caliente por el embudo, encienda el sistema de succión con una presión leve.

- Al término del tiempo de reflujo, lave toda la muestra que pueda estar adherida al bulbo de reflujo y toda aquella que se encuentra en las paredes del vaso. Retire el vaso de la hornilla, con cuidado utilizando guantes de asbesto, decante el líquido sobrenadante sobre el embudo y lave el residuo del vaso utilizando agua caliente, con ayuda de una botella lavadora. Maximice la presión de succión, y luego proceda a lavar el residuo de cuatro a cinco veces con aproximadamente 40 a 50 mL de agua caliente, cercana al punto de ebullición, esto debe remover los residuos de la solución detergente ácido.

- Proceda a lavar tres o cuatro veces con 30 a 40 mL de acetona y filtre hasta a secar la muestra. Durante los lavados con acetona deje reposar de tres a cinco minutos antes de aplicar la succión, en los últimos lavados el filtrado debe ser incoloro. Asegúrese que en la muestra no se sientan vapores de acetona luego del último filtrado.

- Coloque el crisol o el papel filtro con el residuo en un horno de convección forzada de aire caliente a una temperatura de 105° C durante la noche. Luego de este periodo colóquelos en un desecador para enfriarlos y pese con exactitud de 0.0001 g. **P₁**

- Determine el contenido de fibra detergente ácido. Como alternativa se puede llevar el residuo a incineración y se estima el contenido de fibra detergente neutro por la pérdida de peso como se detalla a continuación.

- Coloque el crisol o el papel de filtro en un crisol de porcelana, en un incinerador cuya temperatura máxima sea de 550 °C ± 10 °C, por espacio de dos horas. Al término de este periodo, deje enfriar el incinerador por debajo de los 250 °C, coloque el crisol en un desecador para enfriarlo y posteriormente registre su peso con exactitud de 0.0001 g. **P₂**

- Determine el contenido de fibra detergente ácido por la pérdida de peso.

- Se recomienda procesar al menos dos blancos por cada 24 muestras analizadas, en especial cuando se utiliza el método con papel filtro.

5. CÁLCULOS:

P₁. Peso del crisol o papel filtro más residuo

P₂. Peso del crisol más cenizas

P₃ Peso del crisol o papel solo.

P₄ Peso del residuo (P₁ – P₃)

P₅ Peso de las cenizas (P₂ – P₃)*

P₆. Peso de la muestra fresca o parcialmente seca

* Para el caso del procedimiento donde se utilizo papel filtro, el peso del crisol corresponde al peso del crisol utilizado para la incineración.

Para el caso de ajuste por los análisis de los blancos, reste el promedio de peso (**B**) obtenido luego del secado e incineración de los crisoles con los blancos a los pesos de los residuos y cenizas de la muestra analizada.

El porcentaje de FDA se obtiene por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de FDA} = \frac{(P_4 - B \text{ residuo}) - (P_5 - B \text{ cenizas})}{P_6} \times 100$$

REFERENCIAS:

- De Gracia M. S. y Gallardo A. 2011. Guía para el Análisis Bromatológico de Muestras de Forrajes. Laboratorio de Nutrición Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Panamá.
- Galyean, M. L. 1997. Laboratory Procedures in Animal Nutrition Research. West Texas A & M University, Division of Agriculture and Texas A & M Research and Extension Center, Amarillo.
- Goering, K., and P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agriculture Handbook No. 379. Washington, DC, USA: Agricultural Research Service, US Department of Agriculture. 20 p.
- Laboratorio de Alimentos I, Departamento De Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM. 2007-2008.

TÉCNICA DE DIGESTIBILIDAD IN SITU

1. GENERALIDADES.

En el estudio de la nutrición de los rumiantes, el sitio de la digestión de los alimentos se divide en para su comprensión en la degradación que los alimentos sufren en el retículo-rumen que es un proceso fermentativo y de síntesis de proteína microbiana; y el que ocurre en los compartimentos posteriores a partir de abomaso y que incluye además la digestión y absorción intestinal.

La porción de un alimento (ingrediente o dieta) que es degradada en el rumen por los procesos de fermentación microbiana, existen varias técnicas para estimar la degradabilidad en rumen de los alimentos, la mayoría de ellas son caras; requieren el uso de varios animales dotados de cánulas en rumen y duodeno (mínimo cuatro), así como el uso de sustancias marcadoras de líquidos y sólidos; lo que implica la necesidad de disponer de amplios recursos analíticos en el laboratorio, lo cual no siempre es posible, además estos experimentos requieren de tiempo para llevarse a cabo (al menos 56 días en fase experimental con animales ya adaptados). Sin embargo el cálculo de la degradabilidad ruminal con el uso de la bolsa de nylon, también conocido como digestibilidad *in situ*, constituye un procedimiento relativamente sencillo y de bajo costo, que permite la comparación simultánea entre una serie de ingredientes distintos, o bien diferentes momentos de la degradabilidad de un mismo ingrediente.

Como técnica la digestibilidad *in situ* se entiende a las evaluaciones de alimentos que se realizan empleando animales. La técnica *in situ* o también llamada la bolsa de nylon permite estudiar la cinética de desaparición del alimento en el rumen de animales fistulados dotados de cánulas. El alimento se coloca dentro de bolsas de nylon cerradas y luego en el rumen de los animales, el retiro de distintas bolsas a lo largo del tiempo permite medir la cantidad de material que ha desaparecido. La fracción del alimento que no se recupera dentro de las bolsas se asume que ha sido degradado, de este modo se construye la curva de desaparición. Esta metodología representó un adelanto muy importante dentro del campo de la nutrición de rumiantes, debido a que permite el estudio de la cinética de degradación. Esta técnica ha mostrado un buen grado de asociación con el consumo y la digestibilidad para alimentos (Ørskov, 1988)

2. ANIMALES

Todos los animales utilizados serán tratados de acuerdo a las recomendaciones descritas en la *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching* (FASS, 2010).

En el procedimiento que de manera rutinaria se lleva a cabo en la FMVZ-UAS, se utilizan bovinos; aunque se puede llevar a cabo también con otros rumiantes como ovinos y caprinos, en este manual debido a lo anterior, se describe el procedimiento seguido con el uso de bovinos.

Se utilizan al menos dos bovinos equipados con cánula ruminal permanente de 10 cm de diámetro interno, (C-4, Bar Diamond Inc., Parma, Idaho, USA)

Los bovinos deben estar en condición aparentemente sanos, y quince días antes del inicio de la prueba deben ser desparasitados, vacunados contra las enfermedades propias de la región y recibir una inyección de vitaminas A, D y E (Vitafluid®; Virbac).

Los bovinos deben ser adaptados al menos quince días antes del inicio de la prueba a consumir una dieta que cubra o rebase los requerimientos de mantenimiento, misma con la que serán alimentados durante toda la prueba. La dieta debe contener en proporción adecuada los ingredientes que se probarán en la digestibilidad *in situ*.

Durante la adaptación y a lo largo del periodo de medición los animales deberán ser alimentados a libre acceso y disponer permanentemente de agua limpia y fresca

3. MUESTRAS

3.1. Tipos de muestras. Se utilizan muestras de ingredientes alimenticios como pastos, rastrojos, henos, granos, pastas de oleaginosas, etcétera, o bien dietas integradas por varios ingredientes.

3.1.1. Conservación de las muestras. Es preferible contar con las muestras en el estado y forma que se encuentran en el momento que le son ofrecidos de manera rutinaria al animal, sin embargo debido a la necesidad de su transporte o conservación hasta que son utilizadas en un experimento es posible que requieran e algún método de preservación, en ese caso hay que tomar las siguientes directrices:

3.1.1.1. Secado por calor, en el caso de que las muestras deban ser secadas con el uso de calor, se utilizarán para ello temperaturas entre los 50 a 60 °C; la temperatura no debe exceder los 70 °C, dado que por encima de ella, los cambios que se generan en los componentes (reacción de Mayllard en proteínas, caramelización en azúcares, etcétera) disminuyen la degradación de los ingredientes y en consecuencia alteran los resultados de la medición.

3.1.1.2. Congelación. Es posible mantener las muestras en congelación (- 20 °C) y descongelarlas previamente a su utilización en el experimento; la descongelación debe ser realizada en dos pasos, el primero en condiciones de refrigeración (2-8 °C), y luego a temperatura ambiente.

3.1.2. Reducción del tamaño de partícula. En el caso de muestras frescas y turgentes como henos, pastos y ensilados, el corte del material con guillotina para papel a un tamaño máximo de 1 cm puede ser adecuado, en el caso de muestras con menor contenido de humedad como henos, pajas, granos, pastas de oleaginosas, etcétera se recomienda sean molidos a un tamaño de partícula suficiente para atravesar una criba de 2 mm (Vanzant *et al.*, 1998)

3.2. Determinación de MS de las muestras.

De cada uno de los ingredientes o dietas que se vayan a utilizar, se tomarán alícuotas para determinar por duplicado el contenido de materia seca en estufa de aire forzado a 105 °C durante 24 horas (AOAC, 1995), de acuerdo al procedimiento descrito en otra sección de este mismo manual.

Es importante considerar que estas muestras una vez secas no son de utilidad para ser incubadas en las bolsas dentro de rumen, ni para determinar en ellas el contenido de otros nutrientes como proteína cruda, fibras o materia orgánica, dado que la temperatura a que fueron sometidas puede inducir pérdidas por volatilización de algunos componentes y alterar las proporciones de las mismas.

La determinación de la materia seca de la muestra está orientada a calcular con precisión la cantidad de MS del ingrediente que es introducido en la muestra.

3.3. Uso de ingredientes de referencia.

Es deseable que en los experimentos de digestibilidad in situ, sí no forma parte del experimento se incluya un ingrediente del que exista bastante información publicada y utilizar el resultado de la degradación del mismo como un factor de referencia para la confiabilidad de la medición en los otros ingredientes. En el caso de los forrajes se sugiere la inclusión de heno de alfalfa o heno de sudan y en el caso de ingredientes concentrados la pasta de soya.

En el caso que los valores de degradación en rumen de los ingredientes de referencia se encuentren lejos de los esperados, la corrida debe considerarse como no confiable, los resultados se desechan y se repite el procedimiento completo.

4. BOLSAS

Bolsas de dacrón de 10 x 20 cm, tamaño de poro 50 µm (SKU:R1020; ANKOM Technology, Macedon, NY, USA)

4.1. Características de las bolsas

Se utilizan Bolsas de dacrón de 10 x 20 cm, tamaño de poro 50 µm (SKU:R1020; ANKOM Technology, Macedon, NY, USA)

4.2. Preparación de las bolsas

4.2.1. Secado y pesado de las bolsas.

Las bolsas nuevas o perfectamente limpias, se identifican con número utilizando un marcador con tinta indeleble en las condiciones de rumen, se permite que la tinta seque en temperatura ambiente y luego se colocan en estufa a 60 °C durante 24 h, se enfrían en desecador y se pesan en balanza analítica. Se registra en la bitácora el valor como “peso bolsa vacía”.

4.2.2. Cálculo del número de bolsas.

4.2.2.1. Para degradación de MS. Se utilizan al menos dos bolsas por tratamiento y tiempo en cada animal.

4.2.2.2. Para degradación de varios nutrientes. En el caso de que además de materia seca se vaya a determinar el contenido de uno o varios nutrientes en residuo después de la fermentación en rumen, entonces para el cálculo del número de bolsas, se debe de tomar en cuenta la cantidad de material que se encontrará en ellas después de la degradación con el fin de que se logra completar la cantidad requerida para las distintas determinaciones. Por ejemplo, sí se espera que la degradación de proteína cruda de la pasta de soya a las 16 h de incubación sea de un 80%, se esperaría que con la introducción de 5 g de MS en la bolsa, al final de la incubación se cuente cuando mucho con 1 g de residuo.

4.2.2.3. Bolsas blanco. Se incluyen dos bolsas vacías en cada tiempo de incubación, las bolsas vacías se utilizan para corregir el peso de las bolsas con muestra al final de la corrida.

4.2.3. Llenado y pesaje de las bolsas

A cada una de las bolsas se le introducirá una cantidad de material estimado que el contenido de materia seca se aproxime a 5 g, una vez introducida la muestra, la bolsa se pesa y el valor se registra en la bitácora como “peso bolsa + muestra BH”.

4.2.4. Inmediatamente después del pesado, la bolsa se cierra y se amarra con hilo nylon.

A continuación bolsas de una misma corrida se atan con un cordel de nylon, dejando un espacio de 10 cm entre cada par de bolsas y al final de la línea se coloca una bolsa con un lastre de 200 g; en el extremo superior de la línea se dejaran 70 cm para atarse a la tapa de la cánula. A cada grupo de bolsas ya atadas se les referirá como “el rosario de bolsas”.

4.3. Introducción de las bolsas.

Antes de su introducción en el rumen, todas las bolsas son depositadas en un recipiente con 18 L de agua a 39 °C, se permite que se humedezcan solas (sin presionar) hasta que se sumerjan de manera espontanea, una vez que todas las bolsas se han sumergido se espera un tiempo de 5 antes de introducirlas e el rumen.

4.3.1. Tiempos de incubación

Los tiempos de incubación obviamente que se deben decidir desde que se planeó el experimento, dependiendo el tipo de estudio se pueden agrupar en dos:

4.1.1.1. Digestibilidad *in situ*. Es común que para comparar la degradación ruminal entre un grupo de ingredientes, se utilice la medición de la digestibilidad *in situ* a un tiempo determinado; cuando los ingredientes en estudio son de degradación lenta como los forrajes se utiliza un tiempo de incubación que se ubique entre 48 y 72 h, en tanto que cuando son ingredientes fácilmente degradables como granos y pastas de oleaginosas se elige un tiempo de entre 16 y 24 h.

4.1.1.2. Cinética de degradación. En el caso de que se busque conocer la cinética de la degradación de un ingrediente, entonces se emplean un serie de mediciones a diferentes tiempos de incubación. En la elección de los tiempos además del criterio ya señalado de acuerdo al tipo de ingrediente (sección 3.1.1.1), se incluyen otros dos: el primero de ellos es que como el proceso es exponencial, el incremento en la degradación es proporcionalmente mayor durante las primeras 12 horas de incubación, por lo que en ese lapso es deseable tener una serie de mediciones como a las 0, 2, 4, 6 y 12 h o bien 0, 3, 6, 9 y 12 h; el resto de los tiempos designados pueden ser 24, 48 y 72 h. El otro criterio cuidar que los tiempos de incubación programados coincida con el que otros autores hayan utilizado para esos ingrediente u otros similares, con el fin de poder realizar comparación entre los resultados al concluir la prueba.

Es importante recordar que los tiempos de incubación se establecen a partir de la hora en que los animales reciben alimento, en el caso de la FMVZ-UAS usualmente las 0800 h.

4.3.2. Solubilidad.

La degradación en el tiempo “0 h” es interpretado como el valor de solubilidad. Aunque este se puede estimar por varios métodos, el utilizado en la FMVZ-UAS es el obtenido por la inmersión de las bolsas de dacrón en una solución 0.15 N de NaCl en agua destilada a 39 °C durante 5 minutos (Owens y Zinn, 1982).

4.3.3. El orden de introducción.

La introducción de cada uno de los rosarios de acuerdo al tiempo asignado de incubación, se ejecuta introduciendo en el rumen las bolsas asignadas al tiempo más largo de incubación y así de manera sucesiva hasta llegar al de 2 o 3 h; al llegar al tiempo cero, todas las bolsas son retiradas del rumen de manera simultánea.

Nuevamente, es de importancia recordar que los tiempos de incubación se establecen a partir de la hora en que los animales reciben alimento, en el caso de la FMVZ-UAS usualmente las 0800 h.

4.4. El lavado de las bolsas

Al cumplir el tiempo de incubación, las bolsas son retiradas cuidadosamente del rumen y se lavaran con agua corriente hasta que esta salga clara (Ørskov *et al.*, 1980; Nocek, 1988). Luego se deja escurrir el exceso de agua procedente del lavado.

4.5. El secado y pesaje de las bolsas

Una vez escurridas, a cada bolsa se le retira de manera cuidadosa los hilos de nailon con que fue atada al rosario de bolsas, así como el que se utilizó para cerrarla, luego se colocan en charolas y se secan en estufa a 60-70 °C durante 48 h (Ørskov *et al.*, 1980; Bruinenberg *et al.*,

2004). Se enfrían en desecador y se pesan en balanza analítica, el valor resultante se registra en e la bitácora como “peso bolsa + residuo seco”

5. CÁLCULOS:

5.1. Con el contenido de materia seca determinado en la muestra antes de introducirla en las bolsas, se calcula la cantidad de materia seca que contuvo cada una de las bolsas

Contenido de la bolsa en BH, g = (Peso bolsa + muestra BH) – peso de la bolsa

Materia seca introducida en la bolsa, g = (peso contenido BH * materia seca %) / 100

5.2. Al peso de las bolsas con el residuo seco se les resta el peso de la bosa vacía obtenido previamente, el resultados se considera como el contenido de materia seca (MS).

Materia seca del residuo, g = (Peso bolsa + residuo seco) - peso de la bolsa

5.3. Digestibilidad in situ

5.3.1. Digestibilidad *in situ* de la materia seca a un tiempo de incubación determinado

$$\text{Digestibilidad in situ de MS (\%)} = \frac{(\text{MS introducida, g} - \text{MS en el residuo, g})}{\text{MS introducida, g}} \times 100$$

5.3.2. Digestibilidad *in situ* de un nutriente (Nx; materia orgánica, proteína cruda, fibra detergente neutro, etcétera) a un tiempo de incubación determinado:

5.3.2.1. Se determina en el laboratorio el contenido del nutriente tanto en la materia seca de la muestra como del residuo

5.3.2.2. Cálculo del contenido del Nx en la muestra introducida a la bolsa

Nx introducido, g = (Materia seca introducida, g X Nx% en la muestra) / 100

5.3.2.3. Cálculo del contenido del Nx en el residuo a la bolsa

Nx en el residuo, g = (Materia seca en el residuo, g X Nx% en el residuo) / 100

5.3.2.4. Cálculo de la digestibilidad in situ de un nutriente (Nx)

$$\text{Digestibilidad in situ de Nx, \%} = \frac{(\text{Nx introducido, g} - \text{Nx en residuo, g})}{\text{Nx introducido}} \times 100$$

5.3.2. Cinética de la degradación en rumen

5.3.2.1 Cinética de la degradación en rumen. Con los resultados de la degradación de materia seca o un nutriente a cada tiempo de incubación, se realiza el cálculo de manera manual (Ørskov, 1988) o con la ayuda de un programa de cómputo, en el que se introducen los datos para un modelo exponencial (negativo) propuesto por Ørskov y McDonald (1979), cuya fórmula es $P = a + b(1 - e^{-ct})$,

en dónde P representa la proteína potencialmente degradable, “ a ” es la fracción soluble, “ b ” representa la fracción insoluble pero degradable de la PC en rumen si existe tiempo suficiente para ello, “ c ” es la tasa constante de degradación de la fracción “ b ”; y “ t ” representa el tiempo.

5.3.2.2. Fracción efectivamente degradada en el rumen. Como en el modelo anterior el tiempo de permanencia de la bolsa en el rumen es determinado por el investigador y en condiciones normales el tiempo que un ingrediente permanezca en rumen está determinado por una serie de factores, entre ellos la proporción de forraje: concentrado en la dieta, el valor obtenido de máxima degradación no necesariamente se corresponde con el que tendría en rumen si las partículas de ese ingrediente permanecieron menos o más tiempo que el decidido por el investigador, entonces una corrección por el ritmo de flujo de las partículas pequeñas a través de rumen permite una estimación más aproximada, este concepto fue introducido por Ørskov y McDonald (1979). El ritmo de pasaje de las partículas es algo complicado de establecer, sin embargo (Ørskov, 1988) proponen una serie de valores utilizables de acuerdo con la proporción forraje: concentrado que le haya sido ofrecido al animal durante el experimento. La porción efectivamente degradada en rumen se puede calcular con la fórmula: $P = a + ((b c) / (c + k))$ sugerida por Ørskov y McDonald (1979), en donde “ k ” representa el ritmo de flujo de las partículas pequeñas a través del rumen, de acuerdo con la proporción de forraje y concentrado de la dieta ofrecida a los animales se le atribuyó un valor de $k = 0.03$ de acuerdo al tipo de dieta que consumieron los animales (Ørskov, 1988).

REFERENCIAS:

- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis 15th ed. Association of Official Analytical Chemist. Washington, DC.
- Bruinenberg, M.H., A. H. Van Gelder, P. Gonzalez-Perez, V. K. Hindle, and J. W. Cone. 2004. Estimating rumen degradability of forages from semi-natural grasslands, using nylon bag and gas production technique. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 51:351-368.
- Canbolat, O., A. Kamalak, E. Efe, M. Sahin and C.O. Ozkan. 2005. Effect of heat treatment on in situ rumen degradability and in vitro gas production of full fat soybeans and soybean meal. *South Afric. J. Anim. Sci.* Vol. 35:186-194.
- FASS. 2010. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching. Third edition. Federation of Animal Science Societies. Champaign, IL.
- Kirpatrick, B. K. and J. J. Kennelly 1987. In situ degradability of protein and dry matter from single protein sources and from a total diet. *J. Anim. Sci.* 65: 567-576
- Lykos, T., and G.A. Varga. 1995. Effects of processing method on degradation characteristics of protein and carbohydrate source in situ. *J. Dairy Sci.* 78:1789-1801.
- Nocek, J.E. 1988. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: A review. *J. Dairy Sci.* 71:2051-2069.
- NRC, 1996. Nutrient Requirements of beef Cattle (7th Ed.). National Academic Press. Washington, DC. USA
- Ørskov, E.R. 1988. Nutrición Proteica de los Rumiantes. Edit. Acribia. Zaragoza, España.
- Ørskov, E.R. and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. *J. Agr. Sci. (Camb.)*. 92: 499-503.
- Ørskov, E.R., F. D. DeB Hovell, and F. Mould. 1980. The use of nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. *Trop. Anim. Prod.* 5:195-213.
- Owens, F.N. and R.A. Zinn. 1982. The standard reference system of protein bypass estimation. In: *Protein Requirements for Cattle: Symposium*. Oklahoma State Univ. MP-109.p.352-357.
- Schneider, H.B. and W.P. Flatt. 1975. The evaluation of feeds through digestibility experiments. The University of Georgia. Press. Athens. GA. U.S.A.
- Stern, M.D., L.M. Rode, R.W. Prange, R.H. Stauffacher, and L.D. Satter. 1983. Ruminal protein degradation of corn gluten meal in lactating dairy cattle fitted with duodenal T-type cannulae. *J. Anim. Sci.* 56:194-205.

Vanzat, E.S., R.C. Cochran and E.C. Titgemeyer. 1998. Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuff evaluation. *J. Anim. Sci.* 76:2717-2729.

Wanderley, R.C., J.T. Huber, Z. Wu, M. Pessarakli, and C. Fontes Jr. 1993. Influence of microbial colonization of feed particles on determination of nitrogen degradability by in situ incubation. *J. Anim. Sci.* 71:3073-3077.

DETERMINACIÓN DE DIGESTIBILIDAD APARENTE POR COLECCIÓN TOTAL DE HECES

1. GENERALIDADES. La digestibilidad es el primer paso para establecer el valor nutricional de un ingrediente alimenticio. La digestibilidad aparente de un alimento o un nutriente, se considera como la parte proporcional del mismo que es ingerido y que no aparece en las heces, por lo que se asume que fue digerido y absorbido.

El procedimiento que se describe, es útil para determinar la digestibilidad aparente de la materia seca o de algún nutriente tanto en animales rumiantes como en la mayoría de los animales no rumiantes, las excepciones son las aves dado que por la cloaca salen mezcladas las heces con la orina. Su uso con mamíferos que practican coprofagia (conejos, ratas) puede hacerse con cuidados especiales al obtener la muestra de heces.

2. ANIMALES. En este laboratorio se trabaja de manera rutinaria experimentos llevados a cabo con ovinos y cerdos. Los animales utilizados en las pruebas de digestibilidad deben ser jóvenes, debido a que presentan menos variación en su consumo voluntario, comparados con los animales adultos.

Todos los animales utilizados serán tratados de acuerdo a las recomendaciones descritas en la *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching* (FASS, 2010).

3. ALOJAMIENTO. Los animales deben estar confinados en jaulas denominadas metabólicas, estas jaulas deben de estar acondicionadas para que las heces pasen a través del piso formado con rejillas de plástico y que puedan ser colectadas en recipientes colocados por debajo del piso.

4. UNIDAD EXPERIMENTAL. La jaula constituye la unidad experimental, usualmente se coloca un animal por jaula, pero se pueden utilizar más de uno y el procedimiento es similar.

5. DISEÑOS EXPERIMENTALES. En los experimentos que se desarrollan en la FMVZ-UAS, regularmente son de acuerdo con diseños cross over y cuadrado latino, con o sin arreglo factorial de los tratamientos (en el caso de cuadrado latino cuando son solamente tres los tratamientos, el cuadrado latino deberá necesariamente que ser replicado); por lo que siempre existirán en ellos al menos dos periodos.

6. ADAPTACIÓN Y MANEJO PREVIO. Antes de iniciar un experimento, los animales deberán adaptarse durante 14 días al alojamiento, manejo y dieta; en esta etapa los animales son evaluados clínicamente para detectar signos de enfermedad, se les toman muestras de heces y sangre para determinar en laboratorio la posible existencia de parásitos, son desparasitados y vitaminados. En los experimentos de digestibilidad aparente solamente se incluyen animales aparentemente sanos; aquellos que se les detecte alguna enfermedad, deberán ser tratados con base al diagnóstico y esperar hasta su recuperación o bien ser

eliminados del experimento y sustituidos por otro de características similares y en condición de salud apropiada.

La etapa se considera completada cuando el comportamiento de los animales sea tranquilo ante la cercanía de los operadores y el consumo de alimento sea cercano al esperado por su especie, raza, edad, sexo, peso y tipo de dieta ofrecida. En esta etapa se establece el nivel de consumo voluntario de alimento que será utilizado para la planeación de la alimentación a través del experimento.

7. FASE EXPERIMENTAL. Está constituida por dos o más periodos de acuerdo al diseño experimental elegido. A su vez, cada periodo tiene una duración de 14 días y se divide en dos fases: adaptación y colección de heces. El alimento que se ofrecerá durante todo el periodo deberá elaborarse en un solo evento para evitar variaciones en su composición a través de las mediciones.

7.1. Fase de adaptación a tratamiento: La adaptación a la dieta del tratamiento correspondiente en cada periodo regularmente tiene una duración de diez días, durante los primeros cinco se establece el nivel de consumo voluntario y a partir del sexto día se le sirve el alimento en cantidad equivalente al 95% del consumo voluntario, una restricción del 5% en el consumo no afecta notoriamente a la digestibilidad, restricciones de alimento cercanas al 10% incrementan la digestibilidad de la dieta. La restricción del 5% en el consumo se aplica para evitar la presencia de rechazos y facilitar los cálculos al final de la prueba. El consumo de alimento debe registrarse diariamente. A partir del octavo día, durante cuatro días seguidos (días 8 -12) se toma diariamente una muestra de 250 g de alimento, cada una de las muestras se pesan en fresco y se secan en estufa de aire forzado a 60 °C hasta peso constante. Después de al menos 48 h después de haber realizado la última colección, se pesan las muestras de alimento correspondientes a cada día y se calcula el contenido de materia seca de la dieta. Las muestras de los cuatro días, ya secas se mezclan cuidadosamente sobre papel y por el método de cuarteo se obtiene una muestra analítica de 100 g, se muele y guarda en recipiente cerrado para ser utilizada en las determinaciones de laboratorio.

7.2. Fase de colección de heces. Los últimos cuatro días, se colocan por debajo del piso de las jaulas los bastidores para la recepción de las heces, la totalidad de las heces se colectan cada 24 horas, se pesan en fresco y se secan en estufa de aire forzado a 60 °C hasta peso constante. Después de al menos 48 h después de haber realizado la última colección, se pesan las heces correspondientes a cada día y el promedio de las mismas será el asignado como promedio de la medición de excreción de materia seca en heces de los animales. Las heces colectadas por cada jaula durante los cuatro días, ya secas se mezclan cuidadosamente sobre papel y por el método de cuarteo se obtiene una muestra analítica de 100 g, se muele y guarda en recipiente cerrado para ser utilizada en las determinaciones de laboratorio.

8. CÁLCULOS:

8.1 Digestibilidad aparente de la materia seca DAMS, %

$$\text{DAMS, \%} = [(\text{MS consumida kg} - \text{MS excretad en heces kg}) / \text{MS consumida kg}] * 100$$

8.2. Digestibilidad aparente de un nutriente “x” (PC, MO, FDN, etcétera) DAN_x, %

$$\text{DAN}_x, \% = [(\text{MS consumida kg} * (\text{Nx en alimento}/100)) - ((\text{MS excretad en heces kg} * (\text{Nx en heces}/100)) / (\text{MS consumida kg} * (\text{Nx en alimento}/100))] * 100$$

REFERENCIA:

- FASS. 2010. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching. Third edition. Federation of Animal Science Societies. Champaign, IL.
- Schneider, B. H. and W. P. Flatt.1975. The Evaluation of Feeds through Digestibility Experiments. The University of Georgia Press. Athens, GA, USA.

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GAS

1. GENERALIDADES.

Los microorganismos juegan un papel central, pero mal caracterizado, en la producción de olores del ganado de engorda. Las bacterias llevan a cabo una fermentación anaeróbica incompleta de sustratos en el estiércol, produciendo una mezcla química compleja de ácido grasos volátiles, alcoholes, compuestos aromáticos, amidas (incluyendo NH_3), y sulfuros. Los ácidos grasos volátiles y compuestos aromáticos se correlacionan más estrechamente al olor; por lo tanto, limitan las concentraciones de las fuentes de estos compuestos en el estiércol que podrían ayudar a controlar las emisiones de olores. Los microorganismos del estiércol tienen acceso a una amplia variedad de sustratos potenciales, incluyendo almidón, proteínas, lípidos, hidratos de carbono y no almidones, para producir ácidos grasos volátiles y compuestos aromáticos.

2. MATERIAL Y EQUIPO.

2.1. Reactivos y consumibles:

2.2. Cristalería y equipo:

- Probeta de vidrio graduada de 250 mL
- Frascos de plástico con capacidad de 600 mL
- Tapón de rosca y acondicionados con un tubo de plástico antiadherente y con ausencia de poros (Tygon®; Saint-Gobain; Francia)
- Estufa de sacado de aire forzado
- Baño maría

2.3. Equipo de protección:

- Bata de laboratorio
- Lentes de seguridad (Goggles)
- Guantes con aislante térmico (asbesto)

3. MUESTRA:

Alimento, ingredientes alimenticios o heces de animales tanto rumiantes como no rumiantes.

4. PROCEDIMIENTO:

1. Formar una muestra compuesta
2. Tomaron alícuotas de aproximadamente 20 gramos para la determinación de materia seca (24 horas a 105 °C; AOAC, 1995)

3. Tomar alícuotas de 40 g de heces de cada una de las muestras compuestas y se depositarlas en frascos de plástico con capacidad de 600 mL
4. Adicionarles 40 mL de agua destilada
5. Agitarlas durante un minuto para homogenizar las muestras
6. A los frascos colocarles tapón de rosca y acondicionados con un tubo de plástico antiadherente y con ausencia de poros (Tygon®; Saint-Gobain; Francia)
7. Colocar los frascos en baño maría a 37°C y el extremo opuesto del tubo de plástico se colocó en el interior de una probeta de vidrio graduada de 250 mL, llenada con agua destilada y colocada en posición invertida dentro de un baño de agua
8. Incubar las muestras durante 24, 48 y 72 h hasta que ya no sea posible apreciar producción de gas alguna
9. La producción de gas se contabiliza como la cantidad de agua desplazada por el gas dentro de cada probeta expresada en mL.

5. CÁLCULOS:

Gas producido en 24 h/ g heces BS = (mL gas 24 h)/ g muestra BS

Gas producido en 48 h/ g heces BS = (mL gas 48 h)/ g muestra BS

Gas producido en 72 h/ g heces BS = (mL gas 72 h)/ g muestra BS

FUENTES DE INFORMACIÓN.

Miller, D. N. and V. H. Varel. 2001. In vitro study of the biochemical origin and production limits of odorous compounds in cattle feedlots. *J. Anim. Sci.* 79:2949-2956.

Miller, D. N., E. D. Berry, J. E. Wells, C. L. Ferrell, S. L. Archibeque, and H. C. Freetly. 2006. Influence of genotype and diet on steer performance, manure odor, and carriage of pathogenic and other fecal bacteria. III. Odorous compound production. *J. Anim. Sci.* 84:2533-2545.

DETERMINACIÓN DE CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO (CIA)

1. GENERALIDADES. La digestibilidad es el primer paso para establecer el valor nutricional de un ingrediente alimenticio. La digestibilidad aparente de un alimento o un nutriente, se considera como la parte proporcional del mismo que es ingerido y que no aparece en las heces, por lo que se asume que fue digerido y absorbido.

Cuando es posible conocer la cantidad de alimento que un animal ingiere y coleccionar las heces, entonces se puede calcular la digestibilidad aparente. Sin embargo, cuando no es posible conocer la cantidad de heces producidas e incluso la cantidad de alimento consumido, entonces el cálculo de la digestibilidad aparente por el método del indicador puede ser de utilidad. En el caso de animales como bovinos en corral de engorda, en donde no es económicamente práctico agregar una sustancia indicadora al alimento, o con animales en condiciones de pastoreo, el uso de “indicadores internos”; sustancias que están presentes en el propio alimento y que no son digeribles son una alternativa apropiada. Las cenizas insolubles en ácido están presentes de forma natural en la mayoría de los alimentos y por ello pueden utilizarse como indicadores internos, con la ventaja de que su determinación es sencilla y económica.

Para calcular la digestibilidad aparente con cenizas insolubles en ácido, sólo se requiere recoger una muestra representativa del alimento así como de las heces de los animales y se complementa con un procedimiento de laboratorio que requiere de poco equipamiento especial, a continuación se describe el proceso de laboratorio y al final se proporcionan las fórmulas necesarias para calcular la digestibilidad aparente una vez que se tienen los resultados del laboratorio.

2. MATERIALES Y EQUIPO:

2.1. Reactivos y consumibles:

- Agua destilada
- HCl concentrado
- Solución de HCl 2N
- Papel filtro Wathman No. 42; Wathman No 541 o equivalente

2.2. Cristalería y equipo:

- Vasos de precipitados de 100 mL
- Vasos de precipitados de 1,000 mL
- Matraz aforado de 1,000 mL
- Desecador
- Pipeta graduada de 25 mL
- Pipeta graduada de 100 mL
- Espátula
- Varilla de vidrio
- Vidrio de reloj con diámetro de 8 cm
- Pinza para vaso de precipitado
- Marcador para vidrio o Lápiz No. 2

- Pizeta de plástico
- Charola de plástico
- Embudo de vidrio
- Calentador de agua
- Plato caliente
- Agitador magnético (incluida barra magnética)
- Mufla
- Campana de extracción para ácido perclórico
- Balanza analítica

2.3. Equipo de protección:

- Bata de laboratorio
- Lentes de seguridad (Goggles)
- Guantes de látex
- Guantes con aislante térmico

3. MUESTRA:

Alimento, ingredientes alimenticios o heces de animales tanto rumiantes como no rumiantes.

4. PROCEDIMIENTO:

4.1. Muestras. Se utilizan muestras de alimento y heces provenientes de un mismo experimento. Las muestras de alimento y heces deberán corresponder a cada una de las repeticiones de cada uno de los tratamientos.

Cada muestra se trabajará por duplicado, si el resultado final de la determinación presenta una diferencia mayor al 5% entre las dos repeticiones, los resultados de ambas repeticiones se desechan y se repite completamente el procedimiento.

Todas las muestras que corresponden a un mismo periodo de muestreo deberán procesarse simultáneamente en una misma corrida de laboratorio. Los periodos de muestreo deben corresponder con los bloques o periodos del experimento de origen de acuerdo con el diseño experimental que se haya utilizado en la prueba para mantener la precisión de la misma y evitar la introducción de error. De ser posible, se procesarán en una misma corrida todas las muestras procedentes de un mismo experimento.

4.2. Preparativos

4.2.1. Preparación de reactivos:

Preparación de solución de HCl 2N en H₂O destilada

En un matraz aforado de 1,000 mL adicione 600 mL de H₂O destilada; luego agregue lentamente y en varios pasos (5 a 10 eventos) 196 mL de HCl concentrado resbalando por las paredes del matraz. En cada una de las ocasiones que se agregue el HCl, agite suavemente para homogeneizar y deje reposar 5 minutos para su enfriamiento antes de adicionar otra porción de HCl.

Una vez adicionados los 196 mL de HCl, afora 1,000 mL con H₂O destilada, luego deposite dentro del matraz aforado una barra magnética perfectamente lavada y seca, coloque el matraz en el agitador magnético y mezcle durante 30 minutos.

4.2.2. Preparación de materiales

Vasos de precipitado

Prepare un vaso de precipitados de 100 mL por cada una de las repeticiones (2 por muestra). Una vez que complete el número necesario para las determinaciones de la corrida que va a desarrollar, agregue otros cuatro en previsión de accidentes durante el procedimiento.

Identifique individualmente cada uno de los vasos de pp, la identificación será anotando un número diferente a cada vaso de pp con un marcador de vidrio o en su defecto con lápiz, en caso de utilizar el lápiz asegurarse de remarcar perfectamente el número (no utilizar etiquetas de ningún tipo, el marcaje debe ser directamente sobre los vasos de pp).

Coloque los vasos de precipitado en una estufa de aire forzado a 100 °C durante 24 h, saque de la estufa, coloque en un desecador de vidrio y deje enfriar al menos 1 hora. Saque el vaso del desecador y pese de inmediato en balanza analítica, registre de inmediato el peso del vaso de pp relacionado con el número del mismo.

Papel filtro Wathman No. 42

Prepare un círculo de papel filtro Wathman No. 42 por cada una de las repeticiones (2 por muestra). Una vez que complete el número necesario para las determinaciones de la corrida que va a desarrollar, agregue otros cuatro en previsión de accidentes durante el procedimiento.

Identifique individualmente cada uno de círculos de papel filtro Wathman No. 42, la identificación será anotando un número diferente a papel filtro con lápiz.

Coloque el papel en una estufa de aire forzado a 100 °C durante 24 h, saque de la estufa, coloque en un desecador de vidrio y deje enfriar al menos 1 hora. Saque del desecador y pese de inmediato en balanza analítica, registre de inmediato el peso del papel relacionado con el número del mismo.

4.3. Procedimiento. Coloque aproximadamente 5 g de muestra en un vaso de pp de 100 mL, pese el vaso de pp con su contenido y registre inmediatamente el peso relacionándolo con el número del vaso de pp y con la clave de identificación de la muestra que contiene, el valor correspondiente deberá quedar registrado en la bitácora como peso de vaso + muestra húmeda.

Coloque los vasos de precipitado en una estufa de aire forzado a 100 °C durante 24 h, saque de la estufa, coloque en un desecador de vidrio y deje enfriar al menos 1 hora. Saque el vaso del desecador y pese de inmediato en balanza analítica, registre de inmediato el peso del vaso de pp relacionado con el número del mismo. El valor correspondiente deberá quedar registrado en la bitácora como peso de vaso + muestra seca.

Coloque cada uno de los vasos de precipitado dentro de una Mufla apagada y fría, a un lado de la mufla coloque una charola de plástico por cada nivel del interior de la mufla que vaya a utilizar. En la charola colocará un vidrio de reloj marcado con el número de cada uno de los vasos que se introduzcan en un nivel de la mufla, los vidrios de reloj deberán colocarse en una distribución exactamente igual a la que guardan los vasos dentro de la mufla, dado que como es posible que durante la calcinación se borren los números de identificación de los vasos, en ese caso la colocación de los vidrios de reloj en la charola se vuelven el croquis de referencia para la identificación de los vasos. Adicionalmente, en una hoja de papel dibuje un croquis que represente la ubicación de cada uno de los vasos dentro de cada nivel de la mufla, este es el segundo factor de seguridad para la trazabilidad de las muestras una vez calcinadas.

Una vez colocados los vasos de pp en la mufla, caliente a 100 °C durante 15 minutos, luego eleve la temperatura a 150 °C y mantenga 10 minutos, a continuación eleva la temperatura a 200 °C y mantenga 15 minutos, después eleve la temperatura a 250 °C y sosténgala durante 15 minutos; a continuación suba la temperatura a 350 °C y permita que las muestras permanezcan en ella durante 15 °C; a continuación lleve el indicador de temperatura a 550 °C y una vez alcanzada calcine durante tres horas, una vez transcurrido el tiempo indicado apague la mufla y permita que se enfríe durante toda la noche. Al día siguiente encienda la mufla y revise el indicador de temperatura, si la temperatura interna es mayor de 150 °C espere hasta que descienda a 150 °C para poder abrirla y sacar los vasos; si la temperatura es entre 100 y 150 °C puede abrir la mufla y sacar los vasos, y en caso de que la temperatura sea inferior a 100 °C, programe la mufla 110 °C y una vez que alcance esa temperatura permita que se mantenga durante una hora y después puede sacar los vasos. En cualquiera de las tres situaciones previas, inmediatamente después de sacar cada uno de los vasos, coloque en un desecador de vidrio y deje enfriar al menos 1 hora. Saque el vaso del desecador y pese de inmediato en balanza analítica, registre de inmediato el peso del vaso de pp relacionado con el número del mismo. El valor correspondiente deberá quedar registrado en la bitácora como peso de vaso + cenizas. De inmediato tape el vaso de precipitados con el vidrio de reloj correspondiente.

Coloque los vasos de precipitados (con las cenizas en su interior) en un plato caliente,

Adicione a cada vaso 50 mL de HCl 2N y hierva casi a sequedad; adicione otros 50 mL de HCl 2 N y hierva durante 5 minutos, filtre en caliente en el papel Wathman No. 42 correspondiente para esa muestra, lave con agua caliente para eliminar la totalidad del ácido del papel filtro, así como del vaso de precipitados y coloque nuevamente el papel filtro en el vaso; seque en estufa de aire forzado a 110 °C durante 24 h, saque de la estufa, coloque en un desecador de vidrio y deje enfriar al menos 1 hora. Saque el vaso del desecador y pese de inmediato en balanza analítica, registre de inmediato el peso del vaso de pp relacionado con el número del mismo. El valor correspondiente deberá quedar registrado en la bitácora como peso de vaso + papel + cenizas insolubles en ácido (CIA).

5. CÁLCULOS:

5.1. Cálculo del contenido de cenizas totales:

$$\text{Cenizas \%} = (\text{Vaso} + \text{cenizas}) - (\text{peso del vaso}) * 100 / (\text{Vaso} + \text{muestra seca}) - (\text{peso del vaso})$$

5.2. Cálculo del contenido de Cenizas Insolubles en Ácido (CIA)

$$5.2.1. \text{CIA \% de cenizas totales} = [(\text{peso del vaso} + \text{papel} + \text{cenizas}) - (\text{peso del vaso} - \text{peso del papel})] * 100 / [(\text{Vaso} + \text{cenizas}) - (\text{peso del vaso})]$$

$$5.2.2. \text{CIA \% de la muestra seca} = [(\text{peso del vaso} + \text{papel} + \text{cenizas}) - (\text{peso del vaso} - \text{peso del papel})] * 100 / (\text{Vaso} + \text{muestra seca}) - (\text{peso del vaso})$$

5.3 Digestibilidad aparente utilizando CIA (Método del indicador)

5.3.1. Digestibilidad aparente de materia seca DAMS, %

$$\text{DAMS, \%} = 100 - [100 * (\text{CIA en alimento \%} / \text{CIA en heces \%})]$$

5.3.2. Digestibilidad aparente de un nutriente "x" (PC, MO, FDN, etcétera) DANx, %

$$\text{DANx, \%} = 100 - [100 * ((\text{CIA en alimento \%} * \text{Nx en heces \%}) / (\text{CIA en heces \%} * \text{Nx en alimento \%}))]$$

REFERENCIAS:

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

Van Keulen, J.V. and B.A. Young. 1977. Evaluation of acid insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. J. Animal. Sci. 44:282.