

ANÁLISIS QUÍMICO

DE ALIMENTOS
PARA ANIMALES



José Edmundo
Apráez Guerrero



Universidad de **Nariño**
Facultad de Ciencias Pecuarias
Programa de Zootecnia

Apráez Guerrero, José Edmundo

Análisis Químico de Alimentos para Animales.- 1ª. Ed.-
San Juan de Pasto: Editorial Universidad de Nariño, 2020
290p.: tablas, fig.

Incluye Bibliografía ISBN: 978-958-5123-14-4 (versión digital)

1. Animales.-alimentación.-bromatología 2. Análisis.-alimentos.-animales
3. bromatología.-{aspectos biológicos, aspectos agropecuarios, aspectos
metodológicos)

636.0855 A654 – SCDD - Ed. 22 Biblioteca Alberto Quijano Guerrero

ANÁLISIS QUÍMICO DE ALIMENTOS PARA ANIMALES

© José Edmundo Apráez Guerrero

© Editorial Universidad de Nariño

ISBN: 978-958-5123-14-4

Primera Edición

Diseño y Diagramación: María Elena Mesías P.
Centro de Publicaciones Universidad de Nariño

Fecha de Publicación: Junio 2020

San Juan de Pasto - Nariño - Colombia

Este libro no puede ser reproducido por cualquier
medio sin autorización escrita de su Autor o de la Editorial
Universidad de Nariño.

Prólogo

La nutrición y alimentación animal han tenido avances notorios en el siglo pasado, mismos que han impactado significativamente la nutrición humana y han evidenciado los errores del pasado, los actuales problemas y los retos a que estamos abocados; para los cuales la bromatología constituye el complemento indispensable en la caracterización de alimentos y los diversos nutrimentos contenidos en ellos. La bromatología es una herramienta de mucho valor en los trabajos de investigación, sobre todo en el área de alimentación y por ello esta publicación tiene como objetivo presentar procedimientos y metodologías acopiadas de varias publicaciones que versan sobre determinaciones bromatológicas de alimentos destinados a la alimentación animal.

Este libro pretende hacer un aporte para estudiantes, profesores, investigadores y profesionales del agro y otros especialistas. Mi propósito fue elaborar un texto de utilidad para un público académico y profesional, que pudiera servir como fuente de consulta para cualquier persona que esté interesado en el tema de la Bromatología, ciencia que constituye un campo de investigación científica en el que confluyen diversas disciplinas y profesionales.

La literatura sobre bromatología está creciendo rápidamente y los investigadores persistentemente tratan de descifrar los secretos que rodean muchos alimentos. Por otra parte, esta ciencia cada vez cobra mayor trascendencia, debido a la necesidad humana y la creencia de que los alimentos constituyen la base fundamental del bienestar humano y animal y tienen el potencial de mejorar sus vidas y la economía a través del conocimiento pleno de sus aportes y limitaciones.

El libro consta de Siete Capítulos, el Primero versa sobre el muestreo y debido a que el análisis se hace basado en una muestra pequeña, la confiabilidad de los resultados depende de una cuidadosa toma de muestras,

ya que muchos errores en los resultados, pueden deberse a esta labor y no al proceso seguido en el laboratorio. El Segundo Capítulo trata del análisis proximal por el Método Weende, ideado en 1865 por Henneberg y Stohmann de la Estación Experimental Weende en Alemania, donde establece una serie de procedimientos, mediante los cuales se explora la composición de los alimentos en sus constituyentes genéricos. En el Capítulo 3, se explican las diversas técnicas de estimar la energía de los alimentos y debido a su importancia, se describen algunas formas de valorarla en sus diferentes formas de expresión. El Capítulo 4 se refiere a la determinación de minerales y dado que la importancia de estos elementos en la alimentación animal es innegable, es necesario que la determinación analítica de los componentes inorgánicos sea de interés.

El Capítulo 5 refiere a la determinación de digestibilidad mediante diferentes técnicas, ya que todos aquellos procesos que pueden sufrir los alimentos en el anterior del tracto digestivo de los animales, y que en últimas reflejan el valor nutritivo del pienso, no pueden visualizarse si no se estudia su grado de aprovechamiento en su paso por el tracto gastrointestinal. En el Capítulo 6 se consignan otra serie de técnicas utilizadas en la determinación de compuestos que, a pesar de no ser comunes en la bromatología animal, suelen ser necesarios para dilucidar el verdadero potencial nutricional de algunos alimentos, especialmente aquellos no convencionales. El Capítulo 7 contempla la determinación de toxinas y compuestos antinutricionales. Estos factores han cobrado importancia debido a que son compuestos naturales presentan en los alimentos y que causan diferentes efectos como la alteración de la función reproductiva, reducen el consumo de alimento y pueden limitar la disponibilidad de nutrientes.

Finalmente quiero dar las gracias a María Eugenia Padilla Portilla mi esposa, quien me apoyó en el proceso de preparación y diagramación del manuscrito, a mis hijos y a mis padres por sus bendiciones, las cuales animan siempre mi trabajo. Al INNSZ y UNAM de México, a las Universidades de Nariño, Nacional de Colombia y Antioquia, por su apertura a la consulta en sus bibliotecas. Sinceras gracias a todos los profesores y científicos de los que he tenido el placer de aprender durante estos años y claro está, al maestro de la creación.

Tabla de Contenido

CAPITULO 1	15
MUESTREO	
1.1 Toma de muestras	15
1.2 Muestreo de forrajes en praderas	16
1.3 Muestreo de ensilajes	17
1.4 Muestreo de forraje henificado	18
1.5 Muestreo de raíces, tubérculos y frutos carnosos	19
1.6 Muestreo de granos y concentrados	19
1.7 Toma de muestras en alimentos líquidos y similares	20
1.8 Muestreo de grasas y aceites	20
1.9 Preparación de muestras para envío a laboratorio	22
1.10 Preparación de muestras para el análisis	23
1.10.1 Homogenización de las muestras	23
1.10.2 Reducción del tamaño de la muestra	24
1.10.3 Prevención de cambios en la muestra	24
1.10.4 Identificación de la muestra	25
1.10.5 Pesaje	25
CAPITULO 2	27
ANÁLISIS PROXIMAL MÉTODO WEENDE	
2.1 Generalidades	27
2.2 Determinación de material seca	27
2.3 Determinación de humedad	31
2.3.1 Método de secado en estufa	31
2.3.2 Método de secado en estufa de vacío	33
2.3.3 Método de secado en termobalanza	33
2.3.4 Vacío parcial y baja temperatura	34
2.3.5 Método de Karl Fischer	34

2.3.6	Determinación de M.S con horno microondas	35
2.3.7	Determinación de humedad, método de destilación	37
2.3.8	Determinación de humedad con tolueno	38
2.3.9	La materia seca por infrarrojo cercano espectroscopia de reflectancia	40
2.4	Determinación de ceniza	43
2.4.1	Incineración en seco	44
2.4.2	Incineración en húmedo	48
2.5	Determinación de grasa bruta (Extracto Etéreo)	48
2.6	Determinación de fibra bruta o cruda (Weende)	53
2.7	Determinación de fibra dietética	55
2.8	Determinación de fibra por Van Soest	61
2.8.1	Determinación de fibra detergente neutro y contenido celular	62
2.8.2	Determinación de fibra detergente ácido	64
2.8.3	Determinación de lignina (por permanganato)	65
2.8.4	Lignina ácido detergente	68
2.8.5	Determinación de celulosa	70
2.8.6	Cutina ácido detergente	70
2.8.7	Determinación de Sílice	73
2.9	Determinación de nitrógeno	73
2.9.1	Nitrógeno total	75
2.9.2	Nitrógeno proteico	75
2.9.3	Conversión a proteína	76
2.9.4	Nitrógeno no proteico (ureico y amoniacal)	77
2.9.5	Nitrógeno soluble en detergente ácido	79
2.9.6	Nitrógeno insoluble en pepsina	80
2.9.7	Determinación de nitrógeno amoniacal en ensilajes	81
2.9.8	Determinación del índice de eficiencia proteica	82
2.9.9	Método de balance de nitrógeno o valor biológico	87
2.10	Determinación del extracto libre de nitrógeno (ELN)	89
2.11	Determinación de almidón	89
2.11.1	Método de la antrona	92
2.11.2	Método del yodo	93

CAPITULO 3	95
DETERMINACIÓN DE ENERGÍA BRUTA	
3.1 Energía bruta (EB)	95
3.2 Energía digestible (ED)	101
3.3 Energía metabolizable (EM)	102
3.3.1 Determinación de EM en alimentos para animales	103
3.3.2 Método rápido para medir la E.M de alimentos para Animales	105
3.4 Energía neta (EN)	108
3.5 Formulas para el cálculo de energía de raciones para animales	112
CAPITULO 4	113
DETERMINACIÓN DE MINERALES	
4.1 Obtención del extracto de tejido vegetal	113
4.2 Determinación de fosforo	114
4.3 Determinación de calcio	115
4.4 Determinación de magnesio	116
4.5 Determinación de potasio	117
4.6 Digestión húmeda de productos alimenticios para análisis de minerales	119
4.7 Determinación de calcio a partir de cenizas	119
4.8 Determinación de fosforo	121
4.9 Determinación de magnesio	125
4.10 Metales (método de absorción atómica)	127
4.11 Sodio y potasio (método de fotometría de llama)	131
4.12 Cloruros (método rápido de Volhard)	134
4.13 Determinación de micronutrientes (Zn, Cu, Mn, Fe, Na y S)	135
CAPITULO 5	149
DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD	
5.1 Digestibilidad lignina (por permanganato)	150
5.2 Técnica In situ para determinar la degradabilidad de forrajes	158
5.3 Método In vivo para determinar digestibilidad de forrajes	162
5.3.1 Métodos directos	163
5.3.2 Métodos indirectos	165
5.3.2.1 Método del indicador	165
5.3.2.2 Predicción de la digestibilidad del forraje	167
5.3.2.3 Uso de las heces para pruebas de digestibilidad	176
5.4 Técnica de índices fecales	181

5.5	Medición de la actividad celulolítica ruminal por el método del hilo de algodón	183
5.6	Digestibilidad de forrajes por el método de las membranas de Filtración	184
5.7	Técnicas enzimáticas para determinar digestibilidad	185
5.8	Técnica de producción de gas para la evaluación de forrajes	189
CAPITULO 6		197
OTROS ANÁLISIS		
6.1	Determinaciones especiales en compuestos nitrogenados	197
6.1.1	Proteína soluble	197
6.1.2	Índice de nitrógeno soluble	199
6.1.3	Proteína digestible en pepsina	200
6.1.4	Determinación de bases volátiles totales (nitrógeno amoniacal en carnes y pescado)	201
6.1.5	Nitrógeno no proteico	202
6.1.6	Nitrógeno no proteico (NNP de ácido tungstico)	202
6.1.7	Actividad ureasica	203
6.1.8	Actividad ureasica (por HCl)	205
6.1.9	Determinación de lisina total	206
6.1.10	Determinación de lisina disponible en proteínas	209
6.1.11	Determinación de metionina sintética	210
6.1.12	Determinación de triptófano	218
6.1.13	Determinación de urea en alimentos	219
6.1.14	Análisis cualitativos especiales	221
6.2	Determinaciones especiales en material graso	222
6.2.1	Índice de saponificación	222
6.2.2	Material insaponificable	223
6.2.3	Índice de yodo (método de WIJS)	225
6.2.4	Índice de yodo (método de Hoomann y Green)	227
6.2.5	Índice de peróxidos	227
6.2.6	Prueba de rancidez	229
6.2.7	Determinación de ácidos grasos libres	230
6.2.8	Gosipol en aceites	231
6.3	Ácido láctico en ensilajes (Método Enzimático)	234
6.4	Ácidos grasos volátiles (AGVs) en ensilaje	235

CAPITULO 7	239
DETERMINACIÓN DE TOXINAS Y COMPUESTOS ANTINUTRICIONALES	
7.1 Determinación de taninos en sorgo	239
7.2 Determinación de gossipol libre	243
7.3 Determinación de gossipol total	245
7.4 Detección de aflatoxinas	249
7.4.1 Técnica de la luz negra	249
7.4.2 Prueba de minicolumna	251
7.5 Detección rápida de contaminación por aflatoxinas	253
7.6 Detección de aflatoxinas en alimentos para animales	256
7.7 Determinación de glucosidos cianogenicos	257
7.7.1 Pruebas cualitativas	257
7.7.2 Pruebas cuantitativas	258
7.7.3 Determinación espectrofotométrica de glucosidos cianogenicos	259
7.8 Determinación de óxido de cromo	260
7.8.1 Modificación a la técnica del óxido de cromo	262
7.8.2 Determinación de óxido de cromo en alimentos y heces	263
7.9 Actividad inhibidora de tripsina	264
7.10 Saponinas	266
7.11 Alcaloides	269
BIBLIOGRAFÍA	271

Índice de Tablas

Tabla 1.	Condiciones especiales para incineración de algunos alimentos.	47
Tabla 2.	Condiciones de análisis para la extracción de grasa por el Método Soxhlet .	52
Tabla 3.	Algunos factores para transformar el nitrógeno en proteína.	78
Tabla 4.	Reactivos para calibración del proceso Kjeldahl.	79
Tabla 5.	Composición de dietas experimentales para determinación del IEP.	85
Tabla 6.	Composición de las dietas experimentales.	87
Tabla 7.	Composición porcentual de carbohidratos, proteínas y grasas.	95
Tabla 8.	Energía bruta de los componentes del alimento.	95
Tabla 9.	Energía bruta de sustancias puras.	96
Tabla 10.	Energía bruta de algunos alimentos.	96
Tabla 11.	Nutrientes digestibles totales (NDT).	103
Tabla 12.	Composición de las dietas para determinación de la E.M.	105

Tabla 13. Dieta 2-1.	107
Tabla 14. Patrones de referencia.	128
Tabla 15. Condiciones recomendadas para el análisis de metales.	129
Tabla 16. Diluciones para 20 ml de muestra digerida.	140
Tabla 17. Concentraciones finales.	140
Tabla 18. Condiciones apropiadas para diferentes contenidos de gosipol.	232
Tabla 19. Estimación de contenido de gosipol.	247
Tabla 20. Actividad inhibidora de tripsina.	266

Índice de Figuras

Figura 1. Curva patrón de S	142
Figura 2. Curva patrón de Cu	144
Figura 3. Curva patrón de Zn	145
Figura 4. Curva patrón de Fe	146
Figura 5. Curva patrón de Mn	147

1

Muestreo

Dado que el muestreo constituye una fase crucial para lograr unos resultados confiables en el análisis de un determinado producto, la persona responsable de la toma de muestras debe poseer idoneidad en este campo, ya que lo debe hacer con total apego a los lineamientos técnicos exigidos en los procedimientos. La muestra deberá estar debidamente identificada, en cantidad suficiente para llevar a cabo el análisis y deberá ser empacada de tal manera que evite adulteraciones. La muestra, identificada y marcada, se debe acompañar de la información necesaria para llevar a cabo el análisis; en este se registrarán todas las condiciones en las cuales se recibió la muestra, tales como envases, temperatura, entre otras. La muestra debe ser representativa del producto existente en el lugar de la colecta.

Las muestras deberán ser empacadas correctamente en envases adecuados que prevengan cualquier cambio en la muestra. La elección del tipo de envase o recipiente depende del estado físico del material a muestrear. Los productos elaborados, productos grasos o húmedos e higroscópicos y sustancias líquidas se deben envasar en recipientes de plástico o de vidrio, para muestras de alimentos se debe utilizar recipientes de polietileno. Algunas muestras se deben refrigerar o almacenar en un congelador. El sellado de los recipientes que contienen la muestra evitará cualquier alteración deliberada del contenido y el etiquetado correcto evitará que las muestras se confundan, en ellas se deben describir las características de la muestra, la cual deberá enviarse al laboratorio tan pronto como sea posible.

1.1 Toma de muestras

Debido que el análisis se hace basado en una muestra pequeña, es necesario precisar que para mayor validez y utilidad de los resultados, ésta debe ser

representativa del lote donde fue tomada, lo que implica una toma de muestras con sumo cuidado, ya que muchos errores en los resultados, pueden deberse a esta labor y no al proceso seguido en el laboratorio, lo que hace necesario seguir las recomendaciones sugeridas para los distintos tipos de alimentos.

La recolección de muestras en contenedores como los granos de cereales, partículas más pequeñas como tierra, arena, semillas pequeñas, o más pasadas, se depositan en el fondo y por ello, para obtener una muestra representativa se deben considerar todas las capas.

Los líquidos que tienden a formar capas, deben ser agitados antes de tomar la muestra, en aquellos que no se separan, las muestras se deben tomar del centro del contenedor, con sifón o una pipeta. Líquidos contenidos en barriles pequeños se deben homogeneizar rodándolos; si se trata de materiales contenidos en latas o líquidos parcial o completamente congelados, se deben homogeneizar, antes de extraer la muestra. Estos procedimientos también se pueden adoptar para productos de consistencia viscosa o aceitosa.

1.2 Muestreo de forrajes en praderas

En el caso de los forrajes verdes es aconsejable seguir el siguiente protocolo. Anotar los datos para caracterizar la muestra (día y hora). Son importantes datos como si hubo sol o lluvia. La muestra debe recogerse de la mayoría de los puntos aislados de la superficie total. Todas las muestras deben juntarse y mezclarse, tomando de esta la cantidad necesaria (1kg) para el análisis. Estas deben llevarse al laboratorio en el menor tiempo posible; donde se deben pesar, secar y conservar de manera adecuada para los análisis posteriores. Este método no es válido para determinar componentes lábiles del forraje verde (vitaminas, AGVs, etc.).

La toma de muestras de forraje requiere tener en cuenta el tamaño y la homogeneidad de la pradera, significando que a mayor área y más heterogeneidad, se deben tomar más muestras, para lo cual se puede utilizar un marco cuadrado o rectangular, con área variable, en función de las especies forrajeras. El marco se debe lanzar al azar sobre los potreros y considerar el tipo de animales que lo consumen, pues de ello dependerá la altura de corte de las muestras. El total de submuestras colectadas se deben juntar y mezclar para finalmente reducir la cantidad a aproximadamente 1 kg para enviar al laboratorio.

Lineamientos para el muestreo:

- Delimitar el área de la pradera a ser muestreada
- Tomar de 15 a 20 submuestras de toda el área
- La muestra debe corresponder a la parte de la planta consumida por los animales
- Mezclar todas las submuestras hasta obtener una muestra homogénea, de la cual se extraerá una porción de aproximadamente 1 kg, para enviar al laboratorio.
- Empacar la muestra en bolsas de plástico herméticamente cerradas.
- La muestra debe entregarse al laboratorio en un lapso menor de 24 horas; Si esto no es posible, se debe congelar hasta el envío.
- La identificación de la muestra debe incluir el tipo de forraje, su estado fenológico, parte de la planta a que corresponde, fecha y sitio de recolección, indicando en lo posible los datos climatológicos y aquellos que puedan ser particulares del lugar de muestreo.

1.3 Muestreo de ensilajes

La toma de muestra de un silo es difícil y en muchos casos imposible pues su composición puede variar mucho con la profundidad del silo, principalmente hay variaciones entre las capas superiores, laterales y las situadas centralmente o en las capas inferiores. La mejor muestra la constituye aquella que contenga cantidades equitativas de todas las zonas mencionadas. Cuando esto no es posible se deben descartar las capas superficiales y tomar la muestra de la parte central. Un sistema apropiado es utilizar una sonda cilíndrica similar a aquellas con que se toma muestras de suelo. La muestra de ensilaje (2kg) se introduce en un recipiente hermético y se aprieta lo más posible para enviar al laboratorio.

En silos cerrados, se puede usar sondas, debiendo sellar los orificios por donde se perforó para el muestreo. Se recomienda refrigerar las muestras cuando el laboratorio está distante del sitio de recolección con el fin de preservar las características físicas y químicas del ensilaje.

Lineamientos para el muestreo:

- El muestreo se debe realizar preferiblemente después de abrir el silo
- Las muestras se deben tomar en varios puntos de corte frontal cuando la fermentación se ha estabilizado, es decir, cuando el silo está frío.
- Recoger al menos 10 submuestras, unos 15 cm por debajo del nivel superior del silo para evitar el material expuesto al aire ya la luz
- Mezclar perfectamente las submuestras y tomar unos 2 a 3 kg para enviar al laboratorio.
- Las muestras deben ser empacadas en bolsas de plástico o recipientes de vidrio, eliminando por completo el aire.
- Enviar al laboratorio tan pronto como sea posible o mantener en el refrigerador hasta su envío.
- Las muestras deben estar preferentemente embaladas en cajas de icopor.
- La identificación debe incluir el tipo de material ensilado (lo más detallado posible), si se ha añadido aditivo o inóculo (tipo), fecha de muestreo y procedencia.

1.4 Muestreo de forraje henificado

Tampoco es fácil la toma de muestra de este tipo de alimento, puesto que el desprendimiento de las hojas hace variar el contenido de nutrientes, este caso es más frecuente en alfalfa, trébol y otras leguminosas, por lo que las capas superiores varían en composición con las inferiores. Se debe tomar por lo tanto, gran número de muestras de las diferentes capas para mezclarse y coger la muestra final (2kg) para enviar al laboratorio.

El número de muestras varía en función del número de fardos, se recomienda muestrear al menos 10% de ellos, cuidando de no mezclar muestras de diferentes "lotes". El muestreo de pacas de heno requiere el uso de sondas, con el objeto de tomar muestras del centro de cada fardo, en caso de no tener estos dispositivos, es aconsejable abrir el fardo y tomar la muestra a mano. Las muestras deben tomarse para cada "lote" de heno, teniendo en cuenta que provengan de un mismo cultivo, campo, especie o variedad y similares condiciones de recolección, método de empacado y almacenamiento.

Procedimiento:

- Tomar submuestras de acuerdo con la cantidad de pacas, mezclar y tomar una muestra de aproximadamente 1 kg.
- Colocar las muestras en bolsas de papel para enviar al laboratorio.
- Identificar el tipo de muestra, el tiempo de almacenamiento, la edad de corte de la planta, la(s) especie(s) forrajera(s), la fecha de recogida y procedencia.

1.5 Muestreo de raíces, tubérculos y frutos carnosos

En este caso, la muestra debe tomarse por la recogida al azar de unidades aisladas de todas partes del depósito o almacén, debido a su elevado contenido de agua, la muestra no debe ser pequeña, requiriéndose unos 5 a 10 kg. Seguidamente se troceará y mezclará para extraer la cantidad (3kg) para enviar al laboratorio; estas muestras por su alta humedad y contenido de carbohidratos fermentables, suelen deteriorarse con facilidad, por lo que es preciso hacerlas llegar muy pronto al laboratorio o conservarse refrigeradas hasta su entrega para los análisis requeridos.

Cuando el material objeto de estudio se encuentre contaminado con impurezas como tierra o arena, debe determinarse el grado en que lo están. Para ellos se pesa exactamente la muestra en el estado original, se limpia luego con agua y cepillo, se seca con cuidado y pesa nuevamente.

1.6 Muestreo de granos y concentrados

Es importante considerar su presentación, pues suelen estar en depósitos, a granel o en empaques sellados, en estado de harinas, granos triturados o enteros o peletizados. En todo caso de la cantidad máxima de la que debe tomarse una muestra no debe sobrepasar las 50 toneladas. Si el alimento se presenta en empaques deben tenerse en cuenta dos consideraciones: Si se trata de un solo alimento o si es un alimento compuesto y la capacidad del empaque. En el caso de ser un solo alimento, se puede tomar una muestra por cada 1.000 empaques, cuando el alimento es compuesto debe tomarse una muestra por cada 300 empaques.

En el caso de venir en empaques grandes (50kg), se debe muestrear como mínimo un 5% de ellos, en el caso de empaques de menor capacidad, el 5% es más que suficiente. Para muestrear alimentos harinosos, es necesario utilizar elementos adecuados, en el caso de presentarse en forma grosera o granulados, se requiere vaciar completamente el empaque.

Para obtener la muestra definitiva se deben mezclar todas las submuestras parciales en una superficie lisa y limpia, su peso total debe alcanzar como mínimo 2 kg en el caso de alimentos harinosos y 3 kg en el caso de granos o pellets. De esas muestras deben tomarse cantidades pequeñas hasta completar 500 g para los análisis de laboratorio.

1.7 Toma de muestras en alimentos líquidos y similares

Para el caso de muestras de alimentos como la melaza, emulsiones, etc., de cada 100 recipientes como mínimo debe tomarse una muestra, cuando estos productos vienen en recipientes de gran capacidad. En otros casos como norma, se debe muestrear un 10% de los recipientes. Es necesario mezclar bien el contenido antes de la toma de la muestra. Cuando se trata de tanques o carros cisterna debe valerse de un toma muestras apropiado, por lo menos una muestra de cada tanque. En el caso de que el producto (melaza o residuo de destilería de alcohol) tenga al momento del muestreo una temperatura superior a la normal, debe tenerse en cuenta para el análisis, la muestra final no debe ser menor de 500 ml.

1.8 Muestreo de grasas y aceites

Es muy difícil establecer una descripción detallada del muestreo de los aceites y grasas que abarcará todas las condiciones y circunstancias a las que puede enfrentarse la persona encargada de tomar la muestra. Hay muchos casos en los que la experiencia y el juicio del individuo deben prevalecer. Hay, sin embargo, ciertas normas generales relativas a la elaboración, preparación, almacenamiento y manipulación de muestras que deben regir siempre para que la muestra sea representativa.

- **Precauciones generales de muestreo**

Todos los instrumentos de muestreo deben ser preferiblemente de acero inoxidable; si son de metal, estos deben ser niquelados. Los instrumentos de muestreo deben estar limpios y secos; pueden limpiarse con agua caliente y jabón u otro detergente, teniendo la precaución de lavar los residuos con agua hirviendo. Si hay disponible una fuente de vapor, deberá usarse para una mejor limpieza.

Las muestras no deben ser tomadas en un lugar expuesto. Las muestras, el material que está siendo muestreado, los instrumentos de muestreo y envases para las muestras, deberán protegerse de la contaminación accidental y colocarse en recipientes limpios y secos, almacenarse de tal manera que estén protegidos de la luz, las fluctuaciones de temperatura y otras condiciones anormales.

- **Instrumentos de muestreo**

Botella o lata de muestreo - Es instrumento adecuado para el muestreo en grandes tanques de aceite líquido. Consiste en una botella graduada o un recipiente de metal con un tapón de corcho extraíble, a la que se adjunta una cadena adecuada. Este dispositivo se baja a diversas profundidades en las que se retira el tapón y el recipiente se llena.

Tubos de muestreo - Las formas recomendadas de tubos de muestreo son (a) tubos de tipo cerrado, no graduados, para el muestreo líquidos y semilíquidos que pueden no ser homogéneos; y (b) de tipo abierto para el muestreo de líquidos homogéneos.

Cucharas de muestreo- Estos instrumentos son de tipo abierto y son adecuados para la toma de muestras de materias grasas vegetales de origen natural o aceites vegetales hidrogenados. Deben ser de metal, semicirculares o en forma de C en su sección transversal, para tomar con facilidad la muestra de cualquier punto que se requiera.

- **Empacado de muestras**

Las muestras deberán ser embaladas en recipientes limpios y secos, preferentemente de vidrio o de hojalata, los recipientes no deben llenarse completamente. Se recomiendan las botellas de vidrio de 500 ml de capacidad

para los aceites líquidos y recipientes de vidrio para aceites vegetales o grasas sólidas.

Todos los recipientes deberán estar provistos de tapones que permitan un buen ajuste. No deben utilizarse tapones de goma para cerrarlos; en el caso de envases de vidrio, se deben utilizar tapones de vidrio o corchos y, en el caso de envases de hojalata, tapas de lata se deben ajustar adecuadamente para evitar la contaminación de la grasa.

Muestra bruta - El procedimiento general para la toma de una muestra bruta es extraer una serie de porciones de la cantidad a granel o un número de porciones para formar la totalidad y mezclar a fondo. Porciones representativas de la muestra a granel se deben transferir a recipientes herméticos de tamaño adecuado para conformar las muestras a analizar. La muestra bruta a partir de cantidades a granel, no debe ser menor de 2 kg por 2 000 kg.

Los instrumentos para muestreo deben ser de acero inoxidable u otro material que no reaccione con la grasa o el aceite; si el producto viene en tanques, se pueden usar latas amarradas a cadenas para introducirlas a diferentes profundidades o bien tubos con válvula en la boca para que se abran en la zona deseada.

Para tomar muestras de grasa sólidas es necesario calentar un poco el tanque, aunque este proceso no siempre es posible. Si se sospecha que hay sedimento, hay que tomar la muestra con un instrumento que tenga válvula en el fondo.

De cada submuestra se toma una parte y se coloca en un frasco de vidrio o acero inoxidable limpios, tomar por lo menos tres muestras no menores de 250 g de grasa, tapar, protegerlas de la luz e identificarlas apropiadamente.

1.9 Preparación de muestras para envío al laboratorio

La manipulación posterior dada a las muestras después del muestreo, es tan importante como el muestreo mismo, ya que el manejo inadecuado de estas puede alterar algunos constituyentes, como en el caso de los ácidos grasos volátiles de los ensilajes que no fueron conservados en congelación. El empleo de frascos o bolsas sucias o mal cerradas, conllevan a resultados erróneos.

Tan pronto como la muestra ha sido tomada, debe procederse con las siguientes precauciones: 1) Para muestras secadas al aire, pastos, granos y forrajes el envío al laboratorio puede hacerse en frascos de boca ancha, que permitan un buen taponamiento o en bolsas de polietileno. 2) Forrajes frescos

o muestras parcialmente secas, deben colocarse en bolsas de papel resistentes, que permitan la evaporación de agua y con ello evitan la descomposición de la muestra por microorganismos o el deterioro por exceso de humedad. Es importante el pesaje antes de introducirlo a la bolsa para poder conocer su humedad original y con ella la composición fresca del material objetivo de análisis. 3) Los ensilajes deben enviarse en doble bolsa de polietileno o frascos con tapa y congelarse inmediatamente para enviarse al laboratorio. 4) Muestras líquidas o similares deben envasarse en frascos y taparse con cuidado.

Dependiendo del tipo de análisis requerido, el material del envase es importante pues en el caso de que se desee cuantificar minerales, el frasco de vidrio es indeseable pues la muestra puede contaminarse con minerales de vidrio. Es fundamental identificar en forma apropiada la muestra, para lo cual se requiere especificar el tipo de muestra, origen, nombre del solicitante y análisis requerido.

1.10 Preparación de las muestras para el análisis

En el análisis nutricional de alimentos están involucrados una serie de análisis físicos, químicos y biológicos que no siempre son necesarios en todos los casos, hecho que conlleva a que el analista juzgue que método es el más adecuado para cada alimento en particular.

1.10.1 Homogenización de las muestras. Las muestras que llegan al laboratorio suelen tener diferentes grados de heterogeneidad, la cual debe ser eliminada y para ello se requiere usar cierto tipo de dispositivos mecánicos para su homogeneización. El aparato a utilizar depende de las propiedades del alimento que se analizará (sólido, semisólido, líquido). La homogeneidad se puede lograr usando molinos, batidoras, rebanadoras, licuadoras, métodos enzimáticos (proteasas, celulasas, lipasas) o métodos químicos (ácidos fuertes, bases fuertes, detergentes).

La mayoría de veces se suele recurrir a desecar las muestras a una temperatura baja (65°C); la desecación se ve favorecida si se realiza en una estufa que permita la extracción del aire pues agiliza el proceso, posteriormente muele para que el material pase un tamiz de 1 mm. Resulta difícil moler sustancias ricas en azúcar o grasa, para ello es necesario utilizar molino de martillo, y aun así resulta a veces ineficiente, en estos casos debe molerse groseramente la totalidad de la

muestra deseada, para luego mezclarla cuidadosamente y formar una muestra más pequeña que se muele en molinos especiales.

Hay una gran variedad de sustancias que no permiten el proceso anteriormente descrito, porque sufrirían alteraciones que afectan los resultados. Para estos análisis (vitamina, aminoácido, AGV, etc.), en el caso de que no sean excesivamente sensibles, basta una desecación al vacío o baja temperatura (30-40 °C), para sustancias fácilmente oxidables (vitaminas), es necesario antes de hacer el vacío, sustituir el aire por dióxido de carbono. El material así desecado puede ser molido o triturado en mortero, etapas en las cuales se debe evitar el calentamiento en este proceso.

1.10.2 Reducción de tamaño de la muestra. Una vez que la muestra se ha homogenizado por el método apropiado, se selecciona la porción adecuada para el análisis. A esto normalmente se refiere como una muestra de laboratorio, y lo ideal sería lograr que tenga las propiedades de la población de la que fue tomada. Los planes de muestreo a menudo definen el procedimiento para reducir el tamaño de una muestra con el fin de obtener resultados fiables y repetibles.

1.10.3 Prevención de cambios en la Muestra. El laboratorio debe garantizar que la muestra seleccionada no sufrirá ningún cambio significativo (enzimático, químico, microbiano o físico) en sus propiedades, hasta el momento del análisis. Existen estrategias mediante las cuales se pueden prevenir estos cambios.

Inactivación enzimática. Muchos alimentos contienen enzimas activas que pueden provocar cambios en las propiedades de los alimentos antes del análisis, como: proteasas, celulasas, lipasas, etc., que pueden dar lugar a datos erróneos. La congelación, secado, tratamiento térmico y conservantes químicos o una combinación de ellos, suelen ser utilizados para controlarla.

Protección de los lípidos. Los lípidos insaturados pueden ser alterados por varias reacciones de oxidación. La exposición a la luz, temperaturas elevadas, oxígeno o pro-oxidantes puede aumentar la velocidad a la que estas reacciones tienen lugar. Por lo general es necesario almacenar las muestras que tienen altos contenidos de lípidos insaturados, en atmósfera de nitrógeno o algún otro gas inerte, en habitaciones oscuras o botellas cubiertas y a temperaturas de refrigeración o se pueden añadir antioxidantes que no interfieran con el análisis.

Crecimiento microbiano. Los microorganismos están presentes naturalmente en muchos alimentos y si no se controlan pueden alterar la composición de las

muestras; la congelación, secado, tratamiento térmico y conservantes químicos o una combinación, a menudo se utilizan para controlarlos.

Cambios físicos. El agua puede perderse debido a la evaporación o adquirida debido a la condensación; la grasa o el hielo pueden fundir o cristalizar; propiedades estructurales pueden ser perturbadas. Los cambios físicos pueden reducirse al mínimo mediante el control de la temperatura de conservación de la muestra.

1.10.4 Identificación de la muestra. Las muestras siempre deben ser etiquetadas con cuidado, para identificar fácilmente cualquier problema originado con alguna de ellas. La información utilizada para identificar una muestra incluye: a) Descripción de la muestra, b) tiempo en el que fue tomada, c) Lugar de toma, d) persona que la tomó, y, e) Método utilizado para la selección de la muestra. El Analista siempre debe llevar un registro detallado que documente claramente los procedimientos de selección y preparación de muestras realizadas y registrar los resultados de los procedimientos analíticos realizados a cada muestra. Cada muestra debe ser marcada con un código en su etiqueta que se puede correlacionar con el registro de notas.

1.10.5 Pesaje. Cualquiera que haya sido el proceso empleado para obtener la muestra para los diferentes análisis, debe pesarse con la máxima exactitud (al diezmiligramo) pues en este punto radica gran parte de la validez de los resultados encontrados.

2

Análisis Proximal Método Weende

2.1 Generalidades

El análisis proximal ideado en 1865 por Henneberg y Stohmann de la Estación Experimental Weende en Alemania, establece una serie de procedimientos, mediante los cuales se explora la composición de los alimentos para animales. Fue creado principalmente para identificar los carbohidratos, los cuales clasifica en dos grandes grupos: fibra cruda y extracto libre de nitrógeno (ELN). El proceso contempla las determinaciones de agua (humedad), ceniza, grasa cruda (extracto etéreo), proteína cruda, y fibra bruta. El ELN se cuantifica por la diferencia de 100 menos los otros componentes y no por un método de análisis específico, lo que puede resultar en un error acumulado de las anteriores determinaciones.

Podría decirse que el análisis proximal determina la composición de un alimento en función de grupos de compuestos con características físico-químicas semejantes, pero con diferente valor nutritivo y, a pesar de sus limitaciones, el análisis proximal ha sido por más de un siglo el punto de partida en la evaluación de un alimento y aunque los métodos de análisis hayan cambiado, el fundamento permanece intacto.

2.2 Determinación de materia seca

La determinación de materia seca o, más específicamente, la determinación de humedad es probablemente el análisis realizado con mayor frecuencia en los laboratorios de nutrición y reviste gran importancia, puesto que la concentración de los nutrientes restantes, se expresa por lo general en base a materia seca (%BS). El contenido de humedad o materia seca son extremadamente importantes en el campo pecuario, especialmente en aquellas actividades que tienen que ver con alimentos de alta humedad.

El contenido de humedad usualmente se obtiene por la pérdida de peso al evaporar el agua y aunque este procedimiento resulta satisfactorio para la mayoría de alimentos, para aquellos que poseen alta humedad o fermentados no es el más indicado; puesto que estos generalmente contienen nutrientes volátiles como los ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico, butírico, etc.), o algunos aceites esenciales (mentol, terpenos), pueden perderse a temperatura de secado al horno de 100° C.

El método de secado en estufa para determinar únicamente la cantidad de materia seca presente en una sustancia, no es una medida exacta del contenido de humedad, puesto que en la desecación ocurren una serie de reacciones químicas que ocasionan variaciones en esta determinación. Debido a que la mayoría de estudiantes suelen tener dificultad con los cambios de base, para expresar la concentración de nutrientes en una base determinada, es necesario conocer la terminología empleada en su obtención, por ello a continuación se explican cada una de ellas.

BASE FRESCA (BF) = Resultados obtenidos de una muestra con su humedad original.

BASE PARCIALMENTE SECA (BPS) = Resultados obtenidos de una muestra, cuya humedad es menor al 15%, proceso más usual en el laboratorio.

BASE SECA (BS) = Resultados obtenidos de una muestra cuya humedad es cero, proceso que se hace por métodos matemáticos.

Cualquiera que sea el método empleado para presentar los resultados, está basado en un material que se llama MATERIA SECA, pero es necesario aclarar si este contiene o no agua, para lo cual se usan las siguientes denominaciones:

MATERIA SECA PARCIAL (MSP) = Material residual que contiene la muestra después de la desecación a menos de 75°C, hasta peso constante (más o menos 48 horas).

MATERIA SECA (MS) = Material residual que contiene la MSP después de desecarse a 110 °C por tres horas.

Por lo anterior, para calcular la materia seca real (MSR) de una determinada sustancia, es necesario proceder de la siguiente manera.

1. Determinar el porcentaje de materia seca parcial de la muestra fresca.
2. Determinar el porcentaje de materia seca de la muestra seca parcialmente.
3. Calcular el porcentaje de materia seca real de la muestra fresca con la siguiente formula:

$$\frac{\% \text{ MATERIA SECA REAL}}{(\text{MSR})} = \frac{\% \text{MSP} \times \% \text{MS}}{100}$$

Hay que tener presente que este procedimiento es necesario para expresar los resultados de las demás determinaciones (proteína, grasa, fibra, etc.) en cualquier base que se deseé, con las siguientes formulas:

$$1. \quad \% \text{ en BS} = \frac{\% \text{ en BPS}}{\% \text{ de MS de MSP}} \times 100$$

Ejemplo:

El porcentaje de proteína de un pasto en base parcialmente seca es de 20% y el porcentaje de humedad es de 5%. ¿Cuál es el porcentaje de proteína de dicha muestra en base seca?

$$\% \text{ MS de la muestra parcialmente seca} = 100 - 5 = 95\%$$

$$\% \text{ de proteína del pasto en base seca} = \frac{20 \times 100}{95} = 21.05\%$$

$$2. \quad \% \text{ en BF} = \frac{\% \text{ en BPS} \times \% \text{ de MS en BF}}{\% \text{ de MS en MSP}}$$

Ejemplo:

Si la proteína de la alfalfa en BPS es del 22% y el contenido de MS en BF es del 25%. ¿Cuál es la proteína en BF, si la MS en la BPS es del 95%?

$$\% \text{ de proteína en BF} = \frac{22\% \times 25\%}{95\%} = 5.79\%$$

Determinación de materia seca parcial (MSP). Este tipo de determinación solo es necesario realizarlo en aquellas muestras que tengan un contenido superior al 15% de agua. Materiales que contienen menos de esta cantidad pueden analizarse inmediatamente después de que llegan al laboratorio previa preparación del material para los análisis requeridos.

Al primer caso pertenecen sustancias como pastos frescos, heces y otros forrajes frescos que deben secarse parcialmente antes de iniciar cualquiera otra determinación. Este proceso se conoce como MSP porque permite bajar la humedad a un contenido menor del 15%, o porque elimina parcialmente el agua.

Estas consideraciones dan lugar a clasificar las muestras en dos tipos:

1. Aquellas con un contenido de humedad inferior al 15%, que permiten ser procesados inmediatamente llegan al laboratorio.
2. Las que necesitan secarse parcialmente por contener más del 15% de humedad.

Material y equipo

- Estufa con graduación de temperatura (en lo posible con extractor de aire)
- Molino de tejido vegetal con tamiz de 1 mm de malla
- Frasco de vidrio con tapa o bolsa plástica

Procedimiento

Corte la muestra (sí es necesario) en trozos pequeños y coloque unos 300 gramos en bolsas de papel previamente pesadas. Seque en la estufa a 65 °C (ver 1.11) hasta obtener un peso constante, el que se puede lograr más o menos a las 48 horas, si es necesario prolongue el tiempo de desecación. Saque de la estufa y deje secar y equilibrar la muestra con la humedad ambiente durante 24 horas.

Pese nuevamente y calcule el porcentaje de materia seca parcial, que lo obtiene del promedio de al menos 3 submuestras.

Mezcle las submuestras y páselas por molino con tamiz de 1 mm de malla. Homogenice. De la mezcla extraiga 100 gramos aproximadamente y consérvelos en un frasco de vidrio bien tapado o en bolsa plástica para los demás análisis.

Cálculos

$$\% \text{ de MSP} = \frac{\text{Peso de la muestra parcialmente seca} \times 100}{\text{Peso de la muestra fresca}}$$

2.3 Determinación de humedad

La medida de humedad es de gran importancia no solo para establecer su cantidad en un alimento, sino que es inversa al contenido de materia seca, además de que constituye un elemento de trascendencia económica.

La gran variedad de métodos a seguir para determinar el contenido de agua en una sustancia, se basan principalmente en tres factores: presión, tiempo y temperatura y dependen del tipo de alimento en cuestión. A continuación, se describen brevemente algunos sistemas utilizados para este tipo de determinación.

2.3.1 Método de secado en estufa. Es el método más simple, rápido y el más usado en los laboratorios. Sin embargo, no es el más aconsejable, pues a esta temperatura pueden perderse otros componentes y presentarse reacciones que alteren su composición. El secado en estufa se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua. Para esto se requiere que la muestra sea térmicamente estable y que no contenga una cantidad significativa de compuestos volátiles.

El principio operacional del método de determinación de humedad utilizando estufa y balanza analítica, incluye la preparación de la muestra, pesado, secado, enfriado y pesado nuevamente de la muestra.

Notas sobre las determinaciones de humedad en estufa.

1. Los productos con un elevado contenido en azúcares deben deshidratarse en estufa de vacío a temperaturas que no excedan de 70°C.
2. Los métodos de deshidratación en estufa son inadecuados para productos como las especias, ricas en sustancias volátiles distintas del agua.
3. La eliminación del agua de una muestra requiere que la presión parcial de agua en la fase de vapor sea inferior a la que alcanza en la muestra; de ahí que sea necesario cierto movimiento del aire; en una estufa de aire se logra abriendo parcialmente la ventilación y en las estufas de vacío dando entrada a una lenta corriente de aire seco.
4. La temperatura no es igual en los distintos puntos de la estufa, de ahí la conveniencia de colocar el bulbo del termómetro en las proximidades de la muestra. Las variaciones pueden alcanzar hasta más de tres grados en los tipos antiguos, en los que el aire se mueve por convección. Las estufas más modernas de este tipo están equipadas con eficaces sistemas, que la temperatura no varía un grado en las distintas zonas.
5. Muchos productos son, tras su deshidratación, bastante higroscópicos; es preciso por ello colocar la tapa de manera que ajuste tanto como sea posible, inmediatamente después de abrir la estufa y es necesario también pesar la cápsula tan pronto como alcance la temperatura ambiente; para esto puede precisarse hasta una hora si se utiliza desecador de vidrio.
6. La reacción de pardeamiento que se produce por interacción entre los aminoácidos y los azúcares reductores libera agua durante la deshidratación y se acelera a temperaturas elevadas. Los alimentos ricos en proteínas y azúcares reductores deben, por ello, desecarse con precaución, de preferencia en una estufa de vacío a 60°C.

Material y equipo

- Estufa con graduación de temperatura (en lo posible con extractor de aire).
- Campana para desecación
- Cajas de Petri

Proedimiento

Pesar de 2 a 5 g de muestra. Secar en estufa durante 3 horas a 110 °C, enfriar en desecador y pesar. Repetir el calentamiento y enfriamiento hasta obtener diferencia de pesos menor de 5 mg en dos pesajes sucesivos. Para muestras con menos del 15% de humedad, 3 horas es suficiente. Hacer este proceso con réplica para verificar sus resultados.

Cálculos

$$\frac{\% \text{ MS} = \text{Muestra seca}}{\text{Muestra húmeda}} \times 100$$

$$\% \text{ Humedad} = 100 - \% \text{ Materia seca}$$

2.3.2 Método de secado en estufa de vacío. Se basa en el principio fisicoquímico que relaciona la presión de vapor con la presión del sistema a una temperatura dada. Si se baja la presión del sistema, se reduce la presión de vapor y necesariamente se reduce su punto de ebullición. Si se sustrae aire de una estufa por medio de vacío se incrementa la velocidad del secado.

Es necesario que la estufa tenga una salida de aire constante y que la presión no exceda los 100 mm Hg. y 70°C, de manera que la muestra no se descomponga y que no se evaporen los compuestos volátiles de la muestra, cuya presión de vapor también ha sido modificada.

2.3.3 Método de secado en termobalanza. Este método se basa en evaporar de manera continua la humedad de la muestra y el registro continuo de la pérdida de peso, hasta que la muestra se ponga a peso constante. El error de pesada en este método se minimiza cuando la muestra no se expone constantemente al ambiente.

2.3.4 Vacío parcial y baja temperatura. (25 m – 70-90 °C). Constituye el método más preciso para la mayoría de alimentos, aunque no es un procedimiento que permite la medida exacta de la humedad, es mucho más confiable que el anterior.

2.3.5 Método de Karl Fischer. Es el único método químico comúnmente usado para la determinación de agua en alimentos, que se basa en su reactivo. Este reactivo fue descubierto en 1936 y consta de yodo, dióxido de azufre, una amina (originalmente se empleaba piridina sin embargo por seguridad y toxicidad se está reemplazando por imidazol) en un alcohol (metanol).

Inicialmente, el dióxido de azufre reacciona con el metanol para formar el éster el cual es neutralizado por la base (1). El éster es oxidado por el yodo a metil sulfato en una reacción que involucra al agua (2).

Las reacciones son las siguientes:



Habitualmente se utiliza un exceso de dióxido de azufre, piridina y metanol de manera que la fuerza del reactivo venga determinada por la concentración de yodo. Este reactivo es un poderoso deshidratante, por lo que tanto la muestra como el reactivo deben protegerse contra la humedad del aire. Se hace por titulación y estas pueden ser visuales o potenciométricas. En su forma mas simple, el mismo reactivo funciona como indicador. La disolución muestra mantiene un color amarillo intenso mientras haya agua, que cambia luego a amarillo cromato y después a pardo en el momento del cambio.

En su forma mas simple el método potenciométrico consta de una fuente de corriente directa, un reóstato, un galvanómetro o microamperímetro y electrodos de platino, dos cosas son necesarias para la determinación: una diferencia de potencial que de una corriente y el contacto del titulante con el analito. Este método se aplica a alimentos con bajo contenido de humedad por ejemplo frutas y vegetales deshidratados, aceite y café tostado, no es recomendable para alimentos con alto contenido de humedad.

2.3.6 Determinación de materia seca con horno microondas. Este procedimiento resulta apropiado para la determinación en forrajes secos o parcialmente secos, ($\geq 85\%$ de materia seca). Las muestras secadas por este procedimiento no son apropiadas para posteriores determinaciones de fibra, lignina, o de nitrógeno insoluble en detergente ácido.

Principio básico:

La humedad de la muestra se evapora por la radiación de microondas. La materia seca total se determina gravimétricamente como residuo que queda después de secar.

Equipo:

- Horno microondas con un mínimo de 600 vatios, preferible plato giratorio, pero no esencial
- Balanza electrónica, con precisión de 0,01 g
- Bandejas, papel o vidrio o plástico para microondas

Precauciones de seguridad:

- Compruebe periódicamente que el horno no tiene fugas de radiación. Las microondas son absorbidas por el cuerpo y pueden producir efectos perjudiciales de calor, especialmente en la lente del ojo.
- Los marcapasos cardíacos pueden fallar en presencia de radiación de microondas.
- No coloque ningún objeto de metal o papel de aluminio en el horno, si se oyen crujidos durante la operación del horno, implica la presencia de metal.

Procedimiento:

- 1) Secar recipientes vacíos en el microondas durante 3 min a plena potencia
- 2) Se pesan los recipientes vacíos y se registra el peso (W4)
- 3) Pesar el forraje (100-200 g), registrando el peso de la bandeja y de la muestra (W5)

- 4) Colocar la muestra en el horno microondas durante unos 3 minutos a máxima potencia
- 5) Retirar la muestra y mezclar
- 6) Pesar la muestra y recipiente
- 7) Volver la muestra al microondas a 50% de potencia durante 1 minuto y volver a pesar
- 8) Repita los pasos 6 y 7 hasta que no se produzca ninguna pérdida de peso. No permita que muestra se carbonice. Registre el peso final del recipiente y la muestra seca (W6)

Comentarios:

- Tenga cuidado de no carbonizar o quemar muestras. Cuando las muestras se acerquen a la sequedad, reducir el tiempo de secado y/o ajuste de potencia.
- Desechar las muestras de olor a quemado u oscurecidas y comenzar de nuevo Carbonización afecta a la determinación de materia seca.
- Las muestras con contenidos de humedad más altos requieren más tiempo de secado. Aumentar el número de intervalos de secado, no el tiempo de secado o la potencia de microondas, ya que pueden dar lugar a que las muestras se quemen.
- Un vaso de agua colocado en el horno de microondas durante el secado reduce el riesgo de quemado de las muestras.

Cálculos

Porcentaje de Materia Seca (%MS)

$$\% \text{ MS} = \frac{W6 - W4}{W5 - W4} \times 100$$

Donde:

W4 = peso del recipiente vacío en gramos

W5 = peso inicial de la muestra y el recipiente en gramos

W6 = peso seco de la muestra y el recipiente en gramos

Control de calidad:

Incluir varias réplicas en cada procedimiento, para asegurar la fiabilidad de los resultados, cuya desviación estándar aceptable entre replicas debe ser aproximadamente $\pm 0,10$. Resultados fuera de los límites de confianza deben ser desechados.

2.3.7 Determinación de humedad, método de destilación. Los métodos de destilación se basan en separar los alimentos a reflujo con un líquido no miscible con el agua (Xileno, benceno, tolueno y algunos derivados del petróleo, haluros orgánicos como el tetracloruro de carbono), menos denso que ésta y, normalmente, con un punto de ebullición más alto.

Este método es ampliamente usado en industrias de jabones y aceites, está basado en una destilación azeotrópica (mezclas que mantienen igual punto de ebullición) bajo una condición de presión constante, estas mezclas pueden conservar bajo un proceso de destilación por largo intervalo de tiempo una misma composición; sin embargo cuando la temperatura es cercana al punto de ebullición del agua es posible obtener la mayor concentración de ésta (en la fase destilada) entre el agua y un solvente no miscible en fase acuosa, de la cual se separa el agua en el destilado y puede ser medida volumétricamente.

El sistema de destilación se diseña de tal manera que el alimento, junto con el solvente elegido se volatiliza en un matraz, se condensan en un refrigerante y se recogen en un colector. El disolvente se mezcla en el colector con el mismo líquido y el exceso refluye y vuelve al matraz; el agua, al ser más densa, cae en la parte inferior del colector en el que existe un depósito graduado, donde se hace la lectura directa del volumen recogido. El proceso de extracción se mantiene hasta que el volumen de agua permanece constante, se mide el volumen final y se aplica la siguiente relación:

% de agua en la muestra = $100V/M$

Donde:

V = Volumen de agua recogida

M = Peso de la muestra

Descripción

El solvente empleado debe ser inmiscible y menos denso que el agua, tener un punto de ebullición superior pero próxima al del agua, y estar saturado de agua al momento de su uso. Se recomienda el tolueno (PE 111° C) frente al xileno (PE 137-140° C) o el tetracloroetileno (PE 121° C) debido a que minimiza la descomposición térmica de los componentes del alimento.

Se coloca en el balón la cantidad de muestra necesaria, se agrega el solvente saturado de agua hasta cubrir la muestra. La capa acuosa del tolueno saturado estará bien decantada y se cuidará de no trasvasarla al balón. Se adapta a éste la trampa graduada de Dean-Stark, la que se carga con el solvente más 2 o 3 gotas de indicador (Sudán II o Sudán III) y se conecta el refrigerante.

El tubo del refrigerante y la trampa colectora deben estar bien desengrasados, de lo contrario se observarán gotas de agua adheridas a las paredes durante la destilación.

Se calienta a ebullición suave por espacio de 2 hs. Observar si no destila más agua, dejar enfriar y efectuar la lectura de la capa acuosa contenida en la trampa.

Este método es bastante exacto y rápido para determinar cantidades relativamente pequeñas de agua o cuando se quiere distinguir entre el contenido de agua propiamente dicho y sustancias volátiles.

2.3.8 Determinación de humedad con tolueno. Este procedimiento se recomienda para la determinación de la humedad en los alimentos fermentados (henolajes y ensilajes) que contienen altos niveles de compuestos volátiles. Los ácidos grasos volátiles y alcoholes tienen bajos puntos de vaporización y se pierden cuando la muestra se seca en un horno.

Principio básico: El agua se destila a partir de la muestra y es atrapada bajo una capa de tolueno.

Equipo

- Frasco pyrex de 250 ml
- Receptor de humedad Bidwell-Sterling, calibrado a 0,01 ml por destilación de cantidades conocidas de agua, para evitar que se adhiera a la superficie interior.
- Condensador Liebig de 500 mm
- Campana de destilación de Tolueno

Reactivos:

- Tolueno, calidad reactivo
- Precauciones de seguridad:
- El tolueno es inflamable, así que tome las debidas precauciones para este tipo de compuestos. Evitar la inhalación de vapores. Evitar el contacto con la piel.

Procedimiento:

- 1) Pesar suficiente muestra húmeda (al menos 25 g) para obtener un mínimo de 5 ml de agua, registrar el peso (W1) con precisión, y trasladarlo al matraz de 500 ml.
- 2) Añadir suficiente tolueno para cubrir completamente la muestra.
- 3) llenar Inmediatamente tubo receptor con tolueno, que vierte a través de la parte superior del condensador.
- 4) Llevar a ebullición y se destila lentamente, ca. 2 gotas / seg, hasta que la mayor parte del agua pasa por encima, a continuación, aumentar la tasa de destilación a alrededor de 4 gotas/seg. Destilar 1 hora (o más si es necesario para muestras húmedas) para obtener compensación en la parte superior del condensador.
- 5) Cuando toda el agua ha sido aparentemente destilada, lavar el condensador mediante el vertido de tolueno en por lo la parte superior y continuar la destilación por un corto tiempo (aproximadamente 15 min) para asegurar que toda el agua es destilada. Si 0,1 ml de agua adicional se destila en 15 minutos, repita este paso.
- 6) Si queda agua en el condensador después de que se completó la destilación, lavarlo con tolueno.
- 7) Que el tubo receptor llegue a temperatura ambiente y se lee el volumen

de agua en la capa inferior del receptor y registro de volumen (V) a 0,01 ml.

Comentarios:

- Para ser exactos, el agua destilada debe ser analizado para los ácidos volátiles y alcohol que puede codestilar con agua.
- Materia seca tolueno es aproximadamente equivalente a un secado parcial que deja 3-5% de humedad en la muestra (que es más o menos equivalente a los ácidos volátiles perdidos durante el secado) y es adecuada para el ajuste de proteína cruda y fibra en base seca.

Cálculos: Porcentaje total de materia seca

$$\% \text{ Total MS} = 1 - \frac{V}{W1} \times 100$$

Donde:

V = Volumen de agua en ml

W1 = Peso de la muestra en gramos

Cálculos El por ciento de humedad total:

$$\% \text{ Humedad Total} = 100 - \% \text{ total MS}$$

Control de calidad:

La desviación estándar aceptable entre replicas debe ser aproximadamente $\pm 0,10$. Resultados fuera de los límites de confianza deben ser desechados.

2.3.9 La materia seca por infrarrojo cercano espectroscopia de reflectancia. Este procedimiento es aplicable para la determinación de materia seca en forrajes parcialmente secos (materia seca de 90 a 95%), para lo cual las muestras deben ser molidas a través molinillo con tamiz de 1 mm y tener un contenido de materia seca del 90 al 95%.

Principio básico: Las muestras se cargan en un soporte de muestras NIR y la luz reflejada desde la muestra se mide en la región del infrarrojo (en general 1100 a 2500 nm). El instrumento es parte de un sistema que ha sido calibrado usando muestras representativas de la población a ser investigada. Para calcular el contenido de materia seca de las muestras de pienso y forraje se utilizan ecuaciones seleccionadas en base a las estadísticas de calibración, que han sido validadas.

Equipo:

- Espectrofotómetro de reflectancia de infrarrojos Cercano, rango de longitud de onda de al menos 1100 a 2500 nm.
- Soportes de muestras con ventana de cuarzo transmisor de infrarrojos..
- Computador con software para la toma, almacenamiento y procesamiento de resultados.

Procedimiento:

- 1) Preparar las muestras mediante el mismo método que se prepararon las muestras de calibración.
- 2) Para obtener mejores resultados opere el equipo forma continua (pero no la lámpara). Si el instrumento está frío, el tiempo de calentamiento debe ser de 1h.
- 3) Limpie el soporte de muestras con un cepillo que no bote pelo, adicionalmente lo puede hacer con el tejido suave o un paño sin pelusa. El vidrio debe estar libre de huellas digitales y materiales extraños.
- 4) Colocar una porción de forraje previamente secado (90-95% de MS o mayor) y molido en tamiz de 1 mm, en la capsula de carga de muestras NIR, sobre cada tercio de la superficie de vidrio para asegurar que las diferentes porciones de la muestra sean escaneadas. Llene el portamuestras y quite el exceso.
- 5) Pulse de nuevo en soporte de manera que la muestra quede presionada firmemente contra la ventana.
- 6) Si alguna anomalía aparece en la ventana, retire y repita el proceso. La constancia en la manipulación, preparación y embalaje de muestras es clave para lograr buenos resultados.

7) Escanee la muestra, anote los espectros y procese los datos.

Comentarios:

- El equipo NIR debe mantenerse en un entorno libre de polvo. Limpiar o cambiar el filtro mensualmente.
- No tocar o limpiar la rejilla.
- Instrumento NIR debe mantenerse en una temperatura estable ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$) en un lugar con humedad controlada ($60 \pm 5\%$), debe estar libre de vibraciones y tener corriente eléctrica dedicada y estable.
- Las muestras deben secarse y molerse con los mismos métodos que las muestras utilizadas para desarrollar la ecuación de calibración.
- Espectrofotómetro lee sólo una fracción de 1 mm de profundidad del vidrio que está en contacto con el material del recipiente de la muestra. Por lo tanto, el contenedor debe estar cargado cuidadosamente con diferente submuestra en cada cuadrante para hacer la lectura espectral más representativa de la totalidad de la muestra.

Cálculos

Predicción se hace por comparación directa de la calibración. No hay cálculos adicionales.

Control de calidad:

- Incluir al menos un conjunto de duplicados en cada ejecución. Estos duplicados deben cada uno llenarse en un soporte independiente. El escaneo de la misma muestra dos veces no es un verdadero replicado análisis utilizando NIR. Una desviación aceptable promedio estándar (s) entre los análisis replicados para humedad o materia seca utilizando métodos de referencia es de aproximadamente $\pm 0,10$, lo que resulta en un límite de advertencia (2s) de aproximadamente $\pm 0,20$ y un límite de control (3s) de alrededor de $\pm 0,30$.

- Control de calidad para el análisis NIR implica el control de la exactitud tanto en los equipos y la ecuación de calibración. El equipo de diagnóstico se debe operar y registrar semanalmente, después del calentamiento del equipo, para asegurar que la máxima respuesta, la precisión y repetibilidad de longitud de onda se encuentran dentro de los rangos de tolerancia aceptables del fabricante.
- Cada fabricante debe proporcionar las especificaciones de rendimiento aceptables para su equipo, y con frecuencia es proporcionado el software para controlar su precisión. Sin embargo, es responsabilidad del operador el ejecutar el software de diagnóstico de rutina y registrar los resultados en un mínimo de una vez por semana.

2.4 Determinación de Ceniza

Los elementos o minerales en los alimentos se encuentran en combinaciones de sales inorgánicas y/o orgánicas. Las sales inorgánicas, tales como fosfatos, carbonatos, cloruros, sulfatos y nitratos de sodio, potasio, calcio, son comunes. Las sales de ácidos orgánicos tales como málico, oxálico, acético, etc., pueden así mismo, encontrarse presentes. Por otra parte, ciertos elementos minerales pueden formar complejos con moléculas orgánicas.

La ceniza es el residuo obtenido después de la incineración de la materia orgánica a una temperatura comprendida entre 500-600°C, hasta que queda libre de carbón, y representa el contenido de material mineral presente. Esta determinación únicamente sirve para conocer en forma aproximada el contenido mineral, más no es un indicativo claro del valor o calidad mineral de ella. La naturaleza y cantidad de las diferentes combinaciones minerales que pueden encontrarse en el producto alimenticio, es difícil de determinar.

El proceso encierra la posibilidad de un buen número de errores, por lo que debe hacerse en forma cuidadosa. Las temperaturas inadecuadas (bajas), generalmente conllevan a que se formen carbonatos los cuales no pertenecen a la fracción inorgánica que se pretende determinar.

Las temperaturas altas (700°C) si bien obvian el error anterior, además de que aceleran el proceso, permiten la volatilización de sales alcalinas (KCl, NaCl, etc.) que hacen parte de la fracción en cuestión.

Otro error puede deberse a la contaminación del alimento con elementos como: tierra, arena, arcilla, que son frecuentes en alimentos propios para animales, en estos casos debe realizarse un proceso adicional para diferencias de la ceniza bruta la ceniza pura.

El método más ampliamente usado se basa en el hecho de que los minerales no se destruyen por calentamiento, y que tienen una baja volatilidad en comparación con otros componentes de los alimentos los tres tipos principales de procedimiento analítico utilizado para determinar el contenido de cenizas de alimentos se basan en este principio.: incineración en seco, cenizas húmedas y calcinación de plasma de baja temperatura. El método elegido para un análisis particular depende de la razón para llevar a cabo el análisis, el tipo de alimento analizado y del equipo disponible. La incineración también se puede usar como el primer paso en la preparación de muestras para análisis de minerales específicos, por espectroscopia atómica o los diversos métodos tradicionales.

Preparación de la muestra

Los alimentos sólidos se muelen finamente y luego se mezcla cuidadosamente para facilitar la elección de una muestra representativa. Antes de llevar a cabo un análisis de cenizas, las muestras con alto contenido de humedad a menudo se secan para evitar salpicaduras durante la incineración. Las muestras con alto contenido de grasa deben ser desgrasadas, ya que esto facilita la liberación de la humedad y evita salpicaduras.

2.4.1 Incineración en seco. Los procedimientos de incineración en seco utilizan un horno de mufla de alta temperatura capaz de mantener temperaturas de entre 500 y 600 °C. El agua y otros materiales volátiles se vaporizan y las sustancias orgánicas se queman en presencia del oxígeno en el aire a CO_2 , H_2O y N_2 . La mayoría de los minerales se convierten en óxidos, sulfatos, fosfatos, cloruros o silicatos. Aunque la mayoría de los minerales tienen bastante baja volatilidad a estas altas temperaturas, algunos son volátiles y se pueden perder parcialmente, por ejemplo, hierro, plomo y mercurio. Si un análisis se lleva a cabo para determinar la concentración de una de estas sustancias, es aconsejable utilizar un método de incineración alternativa que utiliza temperaturas más bajas.

La muestra de alimento se pesa antes y después de incineración, para determinar la concentración de ceniza presente. El contenido de cenizas se puede expresar en cualquiera de una base seca o fresca:

Hay diferentes tipos de crisol disponibles para incineración de muestras de alimentos, incluyendo el cuarzo, Pyrex, porcelana, acero o platino. La selección de un crisol apropiado depende de la muestra que se analiza y la temperatura de horno utilizado. Los crisoles más utilizados están hechos de porcelana, ya que son relativamente baratos, se pueden utilizar a altas temperaturas (<1200°C), son fáciles de limpiar y son resistentes a los ácidos, pero pueden ser corroídos por muestras alcalinas.

Reactivos

- Agua (cuando sea necesario humectar la muestra calcinada).
- Ácido Nítrico concentrado (cuando sea necesario humectar la muestra calcinada).
- Cloruro de calcio o cualquier otro agente desecante con indicador de humedad.
- Peróxido de hidrogeno al 30% (cuando se requiera).

Material y equipo

- Crisoles de porcelana ó vidrio.
- Desecador.
- Guantes resistentes a altas temperaturas.
- Pinzas para crisoles.
- Balanza analítica.
- Estufa de calentamiento, capaz de mantener T0 de 90 a 100 °C.
- Estufa de gas o parrilla eléctrica.
- Homogenizador de muestras de laboratorio mecánico o eléctrico.
- Mufla con control de temperatura.
- Parrilla de calentamiento con regulador de temperatura.

Procedimiento

- Colocar los crisoles dentro de la mufla a 550 ± 25 °C durante 30 min aproximadamente. Transcurrido este tiempo, pasar a una estufa con temperatura de 90 a 100 °C durante 20 min aproximadamente ó hasta que tome la temperatura de la estufa y colocarlo dentro del desecador hasta que alcance la temperatura ambiente.
- Determinar el peso del crisol en la balanza analítica. Repetir esta operación hasta obtener el peso constante del mismo que es el resultado de la diferencia entre la primera, segunda, tercera ó cuarta

pesada, utilizando la estufa de 90 a 100 °C. Este resultado no deberá exceder 0.0007 g. Registrar el peso de la última pesada (A).

- Pesar en el crisol de 1 g de la muestra y anotar el peso (B).
- Para muestras líquidas ó semi-sólidas, colocar el crisol con la muestra durante 1 hora en el horno de secado a una temperatura de 90 a 100 °C. Para muestras sólidas no se requiere evaporar en la estufa.
- Colocar el crisol dentro de la mufla y efectuar la calcinación completa de la muestra a 550 ± 25 °C durante 3 a 5 h.
- Verificar que las cenizas estén blancas o ligeramente grisáceas, y en caso de que haya presencia de puntos negros en las cenizas, sacar el crisol de la mufla, dejarlo enfriar y posteriormente colocarlo dentro del desecador hasta que alcance la temperatura ambiente.
- Agregar 2 o 3 gotas de agua desionizada o ácido nítrico concentrado ó peróxido de hidrógeno al 30% y evaporar lenta y completamente colocando el crisol sobre una parrilla de calentamiento, estufa de gas o mechero.
- Colocar nuevamente el crisol dentro de la mufla a 550 ± 25 °C durante 30 min.
- Obtenidas las cenizas de color blanco o gris, sacar el crisol de la mufla, pasar a una estufa a temperatura de 90 a 100 °C durante 20 min aproximadamente ó hasta que tome la temperatura de la estufa y colocarlo dentro del desecador hasta que alcance la temperatura ambiente y obtener la constancia de peso, esto es que la diferencia de peso no debe exceder a 0,0007 g. Registrar el peso del crisol con las cenizas de la última pesada. (C).
- Realizar el análisis por duplicado.

Cálculos

% Cenizas totales = $(C - A) \times 100 / B$ ó

g Cenizas/100 g muestra = $(C - A) \times 100/B$

% Materia orgánica (BS) = $100 - \%Ceniza (BS)$

Donde:

C = peso del crisol con cenizas en gramos

A = peso del crisol vacío en gramos

B = peso de la muestra en gramos.

Tabla 1. Condiciones especiales para incineración de algunos alimentos

Alimento	p ó V	T°	Condiciones Particulares
Alimento para animales	2	600	No requiere condiciones particulares.
Cereales	3-5	550	No requiere condiciones particulares.
Extractos de carne y productos de carne	5-10	525	Secar previamente a 100 °C. Agregar 5-7 gotas de aceite de oliva. Calentar suavemente hasta que se detenga el abombamiento Calcinar ⇒ Enfriar ⇒ Humedecer con agua ⇒ Secar completamente ⇒ Recalcinar ⇒ Enfriar ⇒ Registrar el peso obtenido.
Granos	3-5	550	No requiere condiciones particulares.
Harinas	3-5	550	No requiere condiciones particulares.
Melazas	5	525	Secar previamente a 100 °C. Agregar 5-7 gotas de aceite de oliva. Calentar suavemente hasta que se detenga el abombamiento. Calcinar ⇒ Enfriar ⇒ Humedecer con agua ⇒ Secar completamente ⇒ Recalcinar ⇒ Enfriar ⇒ Registrar masa ó peso obtenido.

2.4.2 Incineración en húmedo. Se utiliza principalmente en la preparación de muestras para el análisis subsiguiente de minerales específicos. Se rompe y elimina la matriz orgánica que rodea a los minerales de manera que se dejan en una solución acuosa. Una muestra de alimento seco y molido es por lo general en un matraz que contiene ácidos fuertes y agentes oxidantes (por ejemplo, ácidos, nítrico, perclórico y / o de ácido sulfúrico) y luego se continúa calentando hasta que la materia orgánica se haya digerido completamente, dejando sólo los óxidos minerales en solución. La temperatura y el tiempo utilizado dependen del tipo de ácidos y agentes oxidantes usados. Normalmente, una digestión tarda de 10 minutos a unas pocas horas a temperaturas de aproximadamente 350°C. La solución resultante se puede analizar entonces para minerales específicos.

- *Ventajas:* Se produce poca pérdida de minerales volátiles debido a las temperaturas más bajas de segunda mano, más rápida que la incineración en seco.
- *Desventajas:* Mucha mano de obra, requiere una campana de laboratorio especial si el ácido perclórico se utiliza debido a su naturaleza peligrosa, bajo rendimiento de la muestra.

2.5 Determinación de grasa bruta (Extracto Etéreo)

Esta determinación se fundamenta en la diferencia existente entre los puntos de ebullición de fracción lipídica y los solventes orgánicos. En general, estos solventes (éter, cloroformo, benceno, etc.), disuelven compuestos grasos y pueden removerlos de los alimentos donde están contenidos por evaporación continua, que luego de condensarse pasa por la muestra extrayendo los lípidos y otras sustancias diferentes a las grasas como: carbohidratos, vitaminas o ciertos lípidos que carecen de valor práctico, por ello el nombre generalizado de extracto etéreo. El extracto se recoge en un recipiente y el éter se destila y recupera, dejando como residuo el extracto etéreo al cual se seca y se pesa. No obstante, compuestos como ceras, ácidos grasos volátiles, clorofila y pigmentos, pueden ser extraídos con este procedimiento, contribuyendo a sobreestimar el valor energético de la fracción extracto etéreo.

Para determinar en forma apropiada el contenido real de grasa es necesario complementar este método con procesos específicos, los cuales no son el objetivo de este documento. Para las grasas en sustancias ricas

en azúcar, levaduras, leche o harina de huesos deben utilizarse procesos diferentes, que dan mayor confiabilidad a los resultados.

Material

- Algodón desengrasado.
- Arena
- Cartuchos de celulosa
- Cuerpos de ebullición
- Embudos
- Espátulas
- Balones de destilación de 250 ml
- Erlenmeyer de 250 ml
- Papel filtro de rápida filtración
- Pinzas para crisol
- Probeta graduada de 50 ml
- Sílica gel con indicador de humedad
- Vaso de precipitados de 100 o 250 ml

Equipo

- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg
- Desecador
- Estufa de secado capaz de mantener τ de $100 \pm 2^\circ\text{C}$
- Parrilla de calentamiento con regulador de temperatura
- Equipo de extracción Soxhlet o similar

Reactivos

- Éter etílico, de petróleo o hexano

Procedimiento

- Para esta determinación es indispensable utilizar una muestra libre de humedad, ya que el agua disminuye la acción del solvente.
- Colocar los balones en estufa de secado a temperatura de $100 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta obtener peso constante (a).
- Retirarlos de la estufa y colocarlos dentro del desecador hasta que alcancen la temperatura ambiente.

- Colocar el papel filtro con la muestra seca previamente pesada (b) dentro del cartucho de celulosa y cubrir con una porción de algodón. Acomodar los cartuchos de celulosa en el equipo de extracción.
- Adicionar la cantidad de disolvente necesario (ver la tabla al final del proceso) a los balones, colocarlos en el equipo.
- Realizar la extracción de acuerdo a las características del equipo y siguiendo las instrucciones de operación del mismo. Una vez efectuada la extracción.
- Retirar los balones y colocarlos dentro de la estufa de secado a 100°C durante 10-20 minutos, para eliminar completamente el disolvente.
- Transcurrido este tiempo, retirarlos de la estufa y colocarlos dentro del desecador hasta que alcancen la temperatura ambiente.
- Determinar el peso de los balones (c) en la balanza analítica.
- Realizar simultáneamente un blanco

Recomendaciones:

- Cuando se trata de muestras líquidas o muestras cuyo contenido de hidratos de carbono o proteínas sea alto, o presente lípidos combinados se recomienda utilizar el siguiente procedimiento: pesar de 1-2 g de muestra finamente molida dentro de un balon de 250 mL, agregar 50 mL de HCl diluido al 33%.
- Colocar el matraz en el equipo de reflujo, prender la parrilla de calentamiento y calentar durante una hora.
- Agregar 150 mL de agua caliente, alrededor de 100 cm² de papel filtro cortado en pequeñas piezas.
- Filtrar a través de papel filtro Whatman No. 540 húmedo de 15 cm de diámetro (si se prefiere se puede usar doble), lavar el matraz con agua caliente agregando los lavados al papel filtro.
- Continuar lavando el papel filtro con agua caliente hasta que el filtrado esté libre de ácido.

- Secar el papel filtro a 120°C sobre un vidrio de reloj ó a 60°C por toda la noche.
- Con la ayuda de unas pinzas pasar el papel filtro seco al cartucho de extracción, tapar con una porción de algodón y proceder con la extracción.
- Conservar la muestra desengrasada para la determinación de fibra bruta.

Cálculos

$$\% \text{Extracto etéreo} = \frac{\text{Peso extracto etéreo (c- a)}}{\text{Peso muestra (b)}} \times 100$$

Donde:

a = peso constante del matraz vacío

b = peso de la muestra

c = peso del matraz con grasa, a peso constante

Notas:

1. En caso de hacer esta determinación en el aparato de goldfish, son necesarios los dedales de celulosa y vasos adecuados para el proceso que sustituyen al papel filtro y balones descritos en el anterior procedimiento.
2. Grandes cantidades de componentes solubles en agua como carbohidratos, urea, ácido láctico, glicerina y otros, pueden interferir con la extracción de grasa, si ese es el caso, extraer 2 g de muestra sobre un papel filtro en un embudo con cinco porciones de 20 ml de agua antes de secar la muestra para determinar el extracto etéreo.
3. Si se va a determinar la grasa en heces o dietas que contienen sales de Ca o Mg probablemente haya formación de jabones, los cuales no son solubles en los mismos disolventes, en tal caso es necesario hacer una hidrólisis ácida de la muestra antes de la extracción. Debido a que la hidrólisis ácida extrae también fosfolípidos, glucolípidos, lipoproteínas se podría hacer una primera extracción, luego hidrolizar y volver a extraer.

4. Muestras ricas en grasa en ocasiones requieren una extracción antes del secado y una segunda extracción después.
5. La asociación europea de producción animal (Van Es y Van – der Meer, 1980), sugiere el uso de éter de petróleo o de hexano, arguyendo que el éter etílico extrae otras sustancias aparte de la grasa, como azúcares o pigmentos, además por razones de seguridad del laboratorio, ya que el punto de ebullición de éste es de 35 °C y el de éter de petróleo y hexano es de 55 a 65 °C, aunque para realizar la extracción con estos disolventes se requiere mayor temperatura.

Tabla 2. Condiciones de análisis para la extracción de grasa por el Método Soxhlet

PRODUCTO	PREPARACIÓN DE MUESTRA	PESO DE MUESTRA	SOLVENTE	VOLUMEN	CONDICIONES DE EXTRACCION
CEREALES					
Trigo, Arroz, Maíz (Rye, Rice)	Moler la muestra a tamaño de partícula de 1mm	3.0 g aprox.	Éter de petróleo	40 - 50 mL 70 - 90 mL	98 - 120°C 135°C Tiempo de ebullición 15 min Tiempo de enjuague 30 min
SOYA	Moler la muestra	2.0 g	Éter de petróleo	40 - 50 mL 70-90 mL	120°C - 135°C
CÁRNICOS	Moler la muestra en homogenizador Presecar ll muestra a 80°C 1 h Hidrólisis con HCl 4N, 60 min	3 g	Éter de petróleo	35 - 40 mL	98 - 120°C 135°C Tiempo de ebullición 10 min

2.6 Determinación de fibra bruta o cruda (Weende)

La determinación de cada uno de los carbohidratos es una labor que además de mucho tiempo, requiere procedimientos difíciles. Este hecho condujo a que los investigadores los agrupasen en dos: los más digestibles y los menos digestibles, en el caso del método Weende, los agrupa en fibra cruda y extracto libre de nitrógeno (ELN). El primero determinado por la ebullición alterna de la muestra con un ácido y un álcali débiles. El residuo que queda libre de componentes solubles como proteína, azúcares, almidones, etc., es lo que se conoce como fibra cruda, después de descontar la ceniza y que está compuesta principalmente por lignina y celulosa.

El ELN se determina por diferencia, esto es lo que queda después de restar todos los valores de fibra, proteína, grasa y ceniza.

Sin embargo, este sistema tiene fallas serias, debido a que el ELN se calcula por diferencia, acumulando los errores de las determinaciones. Además de que el ELN no es producto de un proceso, sino el residuo de una operación matemática. La fibra cruda por su parte es un término descriptivo de poco valor y se ha demostrado que el valor nutritivo de éste, en muchos casos, es mayor al del ELN en el mismo alimento.

Al tener presente estas consideraciones, Van Soest y colaboradores, idearon un método para separar las fracciones de los alimentos de acuerdo a su disponibilidad nutricional, proceso que se detalla más adelante.

Material y equipo

- Bomba para inyección de aire
- Aparato de reflujo
- Lana de vidrio
- Vasos Berzelius o Erlenmeyers
- Bomba de vacío
- Estufa
- Desecador
- Crisoles filtrantes (Gooch)
- Planchas de calefacción
- Mufla

Reactivos

Ácido sulfúrico 1.25%

Hidróxido de sodio 24% ó (KOH 28%)

- Etanol
- Acetona
- Antiespumante

Procedimiento

Hidrólisis Ácida

Pesar un gramo de muestra desengrasada (residuo de la determinación de E.E), colocar en un Erlenmeyer (o en otro recipiente que permita el reflujo), adicionar 5 gotas de antiespumante, colocar el recipiente sobre la plancha de calefacción, acoplar el digestor y permitir la ebullición durante 30 minutos contando a partir del inicio de ésta.

Hidrólisis alcalina

- Retirar el condensador y adicionar al recipiente (sin quitarlo de la plancha) 10 cc de hidróxido de sodio al 24%.
- Acoplar el equipo y continuar la ebullición por 30 minutos más.
- Si hay formación de espuma, insuflar aire o adicionar antiespumante
- Filtrar la solución caliente a través del crisol con lana de vidrio, lavando el residuo sucesivamente con agua hirviendo, ácido sulfúrico al 1.25%, acetona y etanol.

Secado e incineración

- Llevar el crisol a estufa a 130 °C durante 2 horas
- Enfriar en desecador y pesar (Peso A)
- Colocar en la mufla a 600 °C durante 30 minutos
- Enfriar en desecador y pesar (Peso B)

Cálculos

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{\text{Peso fibra}}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

$$\text{Fibra} = \text{Peso A} - \text{Peso B}$$

Notas:

1. Se debe tener en cuenta el porcentaje de E.E para convertir la cantidad pesada a la base original. Ejemplo: Si se pesa 1 g de muestra (desengrasada) que contiene 5% de extracto etéreo.

$$\text{Peso real} = \frac{100 \times 1}{95} = 1.05 \text{ g}$$

2. Descontar también la humedad en el material que se está analizando.
3. El filtrado también puede llevarse a cabo sobre embudos tipo Buchner cubiertos con un círculo de alguna tela resistente o tela de alambre de malla No. 200. Los embudos tipo Oklahoma (Labconco Corp.) o California (Nalge Co.) son adecuados.

2.7 Determinación de fibra dietética

El método se basa en la combinación de procesos enzimáticos, gravimétricos y volumétricos que se llevan a cabo en etapas con temperatura y tiempo controlados: Gelatinización del almidón con α -amilasa, a $\text{pH} = 6.0 \pm 0.1$. Hidrólisis de las proteínas: Remoción de las proteínas con proteasa a $\text{pH} = 7.5 \pm 0.2$. Hidrólisis del almidón: Remoción del almidón con amiloglicosidasa a $\text{pH} = 4.0$ a 4.6 . Separación de las fracciones solubles e insolubles. Cuantificación de las fracciones por gravimetría y volumetría.

Reactivos

- Acetona
- Ácido clorhídrico concentrado
- Ácido sulfúrico concentrado
- α amilasa termoestable, para uso en la determinación de fibra dietética.
- Amiloglicosidasa de *Aspergillus niger*, solución, para uso en la determinación de fibra dietética.
- Celita lavada con ácido
- Etanol 95%
- Éter de Petróleo
- Fosfato dibásico de sodio anhidro o dihidratado (Na_2HPO_2)

- Fosfato monobásico monohidratado de Sodio ó dihidratado ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$)
- Hidróxido de Sodio
- Proteasa de *Bacillus licheniformis*, polvo liofilizado, para uso en la determinación de fibra dietética.

Preparación de soluciones

- Etanol al 95%.
- En un matraz volumétrico de 1000 mL, mezclar 950 mL de etanol y 50 mL de agua.
- Etanol al 78%
- En un matraz volumétrico de 1000 mL, mezclar 800 mL de etanol al 95% (v/v) y 200 mL de agua.
- Solución de Hidróxido de Sodio 0.275 N
- Disolver 11 g de NaOH en aproximadamente 700 mL de agua en un matraz volumétrico de 1 L, enfriar y aforar con agua.
- Solución de Ácido Clorhídrico 0.325 N
- Preparar una solución de HCl 1N.
- Transferir 325 ml de esta solución a un matraz volumétrico de 1 L y aforar con agua.
- Solución Amortiguadora de Fosfatos 0.08 N pH 6.0 ± 0.1
- Disolver 1.4g de fosfato dibásico de sodio anhidro ó (1.753 g dihidratado) y 9.68g de fosfato monobásico monohidratado de sodio ó (10.94g dihidratado) en aproximadamente 700mL de agua, y aforar a 1L con agua.
- Verificar que el pH se encuentre en 6.0 ± 0.1 de lo contrario, ajustar con HCl 0.325 N o NaOH 0.275N.
- Solución de Ácido Sulfúrico 1N
- Diluir 27.18mL de H_2SO_4 (al 98% y densidad de 1.84g/mL ó bien realizar los cálculos estequiométricos pertinentes si la concentración es diferente) con aproximadamente 400mL de agua en un matraz volumétrico de 1000mL, enfriar y aforar.

Material

- Crisoles de filtración con porosidad del número 2
- Crisoles de porcelana
- Desecador
- Embudo Buchner
- Varillas de vidrio

- Matraces volumétricos de 1000mL
- Matraz Kitazato.
- Micropipeta de 100 μ L
- Papel Aluminio
- Papel filtro del No. 5 (de retención fina) de 12.5cm de diámetro, de cenizasconocidas.
- Frasco lavador
- Propipeta
- Tamiz con malla de apertura de 0.3 – 0.5mm
- Vasos de precipitados de 600mL o de mayor capacidad.
- Vasos de precipitados largos de 400mL

Equipos

- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1mg
- Baño Maria para mantener una temperatura mínima de 60 °C, con o sin agitación.
- Equipo para determina fibra dietética
- Estufa de secado capaz de mantener temperatura de 100 ± 2 °C.
- Mufla con control de temperatura
- Potenciómetro con electrodos de vidrio.
- Termómetro con división de 1 °C.

Preparación de la muestra

- Secado, desengrasado y homogenizado de la muestra.
- Homogeneizar la muestra y colocarla en una estufa de secado hasta obtener peso constante y enfriar en un desecador.
- Moler la muestra seca y pasarla a través de una malla de 0.3 – 0.5 mm.
- Si el contenido de grasa es <10% omitir el desengrasado, si es >10% desengrasar como se describe a continuación:
- En un vaso de precipitado de 100mL previamente tarado, pesar 1.0g con una precisión de + de 1.0mg, de muestra. Añadir 25mL de éter de petróleo y agitar durante 15 min. Dejar reposar durante un minuto posteriormente decantar la capa etérea clarificada. Repetir la extracción dos veces más.

Colocar el vaso en una estufa y secar el producto desengrasado con vacío a 70 °C durante la noche.

Enfriar a temperatura ambiente y pesar el vaso.

Anotar la pérdida de peso debido a la remoción y hacer las correcciones apropiadas al % final de fibra dietética encontrada en la determinación.

Almacenar la muestra molida y seca en un desecador hasta llevar a cabo su análisis.

Determinación

- Correr un blanco en forma paralela con las muestras para medir cualquier contribución desde el reactivo al residuo. Pesar por duplicado 1g de muestra con una precisión + 0.1mg y colocarlas dentro de vasos de precipitados largos de 400mL.
- Los pesos de las muestras no deben diferir entre ambos en más de 20mg. Adicionar 50mL de solución amortiguadora de fosfatos a cada vaso, si es necesario ajustar el pH 6 ± 0.2 .

Gelatinización del almidón

Adicionar 0.1mL de solución de α -amilasa. Cubrir los vasos con papel aluminio y colocarlos en un baño a ebullición, durante 30 min verificando con termómetro que alcance una temperatura interna en los vasos de 95 -100 °C. Agitar suavemente cada 5 min.

Hidrólisis de las proteínas

Enfriar las soluciones a temperatura ambiente. Ajustar el pH a 7.5 ± 0.2 por adición de 10mL de solución de NaOH 0.275 M. Adicionar 5mg de proteasa.

Nota: Es preferible preparar una solución de enzima a una concentración de 50 mg/mL de solución amortiguadora de fosfatos y tomar con la micropipeta 100 μ L (0.1 mL) de ésta para adicionar a cada muestra.

Hidrólisis del almidón

Cubrir los vasos con papel aluminio e incubar 30 min a 60 °C con agitación continua. Enfriar y adicionar 10mL de la solución de HCl 0.325 M. Medir el pH y adicionar unas gotas del ácido si el pH final es diferente del intervalo de

4.0 a 4.6. Adicionar 0.3mL de amiloglucosidasa, cubrir con papel aluminio e incubar 30 min a 60 °C con agitación continua.

Separación de la Fibra Dietética Soluble (FDS) e Insoluble (FDI)

Filtrar las mezclas de enzimas (provenientes de la gelatinización y las provenientes de las dos hidrólisis) en un papel filtro previamente pesado utilizando un sistema de succión con vacío, realizar dos lavados con 10 mL de agua cada uno, recibir los lavados que contienen la FDS en vasos de precipitados de 600mL o de mayor capacidad ó utilizar los crisoles de filtración.

Precipitación FDS

A los vasos de precipitados o matraces que contienen los lavados de la (Separación de la Fibra Dietética Soluble FDS e Insoluble FDI), ajustar el volumen a 100mL con agua, adicionar 400mL de etanol al 95% previamente calentado a 60 °C, dejar precipitar a temperatura ambiente por 60 min, posteriormente filtrar los contenidos de los vasos o los matraces a través del papel filtro o crisol de filtración de peso conocido utilizando un sistema de succión con vacío, lavar con tres porciones de 20mL de alcohol etílico al 78%, dos porciones de 10mL de alcohol etílico al 95% y finalmente con dos porciones de 10mL de acetona.

Cuantificación de la FDS

Los residuos recibidos en el papel filtro o en el crisol de filtración, secarlos a temperatura ambiente dentro de un desecador durante toda la noche, o bien cuando la diferencia entre una pesada y otra no exceda de 5mg, pesar y determinar a un papel con residuo el contenido de proteína de acuerdo al método referido de esta norma, usando $N_2 \times 6.25$ como factor de conversión, (omitir la determinación en los casos donde el contenido de N_2 se conoce), determinar al otro residuo la cantidad de cenizas de acuerdo al método ya descrito.

Obtención de la FDI

Al residuo contenido en el papel filtro o crisol de filtración proveniente del punto (Separación de la Fibra Dietética Soluble FDS e Insoluble FDI) Lavar con dos porciones de 10mL de etanol al 95% y dos porciones de 10mL de acetona, utilizando un sistema de succión con vacío en cada lavado.

Cuantificación de la FDI

Los residuos recibidos en el papel filtro o crisol de filtración, secarlos a temperatura ambiente dentro de un desecador durante toda la noche, pesar y determinar a un papel con residuo el contenido de proteína de acuerdo al método referido en el acápite correspondiente, usando $N_2 \times 6.25$ como factor de conversión (omitir la determinación en los casos donde el contenido de N_2 se conoce), determinar al otro residuo la cantidad de cenizas.

Ensayo del blanco

Durante la primera serie de análisis y cada vez que se utiliza un nuevo reactivo, efectuar un ensayo en blanco en las mismas condiciones que la determinación.

Cálculos

Cuantificación de aporte del blanco

$$B = \text{blanco en g} = \text{peso residuo} - PB - AB$$

Dónde:

Peso del residuo = Promedio de los pesos de residuos (g) para las determinaciones del blanco duplicado.

PB y AB = Pesos (g) de proteína y cenizas respectivamente determinado en el primero y segundo blanco de residuos.

Calcular la Fibra Dietética Soluble (FDS) de la siguiente manera:

$$\% \text{ de FDS} = \frac{\text{Peso del residuo} - P - A - B}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Donde:

Peso del residuo = Promedio de los pesos (g) obtenidos en cuantificación de la FDS

P = Peso (g) del contenido de proteína obtenido en cuantificación de la FDS

A = Peso (g) del contenido de cenizas obtenido en cuantificación de la FDS

Peso de la muestra = Promedio de pesos (g) de las 2 muestras tomadas.

- Calcular la Fibra Dietética Insoluble (FDI) de la siguiente manera:

$$\% \text{ de FDI} = \frac{\text{Peso del residuo} - P - A - B}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Dónde:

Peso del residuo = Promedio de los pesos (g) obtenidos en cuantificación de la FDI

P = Peso (g) del contenido de proteína obtenido en cuantificación de la FDI

A = Peso (g) del contenido de cenizas obtenido en cuantificación de la FDI

Peso de la muestra = promedio de pesos (g) de las 2 muestras tomadas.

2.8 Determinación de fibra por VAN SOEST

El método de Weende para determinación de fibra, que se ha descrito, no permite un estudio apropiado de los carbohidratos presentes en los alimentos, especialmente de los llamados estructurales que se consideran fundamentales en la alimentación de herbívoros y que ejercen una influencia marcada sobre la digestibilidad y valor nutritivo de los vegetales tanto directa como indirectamente.

Para tal efecto Van Soest en la década de los 60 propone un método para separar los constituyentes celulares y los clasifica como:

- a. Muy indispensables
- b. De disponibilidad incompleta
- c. Frecuentemente no disponibles

En este método se utilizan detergentes que se combinan con la proteína para solubilizarla, así como un agente quelante (EDTA) que remueve los metales pesados y los iones alcalinos contaminantes.

Al hervir la muestra con detergente neutro, se solubiliza el contenido de la célula y la pectina, dejando un residuo que es la pared celular que contiene celulosa, hemicelulosa y lignina (fibra detergente neutro – FDN).

Por ebullición posterior con un detergente ácido, se hidroliza la hemicelulosa que se encuentra libre y la que está combinada con lignina, dejando la celulosa y lignina como fibra detergente ácida (FDA). La oxidación de la lignina con KMnO_4 , deja la celulosa y ceniza como residuo, las que por incineración da el valor de celulosa. Este procedimiento se detalla a continuación.

2.8.1 Determinación de fibra detergente neutro y contenido celular.

Este es un procedimiento rápido que permite determinar los constituyentes de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y lignina) especialmente de aquellos alimentos fibrosos usados en la alimentación animal. En alimentos con elevado nivel de proteína o almidones y bajo contenido de fibra no es práctica su implementación puesto que la formación de geles o la coagulación de la proteína impiden la filtración adecuada dando valores de fibra superiores a los reales.

El tratamiento de la muestra con detergente neutro (pH 6.9 – 7.1) permite obtener por una parte los compuestos solubles en él (almidones, proteínas, glúcidos solubles, etc.) denominados contenido celular y los no solubles (FDN), incluida dentro de esta fracción se encuentra la ceniza.

Material y equipo

- Aparato de reflujo
- Bomba de vacío
- Desecador
- Estufa
- Lima de vidrio
- Crisoles filtrantes

Limpieza de crisoles

Después de mucho uso, los crisoles tienden a obstruirse con material residual que es resistente al filtrado corriente con ácido crómico. Una manera adecuada de limpiarlos es la de ponerlos a incineración a 500 °C y luego forzarles agua de abajo hacia arriba en dirección opuesta a través del filtro; cuando los crisoles se obstruyen con partículas minerales, se prepara una solución caliente de 20% de KOH, 5% de Na_3PO_4 y 0.5 de etilenodiamino tetra-acetato de sodio y se hace pasar forzada de abajo hacia arriba a través del filtro. Se debe evitar el uso continuo de la solución alcalina, pues tiende a erosionar el vidrio.

Reactivos

Solución detergente neutra (en 1.000cc de agua)

- Lauril sulfato de sodio: 30g
- EDTA 18.61g
- Fosfato disódico: 4.56g
- Exotietanol: 10cc
- Borato de sodio decahidratado: 6.81g
- Decahidronaftaleno
- Acetona
- Sulfito de sodio

Procedimiento

- Pesar aproximadamente 1g de muestra finamente molida (1mm), colocarla en un Erlenmeyer para iniciar el reflujo, adicionar en orden los siguientes reactivos:
- 100cc de la solución detergente neutro a temperatura ambiente, verificando pH.
- 0.5g de sulfito de sodio.
- Calentar para lograr la ebullición entre 5 a 10 minutos y luego reducir la temperatura para lograr ebullición constante durante 60 minutos contados a partir de que esta se estabilice.
- Rotar el recipiente para que la muestra sea bien tratada por el reactivo. Filtrar la solución a través de un crisol previamente tarado (A).
- Lavar la muestra con la menor cantidad de agua caliente posible, repetir el lavado varias veces, después lavar 2 veces con acetona.
- Secar el crisol a 105 °C por un mínimo de 8 horas, enfriar en desecador y pesar (B).

Cálculos

$$\% \text{ Pared celular} = \frac{B - A}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

$$\% \text{ Contenido celular} = 100 - \% \text{ pared celular}$$

En el caso de muestras de granos y subproductos de molinos, existe la posibilidad de que se forme un material gelatinoso derivado de los almidones y las proteínas, obstruyendo el filtro. Si por esta razón las muestras no se pudieran lavar, los resultados finales darían un contenido alto de paredes celulares. Sin embargo la filtración sería normal si se siguen estas indicaciones: a) con frecuencia se puede mejorar el tiempo de filtrado, haciendo pasar aire de abajo hacia arriba en el crisol. b) durante la parte inicial de calentamiento de la muestra hasta la ebullición, se debe tomar precaución para que la muestra no se adhiera al fondo del vaso. Esta adherencia dificulta la filtración y se puede evitar por medio de un calentamiento más rápido y una rotación frecuente del vaso.

La construcción previa de un tubo múltiple (batería) que reciba hasta 6 muestras simultáneamente para filtrado con vacío, ayuda a reducir el tiempo de filtración. Este tubo debe construirse en forma tal que permita el control de la fuerza del vacío. También si se deja una muestra en remojo, en agua caliente mientras las otras están siendo filtradas, ayudará a un mejor, la cantidad de ceniza de la muestra, la que debe descontarse al finalizar el análisis.

2.8.2 Determinación de fibra detergente ácido. Este procedimiento permite la determinación rápida de lignina y celulosa presente en los alimentos, consideradas como las fracciones menos digeribles de la pared celular. La digestión ácida remueve de la muestra la hemicelulosa y la proteína presentes en la pared celular, que a pesar de ser poca, debe considerarse para los Cálculos por esto debe tenerse en cuenta que la diferencia entre FDN y FDA produce una estimación del contenido de hemicelulosa.

Material y equipo

- Aparato de reflujo
- Bomba de vacío
- Estufa
- Desecador
- Crisoles Gooch

Reactivos

- Solución detergente ácido (en 1.000cc de H_2SO_4 1N)
- Bromuro de cetiltrimetil amonio 20 g
- Decahidronaftaleno
- Acetona

Procedimiento

- Pesar aproximadamente 1g de muestra finamente molida y transferirla a un Erlenmeyer para reflujo.
- Adicionar 100cc de solución detergente ácido a temperatura ambiente, verificar el pH que debe ser casi cero.
- Calentar para lograr la ebullición entre 5 a 10 minutos, luego reducir la temperatura para evitar la formación de espuma.
- Ajustar la temperatura para lograr ebullición constante.
- Mantener la solución en ebullición por 60 minutos, contados a partir de que esta se estabilice.
- Rotar el recipiente para que la muestra sea bien tratada por el reactivo.
- Filtrar la solución a través de un crisol Gooch, previamente tarado (A).
- Lavar la muestra de igual manera como se procedió con FDN.
- Secar el crisol a 105 °C por un mínimo de 8 horas. Enfriar en desecador y pesar (B). Conservar el residuo para la determinación siguiente.

Cálculos

$$\% \text{ FDA} = \frac{B - A}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \% \text{ FDN} - \% \text{ FDA}$$

Nota: Tener en cuenta que FDA aún conserva la ceniza de la muestra. Se ha sugerido como satisfactorio, el cálculo de este componente, aplicando la fórmula: $FB = FDA \times 0,83$.

2.8.3 Determinación de lignina (por permanganato). La lignina, es un polímero amorfo de derivados del fenil propano de elevado peso molecular, que por hacer parte de la pared celular, se trata en este capítulo, aunque de ninguna manera constituye un carbohidrato. Es más, interfiere en gran medida el aprovechamiento de estos en aquellos animales que derivan el sustento de los forrajes. Esto lo convierte en un elemento importante y de allí la trascendencia de su cuantificación.

Existe un buen número de procedimientos para su determinación; a saber:

- Oxidación por cloruro de sodio
- Oxidación por ácido acético, permanganato de potasio
- Separación de la celulosa con ácido sulfúrico al 12%

El procedimiento que se detalla a continuación se basa en la relativa facilidad con la que la lignina se oxida, su contenido en la muestra está determinado por la pérdida de peso que sufre ésta sometida a este proceso y el residuo que queda está constituido por celulosa y ceniza.

Material y equipo

- Bomba de vacío
- Horno Desecador
- Crisoles Gooch
- Bandeja de vidrio
- Varillas de vidrio

Reactivos

- Permanganato de potasio al 5%
- Solución Buffer
- Nitrato férrico monohidratado, 6g
- Nitrato de plata 0.15g
- Agua 100cc
- Acetato de potasio, 5g
- Alcohol butílico terciario, 400ml
- Solución combinada
- Antes del análisis, mezclar la solución de permanganato de potasio la solución buffer en la proporción 2:1 por volumen.
- Solución desmineralizadora
- Ácido oxálico deshidratado: 50g
- Etanol al 95%: 700ml
- Ácido clorhídrico concentrado: 50ml
- Agua: 250ml
- Etanol al 80%
- Ácido bromhídrico

Procedimiento

- Colocar el crisol con FDA en una bandeja de vidrio que contenga una capa de 1 cm de espesor de agua fría, no mojar la fibra.
- Agregar al crisol 25ml de la solución combinada
- Colocar una varilla de vidrio dentro del crisol para remover el contenido
- Darle un grado de inclinación apropiado a la bandeja, para que la muestra esté siendo tratada por la solución constantemente
- Permitir que la solución trate la muestra un tiempo mínimo de 90 minutos, adicionando solución si es necesario (debe permanecer de color morado)
- Filtrar la solución sin lavar, con agua
- Colocar el crisol en una bandeja de vidrio limpia
- Llenar hasta la mitad con la solución desmineralizadora
- Con la varilla de vidrio, descomponer los grumos formados
- Después de 5 minutos filtrar y repetir los 2 pasos anteriores
- Si el filtrado es de color café, repetir los pasos anteriores
- Lavar con solución desmineralizadora hasta que el residuo quede de color blanco
- El tiempo necesario para este paso es de 20 a 30 minutos
- Llenar y lavar el contenido del crisol con alcohol con alcohol etílico del 80% y repetir el lavado.
- Lavar dos veces con acetona de igual manera que se hizo con alcohol
- Secar el crisol durante la noche a 105 °C
- Enfriar en desecador y pesar ©

Cálculos

$$\% \text{ Lignina} = \frac{B - C}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

Notas:

- 1.- El peso B es el correspondiente al proceso FDA
- 2.- La cutina que es una fracción muy importante en muchas cubiertas exteriores de las semillas, no se determina con este método. Una variación que se introduce en estos casos, es la de usar el permanganato para celulosa y tratar la muestra con ácido sulfúrico al 72% y asbesto, por espacio de 3 horas. Este procedimiento resulta en el fraccionamiento de la lignina cruda en las dos fracciones descritas seguidamente.

Una desventaja que se le puede atribuir al método por permanganato, es que las partículas de mayor tamaño no le penetran completamente los reactivos y por lo tanto, en estos casos, los resultados dan valores bajos. En consecuencia, los materiales con alto contenido de humedad deberán secarse parcialmente, molerse y pasarse a través de un tamiz de 1 mm para reducir el tamaño de las partículas. Este método, por lo tanto, no es adecuado para heces y forrajes frescos que han sido molidos en un molino para carnes, cuya forma física es inapropiada. Debido a la posibilidad de dañar la muestra con cloro, es preferible usar ácido sulfúrico al 72% para determinar la lignina.

2.8.4 Lignina ácido - detergente. Este método determina lignina por el método ácido detergente. Como paso preliminar se determina la fibra ácido detergente. El detergente elimina la proteína y otro material soluble en ácido que interferirá con la determinación de lignina. El residuo de la fibra ácida detergente consta de celulosa, lignina, cutina y cenizas insolubles en ácido (principalmente silicio). El tratamiento con H_2SO_4 al 72% disuelve la celulosa. La incineración del residuo determina la fracción de lignina cruda incluyendo la cutina. Para determinación y separación de cutina y lignina ver el procedimiento de determinación de lignina por permanganato.

Reactivos

- Acetona R.A. Usar acetona libre de color y que no deje residuo al evaporarse.

- Solución ácido detergente. a) ácido sulfúrico 1N valorado (49.04g/lt); b) Bromuro de cetil-trimetil amonio grado técnico (20g/lt). Pesar el H_2SO_4 , aforar con agua destilada. Determinar la normalidad del ácido por titulación, adicionar el bromuro de cetil-trimetil amonio y agitar.
- Asbesto. Pesar 100 g de asbesto (fibra larga) en un matraz de 3 litros, agregar 800 ml de agua y 1400 ml de H_2SO_4 concentrado. Mezclar y enfriar a temperatura ambiente por 2 horas. Filtrar sobre un embudo Buchner y lavar con agua. Resuspender el residuo en agua, ponerlo dentro de una bolsa 46 x 30 cm de fibra de vidrio de malla de 14 x 18 (aproximadamente 1 mm), la bolsa debe coserse con hilo apropiado, lavar por inmersión y agitación en agua para eliminar las partículas finas. Incinerar el asbesto residual a 800 °C c/16horas. Almacenar en forma seca hasta que se vaya a necesitar. El asbesto usado puede ser nuevamente lavado e incinerado.
- Ácido sulfúrico 72% por peso, calcular los gramos de ácido y agua necesarios en 1 litro de solución, de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$\frac{100 \times 98.0 \times 12 \text{ moles}}{\text{Análisis } H_2SO_4 \text{ (en \%)}} = \text{gramos de ácido necesarios}$$

$$(1000 \times 1.634)^3 - \text{gramos de ácido} = \text{gramos de agua necesaria}$$

Pesar la cantidad de agua calculada dentro de un matraz volumétrico (con bulbo en el cuello) y adicionar la cantidad calculada de H_2SO_4 , lentamente y con agitación suave. Colocar el matraz dentro del lavadero, lleno de agua antes de adicionar el ácido. Enfriar a 20°C y asegurarse si el volumen está correcto.

Procedimiento

- Pesar 1 gramo de muestra y determinar fibra ácido detergente como se indicó antes. Agregar al crisol que contiene el residuo de la fibra una cantidad de asbesto igual al volumen de la fibra. Cubrir el contenido del crisol con H_2SO_4 al 72% (15°C) y agitar con un agitador de vidrio para formar una pasta. Agregar ácido hasta la mitad del crisol y agitar. Dejando el agitador dentro, agregar H_2SO_4 , 72% varias veces según se vaya drenando el crisol (3 veces es suficiente).

- Mantener los crisoles a 20 – 23°C, después de 3 horas eliminar todo el ácido que sea posible haciendo vacío. Lavar el residuo con agua hasta que esté libre de ácido. Lavar y quitar el agitador. Secar los crisoles a 100°C y pesar. Incinerar los crisoles en mufla a 500 – 550 °C/3 horas, enfriar a 100°C y pesar. La toma del peso debe hacerse en caliente; si esto no es posible, enfriarlos en desecador con P2O5 como desecante.

Calcular la lignina ácido detergente.

$$\text{LAD} = \frac{\text{L} \times 100}{\text{S}}$$

Dónde:

LAD = Lignina ácido detergente

L = Pérdida por ignición, después del tratamiento con H₂SO₄ al 72%

S = Peso de la muestra seca en estufa

2.8.5 Determinación de celulosa. Incinerar la muestra procedente de la determinación anterior a 500°C durante 3 horas, enfríe en desecador y pese (D). La pérdida de peso constituye el contenido de celulosa de la muestra.

Cálculos

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{\text{C} - \text{D}}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

2.8.6 Cutina ácido detergente. Este componente de la pared celular no es oxidado por KMnO₄ y resiste la hidrólisis con H₂SO₄ al 72%. Esta fracción puede ser mayor en algunas cáscaras de semillas o no ser importante como en la mayoría de forrajes. La relación que hay entre la cutina y el valor nutritivo de otras partes de la planta, no se conoce con precisión. Sin embargo la cutina reviste importancia por ser resistente a la degradación microbiana.

Reactivos

- Acetona
- Solución ácido detergente: a) ácido sulfúrico 1N valorado (49.04g/l); b)

bromuro de cetil-trimetil amonio grado técnico (20 g/l). Pesar el H_2SO_4 y aforar con agua destilada. Determinar la normalidad del ácido por titulación, adicionar el bromuro de cetil-trimetil amonio y agitar.

- Pesar 100g de fibra larga en un matraz de 3L, agregar 800ml de agua y 1400ml de H_2SO_4 concentrado. Mezclar y enfriar a temperatura ambiente por 2 horas. Filtrar en un embudo Buchner y lavar con agua. Resuspender el residuo en agua y ponerlo dentro de una bolsa (46 x 30cm) de fibra de vidrio, de malla de 14 x 18 (aprox 1mm). La bolsa debe coserse con hilo apropiado. Lavar por inmersión y agitación en agua para eliminar las partículas finas. Incinerar el asbesto residual a 800°C por 16 h. Almacenar en forma seca hasta que se vaya a utilizar.
- Ácido sulfúrico 72% para preparar 1L de solución de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{100 \times 98 \times 12 \text{ moles}}{\text{Análisis } \text{H}_2\text{SO}_4 (\%)} = \text{g de } \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ necesarios}$$

$$(1000 \times 1.634)3 - \text{g de } \text{H}_2\text{SO}_4 = \text{g de } \text{H}_2\text{O} \text{ necesarios}$$

- Pesar la cantidad de agua calculada en un matraz volumétrico y adicionar lentamente la cantidad calculada del ácido con agitación suave. Colocar el matraz dentro de un recipiente con agua, antes de adicionar el ácido. Enfriar a temperatura ambiente.
- n- hexano RA.
- Permanganato de potasio saturado. Disolver 50g de KMnO_4 grado de reactivo por litro de agua destilada o 900 g KMnO_4 para un volumen de 18L de agua destilada. Mantener la solución protegida de la luz solar directa.
- Solución amortiguadora de lignina. Para preparar un litro de solución, disolver 6.0 g de nitrato férrico nonahidratado $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y 0.15 g de nitrato de plata en 100ml de agua destilada. Combinar esta mezcla con 500ml de ácido acético glacial y 5.0g de acetato de potasio (grado reactivo). Agregar 400ml de alcohol butírico terciario (grado reactivo) y mezclar la solución. Para preparar 12 litros se emplean las siguientes cantidades de reactivos:

Nitrato férrico nonahidratado	72.0 g
Nitrato de plata	1.8 g
Ácido acético	6.0 lt
Acetato de potasio	60.0 g
Alcohol butírico terciario	4.8 lt
Agua destilada	1.2 lt

- Solución de permanganato o combinada. Antes de ser usada, combinar y a la vez mezclar la solución de permanganato de potasio saturado con la solución amortiguadora de lignina en la relación de 2:1 volumen. La porción no utilizada de esta mezcla puede mantenerse por una semana en refrigeración en ausencia de luz. Esta solución puede utilizarse si mantiene el color morado y está libre de precipitado.
- Los reactivos deben ser usados después de ser enfriados.
- Solución desmineralizadora. Para cada litro de solución, disolver 50g de ácido oxálico deshidratado en 700ml de alcohol etílico de 95%. Agregar 50ml de ácido clorhídrico concentrado (aproximadamente 12 N) y 250 ml de agua destilada y luego mezclar.

Para preparar 18 lt se emplean las siguientes cantidades de reactivos:

Ácido oxálico	900.0g
Etanol 95%	12.6lt
Ácido clorhídrico concentrado	900.0ml
Agua destilada	4.5lt

- Alcohol etílico de 80% v/v. Para un litro, mezclar 155ml de agua destilada y 845ml de alcohol etílico de 95%. Para preparar 18 lt mezclar 8 lt de agua destilada y 15.2 lt de alcohol etílico de 95%.

Procedimiento

Seguir el procedimiento para la lignina, celulosa y sílice por permanganato hasta el paso en el que se pueda calcular la lignina, pero sin incinerar.

Tratar el residuo sin incinerar con H_2SO_4 72% como en el procedimiento de lignina ácido detergente. Calcular la cutina como pérdida después de incinerar.

2.8.7 Determinación de sílice. Es posible obtener un valor aproximado del contenido de sílice mediante la percolación del residuo de ceniza obtenida en el proceso anterior con ácido bromhídrico concentrado (48%) hasta que el color haya desaparecido. Lave con acetona y filtre. Incinere a 500 °C por 3 horas. Enfríe en desecador y pese (E). Este último peso no es necesario si el residuo de ceniza es menor del 2% de la muestra original.

Cálculos

$$\% \text{ Sílice} = \frac{E - A}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

2.9 Determinación de nitrógeno

La determinación de cada una de las proteínas que integran el alimento es de poca utilidad práctica, por esto el químico asume que el contenido de nitrógeno en las diferentes proteínas es en promedio de 16%; en el caso de la leche o el trigo donde su contenido de nitrógeno es diferente, la constante de conversión varía, como se puede observar en la tabla siguiente.

El valor proteico estimado a partir de su contenido de nitrógeno hace suponer que todo el nitrógeno presente en la sustancia analizada se halla haciendo parte de una proteína. Cosa que no es cierto para ningún alimento, pues contiene cantidades considerables de compuestos nitrogenados que no son proteínas, como aminoácidos, aminas, sales de amonio, nitratos, etc. Estas consideraciones deben tenerse presentes para diferencias la llamada proteína cruda de la proteína verdadera de los alimentos.

En este manual se describe el método Kjeldahl que ha sido el más aceptado de los muchos que se han propuesto para la determinación de nitrógeno total. Este método reportado por Kjeldahl en 1883, ha sido modificado numerosas veces, lo que ha conducido a su mayor simplificación, por lo que oficialmente hoy se conoce como el método Kjeldahl-Gunning-Arnold.

Tres pasos principales contempla este método: Digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado, en presencia de un catalizador y a elevada temperatura, para transformar el nitrógeno en sulfato de amonio. La solución se alcaliniza y el amoniaco librado se destila para su posterior titulación.

Material y equipo

- Digestor Kjeldahl
- Destilador Kjeldahl
- Microbureta o Pipetas volumétricas de diferentes capacidades
- Tubos de digestión Kjeldahl
- Perlas de vidrio o cuerpos de ebullición
- Vasos de precipitados de diferentes capacidades
- Matraces Erlenmeyer de diferentes capacidades
- Balanza analítica con sensibilidad mínima de 0,1 mg
- Campana de extracción de gases
- Digestor de proteínas automatizado con control de temperatura, Kjeldahl tradicional o cualquier otro equipo con características de funcionamiento similares
- Destilador de proteínas tradicional o similar
- Parrilla de calentamiento con agitación con regulador de temperatura
- Potenciómetro y electrodo de pH
- Titulador automatizado (opcional)

Reactivos

- Ácido sulfúrico concentrado
- Ácido clorhídrico concentrado
- Hidróxido de sodio en lentejas al 32%
- Ácido sulfúrico 0.1 N
- Ácido Bórico al 4%
- Indicador verde de bromocresol
- Indicador rojo de metilo: disolver 0.05 g de rojo de metileno y 0.25 de verde de bromocresol en 100 cc de etanol.
- Carbonato de sodio (MRC) o de pureza no menor a 99.95%
- Catalizador: mezclar sulfato de potasio anhidro 96.05%, sulfato de cobre pentahidratado 2.41%, selenio 1.54% y ácido salicílico. (Kjeltabs)
- Sulfato de amonio

Procedimiento

- Pesar con exactitud 0.5g de muestra
- Transferirla al tubo Kjeldahl que debe contener 2 perlas de vidrio. Si la muestra contiene nitratos, proceder con "Nitrógeno proteico".

2.9.1 Nitrógeno total. Evitar la pérdida de ácido nítrico del N proveniente de los nitratos.

- Adicionar a la muestra en el tubo 20cc de ácido sulfúrico concentrado y una tableta Kjeldahl o 5g de mezcla catalítica.
- Agregar 0.5g de ácido salicílico.
- Agitar y dejar reposar por lo menos 10 minutos.
- Continuar el proceso de la misma forma que con N proteico, a partir del calentamiento.

2.9.2 Nitrógeno proteico

- Adicionar a la muestra en el tubo 20cc de ácido sulfúrico concentrado y una tableta Kjeldahl o 5g de mezcla catalítica.
- Colocar el digestor previamente calentado (To 6) y aumentar la temperatura a 9.
- Continuar la digestión hasta que la solución se torne de color verde claro.
- Apagar el digestor y dejar enfriar la solución por 15 minutos (sin desmontar el equipo).
- Trasladar el matraz al equipo de destilación y acoplarlo con sumo cuidado.
- Antes de comenzar este paso, asegurarse que todos los accesorios del equipo estén en posición correcta para su utilización, (consultar al técnico).
- Agregar agua a la solución hasta completar 50cc (en la escala).
- Alcalinizar la solución con hidróxido de sodio al 32%, esto se logra cuando la solución se torna de color café o azul (± 100 cc).
- Presionar el botón de destilación y destilar hasta 125cc de ácido bórico al 4% con indicador.
- El ácido bórico con indicador debe cambiar de morado a verde esmeralda.
- Titular con ácido sulfúrico 0.1 N, hasta cambio de color (morado).
- Anotar el gasto (restándole el del blanco).

Cálculos

- Cantidad de amoniaco titulado:

$$V \times N \times EQ = \text{miligramos de NH}_3$$

$$V \times N \times 17 = \text{miligramos de NH}_3$$

- Cantidad de nitrógeno:

1 Mol de NH₃ contiene un átomo gramo de N, por lo tanto: 17 mg de NH₃ contienen 14 mg de N. $V \times N \times 17$ mg de NH₃ contienen X mg de N.

$$X = \frac{V \times 17 \times N \times 14}{17} = V \times N \times 14 \text{ mg de N}$$

Porcentaje de nitrógeno

$V \times N \times 14$ mg de N provienen de $M \times 1000$ mg de muestra

X mg de N provienen de 100 mg de muestra

$$X = \frac{100 \times V \times N \times 14}{M \times 1000} = 1.4 \times V \times N = \frac{\% \text{ de N}}{M}$$

Dónde:

V = Volumen en ml de ácido sulfúrico gastado para titular.

N = Normalidad del ácido utilizado para titular.

M = Muestra en gramos.

2.9.3 Conversión a proteína. Se ha señalado ya que no todo el contenido de N determinado por este proceso hace parte de proteínas por lo que es necesario aplicar el factor apropiado para cada alimento con el fin de obtener un resultado satisfactorio.

Hay que tener presente por otra parte que no todos los factores de conversión son exactos, debido a la dificultad existente para separar las proteínas verdaderas de un mismo alimento; y no podrán aplicarse a mezclas, sino aquellos para los cuales determinaron.

Aunque existan estas limitaciones, es necesario aplicar factores que aunque aproximados dan una idea más o menos clara del contenido

proteico de la muestra que se está analizando. Para esto se han agrupado los alimentos debido a que su factor de conversión es aproximado, así:

- Para mezclas de cereales: maíz, arroz, cebada, centeno, trigo, semillas de algodón, linaza, soya y subproductos.
- Para carnes, huevos, fríjoles, frutas, verduras y subproductos.
- Para leche y derivados.

En el caso de pastos y forrajes, se asume un contenido de N del 16% y 15%, para el caso de productos lácteos. En el primer caso el porcentaje de proteína será igual a:

$$\% \text{ Proteína} = \frac{V \times N \times 14 \times 6.25}{\text{mg de muestra}} \times 100$$

2.9.4 Nitrógeno no proteico (ureico y amoniacal)

- Destilador Kjeldahl
- Matraz Kjeldahl

Reactivos

- Cloruro de calcio al 25%
- Antiespumante
- Urea Liofilizada: Preparar una solución tal que 10 ml de ella conviertan el N de 0.1g de urea.

Tabla 3. Algunos factores para transformar el nitrógeno a proteína

Producto	Factor
Cereales trigo entero, molido o harina	5.83
Harina de trigo (baja o mediana extracción)	5.70
Macarrones, espagueti o pastas de trigo	5.76
Salvado de trigo	6.31
Maiz, sorgo	6.25
Arroz todos los productos	5.95
Centeno, cebada	
Mijo blanco, Mijo rojo, Trigo duro, Trigo blando (todos los productos)	5.83
Leguminosas, nueces y semillas	5.46
Soya y subproductos	5.71
Otras nueces	5.30
Almendras	5.18
Coco, castañas, semillas (ajonjolí, cártamo, girasol) otras semillas	5.30
Leche y productos de leche	6.38
Otros alimentos (gelatina)	5.55
Huevo	6.68
Yema de huevo	6.62
Carne	6.25
Galletas y productos de panadería	5.70
Ajonjolí, Alberjón, Amaranto, Avena con cascarilla, Avena sin cascarilla, Frijol flor de Mayo, Frijol Negro, Frijol San Francisco, Garbanzo, Haba, Linaza, Lenteja.	6.25

Determinación de la actividad:

- Preparar 50 ml de solución neutra, adicionar diferentes cantidades de solución a muestras de 0.1 g de urea y continuar la digestión enzimática y destilación que se anotan más adelante.
- Calcular la actividad de la ureasa como la cantidad que convierta completamente la urea, determinada por la recuperación del N total.

Procedimiento

- Colocar 2 g de muestra en un matraz Kjeldahl.
- Adicionar 250 cc de agua y agregue 10 ml de solución ureasa.
- Tapar el recipiente y dejar en reposo por una hora.
- Si el alimento contiene más del 5% de urea, adicionar más ureasa.
- Lavar el tapón y cuello de matraz.
- Adicionar 2 mg de MgO, 5 ml de solución de cloruro de calcio y 3 ml de antiespumante.
- Destilar de igual forma como lo hizo con el N protéico.
- Calcular el % de N.

Tabla. 4 Reactivos para calibración del proceso kjeldahl

Compuesto	Gramos	% de N	Factor
Urea	0.06 aprox.	46.6459	2.1438
Ácido úrico	0.08 aprox.	33.3272	3.0006
Sulfato de amonio	0.13 aprox.	21.2007	4.7168
Lisina	0.15 aprox.	19.1625	5.2185
Triptófano	0-20 aprox.	13.7167	7.2904

2.9.5 Nitrógeno insoluble en detergente ácido. El secado de los forrajes a temperaturas superiores a 50 °C provoca incrementos en el contenido de lignina y fibra. Este incremento en la FAD puede deberse a la formación de lignina por medio de reacciones de oscurecimiento no enzimático (browning). Los valores para FAD y lignina pueden ser corregidos con base en el contenido de nitrógeno de la FAD. El contenido de nitrógeno de la FAD se sugiere como una prueba sensible para detectar sobrecalentamiento de alimentos.

Reactivos

- Solución ácido detergente: disolver 20 g de bromuro de cetil-trimetil amonio (hexadecil trimetil amonio bromuro) por litro en ácido sulfúrico 1N (26.6 ml de H₂SO₄/ lt).
- Acetona.

Procedimiento

- Pesar 2 g de muestra en un vaso adecuado para reflujo. Adicionar 100 ml de la solución detergente. Calentar la solución para que hierva en el término de 5 – 10 minutos. Cuando inicie la ebullición, bajar el calor para evitar la formación de espuma y mantener en reflujo por 60 minutos contados a partir del inicio de la ebullición que debe ser lenta durante todo el procedimiento. Filtrar al cabo del tiempo en un papel filtro (Whatman 54) previamente tarado.
- Lavar el filtrado con agua caliente hasta que esté libre de acidez y luego con acetona. Secar a 100 °C por 8 horas o toda la noche y pesar.
- Transferir el residuo a un matraz de Kjeldahl y determinar el nitrógeno.

Cálculos

$$\text{FAD} = \frac{(\text{Peso papel filtro después de secado, g})}{\text{Peso de la muestra seca total, g}}$$

El nitrógeno detergente se expresa como porcentaje de la materia seca total, así:

$$\text{NIAD} = \frac{\text{gramos de nitrógeno}}{\text{Peso de la muestra seca, g}} \times 100$$

Se puede expresar también como porcentaje del nitrógeno total.

2.9.6 Nitrógeno insoluble en pepsina. El método determina el nitrógeno del forraje que no es digerido por una solución de pepsina.

Reactivos

- Ácido clorhídrico 0.1 N agregar 17 ml de HCl 6N a 1 litro de agua. No se necesita valorar la solución.
- Pepsina 1:10.000 NF, XI

Procedimiento

Pesar 0.5 g de la muestra secada al aire y molida, a través de un tamiz de 1 mm de abertura dentro de un matraz Erlenmeyer de 125 ml. Agregar 0.5 g de pepsina y 50 ml de HCL 0.1N al matraz. Tapar y agitar, poner en la estufa o en baño de agua a 39 °C por 20 horas.

Filtrar sobre el papel Whatman No. 4,41 ó 54. Lavar el residuo con agua destilada. Una manera de asegurarse de que todo el nitrógeno soluble se ha eliminado es lavar todo el ácido clorhídrico del residuo. Determinar el nitrógeno en el residuo, colocando el papel filtro y su contenido en un matraz para digestión y determinarlo de acuerdo al método de Kjeldahl. Calcular el nitrógeno insoluble en pepsina mediante la siguiente formula:

$$\%N = \frac{\text{g N}}{\text{Peso muestra seca, g}} \times 100$$

Que también puede expresarse como se indica a continuación:

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

2.9.7 Determinación de nitrógeno amoniacal en ensilajes. Este método determina el nitrógeno amoniacal presente en la muestra como producto de la hidrolisis de proteínas, o por adición de sales de amonio al ensilaje.

Procedimiento

- Colocar 10 g de muestra en matraces de destilación para Kjeldahl, con 20 ml de agua destilada, añadir 1 g de MgO libre de carbonato (tratado como se sugirió en la técnica AOAC, 1975).
- Destilar 100ml de líquido recogiendo en 25 ml de una solución de ácido bórico-indicador, que se prepara así:
- Disolver 20 g de ácido bórico en aproximadamente 700 ml de agua caliente, transferirla ya fría a un matraz volumétrico de 1lt que contenga 200 ml de etanol y 20ml de una solución indicadora (0.330 g de verde de bromocresol y 0.165 g de rojo de metilo en 500 ml de etanol). Después de mezclarse el contenido del matraz, añadir NaOH

0.05 N gota a gota hasta obtener un color verde pálido, se puede observar dicha coloración cuando 1 mm de la mezcla se trata con 1 mm de agua destilada y se agita vigorosamente.

- El destilado se titula con HCl 0.01N adicionando si es necesario un poco más del indicador verde de bromocresol-rojo de metilo.

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

2.9.8 Determinación del índice de eficiencia proteica. Este método determina el índice de eficiencia proteica (IEP) de los alimentos, utilizando ratas como animales de experimentación.

Animales

Ratas sanas de un bioterio conocido de 21 a 23 días de edad, machos con un peso de 40 – 60 g. El periodo de aclimatación es de 2 – 4 días durante el cual se alimenta a los animales con una dieta comercial adecuada.

Los animales se alojan en jaulas individuales de acero inoxidable (33 x 20 x 18 cm) con piso de malla. El ciclo de luz diario debe ser de 12 horas, temperatura ambiente de 24 ± 1 °C y 50 + 10% de humedad relativa.

Después del período de aclimatación, los animales deben ser divididos en grupos por pesos y distribuidos al azar en los diferentes tratamientos que se pretenden realizar, cuidando que los grupos de animales sean semejantes en cada tratamiento.

Los animales deben pesarse al inicio y cada semana durante los 28 días de la prueba en una balanza que tenga una sensibilidad de 1 g.

Los animales deben pesarse al inicio y cada semana, igualmente el alimento problema, así como los residuos y desperdicios.

Si se sospecha de selección del alimento por los animales hay que determinar el nitrógeno a los residuos para comprobarlo y evitarlo, ya sea moliendo más la dieta y humedeciendo e incluso pele tizando el alimento.

Las dietas deben prepararse de manera que contengan:

- a) Como máximo 10% de la humedad. Si no es posible, se deben liorizar.

- b) Los lípidos no deben exceder del 20%, debido a que no se puede extraer la grasa sin alterar la proteína. Productos con elevados niveles de lípidos no deben exceder sino compararse con dietas testigo con niveles semejantes de grasa. Hay que tener cuidado de proporcionar el nivel requerido de ácidos grasos esenciales.
- c) El contenido de proteína debe ser alrededor de $1.6 \pm 0.1\%$ de nitrógeno ($N \times 6.25$), el testigo y el problema deberán contener el mismo nivel de proteína, 1.2% de nitrógeno como mínimo.

El cálculo de las proteínas de las dietas se realiza con base en nitrógeno, sí en nitrógeno total. No deben hacerse correcciones con base en nitrógeno no proteico, excepto en aquellos productos que contienen más del 10% de alcaloides como el chocolate.

- d) Carbohidratos. Las dietas testigo deben contener siempre el mismo nivel de sacarosa u otros azúcares que las dietas problema. El resto de la fracción carbohidratada debe ser almidón de maíz.
- e) Fibra cruda. Las dietas no deben contener ni más del 10% ni menos del 1% siendo óptimo de 2%. A la dieta testigo se le añadirá alfa celulosa.
- f) Vitaminas. Adicionar las vitaminas en las cantidades requeridas por el animal, sin embargo se recomienda que:
- Si se adiciona cloruro de colina en lugar de bítartrato de colina, esta deberá adicionarse hasta que la dieta esté completa.
 - La tiamina debe usarse como indicador de la estabilidad de las vitaminas
 - Las vitaminas deben ser guardadas en refrigeración y no deberán mezclarse con los minerales ni con las proteínas.
 - Deberán prepararse en pequeños lotes los cuales se descartarán después de 6 meses.
- g) Minerales. Proporcionar los minerales en los niveles requeridos por el animal. Aun cuando se ha previsto corrección por el nivel de cenizas de la dieta, sí se ha establecido un límite del 1% de sodio en la dieta.

Con ratas en crecimiento se debe tener cuidado de que el balance sodio/potasio de la dieta se mantenga a 1:3 lo que significa que en dietas que contengan altos niveles de sodio debe analizarse el potasio.

Se puede adicionar BHT o ethoxiquin en niveles máximos de 200 ppm en la dieta y no debe adicionarse medicamento alguno en ninguna de las dietas.

Una vez se han pesado todos los ingredientes hay que mezclarlos durante 15 minutos y pasarlos por una malla de 20 para asegurarse de que no habrá separación de las dietas. Un vez mezclados se deberán guardar en refrigeración a 4°C.

Como fuente de proteína para la dieta testigo se utiliza caseína, la cual deberá tener un IEP (PER) de 2.5 a 3.2.

A un grupo se le da la dieta libre de proteína y a los grupos restantes la dieta problema. Agua y alimento se proporcionan a voluntad. Las dietas en polvo previamente equilibradas a humedad ambiente se proporcionan en pequeñas cantidades pesadas para evitar desperdicios. El peso del alimento consumido se registra todos los días y la ganancia de peso de los animales dos veces por semana.

Al final de los 10 días experimentales se sacrifica a los animales con éter etílico o cloroformo. Se abren cabeza, tórax y abdomen con bisturí y tijeras para facilitar el secado. El secado se lleva a cabo colocando los cadáveres en pequeñas charolas de papel aluminio y secando en estufa de aire forzado a 105 °C por 48 horas. Pesar el contenido de las charolas y calcular el agua y la materia seca corporal.

En el cuadro siguiente se describe la composición de algunas dietas experimentales probadas.

Tabla 5. Composición de dietas experimentales para determinación del IEP

Ingredientes	Testigo	Problema
Caseína	11.7	---
Alimento problema 1.	-----	96.541
Aceite de maíz	1.0	1.000
Alfa celulosa	3.3	----
Azúcar	10.0	-----
Almidón de maíz	71.067	-----
Ca ₂ H ₂ PO ₄	1.745	0.817
CaCO ₃	0.088	-----
KH ₂ PO ₄	----	0.542
Mezcla de vitaminas 2.	0.5	0.500
Mezcla de minerales 3.	0.6	0.600
ANALISIS CALCULADO		
Proteína cruda %	9.8	9.8
Fibra cruda %	3.3	3.3
Grasa cruda %	4.1	4.1
Calcio	0.5	0.5
Fósforo	0.4	0.4

1. Análisis del concentrado problema: humedad 7.2%, cenizas 1.1%, grasa 4.2%, proteína cruda 10.2%, fibra cruda 3.4%, extracto libre de nitrógeno 73.5%, calcio 0.30%, fósforo 0.31%.
2. Mezcla de vitaminas por kg de ración: Vitamina A 2000UI, vitamina D 1000 UI, vitamina E 0.35 mg, clorhidrato de tiamina 1.25 mg, riboflavina 2.5 mg, vitamina B6 7.0 mg, vitamina B12 0.005 mg, pantotenato de calcio 8 mg, vitamina K 0.05 mg, niacina 15 mg, cloruro de colina 7.50 mg, santoquina 20 mg.
3. Mezcla de minerales por kg de ración: CuSO₄ 5H₂O 19.6 mg, KI 0.2 mg, FeSO₄ 7H₂O 174 mg, MgO 663 mg, MnSO₄ H₂O 153 mg, SeO₂ 0.5 mg, K₂CO₃ 318 mg, NaCl 127 mg, ZnO 14.9 mg.

Los cadáveres secos se muelen en molino de carne y luego es uno de cuchillas. Se almacena el residuo seco en un desecador hasta su análisis.

Se separa el alimento que haya sobrado, las heces, y junto con el alimento restante en los comederos se secan y se pesan. Se determina la humedad al alimento para calcular el consumo en base seca.

Se determina el nitrógeno de las heces y las dietas por el método macro semi o micro Kjeldahl dependiendo de la homogeneidad.

La utilización neta de proteína se puede calcular así:

$$\text{UNP} = \frac{N_p - N_c + I_c}{I}$$

Donde:

N_p = N_2 corporal en la dieta problema en base seca

N_c = N_2 corporal en la dieta control libre de proteína en base seca

I_c = N_2 ingerido en la dieta control libre de proteína en base seca

Todas las dietas deben ser probadas por duplicado con distintos grupos de ratas en diferentes tiempos, si los duplicados no tienen diferencias menores a 0.04 hay que hacerlo una tercera vez. Los resultados deben rechazarse si las curvas de peso de los grupos de ratas son quebrados.

En el cuadro siguiente se describe la composición de una dieta control libre de nitrógeno; así como también a base de un sustituto de leche al cual le determinamos la utilización neta de proteína.

Las dietas deben reunir los requerimientos nutricionales de los animales y tener una composición muy parecida con objeto de no tener diferencias por deficiencias en otros nutrientes además de la proteína.

Nota:

El uso de jaulas individuales con aditamentos para recolectar orina y heces facilita el trabajo de separación del alimento de las heces, aunque el costo de las jaulas es mayor.

1. Mezcla de vitaminas por kg de ración; vitamina A 2000 UI, vitamina D 1000 UI, vitamina E 35 mg, clorhidrato de tiamina 1.25 mg, rivo flavina 2.5 mg, vitamina B6 7.0 mg, vitamina B12 0.005 mg, pantotenato de calcio 8 mg, vitamina K 0.05, niacina 15 mg, cloruro de colina 7.50 mg, santoquina 10 mg.

2. Mezcla de minerales por kg de ración. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 19.6 mg; KI 0.2 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 174mg; MgO 663 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 153 mg; SeO_2 0.5 mg; K_2CO_3 318 mg; NaCl 127 mg; ZnO 14.9 mg.

Tabla 6. Composición de las dietas experimentales

Ingredientes %	Dieta Cont. Lib. Prot.	Dieta Prob.
Problema (P.C. 62.7%)	---	15.95
Glucosa	15.00	15.00
Almidón de maíz	78.90	62.95
Aceite de maíz	5.00	4.89
Alfa celulosa	2.00	1.50
Mezcla de vitamina 1.	0.50	0.50
Mezcla de minerales 2.	0.60	0.60
ANALISIS CALCULADO %		
Proteína cruda (N x 6.25)	0.0	10.00
Fibra cruda	2.00	2.00
Grasa cruda	5.00	5.00

2.9.9 Método de balance de nitrógeno o valor biológico. Método de THOMAS MITCHELL. Este procedimiento comprende la determinación del nitrógeno en heces y orina cuando una cantidad conocida de la proteína en prueba es la única fuente de nitrógeno ingerido.

El nitrógeno metabólico fecal y urinario debe ser determinado individualmente en cada animal. Esto se efectúa en un periodo de control en el que cada animal recibe esencialmente una dieta libre de nitrógeno que proporciona suficiente energía para llenar los requerimientos del animal.

Cálculos

$$\text{Valor biológico} = \frac{100 \times \text{N dieta} - (\text{N Fe} - \text{N met}) + (\text{N Uri} - \text{N end})}{\text{N dietal} - (\text{N fecal} - \text{N metabólico})}$$

$$\text{Valor biológico} = \frac{100 \times \text{mg N retenido diariamente}}{\text{mg N absorbido diariamente}}$$

Ejemplo de un experimento con ratas.

Durante un periodo de colección de 7 días se obtuvo un promedio diario de nitrógeno fecal de 27.6 mg de los cuales se determinó previamente que 21.6 mg eran de origen metabólico, dejando solo 5.9 mg contenidos en la proteína dietaria no digerida. Durante este periodo, la excreción de nitrógeno fue de 48.6 mg diarios, de los cuales 37.7 mg fueron de origen endógeno. Por lo tanto solo $48.6 - 37.7 = 10.9$ mg de nitrógeno dietal absorbida fueron utilizados en metabolismo y $51.0 - 10.9 = 40.1$ mg fueron retenidos por el cuerpo. El valor biológico de la proteína es por lo tanto:

$$\frac{100 \times 40.1}{51.0} = 79$$

$$V.B = \frac{100 \times 56.9 - (27.6 - 21.6) + (48.6 - 37.7)}{56.9 - (27.6 - 21.7)}$$

Observaciones

Para que las diferentes pruebas sean comparables es necesario que el consumo de nitrógeno sea mantenido al mismo nivel en todas las pruebas. Con base en los datos anteriores, se puede calcular:

1. N.P.U (Utilización neta de proteína)

$$N.P.U = \frac{\text{Nitrógeno retenido} \times 100}{\text{Nitrógeno dietario}} = VB \times D$$

2. D (digestibilidad verdadera)

$$D = \frac{\text{Nitrógeno absorbido}}{\text{Nitrógeno dietario}}$$

3. V.N.P. (Valor neto de proteína)

$$V.N.P = V.B \times D \times \text{contenido proteico del ingrediente}$$

2.10 Determinación del extracto libre de nitrógeno (ELN)

Como se vio al principio, el esquema Weende agrupa los carbohidratos en dos grupos: fibra cruda y extracto libre de nitrógeno. Para la primera fracción se han descrito los detalles de los procesos, el ELN no se determina por algún proceso específico, sino que es el resultado de restar de la muestra original los demás constituyentes, lo que conduce a que su valor contenga los errores acumulativos de las otras determinaciones.

No es objeto de este manual describir los procedimientos específicos existentes para la cuantificación y cualificación de los carbohidratos solubles, por lo tanto se describe aquí el proceso comúnmente usado en el laboratorio de nutrición, utilizando la siguiente operación:

$$\% \text{ ELN} = 100 - (\% \text{ extracto etéreo} + \% \text{ ceniza} + \% \text{ proteína} + \text{ fibra cruda})$$

Es de tener en cuenta que el extracto libre de nitrógeno no solamente contiene los glúcidos solubles sino que puede encontrarse dentro de esta fracción celulosa, hemicelulosa, lignina, ácidos orgánicos, taninos, etc.

2.11 Determinación de almidón

El almidón es el polisacárido de digerir más común que se encuentra en los alimentos, y por lo tanto es una fuente importante de energía en las dietas. En su forma natural existe el almidón como gránulos insolubles en agua, pero en muchos alimentos procesados no está en esta forma debido a los procesos implicados (por ejemplo, calefacción).

Preparación de la muestra. El contenido de almidón de la mayoría de los alimentos no se puede determinar directamente porque el almidón está contenido dentro de una matriz alimentaria estructural y químicamente compleja. En particular, el almidón a menudo está presente en una forma semicristalina (granular o almidón retrogradado) que es inaccesible a los reactivos químicos utilizados para determinar su concentración. Por tanto, es necesario aislar el almidón de los otros componentes presentes en la matriz del alimento antes de llevar a cabo un análisis de almidón.

En alimentos como las legumbres, cereales o tubérculos, los gránulos de almidón generalmente se separan de otros componentes por secado,

molienda, remojo en agua, filtración y centrifugación. Los gránulos de almidón son insolubles en agua y tienen una densidad relativamente alta (1500 kg/m³) de modo que tenderán a precipitarse durante la centrifugación, en la que se pueden separar de los otros materiales solubles en agua y menos densos. Muestras de alimentos procesados normalmente se secan, se muelen y luego se dispersan en soluciones de etanol caliente al 80%. Los monosacáridos y oligosacáridos son solubles en la solución de etanol, mientras que el almidón es insoluble. Por lo tanto, el almidón se puede separar de los azúcares por filtración o centrifugación de la solución. Si cualquier almidón semicristalino está presente, la muestra se puede dispersar en agua y se calienta a una temperatura en la que el almidón se gelatiniza (> 65 °C). La adición de ácido perclórico o cloruro de calcio al agua antes del calentamiento facilita la solubilización de los almidones difíciles de extraer.

Existen varios métodos de extracción y determinación del contenido total de almidón en los tejidos vegetales, dependiendo del tipo de tejido o la fuente, el contenido almidón total estimado a partir de muestras extraídas con etanol caliente 80% fueron significativamente mayores que a partir de muestras extraídas con una mezcla de metanol: solución de agua: cloroformo. Para la determinación de almidón, una mezcla de enzimas de 1000 U α -amilasa y 5 U de amiloglucosidasa digieren el almidón en el tejido vegetal más rápida y completamente que otras enzimas. El ácido sulfúrico diluido (0,005 N) resulta menos adecuado para la digestión del almidón que la hidrólisis enzimática, debido a que el ácido también rompe los carbohidratos estructurales, lo que puede resultar en una sobreestimación del contenido de almidón. Después de la digestión enzimática del almidón, el hidrolizado de glucosa obtenido se midió con un reactivo de peroxidasa de glucosa oxidasa / o-dianisidina; la absorbancia se lee a 525 nm después de la adición de ácido sulfúrico.

Para estimar el contenido de almidón en muestras de vegetales, la mayoría de los métodos proponen hidrolizar el almidón en glucosa. Entre estos métodos son la hidrólisis de ácido perclórico (MacRae et al 1974, Rose et al., 1991), que se considera peligroso debido a la inestabilidad del ácido; hidrólisis con ácido sulfúrico (Smith et al 1964.), considerado el más simple y rápido y la digestión enzimática con amilasa y amiloglucosidasa (Smith 1969, Haissig y Dickson 1979, Rose et al. 1991, Hendrix 1993), calificado como el más preciso pero que requiere mayor laboriosidad.

Métodos de análisis

Una vez que el almidón ha sido extraído hay varias formas de determinar su concentración:

- Enzimas específicas se añaden a la solución de almidón para su descomposición en glucosa. La concentración de glucosa es luego analizada utilizando métodos descritos anteriormente (por ejemplo, cromatografía o métodos enzimáticos). La concentración de almidón se calcula a partir de la concentración de glucosa.
- El yodo se puede añadir a la solución de almidón para formar un complejo almidón-yodo insoluble que se puede determinar gravimétricamente mediante la recolección, secado y pesando el precipitado formado por titulación; la determinación de la cantidad de yodo requerido para precipitar el almidón.
- Si no hay otros componentes presentes en la solución que pudieran interferir con el análisis, la concentración de almidón se puede determinar mediante métodos físicos, por ejemplo, densidad, índice de refracción o la polarimetría.

Las concentraciones de amilosa y amilopectina en una muestra se pueden determinar usando los mismos métodos como se describe para el almidón una vez que la amilosa se ha separado de la amilopectina. Esto se puede lograr mediante la adición de productos químicos que forman un complejo insoluble con uno de los componentes, pero no con la otra, por ejemplo, algunos alcoholes precipitan amilosa pero no amilopectina. Algunos de los métodos mencionados no permiten determinar la concentración de almidón resistente presente en la muestra. Si se requiere la concentración de almidón resistente, un paso adicional se puede añadir al procedimiento añadiendo dimetilsulfoxido se añade (DMSO) para disolver el almidón resistente antes de la llevar a cabo el análisis.

Un método rápido para la medición de azúcar total y almidón en tejidos de plantas leñosas, consiste en extraer con etanol caliente al 80%, 50 mg de muestra de tejido seco y molido. El extracto de etanol se analiza para el azúcar usando fenol-ácido sulfúrico contra un estándar GFG, con 2% de fenol y se lee la absorbancia a 490 nm. La interferencia se corrige mediante la ejecución de un ensayo de azúcar paralelo sin fenol. El residuo se analiza

para el almidón por digestión enzimática con una mezcla de 1.000 U de α -amilasa y 5 U de amyloglucosidasa durante 20 h, seguido de la medición colorimétrica del hidrolizado de glucosa con un reactivo de peroxidasa de glucosa oxidasa / o dianisidina. Se lee la absorbancia a 525 nm después de la adición de H_2SO_4 .

2.11.1 Método de la antrona

Reactivos

- Solución de 0,5 g de antrona en 250 ml de ácido sulfúrico.
- Acido perclórico al 52% (W/W).
- Etanol al 80% (V/V).
- Solución de etanol en éter de petróleo (1:3).
- Solución patrón de glucosa (0,1 g en 100 ml)

Material

- Tubos de centrifuga cónicos de 100 ml.
- Centrifuga capaz de 2500 rpm.
- Papel de filtro Whatman n° 40.
- Espectrofotómetro de doble haz visible y ultravioleta
- Material de uso corriente en el laboratorio.

Se prepara una escala de glucosa tomando 1; 2; 3 y 4 ml de la solución patrón que se llevan a 200 ml con agua destilada.

De estos se toman 5 ml que se tratan según indica el método oficial con 10 ml del reactivo antrona-sulfúrico, leyendo los valores de absorbancia a 630 nm y los correspondientes a la longitud de onda máxima neta ($A_{m.n}$) ($A_{625} - A_{870}$).

2.11.2 Método del yodo

Reactivos

- Acido perclórico 52% (w/w).
- Solución de yodo-yoduro potásico:
- 20 g de yoduro potásico, disueltos en 20 ml de agua destilada y 2,0 g de yodo, diluir a un litro.
- Almidón soluble.

Material: Los mismos que en el Método de la Antrona

Recta patrón de almidón soluble: se pesan 0,1 g de almidón soluble y se tratan con 10 ml de ácido perclórico al 52%, se mezcla para disolver y se deja reposar durante 10 minutos, al cabo de los cuales se enrasa a 100 ml con agua destilada.

En cuatro matraces aforados de 50 ml que contienen 2,5 ml de ácido perclórico al 52%, se disponen 1; 1,5; 2; y 2,5 ml de la solución de almidón y se enrasa con agua destilada; se toman de cada uno 10 ml se añade 0,5 ml de la solución yodo-yodurada y se deja reposar diez minutos en oscuridad; transcurrido este tiempo se mide en el espectrofotómetro frente a un blanco, anotando el valor máximo de la absorbancia y el valor a 600 nm.

El blanco se prepara de igual forma que los patrones pero sin solución de almidón, más tarde se modifica, utilizando la misma solución de la escala patrón con almidón, pero sin añadirle la solución de yodo yodurada y haciendo después una corrección de las lecturas de absorbancia, para corregir la absorbancia que presenta la disolución de yodo yodurada en exceso.

Para las muestras de harinas, se hace directamente, igual que con el almidón patrón.

3

Determinación de energía bruta

3.1 Energía bruta

Es aquella energía liberada como calor cuando una sustancia orgánica es oxidada totalmente hasta CO_2 y H_2O . El valor energético puede estimarse a partir de la composición química (análisis de Weende o Van Soest) y los valores de combustión de los carbohidratos, proteínas y lípidos.

Tabla 7. Composición porcentual de carbohidratos, proteínas y grasas

Componente	C	H	O	N
Carbohidratos	44	6	50	
Proteínas	52	6	22	16
Grasas	77	12	11	

C: Carbono; O: Oxígeno; H: Hidrógeno; N: Nitrógeno; 1 g C = 8 Kcal, 1 g H = 34,5 Kcal, Maynard *et al*, 1979.

Tabla 8. Energía bruta de los componentes del alimento

Compuesto	Kcal/ g = Mcal/kg
Carbohidratos	4,2
Proteínas	5,6
Lípidos	9,4

Maynard *et al.*, 1979

Estimación de la EBa partir de la composición química.

$$EB(\text{Mcal/Kg}) = 5.6 \text{ PC} + 9.4 \text{ EE} + 4.2 \text{ FC} + 4.2 \text{ ELN} \quad 2. \text{ EB (Mcal/kg)} = 5.6 \text{ PC} + 9.4 \text{ EE} + 4.2 \text{ FDN} + 4.2 \text{ CHOs}$$

Tabla 9. Energía Bruta de sustancias puras

Sustancia	Kcal/g
Glucosa	3,76
Almidón	4,23
Caseína	5,86
Globulina	5,36
Ac. Acético	3,49
Ac. Propionico	4,96
Ac. Butirico	5,35
Ac. Palmitico	9,35
Urea	2,53
Acido úrico	2,74
Metano	13,25

Tabla 10. Energía Bruta de algunos alimentos (BS)

Alimentos	Kcal/g
Maíz (grano)	4,55
Trigo (afrechillo)	4,54
Harina de soja	4,72
Soja (poroto)	5,52
Raigrás (vegetativo)	4.54
Heno de alfalfa	4.37
Chala de maíz	4.33
Sebo vacuno	

INRA, 1989

Calorimetría Adiabática

Proceso mediante el cual se quema una sustancia por completo hasta sus últimos productos de oxidación, como son: dióxido de carbono, agua y otros gases, el calor que se libera en este proceso se considera como la energía bruta o calor de combustión, generado por un alimento que se incinera en una cámara de reacción (bomba), circundada por agua, a la cual se carga con 25 a 30 atmósferas de oxígeno y se ha provisto de medios para medir el calor producido.

Material y equipo

- Calorímetro adiabático
- Cilindro de oxígeno
- Beakers
- Alambre fusible

Reactivos

- Hidróxido de sodio 0.1 N
- Metil naranja

Procedimiento

- Pesar con exactitud un gramo de muestra (prensada en el caso de forrajes).
- Colocar en la cápsula de combustión
- Cortar 10 cm de alambre fusible y fijarlo por los extremos a los electrodos de la bomba.
- Colocar la cápsula con muestra en el electrodo correspondiente
- Permitir que el alambre fusible haga contacto con la superficie de muestra.
- Verter 2 cc de agua en la bomba
- Tapar la bomba con cuidado
- Cargar la cubeta cromada con 2000 ml de agua
- Cargar la bomba con 25 – 30 atmósferas de oxígeno
- Introducir en el calorímetro y dentro de ella colocar la bomba
- Conectar los dos cables de ignición a la tapa de la bomba

- Cerrar la cubeta del calorímetro, bajar el soporte del termómetro
- Ajustar los lentes de lectura y encender el motor
- Esperar 5 minutos para estabilizar la temperatura inicial
- Anotar la temperatura inicial T_i
- Oprimir el botón de ignición
- Esperar 10 minutos y anotar la temperatura final T_f
- Sacar la bomba, dejar escapar el oxígeno y abrir
- Lavar con agua la bomba y la cápsula, recoger en un beaker
- Titular con NaOH 0.1 N usando metil naranja como indicador, anotar el gasto
- Remover los pedazos de alambre de los electrodos y medir su longitud (anotar).

Cálculos

Para esto se deben tener los siguientes datos:

M = Cantidad de muestra en gramos

T_i = Temperatura inicial

T_f = Temperatura final

T = Diferencia de temperatura ($t_f - t_i$)

V = Mililitros de NaOH 0.1 N

C = Centímetros de alambre quemados

K = Equivalente energético del calorímetro en cal/°C

Equivalente energético del calorímetro

Se define como la energía necesaria para elevar la temperatura del calorímetro en un grado centígrado y se expresa cal/°C.

Este valor es una constante del conjunto (agitador, bomba, agua, etc) que sirve para estandarizar o calibrar el aparato.

Se determina quemando en iguales condiciones que la muestra, un compuesto cuyo valor de combustión se conozca exactamente. Este compuesto debe reunir las siguientes condiciones.

- Obtenerse en forma sólida estable
- Ser fácilmente purificable
- No ser volátil a temperatura ambiente

- No ser higroscópico
- Quemarse cuantitativamente en la bomba
- Ser fácil de prensar

Para este fin se puede usar naftaleno, sacarosa y ácido salicílico, pero actualmente se considera como el más apropiado al ácido benzoico, cuyo valor de combustión es de 6318 cal/g.

De acuerdo con la definición, el equivalente energético del calorímetro será igual a:

$$K = \frac{\text{Calorías totales}}{\text{Aumento de la temperatura}}$$

Las calorías totales son:

Calorías producidas por el ácido benzoico $6318 \times M$ (M =peso en gramos).

Calorías producidas por la formación de ácido nítrico. Puesto que la combustión en la bomba tiene lugar en una elevada presión de oxígeno y temperatura, ocurren varias reacciones ambientales. Estas reacciones son importantes porque generan calor. El nitrógeno se oxida y con el vapor de agua forma ácido nítrico, el azufre se oxida a SO_3 y con el agua forma ácido sulfúrico.

En muestras que no tengan alto contenido de azufre, no es necesaria la corrección por ácido sulfúrico. Generalmente la corrección que se realiza en el laboratorio se hace por HNO_3 , de la siguiente manera:

Se asume que todo el ácido titulado es nítrico, y que el calor de combustión del HNO_3 0.1 N es de 13.8 Kcal por mol, lo que es igual a 13800 cal por mol.

Como $V_1 N_1 = V_2 N_2$, el volumen consumido de NaOH 0.1 N es equivalente al volumen de HNO_3 0.1N que podría haber en la bomba: llámese volumen V .

1000 cc de HNO_3 0.1N contiene 0.1 mol de HNO_3 , o sea 0.1×13800 cal = 1380 cal.

$$\frac{\text{El volumen } V \text{ tendrá: } V \times 1380}{1000} = V \times 1.38 \text{ cal}$$

Por lo tanto, para hallar las calorías debidas a la formación de HNO_3 basta multiplicar el volumen de NaOH 0.1N por el factor 1.38.

Con este valor se procede a determinar el valor de energía bruta de la muestra.

$$Q = \frac{\text{Calorías producidas por la muestra}}{\text{Peso de la muestra}}$$

Las calorías producidas por la muestra son:

Si K calorías producen un aumento de 1 °C, para lograr un aumento de T °C son necesarias KT calorías (T = diferencia de temperatura).

A este valor debe restársele las calorías debidas a la formación de HNO₃ y a la combustión del alambre, ya que no son propias de la muestra.

Ejemplo:

Acido benzoico

M: 0.8988 g

T: 2.375 C

V: 6.9 cc

C: 5.7 cm

$$K = \frac{(6318 \times 0.8988) + (6.9 \times 1.38) + (5.7 \times 2.3)}{2.375}$$

$$K = 2400 \text{ cal/}^{\circ}\text{C}$$

Ejemplo para una muestra de concentrado:

M: 1.4135 g

T: 2.262 C

V: 8.0 cc

C: 4.5 cm

$$Q = \frac{(2400 \times 2.262) - (8 \times 1.38) - (4.5 \times 2.3)}{1.4135}$$

$$Q = 3826 \text{ cal/g}$$

3.2 Energía digestible (ED)

Cantidad de energía del alimento consumido que no aparece en las heces y que se calcula así:

$$ED = EB - (E \text{ heces} - E \text{ urinaria})$$

En el proceso de utilización de la energía ingerida la pérdida en las heces es la primera y, cuantitativamente, la más importante y más variable.

Determinación

1) Pruebas de digestibilidad

- Calorimetría (bomba calorimétrica): restando a la EB consumida la EB de las heces se obtiene la energía digestible aparente.
- Estimaciones a partir de composición química del alimento ingerido y material excretado
- Determinación de Nutrientes Digestibles Totales (NDT)

Estimación de ED por calor de combustión

En cerdos:

- $ED \text{ (Mcal/kg)} = (CNED \times 4.2) + (FDND \times 4.2) + (PCD \times 5.6) + (EED \times 9.4) - 0.3$

Fracciones expresadas como fracción de la Unidad

2) Estimación a partir de AQ

En cerdos:

- $ED \text{ (kcal/kg MS)} = 4151 - (122 \times \%C) + (23 \times \%PC) + (38 \times \%EE) - (64 \times \%FC)$
R2 = 0.89

- $ED \text{ (kcal/kg MS)} = 949 + (0.789 \times EB) - (43 \times \%C) - (41 \times \%FDN)$
 $R^2 = 0.91$

Fracciones como % de la MS

Tabla 11. Nutrientes digestibles totales (NDT)

Grupo de Nutrientes	EB (Kcal/g)	Pérdida fecal (% de EB)	ED (Kcal/g)	Pérdida en Orina (% de ED)	VFC (Kcal/g)
CHO	4,15	2	4,0	0	4.0
Lípidos	9,45	5	9,0	0	9.0
Proteínas	5,62	8	5,2	23	4,0

Nutrientes digestibles totales (NDT)

$$NDT \% = 1 \times \%PCD + 1 \times \%FCD + 1 \times \%ELND + 2.25 \times \%EED$$

- 1 kg NDT = 4.4 Mcal ED
- $ED \text{ (Mcal/kg)} = \% NDT \times 0.04$

$$NDT \% = CHONed + PCd + 2.25 EEd + FDNd - 7$$

Donde:

CHONed = carbohidratos no estructurales digestibles

PCd = proteína cruda digestible

EEd = extracto etéreo digestible

FDNd = fibra detergente neutro digestible

Fracciones en %

Energía de los ensilajes

Se suele calcular mediante la fórmula siguiente:

$$NDT = 87.84 - (0.7 \times \%FDA) \text{ y } ED = NDT \times 0.04409$$

3.3 Energía Metabolizable (EM)

Se define como la cantidad de energía proveniente del alimento de la que dispone el animal para sus procesos metabólicos y se obtiene de restar a la

ED, la energía perdida en los productos gaseosos de la digestión y la energía perdida en la orina.

$$EM = ED - (Eg + Eu)$$

Las pérdidas de energía en gases corresponden a los procesos de fermentación en el TGI. La pérdida de energía por gases más importante corresponde al metano, que en rumiantes puede estar entre: 7 y 10 % de EB y en cerdos entre 0.1 y 3 %; con una alimentación a base de concentrados la pérdida es mínima.

Pérdidas de energía en orina

Compuesto	% del N total
Urea	80 - 90
Creatinina	3 - 4
NH ₄ ⁺	2.5 - 4.5
Ác.Úrico	1 - 2 (80 %, aves)
AA	1 - 2

Costo energético de la excreción de N:

Urea: EB = 5.50 Mcal/kg

Acido Úrico: EB = 6.70 Mcal/kg

Pérdidas energético en orina:

Rumiantes: 4 - 5 % de EB consumida

Cerdos: 2 - 3 %

Equivalente energético EM/ED

- Rumiantes: 0.82
- Cerdos: 0.96

Corrección por balance de N

- Mamíferos: 7.45 kcal/g de N
- Aves: 8.22 kcal/g de N

3.3.1 Determinación de energía metabolizable en alimentos para animales. El procedimiento evita la separación, física, química o quirúrgica de las heces y la orina como se ha sugerido en otros métodos, ya que esto

involucra gran cantidad de trabajo, además de emplear animales alterados quirúrgicamente.

Animales: Pollos de engorde de un día de edad, los cuales se alimentan de 9 – 10 días con una dieta de iniciación, al final de este periodo se hacen grupos homogéneos de 10 animales, los animales se alojan en criadoras de batería. La dieta sugerida por los autores es semipurificada y debe contener todos los nutrientes requeridos por el pollo. Se adicionó óxido de cromo Cr_2O_3 al 0.2 % de la dieta como indicador externo para evitar la colección cuantitativa de las heces y la medición también cuantitativa del consumo de alimento.

Los animales son alimentados con la dieta problema durante 14 días. En los últimos 4 días se colectan las excretas de cada lote, se congelan y se mezclan. Al cabo del período de colección se acidifican con ácido sulfúrico al 5% con objeto de fijar el nitrógeno y se secan a 60°C en un horno de aire forzado. Moler las heces en un molino de cuchillas.

Se realizarán los siguientes análisis a las heces y al alimento:

- Humedad por secado con estufa de aire forzado o al vacío.
- Nitrógeno por el método Kjeldahl
- Energía combustible determinada en una bomba calorimétrica
- Óxido de cromo determinado espectrofotométricamente.

Los métodos de humedad o análisis de humedad y nitrógeno se describen en el capítulo de análisis proximal. Los métodos de energía de combustible y óxido de cromo se describen en este mismo capítulo.

La energía metabolizable fue calculada de los datos analíticos y expresada sobre base seca como sigue:

E dieta = calorías de la energía combustible por gramo de materia seca de dieta (determinando directamente por la bomba calorimétrica).

E excreta = calorías de la energía combustible en excreta por gramo de materia seca de dieta.

$$\text{Calorías por gramo de excreta} \times \frac{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ por gramo de dieta}}{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ por gramo de excreta}}$$

N = Nitrógeno retenido por gramo de materia seca de dieta

$$\text{N por gramo de dieta} - \text{N por gramo de excreta} \times \frac{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ g dieta}}{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ g excretas}}$$

$$\text{EM/g MS de dieta} = E \text{ dieta} - E \text{ excreta} - 8.22 \text{ N}$$

En los cálculos se hace la corrección para balance de nitrógeno positivo con objeto de convertir todos los datos a equilibrio de nitrógeno para comparación. Si se supone que la proteína del tejido al oxidarse, para propósitos de energía, se convierte en ácido úrico como el único producto de excreción, el valor de 8.22 usado es el valor de energía combustible de ácido úrico por gramo de nitrógeno. Aunque esto no es estrictamente correcto debido a que la orina del pollo contiene de 60 a 80% de ácido úrico, además de que se supone que todo el nitrógeno de tejido era convertido a ácido úrico. Sin embargo, el error es pequeño y parece ser la solución más simple.

3.3.2 Método rápido para medir la energía metabolizable de alimentos para animales. Este método determina la energía metabolizable de alimentos para animales. Debido a que este tipo de determinaciones requiere no solo precisión sino además facilidad y rapidez para su ejecución, este método se puede realizar en menos de tres días de recibida la muestra, además que involucra menos trabajo en el laboratorio al no requerir las determinaciones de cromo como en el método original de Hill y Anderson.

Tabla 12. Composición de las dietas para determinación de la energía metabolizable

Ingrediente	%
Glucosa	44.1
Trigo molido	9.0
Pasta de soya	17.5
Caseína cruda	10.5
Gelatina	2.5
Harina de pescado	4.0
Levadura de cerveza	2.5
Suero seco	2.0
Solubles de pescado	1.0
Grasa hidrogenada	2.5
Piedra caliza	2.0
Fosfato de calcio	1.0

NaCl ionizado	0.5
Mezcla mineral 2	0.4
Mezcla vitamínica 2	0.5

1. mg/100 g dieta: K_2HPO_4 220, $MgSO_4$ 120, $MnSO_4$ 30, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 30, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.8, Tiamina 0.3, Riboflavina 0.4, Pantotenato de calcio 1.0, Piridoxina 0.5, Niacina 2.6, Folacina 0.7, Menadiona 0.09, Biotina 0.01, Vitamina B12 0.001, Cloruro de colina 130, Vitamina A 1000 UI, Vitamina D3 100UI, Acetato de alfa tocoferol 2 UI.

- **Animales.** Gallos adultos de por lo menos 6 meses de edad los cuales han sido entrenados para consumir su ración en una hora. El entrenamiento se lleva a cabo en aproximadamente dos semanas, el alimento se proporciona a los animales en comederos especiales que eviten que el alimento se caiga. El alimento se ofrece en intervalo de tiempo cada vez menor; a los 14 días los animales son capaces de consumir de 80 a 110 g de una dieta peletizada o en harina, en una hora y continuar haciéndolo independientemente del alimento ofrecido. El alimento debe peletizarse en frío y los animales deben someterse a ayuno por lo menos 32 horas antes de la prueba.
- **Jaulas.** Deben ser individuales y estarán separadas entre sí lo menos 5 cm. Colocar camisas de metal bajo las jaulas, para evitar que se caiga la excreta fuera de las bandejas de recolección.
- **Dietas.** El autor del método sugiere que el ingrediente en estudio se incluya por lo menos en 50% de la dieta.
La dieta basal consta de maíz 91%, harina de pescado 8%, harina de hueso 1% y un suplemento de vitaminas y minerales. La mayoría de los gallos son alimentados al 100% de la dieta trigo, subproductos de grano y suplementos proteicos se incluyen al 50%, completando con la dieta basal.

Procedimiento

Se proporciona el alimento a los animales en la forma indicada. Se colecta la excreta por 32 horas. Para realizar la recolección, las charolas se cubren con una hoja de plástico tarada. Al final del periodo de recolección se secan las hojas de plástico con su contenido y se secan en estufa de aire

forzado 70 °C (generalmente es suficiente un periodo de secado de 8 – 12 horas) cuando ya estén secas se dejan al aire por tres horas para que se equilibren a la humedad ambiente y se pesan.

Se determina la energía gruesa a las excretas a las dietas usando una bomba calorimétrica.

Nota:

1. Debido a que los animales no ganan apreciablemente durante la prueba se considera que están en equilibrio nitrogenado y no es necesario hacer correcciones para nitrógeno retenido.
2. Por kg de dieta: Vitamina A 5000 UI, Vitamina D3 1000 UI, Cloruro de colina 2000 mg, Niacina 80 mg, DL pantotenato de calcio 40 mg, Piridoxina 20 mg, Tiamina 10 mg, Riboflavina 10 mg, Menadiona 3 mg, Vitamina B12 50 mg, Ethoxiquin 200 mg, Bacitracina cinc 10 mg.

Tabla 13. Dieta 2 - 1

Ingrediente	%
Maíz molido	48.45
Pasta de soya	40.00
Aceite de maíz	3.00
Harina de hueso	5.00
D1 metionina	0.50
NaCl yodado	0.50
MnSO ₄ H ₂ O	0.03
ZnCO ₃	0.02
Mezcla de vitamina 2.	1.50
Cr ₂ O ₃ al 50%	1.00

Garbanzo adicionado al 20, 40 o 60% de esta dieta

Conocida la ED de un alimento, se puede estimar la EM mediante la fórmula que sigue:

$$EM = ED \times 0.82$$

3.4 Energía Neta (EN)

Energía del alimento que efectivamente es utilizado por el animal. Parte de la EM es retenida como producto/s (carne, leche, huevos, etc.) y/o utilizada en las funciones de mantenimiento del organismo.

$$EN(\text{Kcal/kgMS}) = \frac{EM - IC}{MSA}$$

Donde:

- EN = Energía neta
- EM = Energía metabolizable
- IC = Incremento de calórico
- MSA = Materia seca del alimento

IC = (Incremento calórico) se define como el calor que resulta de la ingestión, digestión, metabolismo y excreción de alimentos.

Incluye calor proveniente de:

- Fermentaciones microbianas
- Trabajo:
- Movimiento del TGI
- Acción de enzimas digestivas
- Metabolismo de nutrientes (mantenimiento y síntesis)
- Excreción de productos de desecho

USOS de la EN

- Mantenimiento
- Producción

Eficiencia de transformación de EM en EN

$$k = EN / EM$$

El valor de EN de un alimento para un mismo género y especie animal es variable en función de la etapa fisiológica (mantenimiento, lactación, crecimiento, engorde, etc.) en el cual es utilizada la EM .

Energía Neta para mantenimiento (ENm)

Fracción de la EN consumida destinada a mantener el equilibrio energético del animal.

Comprende la energía destinada a:

- Metabolismo basal
- Termorregulación
- Actividad voluntaria del animal.

Metabolismos basal. Necesidades energéticas de un organismo animal en post-absorción, reposo y ambiente termoneutro. Incluye:

Funciones de servicio que comprenden:

- Trabajo de circulación y respiración
- Trabajo hepático y renal
- Funciones nerviosas
- Funcionamiento de órganos vitales

Funciones de mantenimiento celular

La energía empleada en estos procesos se disipa como calor, siendo en muchas condiciones climáticas, este calor suficiente para mantener la temperatura interna y comprenden:

- Renovación de proteínas y lípidos
- Transporte de iones (Ca y Na, principalmente)

Distribución del costo energético

- Funciones de servicio: 50 – 60 %
- Mantenimiento celular: 40 – 50 %

Metabolismo basal = Producción de calor en ayuno

Es proporcional al Peso Metabólico Corporal

$$PMC = PV0.75$$

Termorregulación:

Se define como la energía destinada a mantener la temperatura corporal

Costo energético en cerdos

0,0055 – 0,007 Mcal EN / KP $V^{0.75}$ / °C/día

(T° por debajo de la TCI)

Costo energético en bovinos,
 $ENm = 0.007 * (20 - T) \text{ Mcal/PV}0.75/\text{día}$

Actividad voluntaria = Energía utilizada para echarse/levantarse, búsqueda e ingestión de alimentos y agua, etc.

Gasto energético relativo al MB en ovejas

Situación		Aumento en ref. al MB
Metabolismo basal	100	
Brete pequeño	116	16%
Alta disponibilidad de pastura	134	34%
Baja disponibilidad y agua lejos (5Km)	172	72%
Terreno escarpado	153	53%

Incremento del costo energético de mantenimiento

General: 10 a 15 % cuando los animales están en pastoreo.

Vacas lecheras en lactación:

10 % en buenas pasturas → 4 Kg leche

20 % en pasturas pobres → 2,6 Kg leche

(NRC, 1988)

Ovinos:

20 a 30 %: pastoreo 1 - 2 hr/día, con buena disponibilidad de pasturas.

50 a 100%: pastoreo 6 - 8 hr/día, con baja disponibilidad de pasturas

Costo energético de la actividad voluntaria (bovinos)

Actividad	cal / Kg PV / hora
Comer	0,55
Rumiar	0,24
Parado	0,12
Caminar:	
Horizontal	0,6 / Km
Vertical	6,45 / Km

Costo energético de la actividad voluntaria en cerdos

Actividad	Costo
Comer	24 - 35 Kcal/kg alimento
Parado	6,5 Kcal/KMC/100 min
Caminar:	1,67 Kcal/KPV/Km

Bovinos

Req. bovinos carne y leche :

ENm = 0.077 Mcal / KPV0.75

Eficiencia en la utilización de la EM del alimento para mantenimiento:

- km = 0.28 q + 0.554 (INRA)
- km = 0.64 (NRC 2000)

Energía Neta para producción (ENp)

Se define como la energía retenida en los tejidos sintetizados

- Incorporados = ganancia de peso
- Exportados: p.ej: producción de leche, huevos, lana

EN para ganancia de peso:

Costo de la ganancia

Proteína: 10.6 Mcal /kg

Grasa. 12.5 Mcal /kg

(tejido magro = 20 - 23 % Proteína)

(tejido adiposo = 80 -95 % Grasa)

- Costo de 1 kg de tejido magro: 5.5 Mcal
- Costo de 1 kg de tejido adiposo: 9.5 Mcal

Bovinos:

Uso de la EM del alimento para ganancia:

- kg = 0.78 q + 0.006

Valor promedio kg = 0.5

ENg (Mcal/kg) = 1.42 EM - 0.174 EM2 + 0.0122 EM3 - 1.65

EN para producción de leche

Bovinos:

E retenida en la leche (Mcal/kg) = 0.0929 x % EE + 0.0547 % PC + 0.192

Uso de la EM para producir leche:

- kl = 0.64

- $kl = 0.6 + 0.24 (q - 0.57)$

Cerdos:

- $kg = 0.60 - 0.7$

Aves

EN para ganancia de peso

- $kg = 0.75 - 0.8$

EN para producción de huevos

Gallinas: $kh = 0.69$

3.5 Fórmulas para el cálculo de energía de raciones para animales

Raciones compuestas (forraje concentrado) $NDT = 93.53 - (1.03 \times FDA)$

Raciones concentradas $NDT = 81.41 - (0.60 \times FB)$

Grano de Millo $NDT = 99.72 - (1.927 \times FDA)$

Granos pequeños $NDT = 4.898 + (EN \times 40.767)$

Energía Neta lactación (Mcal/kg)

Ración Total

$$EN = (NDT \times 0.0245) - 0.12$$

Raciones concentradas

$$EN = (NDT \times 0.0245) - 0.12$$

Grano de Millo

$$EN = [1.036 - (0.0203 \times FDA)] / 0.454$$

Granos pequeños

$$EN = [0.9265 - (0.00793 \times FDA)] / 0.454$$

Energía neta de mantenimiento (ENm) (Mcal/Kg)

$$ENm = [(1.37 \times EM) - (1.12) - (0.137 \times EM^2) + (0.0105 \times EM^3)] \times 0.454$$

Energía neta de ganancia (ENg) (Mcal/Kg)

$$ENg = [(1.2 \times EM) - (1.65) - (0.174 \times EM^2) + (0.0122 \times EM^3)] \times 0.454$$

4

Determinación de minerales

La importancia de los minerales en la alimentación animal es innegable, esto hace necesario que la determinación analítica de los componentes inorgánicos que son de interés usual.

En este caso nos referimos a los macroelementos que representan la fracción más grande del contenido mineral del animal.

La determinación del método Weende de cenizas, como se dijo antes, no es una medida confiable del contenido mineral de un alimento. Se debe más bien determinar cada elemento por proceso específico que permita visualizar la calidad mineral de la sustancia analizada.

Los recursos disponibles en el laboratorio son una condicionante grande que no permite la implementación de métodos más modernos.

4.1 Obtención del extracto de tejido vegetal

- Materiales:
- Erlenmeyer 125 ml
- Pipeta 5 ml
- Plancha de calentamiento
- Embudo de filtración
- Balón aforado 50 ml
- Reactivos:
- Ácido nítrico (grado reactivo)
- Ácido perclórico (grado reactivo)
- Ácido clorhídrico 6N

Procedimiento:

- a. Pesar 0.25 g de tejido vegetal molido y seco en estufa (a 65 °C por 24 horas) y colocar en un Erlenmeyer.

- b. Agregar 3 ml de ácido nítrico (HNO₃) y calentar a baja temperatura (150 °C) en una plancha durante 30 min. Dejar enfriar durante 15 min.
- c. Agregar 2 ml de ácido perclórico y continuar el calentamiento a alta temperatura (220 °C) durante una hora o más, hasta cuando parezcan humos blancos y se obtenga un líquido blanco.
- d. Dejar enfriar y agregar 3 ml de HCl 6 N. Completar el volumen a 50 ml con agua doblemente deionizada o destilada y agitar.

La solución obtenida constituye el extracto del tejido vegetal en el cual se determinan los elementos P, K, Ca, Mg, S y Al.

4.2 Determinación de fósforo

La disponibilidad de fósforo se estima multiplicando la cantidad de elemento extractado durante el análisis por un factor de dilución (FD), los cálculos se hacen en forma de porcentaje, así:

$$P \text{ tejido (\%)} = P \text{ muestra (ppm)} \times FD$$

El factor de dilución FD es 0.2 y se calcula así:

$$FD = \frac{50 \text{ ml sln ext.} \times 20 \text{ ml vol fin}}{1000 \text{ ml sln ext} \times 2 \text{ mlect}} \times \frac{1}{1000 \text{ mg}} \times \frac{100 \text{ g tej. Veg}}{0.25 \text{ g tej. Veg.}} = 0.2$$

Reactivos:

Solución para desarrollo de color:

- a. ((NH₄)₆ Mo₇ O₂₄ 4H₂O)) en 200 ml de agua doblemente de ionizada o destilada. Añadir 1.455 g de tartrato de antimonio y potasio (K (SbO)C₄H₄O₆ ½H₂O)) y disolver. Agregar lentamente y con agitación suave 700 ml de H₂SO₄ concentrado. Enfriar la solución y diluir con agua doblemente de ionizada o destilada a un volumen de un litro.
- b. Solución patrón B. Disolver 132 g de ácido ascórbico (C₆H₆O₆) en agua doblemente de ionizada o destilada. Completar el volumen a 1 lt con la misma agua.

- c. Solución de trabajo. Prepararla en el día, con base en las soluciones patrón A y B, así: tomar 25 ml de la solución A y transferirlos a un vaso de 1 lt, 800 ml B; completar el volumen del vaso con agua doblemente de ionizada o destilada.

Solución estándar con fósforo:

- a. Pesar 0.2195 g de fosfato dehidrogenado de potasio cristalizado (KH_2PO_4), previamente secado durante 1 hora a 105 °C.
- b. Diluir con agua doblemente de ionizada o destilada en un matraz volumétrico de 1 lt y completar el volumen; la solución contendrá 50 ppm de P.
- c. De la solución anterior, tomar alícuotas de 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 y 50.0 ml y diluir cada una de ellas a un volumen de 250 ml con agua doblemente de ionizada o destilada. Así se obtienen soluciones cuya concentración respectiva será de 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 10.0 ppm de P y con ellas se determina la curva patrón para este elemento.

Procedimiento:

- a. Con la ayuda de un diluidor dispensador, llevar simultáneamente 2 ml del extracto de tejido vegetal y 18 ml de la solución de trabajo a tubos calorimétricos. Hacer lo mismo con las soluciones patrón de P (2 ml de solución patrón y 18 ml de solución de trabajo); de esa manera las concentraciones finales de P variarán entre 0.05 y 1.0 ppm.
- b. A los 15 min y hasta las 24 horas después, se pueden leer los porcentajes de transmitancia (T) en un espectrofotómetro, usando una longitud de onda de 660 m. Con estas lecturas se elabora un gráfico en papel semilogarítmico, en el cual ordenada (escala logarítmica) representa los porcentajes de transmitancia y la abscisa (escala ordinaria) representa la concentración de P en ppm. Con este gráfico es posible pasar directamente la lectura del calorímetro a partes por millón de P en la solución, durante el análisis de la muestra.

4.3 Determinación de calcio

$$\text{Ca tejido (\%)} = \text{P muestra (ppm)} \times \text{FD}$$
$$\text{Fd} = 0.2$$

Reactivos

Solución de sodio para evitar interferencia en los extractos al usar el espectrofotómetro. Prepararla así:

Pesar 50.84 g de NaCl y disolver completamente en 200 ml de agua doblemente de ionizada o destilada; completar el volumen a 1 lt para obtener una concentración de 20.000 ppm Na. Tomar 60 ml de esta solución y diluir hasta completar 1 lt.

Procedimiento:

- a. Tomar 2 ml del extracto y diluir con una solución de NaCl hasta un volumen de 20 ml.
- b. Preparar soluciones estándar de Ca de 0, 0.4, 1.0, 3.0 y 5.0 ppm de Ca para usar en la curva patrón. Prepararlas así:

De una solución de 1000 ppm de Ca (preparada comercialmente), tomar 0, 0.1, 2.5, 7.5 y 12.5 ml y diluir a 250 ml con agua doblemente de ionizada o destilada, para obtener estándares de 0, 4, 10, 30 y 50 ppm de Ca.

Al momento de utilizar las soluciones en el espectrofotómetro de absorción atómica, diluirlos nuevamente; se toman 2 ml de cada una de ellas y se llevan a un volumen final de 20 ml agregando la solución de NaCl.

- c. Usando la llama de óxido nitroso-acetileno y los estándares de Ca, leer en un espectrofotómetro de absorción atómica la transmitancia del extracto diluido.

4.4 Determinación de magnesio

$$\text{Mg tejido (\%)} = \text{Mg muestra (ppm)} \times \text{FD}$$
$$\text{FD} = 0.2$$

Procedimiento:

- a. Tomar 2 ml del extracto y diluir con una solución de NaCl hasta un volumen de 20 ml.

- b. Preparar estándares de magnesio de 0, 0.2, 0.5 y 1.5 ppm de magnesio para calibrar el equipo y obtener la curva patrón de mg, así:

De una solución de 500 ppm de Mg preparada comercialmente, tomar 0, 1, 2.5 y 7.5 ml y llevar a un volumen de 250 ml con agua doblemente de ionizada o destilada.

Para utilizar las soluciones obtenidas (0, 2, 5 y 15 ppm de Mg) se deben diluir nuevamente tomando 2 ml de cada una de ellas y completando su volumen a 20 ml, con la solución de NaCl.

- c. Usando la llama aire-acetileno y la curva calibrada para Mg, leer directamente la transmitancia en un espectrofotómetro de absorción atómica.

4.5 Determinación de potasio

$$K \text{ tejido (\%)} = K \text{ muestra (ppm)} \times 0.02$$

En donde 0.02 es el factor de dilución (FD) que se calcula así:

50 ml sln.extr. 1 g K 100g tej. vegetal

FD 1000 ml sln.extr. 1000mg K 0.25g tej. Veg.

Procedimiento

- a. Usar el extracto de tejido y el espectrofotómetro de absorción atómica con la llama de aire-acetileno.

- b. Preparar estándares de potasio para la lectura correspondiente, así:

Tomar 10 g de cloruro de potasio (KCl) y secar en estufa a 105 °C durante 1 hora.

Una vez seco y frío el KCl, pesar 1.91 g, disolver y diluir a 1 lt para obtener una solución de 1000 ppm de K.

Tomar de esa solución alícuotas de 0, 2.5, 5.0, 10, 15, 20 y 30 ml, diluyendo en 250 ml de agua doblemente de ionizada o destilada. Las concentraciones finales serán de 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 120 ppm de K, respectivamente.

- c. Leer la transmitancia en el espectrofotómetro de absorción atómica.

4.6. Digestión húmeda de productos alimenticios para análisis de minerales

Aplicación

El método puede aplicarse a todos los tipos de productos alimenticios.

Principio

La materia orgánica se destruye y oxida por la acción del ácido sulfúrico y del ácido nítrico en ebullición.

Reactivos

- Ácido sulfúrico concentrado (peso específico 1.84)
- Ácido nítrico concentrado (peso específico 1.42)
- Líquido para el lavado ácido del material de vidrio
- Diluir 1 a 100 ácido nítrico concentrado en agua.
- Comprobar el contenido en metales de los ácidos. Utilizar reactivos que no contengan más de un mg de metal objeto de determinación por litro.
- Agua. Utilizar agua desmineralizada o destilada de buena calidad.

Aparatos

Lavar todo el material de vidrio con líquido de lavado ácido. Guardar separadamente el material de vidrio destinado a la determinación de metales traza.

Procedimiento:

- Pesar 2 g (si la muestra contiene 10% de agua) o 3 g (si la muestra contiene + de 10% de agua) de muestra homogenizada y transferirla a un matraz de Kjeldahl de 100 ml.
- Añadir 5 ml de ácido nítrico concentrado y mezclar.
- Calentar con precaución hasta que cese la violenta reacción inicial
- Calentar con mayor intensidad hasta que desaparezcan casi todos los vapores nitrosos.
- Continuar añadiendo ácido nítrico gota a gota hasta destruir toda la materia orgánica.

- Calentar hasta que se liberen los humos blancos de sulfúrico
- Preparar un blanco usando las mismas cantidades de los reactivos.
- Para la medida del contenido del elemento seguir las instrucciones dadas para dicho metal.

Nota:

Todas las operaciones deberán efectuarse bajo vitrina de gases con ventilación adecuada y lavado de los gases de salida.

4.7 Determinación de calcio a partir de cenizas

Este elemento por ser el que en mayor cantidad hace parte del organismo animal especialmente en el tejido óseo, además que juega un papel importante en las demás células, es obligado su análisis en el laboratorio.

Para la determinación de calcio en un alimento, es necesario tomar en cuenta que se pueden presentar interferencias con elementos como ácido fosfórico, manganeso, hierro y aluminio.

Para el análisis de calcio, así como se hizo para el fósforo se debe partir de la solución "P" obtenida por la digestión de la muestra original del alimento.

Reactivos

- Ácido nítrico conc.
- Ácido sulfúrico conc.
- Solución de HCl en agua (1+3)
- Solución de NH_4 en agua (1+1)
- Solución diluida NH_4OH en agua (1+50)
- Solución acuosa de oxalato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, al 4.2%
- Solución 0.05 o 0.10 N de KMnO_4
- Indicador de rojo de metilo al 0.5% en etanol

Preparación de la muestra

Pesar con exactitud aproximadamente 2.5 g de muestra en crisol de porcelana o sílice y calcinar a 550 °C durante 2 horas (el residuo de la determinación de cenizas puede usarse para esta determinación). Añadir

40 ml HCl (1+3) y unas gotas de HNO₃ calentar a ebullición, transferir a matraz volumétrico de 100 ml, enfriar, aforar con agua homogenizar.

Procedimiento:

- Transferir 50 ml de la solución de la muestra a un vaso precipitado de 250 ml, añadir 2 gotas de rojo de metilo y NH₄OH (1+1) gota a gota hasta llegar a alcanzar un pH de 5.6 indicando por un color café-naranja. Añadir entonces dos o tres gotas de HCl (1+3) a modo de que el indicador vire al rosa (pH 2.5 – 3.0).
- Diluir aproximadamente a 150 ml, calentar a ebullición y añadir lentamente y con agitación constante 10 ml de solución de oxalato de amonio, si el indicador vira al anaranjado o amarillo añadir HCl (1+3) hasta obtener el color rosado.
- Dejar reposar durante la noche o 1 – 2 horas en baño maría a modo de que sedimente el precipitado de oxalato de calcio.
- Filtrar el precipitado a través de papel filtro retentivo, asbestos o filtro de vidrio poroso y lavar el precipitado repetidamente con NH₄OH (1+50).
- Colocar el papel o crisol con el precipitado con el vaso original y añadir una mezcla de 125 ml de agua y 5 ml de H₂SO₄.
- Calentar a unos 70 °C y titular con la solución de KMnO₄ hasta alcanzar un color rosado. Pero la presencia de papel puede decolorar la solución en unos cuantos segundos.
- Corregir por determinación en blanco y calcular por ciento Ca. 1 ml de solución de KMnO₄ 0.05 N equivale a 1 mg de calcio.

Nota: Debe evitarse el calentamiento demasiado rápido puesto que algunas sales funden y absorben carbono que luego es difícil de quemar. El uso de una temperatura excesivamente alta también puede determinar pérdidas de sales volátiles como cloruro de sodio y de hierro.

4.8 Determinación de fósforo

- El fósforo presente en organismos animales y vegetales, hace gran parte de un número de compuestos diversos, en parte como fosfato inorgánico puro, pero la mayor cantidad hace parte de compuestos de naturaleza orgánica.
- A pesar de que todos los compuestos contienen el fósforo como ácido ortofosfórico, se requiere frecuentemente un ataque químico fuerte para transformarlo en un compuesto analizable.
- Fósforo total (método colorimétrico)
- Aplicación
- El método puede aplicarse a las cenizas de los productos alimenticios.

Principio

El ortofosfato del extracto de las cenizas reacciona con molibdeno amónico en solución ácida para formar ácido fosfomolibdico. Este compuesto es reducido por el ácido ascórbico dando un intenso color azul que se mide colorimétricamente.

Reactivos

- Ácido sulfúrico 5N diluir 140 ml de ácido sulfúrico (peso específico 1.84) a un litro.
- Ácido clorhídrico 3N y 6N.
- Hidróxido sódico 0.3 N disolver 12 g de hidróxido sódico en un litro de agua.
- Solución madre de los reactivos del color, disolver 6g de molibdato amónico y 0.137g de tartrato antimonil potásico ($C_4H_4O_7$, SbK 1/ H_2O) en 400ml de agua. Añadir 500ml de ácido sulfúrico 5N y mezclar, diluir a 1lt con agua y volver a mezclar. Almacenar.
- Solución de trabajo de los reactivos del color. Añadir 0.53g de ácido ascórbico por cada 100 ml de solución madre de los reactivos del color preciso. Preparar este reactivo fresco cada día.
- Solución patrón de fósforo, desecar fosfato mono potásico (PO_4H_2K) durante dos horas $105^\circ C$, pesar 0.286 g de fosfato mono potásico, disolver en agua y diluir a 100 ml ($2 \text{ mg } PO_4/\text{ml}$).

- Solución patrón de fosfato, diluir 5 ml de la solución anterior a 500 ml con agua (20 ug PO_4 /ml). Esta solución es la de trabajo, la anterior se considera como solución madre.

Equipos

- Dispensador automático de 8 ml
- Espectrofotómetro o colorímetro adecuado para la región de 880 nm
- Cubetas de vidrio de 1 cm de camino óptico.

Procedimiento:

Cenizas obtenidas por incineración seca.

- Tratar las cenizas con 5 – 10 ml de ácido clorhídrico 6 N para mojarlas completamente y desecarlas con cuidado sobre una placa caliente de baja temperatura.
- Añadir 15 ml de ácido clorhídrico 3N y calentar el crisol sobre la placa caliente hasta que la solución comience justamente a hervir.
- Enfriar y filtrar a través de papel filtro hacia un matraz volumétrico (Nota 1) reteniendo en el crisol la mayor cantidad de sólidos posibles.
- Añadir al crisol 10 ml de ácido clorhídrico 3N y calentar hasta que la solución comience justamente a hervir.
- Enfriar y filtrar hacia un matraz volumétrico de 250 ml
- Lavar el crisol al menos tres veces con agua y filtrar los lavados hacia el matraz.
- Lavar perfectamente el papel del filtro y recoger los lavados en el matraz.
- Enfriar y diluir el contenido del matraz hasta la señal de enrase con agua.

Determinación

- Pipetear una alícuota de los 250 ml de extracto de cenizas hacia un matraz volumétrico de ml. Esta alícuota debe contener menos de 100 ug de fosfato y más de 20 ug.
- Añadir un volumen igual de hidróxido sódico 0.3N para neutralizar la solución.

- Añadir agua hasta alcanzar un volumen total de unos 30 ml.
- Utilizando el dispensador automático añadir 8 ml de solución de trabajo de los reactivos del color.
- Diluir hasta la señal de enrase con agua y mezclar.
- Dejar que el color se desarrolle durante 10 minutos (Nota 1)
- Leer la absorbancia a 882 nm en cubeta de 1 cm.

Estandarización

- Pipetear alícuotas de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ml de la solución de trabajo patrón a matraces volumétricos de 50 ml. Estas soluciones contienen 0, 20, 40, 60, 80 y 100 ug PO₄ por 50 ml.
- Añadir agua hasta llenar el volumen a unos 30 ml
- Continuar como las instrucciones

Cálculos

Construir una curva de calibración representando gráficamente la concentración de los patrones sobre el eje X(g PO₄ x 50 ml) frente a la absorbancia sobre el eje Y.

A partir de la curva de calibración leer la concentración de fosfato de la muestra y del blanco.

Análisis de los nutrientes de los alimentos

Si: Fosfato de la muestra (ug PO₄/50 ml) = a

Fosfato del blanco (ug PO₄/50 ml) = b

Peso (g) de la muestra tomada para el análisis de cenizas = w

Alícuota (ml) tomada para el análisis = v

Entonces: $\text{Contenido de fosfato (\% PO}_4^{3-}) = \frac{0.025 \times (a - b)}{W \times v}$

$\text{Contenido de fósforo (\%P)} = \frac{0.00815 \times (a - b)}{W \times v}$

Nota: El color es estable durante varias horas.
Fósforo (molibdo - vanadato)

Reactivos

- Solución molibdo - vanadato. Disolver 40 g de molibdato de amonio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 (\text{H}_2\text{O})$ en 400 ml de agua caliente y enfriar. Disolver 2 g de metavanadato de amonio (NH_4VO_3) en 250 ml de agua caliente, enfriar y añadir 450 ml de HClO_4 al 70%. Añadir gradualmente y con agitación constante la solución de molibdato sobre la de vanadato y finalmente, diluir a dos litros.
- Solución estándar de fósforo. Disolver 8.788 g de KH_2PO_4 en agua y diluir a 1 litro (1 ml = 2 mg P). Diluir 50 ml de esta solución a 1 lt (1 ml = 0.1 mg P).

Preparación de la curva patrón

- Transferir a matraces volumétricos de 100 ml alícuotas de la solución estándar de fósforo que contengan 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1.0 y 1.5 mg de P.
- Añadir 20 ml de la solución de molibdo - vanadato, aforar con agua a 100 ml y homogenizar. Dejar reposar 10 minutos y determinar D.O a 400 nm en un espectrofotómetro.
- Preparar una gráfica en papel milimétrico que relacione mg de P con D.O, calcular la ecuación de la línea recta.

Determinación

- Pesar en un crisol 2 g de muestra e incinerar a 600 °C durante 4 horas.
- Dejar enfriar, añadir 40 ml HCl (1 + 3), varias gotas de HNO_3 concentrado y calentar hasta ebullición.
- Dejar enfriar, transferir a matraz volumétrico de 200 ml y aforar con agua hasta la marca.
- Filtrar, transferir una alícuota que contenga 0.1 a 1.0 mg P a un matraz volumétrico de 100 ml y proceder como se indicó en el segundo punto en la parte de "preparación de la curva patrón".

4.9. Determinación de magnesio

Este elemento se encuentra asociado íntimamente con el calcio y el fósforo tanto en su distribución como en el metabolismo. La mayor porción de magnesio está haciendo parte del esqueleto y la restante integra los líquidos y tejidos blandos del cuerpo. La determinación de este elemento está muy relacionada en el laboratorio con el calcio y generalmente los dos análisis se hacen para agilizarlos.

Material y equipos

- Bureta con graduación de 0.01 ml
- Planchas para agitación
- Agitadores magnéticos
- Los demás utilizados para fósforo

Reactivos

- Cloruro de amonio
- Hidróxido de amonio
- Hidróxido de sodio
- Carbonato de calcio
- Ácido clorhídrico
- Indicador negro de Eriocromo T.
- Clorhidrato de Hidroxilamina
- Alcohol de 95 °C
- Púrpura de amonio (Murexida)
- Sulfato de potasio anhidro
- Dreitilditrocarbamato de sodio
- Cloruro de magnesio hexahidratado
- EDTA

Soluciones

a. Solución reguladora para pH 10

Pesar 67.5 g de NH_4Cl en 750 ml de NH_4OH concentrado, llevar con agua a 1 litro.

b. Hidróxido de sodio 6N

Disolver 240.48 g de NaOH 100% en un litro de agua.

c. Patrón 0.01N de Ca y Mg en medio clorhídrico

Disolver 0.5004 g de CaCO_3 y 0.4216 de MgCO_3 en 10 ml de HCl 3N. Llevar con agua a 1 litro.

d. Indicador negro de Eriocromo T.

Pesar 0.5 g de negro de ericromo T y 4.5 g de clorhidrato de hidroxilamina. Disolver en 100 ml de alcohol de 95.

e. Purpurato de amonio (Murexida)

Pesar 0.5 g de murexida y 100 g de K_2SO_4 anhidro. Pulverizar y mezclar.

f. EDTA sódico Magnésico 0.01N

Disolver 2 g de EDTA sódico en 100 ml de agua destilada, añadir 0.4216 g de MgCO_3 . Tranformar en medio clorhídrico en $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, llevar con agua destilada hasta 1 litro. Valorar con "C"; tener en cuenta que 1 ml de verseno 0.01N equivale a 0.2008 mg de Ca y 0.1216 mg de Mg.

g. Indicador de carbamato

Disolver 1.5 g de solución sódica de "Dietil ditiocarbámico", llevar con agua a 100 ml.

Determinación de factor para magnesio

- Pipetear en un Erlenmeyer de 100 ml 5 ml de solución "C". Agregar 1 ml de solución "A".
- Adicionar 10 ml de agua destilada
- Añadir 5 gotas de solución "C"
- Colocar 3 gotas de solución "D"
- Titular con "F". En el punto final de rosado o violeta pasa a azul o verde.

Cálculos:
$$Fa = \frac{5}{\text{gasto de "F"}}$$

Procedimiento para magnesio

- Pipetear en un Erlenmeyer de 100 ml, 5 ml de solución "P"
- Agregar 1 ml de solución "A"
- Adicionar 20 ml de agua destilada
- Añadir 5 gotas de solución "G"
- Colocar 3 gotas de solución "D"
- Titular con "F". En el punto final de rosado o violeta pasa a azul o verde.

Cálculos

$$\%Mg = \frac{\text{Gasto de "F"} \times 0.02 \times Fa}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

4.10. Metales (Método de Absorción Atómica)

Aplicación

El método puede aplicarse a la determinación de calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio, sodio y cinc en los productos alimenticios.

Principio

Una vez eliminada la materia orgánica por incineración seca o digestión húmeda, el residuo se disuelve en ácido diluido. La solución se pulveriza en la llama de un aparato de absorción atómica y se mide la absorción del metal objeto de análisis a una longitud de onda específica.

Reactivos

- Ácido clorhídrico 6N, 3N y 0.3N
- Cloruro de lantano al 10% P/V
- Agua destilada de buena calidad o deionizada
- Papel del filtro Whatman 541 o Schleicher and Sohul No. 589-1. Lavar los papeles de filtro antes del uso con ácido clorhídrico 3N para eliminar las trazas de metales.

- Solución madre patrones contenido 1.000 mg/l. Pesar las cantidades de reactivos para análisis que se indican en la tabla y disolver las sales en 25 ml de ácido clorhídrico 3N y diluir a 250 ml con agua.
- Soluciones patrones. Disolver la solución madre patrón con agua (si se aplica la digestión húmeda) o ácido clorhídrico 0.3N (si se aplica la incineración en seco) a las concentraciones que caigan dentro del margen de trabajo. Añadir otras sales (si es necesario tal como indica la primera columna de la tabla).
- Patrones de referencia suministrados por J.T Baker Chemical Ltda y Merk Chemicals, Darmstadt. Ambas firmas venden solución o soluciones en ollas que contienen una unidad exacta de peso de una especie iónica. Estas soluciones pueden diluirse a un volumen definido.

Equipo

Aparato de absorción atómica. El instrumento requiere calibración con patrones definidos para cada serie de determinaciones de cada elemento.

Material de vidrio especial para análisis de metales traza. Todo el material de vidrio debe lavarse perfectamente con ácido nítrico diluido antes del uso. Mantener el material utilizado para análisis de metales traza separado de otro material de vidrio de uso general.

Tabla 14. Patrones de referencia

Metal	Reactivo	Peso de reactivo(g) Por 250 ml de sol.
Calcio	CO ₃ Ca (seco)	0.624
Cobre	SO ₄ Cu 5H ₂ O	0.981
Hierro	(SO ₄) ₃ Fe ₂ SO ₄ (NH ₄) ₂ .24H ₂ O	2.158
Magnesio	SO ₄ Mg.7H ₂ O	2.530
Manganeso	SO ₄ Mn.4H ₂ O	1.015
Potasio	ClK (desecado 2 hrs a 105 °C)	0.476
Sodio	ClNa(desecado 2 hrs a 105 °C)	0.636
Cinc	SO ₄ Zn.7H ₂ O	1.100

Soluciones obtenidas por digestión húmeda

1. Transferir el contenido a un matraz volumétrico (Nota 1)
2. Diluir hasta la señal de enrase con agua y mezclar perfectamente

Tabla 15. Condiciones recomendadas para el análisis de metales

Elemento	Longitud de onda	Absorción (A) Emisión (E)	Límite de Detección (ug metal/ml) *	Rango de trabajo (ug metal/ml) *
Ca (+0.5%ClLa)	422.7	A	0.01	0.05 - 5
Cu	324.8	A	0.005	0.05 - 5
Fe	248.3	A	0.03	0.05 - 5
Mg	285.2	A	0.001	0.02-2 (0.5)+
Mn	299.5	A	0.005	0.2 - 5 (3)
K (+1000 ugNa/ml)	766.5	A	0.002	0.1 - 5 (2)
K (+1000 ugNa/ml)	766.5	E	0.002	1 - 20
Na (+1000 ugK/ml)	589.0	A	0.002	0.1 - 5 (1)
Na (+1000 ugK/ml)	589.0	E	0.002	1 - 20
Zinc	231.9	A	0.004	0.1 - 2(1)

* Con una expansión de escala de 10 veces. Estas cifras solamente son indicativas puesto que dependen del aparato y condiciones.

+ Los valores entre paréntesis indican que la curva de calibración es lineal hasta dicho valor. Cenizas obtenidas por incineración seca.

1. Tratar las cenizas con 5 - 10 ml de ácido clorhídrico 6N hasta mojarlas totalmente y a continuación desecarlas cuidadosamente sobre placa caliente a temperatura moderada.
2. Añadir 15 ml de ácido clorhídrico 3N y calentar el crisol sobre la placa caliente hasta que la solución comience justamente a hervir.
3. Enfriar y filtrar a través de papel de filtro hacia un matraz volumétrico (Nota 1) reteniendo en el crisol, la mayor cantidad posible de sólidos.
4. Añadir 10 ml de ácido clorhídrico 3N al crisol y calentar hasta que la solución comience justamente a hervir.
5. Enfriar y filtrar hacia el matraz volumétrico.
6. Lavar el crisol por lo menos 3 veces con agua y filtrar los lavados hacia el matraz.

7. Lavar perfectamente el papel del filtro y recoger los lavados en el matraz.
8. Si se va a determinar calcio, añadir 5 ml de solución de cloruro de lantano por 100 ml de solución.
9. Enfriar y diluir el contenido del matraz hasta la señal de enrase con agua.
10. Preparar en blanco tomando las mismas cantidades de reactivos indicados en las instrucciones 1 – 9.

Calibración del aparato y medida de las muestras

1. Poner en marcha el aparato de acuerdo con las instrucciones.
2. Medir las soluciones de calibración y la solución en blanco de los reactivos.
3. Mientras se están midiendo las muestras comprobar periódicamente que los valores de calibración permanecen constantes.
4. Para los metales objeto de análisis preparar una curva de calibración representando gráficamente los valores de absorción o emisión frente a la concentración del metal en ug/ml.

Cálculos

A partir de la gráfica leer la concentración del metal (ug/ml) que corresponde a los valores de absorción o emisión de las muestras y blanco.

Sí: Peso g de las muestras = W

Volumen (ml) de extracto = V

Concentración de (ug/ml) de la solución de la muestra problema = a

La solución en blanco = b

Entonces: Contenido del metal (mg/100 g) = $(a - b) \times V / 10W$

ó (mg/1000g) = $(a - b) \times V / W$

Nota: Elegir un matraz volumétrico con capacidad adecuada para que la concentración del metal en la solución final se encuentre dentro del margen de trabajo.

4.11. Sodio y Potasio (Método de Fotometría de Llama)

Reactivos

- Ácido nítrico. Preparar una dilución 1:1 de ácido nítrico (peso específico 1.42) con agua.
- Papel de filtro de 9 y 12.5 cm de diámetro Scheincher and Schull No.589 -1.
- Líquido de lavado de ácido para el material de vidrio. Diluir ácido nítrico a 100 ml con agua destilada.
- Agua destilada de buena calidad o agua deionizada.
- Solución madre de sodio conteniendo 100 mgNa/lit, desecar cloruro sódico a 105°C durante dos horas. Pesar 254.2 mg de producto seco, disolverlo en agua y diluir a 1000 ml. Almacenar esta solución en botella de polietileno.
- Patrón madre de potasio conteniendo 100 mg K/lit. Desecar cloruro potásico a 105 °C durante dos horas. Pesar 190.7 mg de producto seco, disolverlo en agua y diluir a 1000 ml. Almacenar esta solución en botella de polietileno.
- Solución diluida de potasio. Pesar 3.8 g de cloruro potásico, disolverlos en agua a un litro.
- Soluciones de trabajo patrón sodio. Pipetear 0.5, 10, 15 y 20 ml de solución madre de sodio a matraces volumétricos de 100 ml. Añadir 5 ml de solución diluida de potasio a cada matraz y diluir hasta la señal de enrase con agua. Estas soluciones contienen 0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg de sodio por 100 ml respectivamente.

- Soluciones de trabajo patrón de potasio, pipetear 0.5, 10, 15 y 20 ml de solución madre de potasio a matraces volumétricos de 100 ml y diluir hasta señal de enrase con agua. Estas soluciones contienen 0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg de potasio por 100ml respectivamente.

Equipos

- Fotómetro de filtro de llama o espectrofotómetro de emisión de llama.
- Material de vidrio especial para análisis de metales traza. Lavar todo el material perfectamente antes del uso con ácido nítrico o diluido y seguidamente con agua destilada de buena calidad o agua deionizada.

Procedimiento

Preparación de la muestra.

1. Pesar el mg más próximo 2 g de muestra sobre un papel de filtro (de 9 cm de diámetro).
2. Plegar el papel de filtro y transferirlo a un matraz de Kjeldahl de 250 ml.
3. Añadir 20 ml de ácido nítrico diluido 1:1
4. Hervir suavemente durante unos diez minutos y enfriar a temperatura ambiente.
5. Filtrar la solución digerida a través de papel de filtro (de 12.5 cm de diámetro) hacia un matraz volumétrico de 100 ml. Lavar el matraz de Kjeldahl y el papel de filtro tres veces, cada una con 10 ml de agua.
6. Diluir 100 ml y mezclar (solución A)
7. Preparar un blanco comenzando a partir de la instrucción 2 (solución B).

Dilución de la solución para la determinación de sodio:

1. Pipetear 5 ml de la solución A y B a un matraz volumétrico de 100 ml, diluir hasta la señal de enrase y mezclar (solución E y F).

Medida

1. Medir el sodio y el potasio de las soluciones patrón utilizando los filtros adecuados. En caso de usar espectrofotómetro medir a las longitudes de onda de 589.0 nm y 766.5 nm.
2. Corregir los valores obtenidos para la concentración cero de los patrones.
3. Medir las soluciones C y D para el sodio y las soluciones E y F para el potasio.

Cálculos

Preparar una gráfica de calibración para el sodio y el potasio.

Leer las concentraciones (mg/100ml) de las soluciones C, D, E y F a partir de la gráfica de calibración.

Sí: Las concentraciones (mg/100ml) son c, d, e y f
Respectivamente, peso g de la muestra = W

Entonces: Contenido de sodio (mg/100g) de producto = $(c-d) \times 200/w$
Contenido de potasio (mg/100g) de producto = $(e-f) \times 2000/w$

Nota: Sin la adición del potasio al patrón de sodio, los resultados para el sodio pueden ser demasiado altos. Esto es causado por el efecto inter elemento del potasio, presente en el producto, sobre el sodio.

Las adiciones de excesos de potasio al patrón y la muestra iguala este efecto. El efecto depende de la temperatura de la llama. La llama de acetileno-aire produce una mayor desviación que la llama de gas natural-aire.

4.12 Cloruros (Método rápido de Volhard)

Principio

Los cloruros se precipitan con un exceso de nitrato de plata y la materia orgánica se oxida seguidamente con permanganato potásico en solución ácida. El exceso de permanganato se descompone con sacarosa. El nitrato de plata no utilizado se determina por titulación tiocianato. El contenido de cloruro sódico se calcula a partir de la cantidad de nitrato de plata utilizada.

Reactivos

- Reactivo de ácido nítrico. Diluir ácido nítrico concentrado (peso específico 1.42) con un cuarto de su volumen de agua.
- Solución de nitrato de plata 0.05N
- Solución de tiocianato potásico o amónico 0.05N estandarizada.
- Solución de sulfato amónico férrico al 5% p/v en ácido nítrico al 10%
- Solución acuosa saturada de permanganato potásico.
- Acetona
- Sacarosa
- Urea

Procedimiento

1. Pesar una cantidad adecuada de muestra que contenga 30 – 50 mg de cloruro sódico.
2. Transferirla a un Erlenmeyer de 250 ml y añadir 30 ml de agua destilada y dos perlas de vidrio.
3. Calentar matraz y contenido y añadir con pipeta 25 ml de solución de nitrato de plata.
4. Añadir 10 ml de reactivo de ácido nítrico
5. Hervir suavemente en vitrina de gases durante 5 minutos

6. Enfriar a unos 80 °C y añadir con precaución un ligero exceso de permanganato de la solución.
7. Hervir suavemente hasta desaparición de color marrón o rosa
8. Añadir 0.5 ml de permanganato y hervir nuevamente
9. Repetir este tratamiento hasta que la solución no se decolore tras ebullición durante 5 minutos
10. Añadir pequeñas cantidades de sacarosa y hervir hasta que la solución sea incolora
11. Enfriar durante 30 segundos. Añadir aproximadamente 0.1 g de urea y enfriar durante 10 minutos bajo chorro de agua caliente.
12. Añadir 5 ml de acetona y 2 ml de indicador de sulfato amónico férrico.
13. Titular con solución de tiocianato hasta punto final rosa
14. Realizar una determinación en blanco omitiendo la muestra.

Cálculos

Sí: Peso (g) de la muestra tomada	= w
Vol (ml) de tiocianato gastado	= V1
Vol (ml) de tiocianato gastado por el blanco	= V2
Normalidad del tiocianato	= N

Entonces:

$$\text{Cloruro sódico (mg/100g)} = \frac{(V2 - V1) \times N \times 5850}{W}$$

4.13. Determinación de micronutrientes (Zn, Cu, Mn y Fe, Na y S) Metodología

La digestión con HNO₃, HClO₄ tiene las siguientes características:

- 1) No se presentan pérdidas de elementos por volatilización, a excepción de B y Cl, porque la temperatura no excede el punto de ebullición del HClO₄ (203 oC).

2) Se produce la absorción de elementos metálicos en sílice (lo que se observa en la incineración a 500-600 ° C). Por ello es ampliamente utilizado para extracción de Zn, Cu, Fe, Mn y S del tejido vegetal y otros materiales (compost, abonos, animales y desechos de plantas, etc.). Otros macronutrientes (P, K, Ca y Mg) y metales pesados (Pb, Ni, Cd, Cr, etc.), también pueden ser determinados en el extracto

La concentración de micronutrientes en las plantas, por lo general es menor de 20 mg/kg⁻¹ para el cobre, entre 10 y 100 mg/kg⁻¹ para el de zinc, entre 20 y 1.000 mg/kg⁻¹ de manganeso y entre 20 y 1.000 mg/kg⁻¹ para el hierro. EL sodio puede variar entre 10 y 200 mg/kg⁻¹ (en suelos salinos los niveles son más altos). El contenido de S es compatible al de P, variando entre 0.05 a 1.2%.

En el procedimiento adoptado, la cantidad de HNO₃, HClO₄ recomendada se debe reducir tanto como sea posible, para acelerar la digestión y mantener una concentración de HClO₄ de aproximadamente 0, 5M en el extracto (después de la dilución de 20 ml, suponiendo que no hay pérdida de ácido), compatible con la lectura directa en fotómetro de absorción con nebulizador especial (para evitar la corrosión).

Para evitar la pérdida de HClO₄ (y extracto seco) es apropiado usar un pequeño embudo para tapar los tubos de digestión y así facilitar la condensación de ácido y su goteo por las paredes del tubo. Este procedimiento permite lavar las paredes de los residuos que se adhieren durante la digestión con HNO₃ y evitar que las mismas se sequen, lo que puede provocar la pérdida de S, As y P.

En este procedimiento, el extracto se deja reposar para decantación del sílice (y la fracción mineral), determinar los elementos metálico en el extracto por fotometría de llama absorción o emisión, después de la dilución adecuada. El S se determina por turbidimetría.

Material y equipos

- a) Digestor para tubos de digestión de 25 x 250 mm, con temperatura ajustable hasta 300 °C
- b) Embudo para depositar el tejido en el fondo del tubo de digestión (barilla de 18 mm de diámetro y longitud de 20 cm)

- c) Condensador de 30 mm de diámetro en la parte más ancha, 45 mm de largo y 5 mm de diámetro exterior del vástago
- d) Fotómetro absorción atómica
- e) Fotómetro de llama
- f) Colorímetro (UV-visible) o turbidímetro
- g) Campana de extracción

Reactivos

- a) cobre (Cu)
- b) zinc (Zn)
- c) hierro (Fe)
- d) manganeso (Mn)
- y) sodio (Na)
- f) cloruro de sodio (NaCl)
- g) Ácido nítrico concentrado (65%; d = 1,40)
- h) Ácido perclórico, concentrado (70%; d = 1.67)
- l) Sulfato de potasio anhidro

Patrón de Cu de 1.000 mg L⁻¹

- a) pesar 1000 g de Cu metálico
- b) disolver con 20 ml de HNO₃ al 50%
- c) diluir a 1 litro con HCl 0, 1M

Patrón de Zn de 1000 mg L⁻¹

- a) pesar de 1000 g Zn metálico
- b) disolver con 20 ml de HNO₃ al 50%
- c) diluir a 1 litro

Patrón de Fe, Mn y Na

- a) Pesar 0.60 g de Fe y 0,450 g de Mn metálicos
- b) Disolver en 20 ml de HNO₃ 50%, con matraz aforado de 500 ml

- c) Agregar aproximadamente 300 ml de agua destilada o desionizada
- d) Añadir 1,524 g NaCl (seco a 105 oC durante 2 horas) y completar el volumen
- f) Esta solución tiene 1.200 mg/L⁻¹ de Fe, 900 mg/L⁻¹ de Mn y 1.200 mg/L⁻¹ de Na

Dilución estándar

- a) Disolver 7,175 g K₂SO₄ (seco a 105 oC durante 2 horas) en aproximadamente 300 ml de agua destilada y hacer completar con agua desionizada en un matraz aforado de 1000 ml
- b) Añadir 40 ml de solución patrón de Cu (1.000 mg/L⁻¹ Cu), 24 ml de la solución patrón de Zn (1.000 mg/L⁻¹ Zn) y 200 ml de solución patrón de Fe, Mn y Na
- c) Conforman al volumen
- d) Esta solución contiene 40 mg/L⁻¹ de Cu, 24 mg/L⁻¹ de Zn, 240 mg/L⁻¹ de Fe, 180 mg/L⁻¹ de Mn, 240 mg/L⁻¹ de Na y 1.320 mg/L⁻¹ de S

Gel de BaCl₂

- a) Disolver 0.6 g de gelatina (se puede utilizar el producto comercial incoloro) en 200 ml de agua destilada o desionizada, calentada a 60-70 °C
- b) Poner en la nevera (- 4 °C) durante 16-18 horas
- c) Llevar a temperatura ambiente (20-25 °C)
- d) Agregar 2,0 g de BaCl₂ en esta solución y agitar hasta completar la disolución
- e) Esta solución debe guardarse en el refrigerador a una temperatura entre 4-8 °C (sigue siendo estable por aproximadamente 10 días)
- f) Antes de usar, llevar a temperatura ambiente y agitar

Procedimiento

Digestión de las muestras

- a) Pesar 1.000 g de muestra y poner en tubos de digestión (los tubos se deben marcar a 20 ml. usar embudo de tallo largo)
- b) Añadir 6,0 ml de HNO_3 concentrado
- c) Dejar en reposo hasta el día siguiente (en la campana)
- d) Agitar manualmente cada tubo (evitar que la mezcla se adhiera a las paredes del tubo)
- e) Calentar de 80-90 °C durante 30 minutos
- f) Aumentar la temperatura a 120 °C (desprende vapores fuertes de óxidos de nitrógeno del HNO_3 , color marrón)
- g) Mantener esta temperatura hasta llegar a 0,5 ml de -1,0 de ácido (retirar los tubos que tienden a secarse)
- h) Deje que se enfríe durante 10 minutos (sobre una tabla de madera)
- i) Añadir 1.0 ml HClO_4 concentrado
- j) Calentar a 180-190 °C (desprende vapores fuertes de óxidos de nitrógeno del HNO_3 restante)
- k) Al inicial el desprendimiento de vapor del HClO_4 (blanco), colocar los embudos de 30 mm de diámetro sobre los tubos de digestión (para evitar la pérdida de HClO_4 y secado del material)
- l) Mantiene a esta temperatura durante 2 horas
- m) Dejar enfriar y añadir aproximadamente 5 ml de agua destilada (hay formación de calor cristales)
- n) Ajustar el volumen a 20 ml con agua destilada (concentración final del ácido es de 0,57M)
- o) Homogeneizar cada tubo manualmente
- p) Dejar decantar hasta el día siguiente

Nota:

- a) Para las curvas patrón usar para medición microburetas de 0.0-0.5-2.5 y 4.0 ml de la mezcla patrón para la digestión, siguiendo el procedimiento descrito desde el inicio del procedimiento. Después de la dilución a 20 ml, se tendrá en cuenta los valores citados en la tabla siguiente:

Tabla 16. Diluciones para 20 ml de muestra digerida

ml de patrón	0.0	0.5	1.0	1.5	2.5	4.0
Contenido de Cu (mg/L ⁻¹)	0.0	1.0	2,0	3,0	5,0	8,0
Contenido de Zn (mg/L ⁻¹)	0.0	0.6	1,2	1,8	3,0	4,8
Contenido de Fe (mg/L ⁻¹)	0.0	6.0	12,0	18,0	30,0	48,0
Contenido de Mn (mg/L ⁻¹)	0.0	4.5	9,0	13,5	22,5	36,0
Contenido de Na (mg/L ⁻¹)	0.0	6.0	12,0	18,0	30,0	48,0
Contenido de S (mg/L ⁻¹)	0.0	33.0	66,0	99,0	165,0	264,0

- b) Con las diluciones y los métodos de determinación descritos antes, las concentraciones finales serán (sin dilución para Cu, dilución de 3x para Zn, Fe, Mn e Na y dilución de 11x para S).
- c) En el trabajo cotidiano, no es necesario repetir las curvas patrón para cada lote, solamente se requiere un blanco y 2 patrones.

Tabla 17. Concentraciones finales

Contenido de Cu (mg/L ⁻¹)	0.0	1,0	2,0	3,0	5,0	8,0
Contenido de Zn (mg/L ⁻¹)	0.0	0,2	0,4	0,6	1,0	1,6
Contenido de Fe (mg/L ⁻¹)	0.0	2,0	4,0	6,0	10,0	16,0
Contenido de Mn (mg/L ⁻¹)	0.0	1,5	3,0	4,5	7,5	12,0
Contenido de Na (mg/L ⁻¹)	0.0	2,0	4,0	6,0	10,0	16,0
Contenido de S (mg/L ⁻¹)	0.0	3,0	6,0	9,0	15,0	24,0

4.13.1 Determinación de azufre

- Pipetear 1.0 ml de sobrenadante
- Añadir 10 ml de HCl 0,1M
- Añadir 1,0 ml de solución de gel BaCl₂. agitar unos segundos
- Dejar reposar durante 30 minutos
- Agitar nuevamente y determinar la absorbancia a 440 nm en el fotómetro (lea entre 30 y 60 minutos después de la adición del gel)

Cálculos

Para esto se debe tener en cuenta:

- Curva patrón de S
- Factor de concentración: determinado por la curva patrón

Factor de concentración = 0,0265 mg/L⁻¹ por mil absorbancias

- Factor de dilución

$$FD = \frac{20}{1} \times \frac{11}{1} = 220$$

- Contenido de S

$$S (\%) = \frac{L \times FC \times FD}{10.000}$$

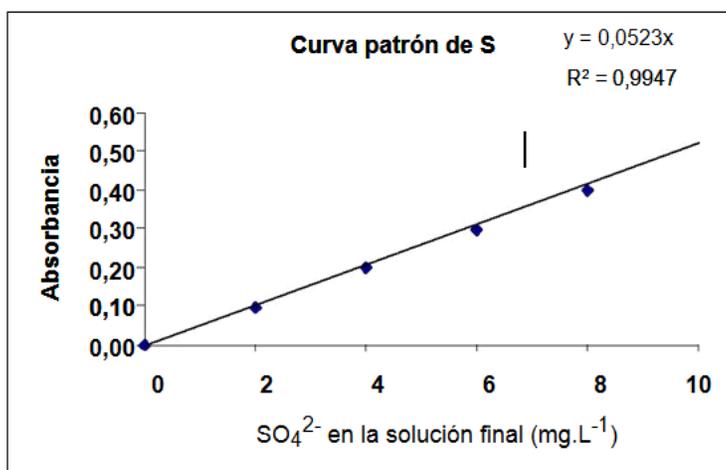


Figura 1. Curva patrón de S

Donde:

L = lectura

FC = factor de concentración

FD = factor de dilución

4.13.2. Determinación de cobre, zinc, hierro, manganeso y sodio

- Pipetear 10 ml de sobrenadante
- Determinar la absorción de Cu en el fotómetro de absorción
- Pipetear 5,0 ml del resto de la solución y añadir 10 ml de agua destilada
- Determinar las absorbancias de Zn, Fe y Mn en el fotómetro de absorción
- Determinar la emisión de Na en el fotómetro de llama (ajustar el fotómetro con los patrones convenientes).

Comentarios

- Las muestras con altos niveles) deben diluirse apropiadamente con el extracto de la prueba del blanco.
- Para el Cu, la sensibilidad (absorbancia = 0,002) es aproximadamente de 0,057 mg/L⁻¹ en la solución de lectura (factor de concentración

hasta el punto $4,0 \text{ mg/L}^{-1}$ en la curva del elemento, o $1,14 \text{ mg/kg}^{-1}$ en la muestra (dilución al 20 x). Concentraciones de hasta 120 mg/kg^{-1} en la muestra, puede determinarse por el procedimiento descrito, sin necesidad de otra dilución.

- c) Para el Zn, la sensibilidad (absorbancia = 0,002) es aproximadamente $0,016 \text{ mg/L}^{-1}$ en la solución (factor de concentración hasta el punto $1,0 \text{ mg/L}^{-1}$ en la curva del elemento, o $0,98 \text{ mg/kg}^{-1}$ en la muestra (dilución al 60 x). Concentraciones de hasta 95 mg/kg^{-1} en la muestra pueden ser determinadas por el procedimiento descrito, sin otra dilución.
- d) Para el Fe, la sensibilidad (absorbancia = 0,002) es aproximadamente $0,06 \text{ mg/L}^{-1}$ en la solución de lectura (factor de concentración a $2,0 \text{ mg/L}^{-1}$ en la curva del elemento) o $3,60 \text{ mg/kg}^{-1}$ en la muestra (dilución al 60 x). Concentraciones de hasta 365 mg/kg^{-1} en la muestra pueden ser determinadas por el procedimiento descrito, sin otra dilución.
- e) Para el Mn, la sensibilidad (absorbancia = 0,002) es aproximadamente $0,045 \text{ mg/L}^{-1}$ en solución de la lectura (factor de concentración de $1,0 \text{ mg/L}^{-1}$ en la curva del elemento), o $2,70 \text{ mg/kg}^{-1}$ en la muestra (dilución de 60 x). Concentraciones de hasta 140 mg/kg^{-1} en la muestra, pueden determinarse por el procedimiento descrito, sin otra dilución.
- f) En la determinación de Na, el fotómetro de llama se puede ajustar para registrar 80 nm con el patrón predeterminado de 4 mg/L^{-1} en la solución de lectura. La sensibilidad en este caso (para la lectura de una unidad) es de aproximadamente $0,05 \text{ mg/L}^{-1}$ en la solución de lectura o $3,0 \text{ mg/kg}^{-1}$ en la muestra (dilución de 60 x). Concentraciones de 300 a 600 mg/kg^{-1} en muestras pueden determinarse por el procedimiento descrito, sin otra dilución (determinar el contenido de Na en la solución con la curva).
- g) Para lectura directa de los niveles de Cu, Zn, Fe y Mn en la muestra, ajuste el fotómetro de absorción para obtener valores de 40 mg/kg^{-1} de Cu, 24 mg/kg^{-1} de Zn, 240 mg/kg^{-1} de Fe y de 180 mg/kg^{-1} de Mn, con un ml de extracto de la mezcla patrón, diluido como muestras (cuya concentración final es de 2 mg/L^{-1} de Cu, $0,4 \text{ mg/L}^{-1}$ de Zn, 4 mg/L^{-1} de Fe y 3 mg/L^{-1} de Mn.

Cálculos

Determinación de Cobre

a) Curva patrón de Cu

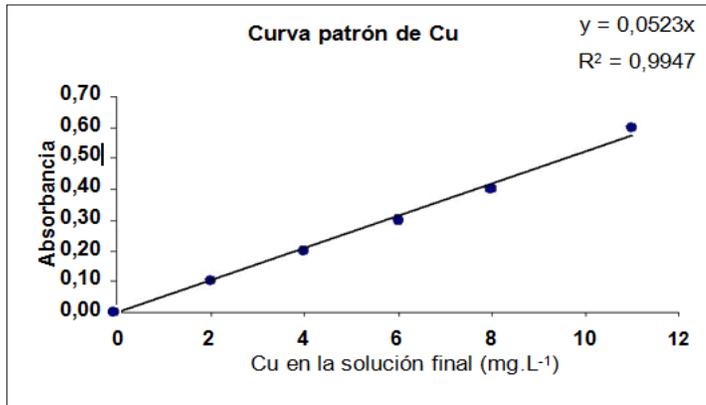


Figura 2. Curva patrón de Cu

b) Factor de concentración: determinado por la curva patrón

Factor de concentración = 0,0288 mg/L⁻¹ por mil absorbancia

c) Factor de dilución

$$FD = \frac{20}{1} = 20$$

d) Contenido de cobre

$$Cu \text{ (mg/kg}^{-1}\text{)} = L \times FC \times FD$$

Donde:

Cu = Contenido (mg/kg⁻¹)

L = Lectura

FC = Factor de concentración

FD = Factor de dilución

Determinación de Zinc

a) Curva patrón de Zn

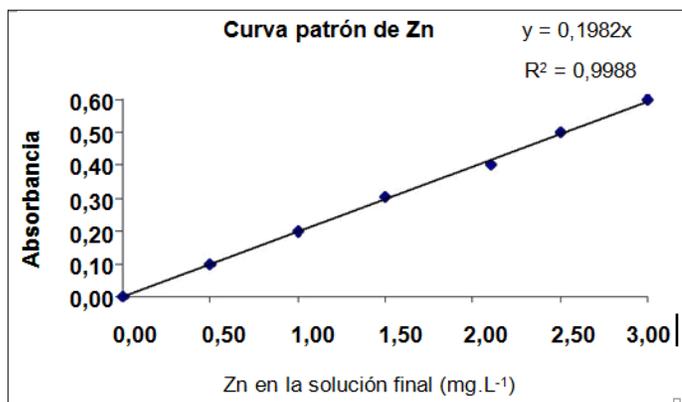


Figura 3. Curva patrón de Zn

b) Factor de concentración: determinado por la curva patrón

Factor de concentración = 0,00820 mg/L⁻¹ por mil absorbancias

c) Factor de dilución

$$FD = \frac{20}{1} \times \frac{15}{5} = 60$$

d) Contenido de Zinc

$$Zn \text{ (mg/kg}^{-1}\text{)} = L \times FC \times FD$$

Donde:

Zn = Contenido (mg/kg⁻¹)

L = Lectura

FC = Factor de concentración

FD = Factor de dilución

Determinación de Hierro

a) Curva patrón de Fe

b) Factor de concentración: determinado por la curva patrón

Factor de concentración = $0,00820 \text{ mg/L}^{-1}$ por mil absorbancias

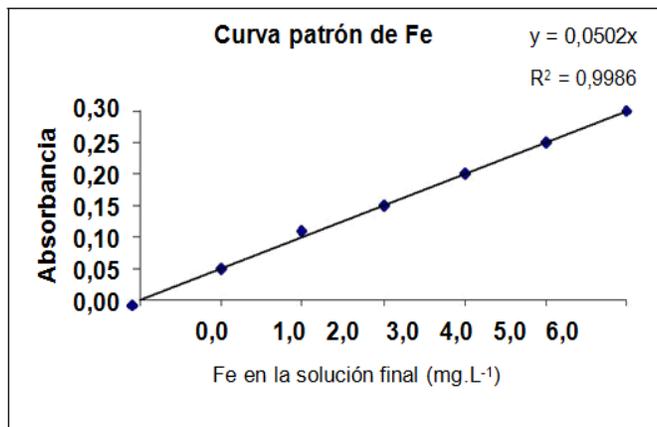


Figura 4. Curva patrón de Fe

c) Factor de dilución

$$FD = \frac{20}{1} \times \frac{15}{5} = 60$$

d) Contenido de Hierro

$$\text{Fe (mg/kg}^{-1}\text{)} = L \times FC \times FD$$

Donde:

Fe = Contenido (mg/kg^{-1})

L = Lectura

FC = Factor de concentración

FD = Factor de dilución

Determinación de Mn

a) Curva patrón de Mn

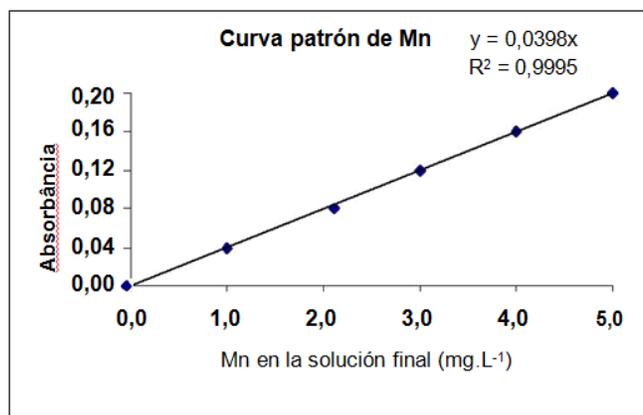


Figura 5. Curva patrón de Mn

b) Factor de concentración: determinado por la curva patrón

Factor de concentración = 0,0227 mg/L⁻¹ por mil absorbancias

c) Factor de dilución

$$FD = \frac{20}{1} \times \frac{15}{5} = 60$$

d) Contenido de Manganeso

$$Mn \text{ (mg/kg}^{-1}\text{)} = L \times FC \times FD$$

Donde:

Mn = contenido (mg/kg⁻¹)

L = Lectura

FC = factor de concentración

FD = factor de dilución

Determinación de Sodio

- a) Curva patrón de sodio: ajustar la lectura (en una escala de cero a 100), con el valor predeterminado de 20 (mg/L⁻¹)
- b) Concentración de la solución final (CS): determinado por la curva patrón
- c) Factor de dilución

$$FD = \frac{20}{1} \times \frac{15}{5} = 60$$

- d) Contenido de Sodio

$$Na(\text{mg/kg}^{-1}) = L \times CS \times FD$$

Donde:

Na = Contenido (mg/kg⁻¹)

L = Lectura

CS = Factor de concentración de la solución final

FD = Factor de dilución

5

Determinación de la digestibilidad

Los análisis bromatológicos antes descritos, si bien contribuyen a dar una información clara del contenido nutricional de un determinado alimento, todos aquellos procesos que pueden sufrir en el anterior del tracto digestivo de los animales, y que en últimas reflejan el valor nutritivo del pienso, no pueden visualizarse si no se estudia el grado de aprovechamiento de un alimento en su paso por el tracto gastrointestinal.

La proporción de un alimento que no se excreta en las heces se supone que ha sido absorbido por el animal, y esto se define como digestibilidad aparente ya que, además de residuos de alimentos no digeridos, las heces contienen enzimas y otras sustancias secretadas en el intestino, que no son reabsorbidos.

Partes de la mucosa intestinal que se desprenden a medida que el alimento pasa a través del intestino, también son excretados en las heces y la cantidad de este material metabólico que se pierde inevitablemente es directamente proporcional a la materia seca consumida, independientemente del tipo de forraje, pero debe ser considerado para una valoración más precisa del aporte real de alimento.

Desde las primeras pruebas de digestibilidad se llevaron a cabo en la Estación Experimental en Weende la Universidad de Goettingen en Alemania, muchas técnicas se han desarrollado para estimar la digestibilidad, algunas de las cuales se describen a continuación y cuya implementación depende de las condiciones de cada laboratorio.

5.1 Digestibilidad In vitro de forrajes

Material

- Molino de cuchillas con cribas de 1 mm. El uso de cribas con mayor apertura deprime la digestibilidad In vitro, por lo tanto todos los forrajes y los estándares deben ser pasados por esa criba.
- Pipeta automática para las soluciones amortiguadora-inóculo y de pepsina.
- Tubos de centrifuga de polietileno de 150 mm x 40 mm de diámetro, tapados con tapones con una válvula Bunsen acondicionada.
- Baño de agua con agitación.
- Centrifuga con cabezal apropiado para los tubos empleados.

Reactivos

- 1. Solución amortiguadora de McDougall
 - Solución 1
 - Na_2HPO_4 anhidro 3.7 g
 - NaHCO_3 9.8 g
 - Agua desionizada a 40 °C/1 litro
 - Solución 2
 - NaCl
 - KCl
 - CaCl_2
 - MgCl
 - Agua destilada
 - Acetona
1. La solución amortiguadora se prepara adicionando 10 ml de la solución 2 a 1 lt de la solución 1. Se agita la mezcla con agitador durante 15 minutos, durante el cual se le burbujea CO_2 .
 2. Solución de pepsina ácida. Disolver 2.4 g de pepsina 1:10.000 en 1.2 lt de ácido clorhídrico 0.1N (120 ml HCl 10N/12 lt de agua).

3. Inoculante. Obtener el contenido ruminal de becerros fistulados, alimentados con una mezcla 50:50 de alfalfa y un pasto fibroso. Conservar el líquido caliente y tapado. Licuarlos por dos minutos y filtrar rápidamente a través de gasa recogiendo en un matraz precalentado, adicionar 250 ml de líquido por cada litro de amortiguador a 40 °C.

Nota: Si el animal donador se alimenta con forrajes pobres, bajos en proteína, la correlación In vitro e In vivo se reduce.

4. Preparación de la muestra, secar el forraje en una estufa de aire forzado a 100°C no más de 24 horas (si se seca en tiempo mayor se deprime la digestibilidad), moler la muestra con el forraje aún caliente ya que el molido de muestra húmedas es más difícil. Según Van Soest 1975, la temperatura no debe ser mayor a 50 °C.

Almacenar la muestras molidas en frascos tapados, si no se realiza el análisis inmediatamente resecar las muestras de aproximadamente 0.250 g (\pm 0.1 mg) dentro de los tubos de polietileno.

Nota: El incremento en el tamaño de la muestra deprime la digestibilidad.

5. Inoculación. Adicionarle a cada tubo 25 ml del amortiguador, tapar los tubos con las válvulas Bunsen.
6. Incubar los tubos en el baño a 39 °C por 48 horas. Agitar los tubos durante las primeras 6 horas después de la incubación, centrifugar inmediatamente a 2000 – 3000 r.p.m/10 minutos y decantar el contenido.
7. Digestión con pepsina. Adicionar al residuo de la digestión con el líquido ruminal 25 ml de la solución de pepsina a 40 °C, tapar los tubos e incubar 48 horas a 39 °C después de la incubación, filtrar a través de crisoles porosos tapados por el papel filtro, lavar con agua 2 veces, secar a 100 °C y pesar. Si se va a determinar materia orgánica (MO) usar crisoles de porcelana para incinerar el filtro a 550 °C durante 3 horas.

Nota: Si no hay centrífuga, entonces acidificar el medio y agregar la pepsina como lo sugiere Telly y Terry (2 ml de HCl 6N \pm 0.5 g de pepsina) o Barnes y Lynch, 1969 (1 ml de HCl 6N \pm 0.2 g de pepsina).

8. Realizar blancos y estándares con cada corrida. Los blancos se realizan con las soluciones amortiguador – Inóculo sin forraje y los estándares con algún forraje, de preferencia el estudiado, el cual tenga conocida la digestibilidad in vivo.

Cálculos

$$\% \text{ D MS} = \frac{100 \text{ M.S muestra (M.S del residuo - M.S del blanco)}}{\text{M.S de la muestra}}$$

Materia orgánica digestible

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

$$\% \text{ DMO} = \frac{100 \text{ MO de la muestra - (MO del residuo - MO del blanco)}}{\text{MO de la muestra}}$$

Nota: Para forrajes bajos en grasa la digestibilidad de la materia orgánica en 100 g de muestra seca es igual a los nutrientes digestibles totales. La conversión de digestibilidad *In vitro* a digestibilidad estimada *In vivo* se obtiene adicionando a los resultados *In vitro* la diferencia promedio entre la digestibilidad *In vivo* de los forrajes estándar, cuando la diferencia entre la digestibilidad *In vitro* e *In vivo* no es la misma a todos los niveles de digestibilidad se deben calcular factores como una función del nivel de digestibilidad.

Material

1. Líquido ruminal de animales alimentados con forrajes preferiblemente fistulados.
2. Matraces Erlenmeyer de 125 ml
3. Baño maría con agitación ajustada a 40 °C con capacidad para 18 matraces
4. Sistema para burbujeo de CO₂

5. Licuadora
6. CO₂ o un generador de CO₂
7. Gasa
8. Lana de vidrio
9. Jeringa automática
10. Aparato para reflujo (fibra cruda)

La fermentación se realiza en matraces de 125 ml y se usan 0.5 g de muestra, 40 ml de medio y 10 ml de inóculo. Los matraces son puestos en el baño maría con agitación. Los tapones de los matraces son No.6 con tres perforaciones 1) tubo de entrada 2) válvula Bunsen 3) tubo para el sistema de burbujeo de CO₂. El tubo de entrada se cierra con varilla de vidrio.

Reactivos

1. Trypticasa – Digerido pancreático de caseína USP
2. Sulfuro de sodio no hidratado
3. NaOH 1N
4. Cisteína HCl Baker o equivalente
5. Resazurina 0.1% peso a volumen
6. HCl 6N – (50%)
7. Pepsina – 1:10.000
8. Tolueno
9. Solución amortiguadora

Agua destilada	18 lt
NH ₄ HCO ₃	72 g
NaHCO ₃	630 g
10. Solución macromineral

Agua destilada	1 lt
Na ₂ HPO ₄ anhidro	5.7 g
KH ₂ PO ₄ anhidro	6.2 g
MgSO ₄ H ₂ O	0.6 g
11. Solución micromineral

CaCl ₂ 2 H ₂ O	13.2 g
MnCl ₂ 4H ₂ O	10.0 g

CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.0 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	8.0 g
Agua destilada cbp	100 ml

Procedimiento

- Pesar 0.5 g de muestra (molida a través de una criba de 1 mm) en un Erlenmeyer de 125 ml. Adicionar 40 ml de una solución preparada así: A 2 g de tripticasa agregarle 400 ml de agua y 0.1 ml de solución micromineral, agitar y disolver entonces adicionar 20 ml de solución amortiguadora, 200 ml de solución macromineral y 1 ml de resazurina.
- Colocar los matraces en el baño, tapar los matraces y burbujear CO₂ a una presión de 30 a 40 cm de agua y comprobar las válvulas Bunsen, abrir los tubos de entrada y agitar con el matraz abierto y tapar.
- Preparar la solución reductora como sigue: disolver 625 mg de clorhidrato de cisteína en 95 ml de agua, agregar 4 ml de NaOH 1N. Adicionar 625 mg de sulfuro de sodio y disolver. Reducir la presión del CO₂ a 3 – 4 cm y agregar 2 ml de solución reductora a través del tubo de entrada con una jeringa automática abriendo y cerrando cada tubo en turno. Agitar todos los matraces, los cuales cambian de color rojo (óxido) a incoloro (reducido).
- Separación de inóculo. Recoger el contenido ruminal del animal fistulado en un vaso, cubrir con un vidrio de reloj. Descartar la parte superior del contenido ruminal y licuar los 400 ml restantes por 2 minutos burbujando CO₂. Exprimir el licuado a través de gasa y filtrar con lana de vidrio en un matraz tibio, mantener el matraz bajo CO₂. Inocular 10 ml de filtrado con una jeringa automática a través del tubo de entrada a cada tubo.
- Sellar los y tubos e incubar 48 horas con agitación a un grado total que no se salga. Ajustar el CO₂ a una presión de 2 cm de agua. Al fin de la fermentación puede seguirse uno de los procedimientos descritos a continuación.

Nota: La técnica puede interrumpirse aquí para continuar al otro día agregando 1 ml de tolueno como preservativo y refrigerar; tapar con tapones de corcho.

1. Procedimiento de Tilley y Terry. Cuidadosamente adicionar 2 ml de HCl 6N a cada matraz (baja el pH a 2.0). Adicionar 0.5 g de pepsina (puede ser medida con una cucharilla). Agitar para disolver. Adicionar 1 ml de tolueno. Volver a poner los matraces en el baño de agua e incubar 48 horas. Sacar los matraces del baño y filtrar sobre papel Whatman No. 4, previamente tarado, sin succión. Lavar el filtrado llenando el embudo y drenar hasta casi acabar el líquido, llenar el embudo con acetona, drenar y secar al aire y doblar los papeles, secar a 100 °C y pesar. La materia seca del papel se determina por separado en otros círculos de papel. Usar el factor de materia seca para calcular el peso seco de los papeles tarados de la filtración. Corres simultáneamente blancos que contengan el inóculo y el medio pero no sustrato. Como estándar se usan papel Whatman No. 44, 416 54 y un forraje común como alfalfa.
2. Procedimiento neutro detergente para estimación de la digestibilidad verdadera. Quitar los matraces del baño después de la digestión o después de refrigerar. Lavar con solución detergente neutro (ver técnica de fibra detergente neutro) dentro de un vaso Berzelius de 600 ml hasta hacer un volumen de 150 ml. Adicionar 2 ml de decahidronaftaleno. Reflujar por una hora y filtrar el crisol tarado de fondo de vidrio poroso. Lavar 2 veces con agua caliente y 2 veces con acetona y succionar hasta sequedad. Secar en estufa a 100 °C y pesar. No son necesarios blancos.

Cálculos

Calcular la digestibilidad verdadera de la materia seca.

Digestibilidad verdadera de la M.S = 100 - % residuo ND

El cálculo para el método de Telley y Terry es:

$$\% \text{ Digestibilidad} = \frac{100 - (R F) - \text{blanco}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

R = Peso del papel filtro + residuo

F = Peso del papel filtro

El valor del blanco es igual a R - F cuando no se adiciona sustrato al medio.

Digestibilidad In vitro de materia seca (método odificado por MINSON Y Mc LEOD)

Material y equipo

- Molino de laboratorio
- Tubos de centrifuga de policarbonato o polipropileno de 50 ml
- Tapones No. 6
- Baño metabólico
- Termómetro
- Centrifuga con cabezal apropiado para los tubos empleados
- Gasa
- Probetas de 25, 100 y 500 ml
- Bomba de vacío
- Crisoles Gooch de porosidad media
- Parrilla con agitador magnético
- Matraces volumétricos de 100 y 1000 ml
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg

Reactivos

- Solución amortiguadora de Mc Dougall.
- Solución A. Pesar y mezclar 3.7 g de fosfato de sodio anhidro (Na_2HPO_4) y 9.8 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), disolver bien y aforar a un litro con agua desionizada; para facilitar la mezcla se puede usar agua a 40 °C.
- Solución B. Pesar y mezclar 4.7 g de cloruro de sodio (NaCl), 5.7 g de cloruro de potasio (KCl), 0.4 g de cloruro de calcio (CaCl_2) y 0.6 g de cloruro de magnesio (MgCl_2), disolver bien y aforar a 100 ml.
- La solución amortiguadora se prepara adicionando 10 ml de la solución 2 a 1 litro de la solución 1. Se agita la mezcla durante unos minutos antes de que se vaya a emplear.
- Solución de pepsina ácida.
- Homogenizar 4 ml de pepsina (cuajo) en una solución 0.1 N de ácido clorhídrico (HCl) por litro, esta solución se prepara únicamente el día que se va a emplear, debe tener una temperatura de 40 °C con un pH de 1.5.

Procedimiento

- a. Secar la muestra en estufa de aire forzado a 50 °C, la temperatura no debe ser superior a la antes mencionada.
- b. Moler la muestra a través de una malla de 1 mm.
- c. Almacenar la muestra en un lugar seco.
- d. Pesar dentro de un tubo de centrifuga aproximadamente 0.25 g de muestra seca (excepto en el blanco).
- e. Obtener el contenido ruminal de ovinos fistulados, alimentados con 50:50 de alfalfa seca de buena calidad y pasto fibroso.
- f. Conservar el líquido ruminal a 39 °C perfectamente tapado. Filtrar rápidamente a través de gasa.
- g. Adicionar 250 ml de líquido ruminal por cada litro de solución amortiguadora a 40 °C, sin dejar de agitar. Tomar el pH que debe ser de 6.8 a 7.0.
- h. Burbujear CO₂ a la solución amortiguadora y al inóculo durante 60 minutos, manteniendo la temperatura constante a 40 °C.
- i. Adicionar a cada tubo 25 ml del amortiguador – inóculo y tapar los tubos perfectamente.
- j. Incubar los tubos en el baño metabólico a 39 ± 1 °C por 48 horas.
- k. Agitar ligeramente los tubos (4 veces al día).
- l. Pasadas las 48 horas, centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos.
- m. Decantar el sobrenadante.
- n. Adicionar al residuo de cada tubo 25 ml de la solución de pepsina ácida.
- o. Tapar los tubos e incubarlos en el baño metabólico a 39 °C durante 48 horas (agitar 4 veces al día).
- p. Filtrar el contenido del tubo a través de los crisoles Gooch previamente puestos a peso constante.

- q. Lavar con agua caliente varias veces el tubo, hasta que no quede ningún residuo.
- r. Lavar con acetona varias veces.
- s. Secar a 60 °C durante toda la noche.
- t. Pasar a un desecador para enfriar los crisoles, pesar.

Nota: Es necesario correr el mismo tiempo que las muestras problema, un blanco y una muestra patrón. El blanco consiste en determinar el residuo de inóculo ruminal. La muestra patrón es aquella que se conoce el valor de la digestibilidad In vivo. Las muestras patrón deben ser lo más similar posibles a las muestras bajo estudio.

Cálculos

$$\% \text{ DMS} = \frac{\text{Peso de la muestra seca} - \text{peso del residuo blanco} \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

% DMS = % de digestibilidad de la materia seca

5.2 Técnica In situ para determinar la degradabilidad de forrajes

La técnica de las bolsas de nylon ha sido utilizada durante varios años para estimar la tasa de desaparición de los constituyentes de un alimento en el rumen de ovinos o bovinos canulados. El procedimiento consiste en suspender muestras de alimento seco y molido, colocadas en bolsas de nylon, las cuales se incuban y a continuación se retiran después de varios intervalos de tiempo, se lavan y se secan. De esta manera se estima la degradabilidad de la materia seca, nitrógeno, energía, etc., en un tiempo determinado. El tamaño de poro de las bolsas, permite la entrada de los microorganismos y la bolsa se mantiene en el ambiente natural de un rumen funcional, lo que favorece la colonización microbiana del alimento investigado. La cantidad de material soluble de la muestra se calcula por diferencia entre el peso de la muestra no incubada y el peso después de la incubación, previo lavado y secado.

En algunos estudios se colocan todas las bolsas juntas en el rumen y se retiran a diferentes intervalos de tiempo. Sin embargo, es más práctico

introducir las bolsas en momentos diferentes y retirarlas todas a la vez. Esto significa que todas las bolsas se pueden tratar, lavar y secar juntas. La flexibilidad de los tiempos de incubación también es posible, ya que usualmente se hace a las 8, 16, 24 h, etc.; aunque pueden modificarse, los tiempos reales de incubación se deben contemplar en los cálculos.

La curva de degradación se estima con la siguiente ecuación:

$$P = a + b (1 - e^{-ct})$$

Donde P es la degradación al tiempo t, a y b son constantes y c es la tasa constante de b. Para proteína por ejemplo, el intercepto a corresponde a la fracción soluble (pérdida por lavado) y b representa el potencial de degradabilidad.

Cuando se usa esta técnica para evaluar un alimento, el medio ambiente ruminal debe ser óptimo, de modo que permita expresar la degradabilidad máxima de dicho alimento. Sin embargo, el ambiente ruminal no siempre es favorable; esto puede ser debido a condiciones de pH, a interacciones negativas entre los alimentos o a deficiencias en la dieta.

También hay un problema relativo a la pérdida de partículas pequeñas de una gran variedad de alimentos. Estas partículas aparecerán como solubles ya que pueden pasar a través de los poros de la bolsa de nylon, para lo cual se han propuesto soluciones matemáticas.

Otro problema se presenta si el alimento contiene factores antinutricionales, ya que la pequeña cantidad de estos contenidos en la muestra de la bolsa, tendrá poco o ningún efecto sobre el medio ambiente del rumen y por tanto no afectará a las características de degradación de la muestra. Existen también alimentos que no pueden ser evaluados utilizando esta técnica, como los alimentos solubles como la melaza y alimentos de partículas muy pequeñas, como harina de sangre, proteína unicelular y harinas de cereales o tubérculos, que no pueden ser retenidos en la bolsa de nylon. Adicionalmente, la técnica In situ requiere el uso de animales fistulados, lo que puede plantear dificultades en algunos laboratorios.

El método involucra la suspensión de 4 – 6 bolsas de nylon, cada una conteniendo una cantidad conocida (5 g) de muestra, en un hilo de nylon en el rumen de ovinos o bovinos fistulados con cánulas ruminales apropiadas. Las bolsas se sacan del rumen en intervalos conocidos durante un periodo de 24 – 72 horas, según la naturaleza de la muestra, luego se lavan en agua. Las bolsas se secan a una temperatura de 70 °C durante 24 horas y la tasa

de degradabilidad se calcula normalmente a partir de la desaparición de la materia seca (MS) y la proteína de la bolsa según el tiempo.

La comparación de los resultados procedentes de diferentes experimentos se complica en cierto grado por las diferencias en el tamaño de las bolsas, la porosidad de la tela utilizada, la preparación de la muestra y el tiempo de incubación en el rumen; la principal fuente de variación sin embargo se relaciona con la composición de la dieta básica y el nivel en el cual se ofrece a los animales.

Porosidad de la tela utilizada para la bolsa y la finura de molienda

La porosidad del material utilizado para la fabricación de las bolsas de nylon, aparentemente no tiene efecto significativo en la tasa de desaparición de la MS de las bolsas, durante el periodo de incubación de 72 horas. En estudios llevados a cabo en varios laboratorios la tasa de degradación del heno, alfalfa picada (0.5 – 1 cm de longitud) o molida (una criba de 40 mm) no mostro diferencias significativas

Efecto del lavado

Ni el procedimiento usual es lavar la bolsa en agua de la pila hasta que corra clara; tiempo que lleva aproximadamente 5 minutos por muestra, ni el método ni el tiempo al parecer afectan la desaparición de MS.

Variación entre dietas y animales

La dieta básica del animal fistulado tiene un efecto importante sobre la tasa de desaparición de MS. Por ejemplo, el tiempo medio de desaparición de la MS de la cáscara de arroz es considerablemente menor en animales que reciben una dieta de alfalfa picada en comparación con aquellos que reciben una dieta de melaza líquida y paja de trigo. No se reporta diferencias entre animales sobre la tasa de desaparición de MS, aunque una pequeña variación se ha asociado a los días de muestreo.

Las tasas más rápidas de degradación en la dieta de hierba probablemente resultarían en una tasa más rápida de recambio en el rumen comparada con la dieta de paja. Por lo tanto es importante que los animales fistulados reciban dietas uniformes cuando sean utilizados para determinar la tasa de degradación de los materiales alimenticios. La variación entre animales puede resolverse al repetirse las mediciones por los menos en tres animales.

Materiales

- a. Tela de dacrón o nylon con aproximadamente 2000 orificios por cm² (la tela con la que se confeccionan los paracaídas resulta adecuada).
- b. Animales (tres mínimo) con fistula permanente en rumen. Alimentados de ser posible durante dos semanas antes de la prueba con el alimento problema, o bien con forraje de buena calidad.

Procedimiento

1. Con la tela se hacen las bolsas de 12 x 18 cm, los bordes de las mismas se unen con una costura doble así mismo se redondean para evitar la acumulación del alimento en las esquinas.
2. Las bolsas se lavan y se secan a 60 °C.
3. Se introduce a cada bolsa 3 g de muestra seca pesada a través de una malla del No. 20 y se pone a peso constante a 60 °C por 8 horas.
4. Los extremos de las bolsas se cierran con una liga
5. Posteriormente, las bolsas se amarran con hilo nylon y se aseguran a la cánula.

Nota: Generalmente en pequeños rumiantes, se introduce al rumen únicamente 5 bolsas a la vez.

Las bolsas se incuban durante 3, 6, 9, 12, 24, 48 o 72 horas dependiendo el tipo de muestra; al final de cada uno de estos periodos se remueve una bolsa del rumen del animal.

7. Las bolsas se lavan al chorro del agua, hasta que el agua salga completamente incolora, posteriormente se seca a 60 °C durante toda la noche.

La proporción de materia seca desaparecida, se calcula de la diferencia entre el porcentaje incubado de cada nutriente y el porcentaje del nutriente que quedó en las bolsas después de incubar.

Cálculos

peso de bolsa - peso de bolsa

$$\% \text{ de MS desaparecida} = \frac{\text{antes de incubar} - \text{después de incubar}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

5.3 Método In vivo para determinar digestibilidad de forrajes

La relevancia de la determinación de la digestibilidad In vivo de la materia seca (DMS), radica en que da una medida aproximada de la disponibilidad de energía y otros nutrientes, aunque no contempla la pérdida de energía en la forma de metano. Como un medio para evaluar los forrajes, resulta laboriosa y requiere mucho tiempo, grandes cantidades de forraje y el uso de animales. Por lo tanto, no es apropiado como un medio de evaluar forrajes de forma rutinaria. Sin embargo, es necesaria como una técnica para validar muchos de los procedimientos In vitro que se han desarrollado, aunque no proporciona ninguna información sobre el lugar de la digestión o la cinética de la misma.

Es necesario antes de hacer una diferenciación de los métodos In vivo para hallar la digestibilidad, aclarar los conceptos de digestibilidad real y aparente. Se considera como digestibilidad aparente la fracción del forraje que desaparece como resultado del procesamiento en el tracto gastrointestinal y por lo tanto es la fracción que aparentemente es digerida o absorbida porque no aparece en las heces.

La digestibilidad real es aquella en la que algunas sustancias que son excretadas con las heces, contienen productos de desecho del organismo como son: residuos de bilis, jugos digestivos, células muertas, moco de las membranas que tapizan el tubo digestivo, materia mineral, bacterias vivas y muertas. Desde el punto de vista práctico es correcto deducirlos en unión de los alimentos que no han sido digeridos al calcular los principios nutritivos digeribles, porque hacen parte del costo de digestión del alimento y desgaste de los órganos digestivos.

La digestibilidad real da un índice más exacto de la cantidad de alimento digerido por el animal, pero los sistemas para valorarla son más dispendiosos. Para establecer la digestibilidad aparente existen métodos directos e indirectos.

5.3.1 Métodos directos. Para estimar la digestibilidad de la materia seca (DMS) de una dieta, se debe realizar la colección de todas las heces excretadas por un animal en un período de tiempo determinado, una vez que este se ha adaptado a la dieta investigada. Durante este tiempo se requiere registrar la cantidad de alimento consumido, la cual se obtiene de la diferencia entre el alimento suministrado y el rechazado por el animal.

La digestibilidad estaría dada por la formula:

$$\% \text{ Digestibilidad (MS)} = \frac{\text{MS consumida} - \text{MS excretada} \times 100}{\text{MS consumida}}$$

Para recoger totalmente las heces se hace necesario albergar el animal en jaulas diseñadas especialmente, o adaptarles bolsas especiales o arneses. Es preciso recoger las heces separadas de la orina, debe recordarse que las sustancias presentes en la orina no son alimentos no digeridos sino productos de desechos de los órganos y tejidos del organismo.

En cuanto al diseño de las jaulas de digestibilidad se debe tener en cuenta la edad, la especie y el sexo del animal. Las condiciones de comodidad que pueden tener los animales son básicas para el desarrollo del experimento.

Con respecto a la edad debe estar comprendida entre 18 y 24 meses para bovinos, entre 12 y 18 meses para ovinos, de 3 meses para el caso de los cuyes. Se pueden usar 3 o 4 ovinos, de 2 a 4 bovinos, cuando se utiliza cuyes el número puede ser 2 o 3 veces mayor.

Debe haber un periodo preliminar de adaptación en el cual se suministre el alimento o los nutrientes en estudio, durante este tiempo el animal debe excretar la totalidad del alimento que consumió antes del estudio. El periodo generalmente usado para rumiantes es de 10 días y en ese lapso se calcula la cantidad de alimento consumido durante 24 horas.

Algunos investigadores recomiendan no extender el periodo experimental por más de 15 días. Tiempo que es más que suficiente para la colección de heces.

Los animales en experimento con frecuencia rehúsan consumir toda la dieta que se les suministra. El alimento rechazado no debe ser ignorado por ningún motivo, es posible hacer ajuste satisfactorio. Simplemente restando el peso del alimento rechazado de la cantidad total ofrecida al animal, esto en el caso que el material ofrecido sea homogéneo y no haya escogencia; si por otra parte la naturaleza del material es tan pobre que los animales la

rechazan sería mejor añadirlo a los nutrientes perdidos en las heces en vez de restarlos de los nutrientes ofrecidos.

Alimento ofrecido	50 kg
Alimento rechazado	5 kg
Heces	3 kg

$$\text{Digestibilidad} = \frac{(45 - 3)}{45} \times 100 = 93.3\%$$

Teniendo en cuenta la segunda consideración

$$\text{Digestibilidad} = \frac{(50 - 8)}{50} \times 100 = 84\%$$

Para determinar la digestibilidad de otros nutrientes, tanto la ingesta como las heces se someten a análisis químico en el laboratorio y se realiza la sustitución de ellos en la fracción materia seca de la ecuación anterior.

La digestibilidad de la materia orgánica (MO) en la materia seca del forraje (DMO) se calcula para estimar la energía disponible en la materia seca de forraje, usando la fórmula:

$$\% \text{ Digestibilidad (DMO)} = \frac{\text{MO consumida} - \text{MO excretada}}{\text{MO consumida}} \times 100$$

Método de la diferencia

Este procedimiento es útil cuando por algunas circunstancias es necesario suplementar el forraje con otro alimento, como se describe más adelante. Esto dificulta el cálculo de la digestibilidad, pero ante la necesidad de hacerlo, se ha propuesto como condición, el que no haya interacción entre los alimentos en términos de su digestibilidad.

El primer método consiste en alimentar con el forraje y otro de digestibilidad conocida (McDonald et al., 1995). El ensayo se lleva a cabo de forma normal, donde el forraje (alimento de prueba) debería constituir la mayor proporción de la dieta.

La digestibilidad se calcula entonces usando la ecuación:

$$(\% \text{ DMSap}) = \frac{\text{MSCap} - (\text{MSf} - \text{MSfab})}{\text{MSCap}} \times 100$$

Donde:

DMSap = digestibilidad del alimento de prueba

MSCap = materia seca consumida del alimento de prueba

MSf = materia seca fecal

MSfab = materia seca fecal del alimento base

La digestibilidad del forraje se calcula por diferencia.

Método de regresión

El segundo enfoque consiste en alimentar con el forraje y un suplemento (que puede ser otro forraje) en diferentes proporciones. Se estima la digestibilidad de cada uno de los componentes de la dieta, mediante una regresión con la proporción del forraje en ella, y luego la digestibilidad del forraje se calcula mediante la extrapolación a cero inclusión del suplemento.

5.3.2 Métodos indirectos

5.3.2.1 Métodos del indicador. En animales de pastoreo, no resulta fácil medir con exactitud el consumo de alimento, la excreción fecal, o ambos. No obstante es factible estimar la digestibilidad del forraje, si este contiene un componente completamente indigerible. Este compuesto denominado “marcador” también debe permanecer inalterado en su paso a través del intestino y la digestibilidad se determina a través de su concentración en las heces fecales y en la dieta consumida por el animal.

Adicionalmente, el indicador no debe tener acción farmacológica en el sistema digestivo, debe pasar a través del sistema a una velocidad uniforme, debe ser determinado químicamente en una forma fácil y finalmente debe ser de preferencia un constituyente natural del alimento. La digestibilidad es hallada mediante la fórmula.

Bajo el supuesto que el marcador que se consume es excretado, la ecuación utilizada para calcular la digestibilidad sería:

$$\text{Marcador}_a \times \text{Alimento consumido} = \text{Marcador}_h \times \text{heces excretadas}$$

a = alimento

h = heces

Si las concentraciones de marcadores se expresan en g kg^{-1} MS y alimento y heces excretadas en kg MS día^{-1} , resulta :

$$\text{Volumen de heces} = \frac{\text{Marcador}_a \times \text{Alimento consumido}}{\text{Marcador}_h}$$

Entonces:

$$\text{Digestibilidad} = \frac{\text{Alimento consumido} - \text{Volumen de heces}}{\text{Alimento consumido}}$$

y :

$$\text{Digestibilidad} = \frac{1 - \text{Marcador}_a \times \text{Alimento consumido}}{\text{Marcador}_h \times \text{Alimento consumido}} = 1 - \frac{\text{Marcador}_a}{\text{Marcador}_h}$$

El marcador puede ser un constituyente natural del alimento, o una sustancia diferente. Sin embargo, es difícil mezclar productos químicos con los forrajes, aunque los animales podrían recibir la dosis del marcador cada día. La desventaja de esto es que se aumenta la manipulación requerida, incrementando el estrés de los animales. Los constituyentes de los forrajes que se han utilizado incluyen lignina, fibra detergente ácido, fibra detergente ácido indigerible (FDAI), cenizas insolubles en ácido (CIA) (que es principalmente de sílice) y algunos de origen natural como los n-alcános de gran longitud de la cadena (C-25-C-35).

El indicador comúnmente agregados a los alimentos es de cromo en forma de óxido de cromo, Cr_2O_3 , aunque se han utilizado también otros marcadores, incluyendo disprosio y poliamida granulado. Un problema con los marcadores externos es que pueden contaminarse y dar resultados sesgados.

La técnica de marcadores es fácil de llevar a cabo y requiere menos trabajo que la de digestibilidad mediante la colección completa de las heces. Si la concentración del indicador en la alimentación es alta, entonces esta técnica produce buenos resultados. Sin embargo, la técnica tiene una utilidad limitada y sólo se debe utilizar si hay una alta posibilidad de obtener una muestra representativa del forraje consumido. Las fuentes principales de error asociadas con este método, están en la estimación de la concentración del marcador en el forraje, si se utiliza un marcador interno. Esto puede

darse ya sea desde la toma de muestras del forraje, o de errores analíticos asociados con la estimación de la concentración de marcador en las heces o el forraje, puesto que la mayoría de los marcadores no son completamente indigeribles.

La obtención de una muestra representativa del forraje consumido es difícil, ya que los animales en pastoreo, especialmente el ovino, puede ser altamente selectivo en el forraje que consumen, para lo cual se puede recurrir a fistular el esófago para tomar muestras y determinar la concentración del marcador en el forraje realmente consumido por el animal.

5.3.2.2 Predicción de la digestibilidad del forraje. Este método se basa en que ciertos componentes fecales están relacionados con la digestibilidad de la dieta. Si la digestibilidad de la dieta se ha medido utilizando el método directo y se han analizado las heces para un componente particular, entonces puede establecerse una regresión entre la concentración de ese componente en las heces y la digestibilidad In vivo observada. Una gama de diferentes componentes fecales se han utilizado, incluyendo nitrógeno, cromógeno, fibra cruda y metoxilo.

La realización de un experimento de digestibilidad

Para obtener una estimación precisa de la digestibilidad de un forraje, es importante que se adopten técnicas bien establecidas y también que el objetivo del experimento esté claramente definido, ya que esto afectará la cantidad de forraje que se suministra y los suplementos que se incluyen en la dieta.

A pesar de que se considera generalmente que la variación en la digestibilidad entre animales es baja, la precisión de la estimación se mejora si se utiliza un diseño cruzado. Si no se prevé un efecto del período, entonces se debe emplear un diseño cuadrado latino. Esto es importante si se están recogiendo diariamente los forrajes y son susceptibles de cambiar en la composición durante el experimento o si los animales están cambiando de estado fisiológico durante la investigación.

Hay dos etapas en el ensayo de digestibilidad, el primero el período de adaptación y el segundo el período de recolección. El primero está diseñado para asegurar un proceso digestivo estable en el que los animales están comiendo aproximadamente la misma cantidad de alimento y que los excretas corresponden enteramente a la digestión de los piensos en experimentación.

El período de adaptación apropiado a una dieta se estima entre 4 a 12 días, un período de adaptación mayor puede requerirse para obtener el máximo nivel de consumo, pero podría reducirse si los animales están familiarizados con el forraje investigado. Durante este periodo de adaptación, los animales también deben ser introducidos a sus jaulas de digestibilidad si están siendo confinados.

Después del período de adaptación, hay un período en el que las heces se recogen de cada animal experimental. Durante este tiempo se toman muestras del alimento consumido y rechazado y se analizan, para calcular la cantidad de cada nutriente que realmente se consumió.

Colección completa de las heces. Se requiere una colección completa de todas las heces excretadas en el método directo, a diferencia de si o se están utilizando métodos de regresión. Las heces no deben estar contaminadas con orina, y la colección deben realizarse a la misma hora cada día, a lo largo de todo el período de recolección y una muestra para el análisis. Si se usan ovejas, conejos o cuyes entonces no hay necesidad de submuestrear durante el período de recolección. Sin embargo, con las vacas, las submuestras se deben tomar cada.

Muestreo puntual de heces. Muestras puntuales de las heces son necesarias si se está usando el método indirecto o el de predicción. Las muestras deben tomarse al menos una vez y preferiblemente dos veces al día. Si hay variación diurna en la excreción del marcador (Como es el caso con óxido crómico), sin embargo, se requiere un muestreo más frecuente.

Las muestras puntuales de las heces pueden ser tomadas al azar desde el recto de cada animal, esto requiere que los animales se manejen apropiadamente, para evitar el estrés. Si ellos están pastando, las muestras de las heces se pueden tomar en campo y los animales pueden ser dos identificados con un tinte de color de modo que las heces de cada individuo puedan ser identificados. Si se adopta este método, es importante que el colorante seleccionado no afecte la digestibilidad del forraje o interfiera con el marcador utilizado para estimar la digestibilidad.

El período de recogida varía con la naturaleza de la dieta, periodos más cortos se requieren para dietas más uniformes. Usualmente, el periodo varía de 4-12 días, pero la exactitud de la medición aumenta al aumentar el período.

Equipo necesario. Los Animales usados en una prueba de digestibilidad deben ser alojados y alimentados individualmente, de manera que se pueda controlar sus consumos y desperdicios, en especial que faciliten el suministro y reduzcan al máximo el desperdicio de alimento, para lo cual es aconsejable que el comedero limite la movilidad de la cabeza mientras se esté alimentando, esto reducirá la cantidad de alimento desperdiciado. Esto puede requerir que el esté atado durante el ensayo de digestibilidad. El interior del comedero debe ser liso, de modo que las partículas de alimento no se incrusten en las grietas.

El agua de bebida limpia y fresca debe estar siempre disponible, ya sea a través de un sistema automático o por una cubeta que se debe llenar dos o tres veces al día.

Mallas. Este diseño que permite la separación de las heces y la orina fue descrito por. La jaula tiene un piso de malla con abertura que permite retener las heces; la bandeja de malla es extraíble, de modo que las heces pueden recogerse cada día, mientras que la orina cae a través de una bandeja inclinada y se recogen en botellas. La desventaja de este tipo de jaula es que los excrementos caen sobre una amplia área de la bandeja y quedan expuestos a la contaminación por orina o también puede ser aplastados por el animal. Este problema puede solucionarse parcialmente al reducir el tamaño de la jaula de manera que el animal no pueda darse de vuelta.

Bolsas. Sujetas al animal mediante arneses, permiten acumular las heces y deben ser vaciadas una vez o dos veces al día, o más a menudo si es necesario. Pueden estar hechas de lona de caucho o de goma, también pueden estar forradas interiormente con plástico, que facilita la colección de muestra. La bolsa puede estar unida al arnés por ganchos, que se desabrochan cuando para recoger las heces. Alternativamente, la bolsa puede estar unida al arnés por hebillas y un cierre de cremallera (si se hace de lona), entonces las heces se recogen simplemente al vaciar la bolsa en un balde.

Se debe tener cuidado en el ajuste de los arneses, asegurándose que no molesten o lastimen al animal. Los animales deben adaptarse a estos arneses durante algunos días antes de comenzar la recogida de las heces. La ventaja de estas bolsas es que se pueden utilizar para animales en pastoreo, sin que afecten su comportamiento. En hembras, una lengüeta de plástico necesita fijarse por encima de su vulva para evitar que la orina caiga sobre las heces.

Selección de animales para el ensayo. Los animales para este tipo de pruebas deberán estar completamente sanos, libres de parásitos. Deberán acostumbrarse al alojamiento o a los arneses y manejo en la colecciones completas de heces.

Varias especies se han usado para estimar la digestibilidad de forrajes, incluyendo hámsteres, cuyes, conejos, cabras, ovejas, bovinos, caballos, asnos, mulas y camellos. La ventaja de especies pequeñas radica en que consumen menos alimento y son por menos costosos sus alojamientos. Sin embargo, debido a sus diferencias digestivas, los resultados obtenidos pueden no ser muy útiles para todas las especies, aunque para la mayoría de forrajes, las diferencias entre ovinos y bovinos resultan pequeñas y sin mayor importancia práctica. Sin embargo, se sugiere que si se usan ovejas para estimar la digestibilidad, se requiere realizar una corrección positiva para la materia orgánica (DMO) por debajo de 0.65 y una corrección negativa para DMO por encima de 0.80, a fin de predecir la digestibilidad del forraje para bovinos. La corrección aplicada (Y) resulta:

$$Y \text{ (como proporción)} = 0.348 - (0.0048 \times \text{DMO en la Oveja})$$

Sexo. Generalmente se prefiere machos, debido a que es mucho más fácil separar los excrementos y la orina. Sin embargo, si requieren la digestibilidad de forraje en esquemas de nutrición muy altos, entonces vacas de alta producción deben ser utilizadas.

Edad. La edad del animal al parecer tiene poco efecto, y se ha observado que ni la edad ni el peso reportaron diferencias significativas sobre la digestibilidad de forraje en ovejas, aunque si las hubo entre razas.

Numero. El número de animales que deben usarse depende de la diferencia esperada entre el alimento probado y el nivel de confianza requerido. El número de animales puede reducirse si se usa un diseño cruzado, para obviar la variación entre animales. Si el alimento investigado es único y se usó el método directo, tres animales resultan suficientes. Sin embargo, si el alimento está mezclado con otro (y se usó el método de diferencia), entonces se requerirán al menos cuatro, seis u ocho animales si la ración mezcla estuviera constituida por 50, 25 o menos del 25%, respectivamente.

Alimento. Si se están haciendo colecciones completas de heces, es importante que la cantidad y la composición de los alimentos que se consumen en el experimento sean determinadas con exactitud. Si se utiliza el método indirecto, es imprescindible conocer la composición del forraje realmente consumido, al igual que la concentración exacta del marcador en el forraje consumido.

Uso de suplementos. Para desarrollar un experimento de digestibilidad, es importante contar con animales sanos y para ello se requiere del suministro de una dieta equilibrada para lo cual suele ser necesario incorporar suplementos. Se ha sugerido que si la DMO del alimento en investigación está por debajo 0,55 o superior a 0,75, no puede constituirse como único alimento. También puede ser el caso, si se utilizan las vacas lecheras de alta producción, donde el forraje no puede satisfacer la totalidad de los requerimientos. Se recomienda, además, que las dietas deban contener (BS) al menos 180 g kg⁻¹ de fibra cruda, entre 120 y 200 g kg⁻¹ de proteína cruda, 400 g kg⁻¹ de almidón y menos de 200 g kg⁻¹ de azúcares. Esto implica que muchos forrajes deban ser suplementados. La digestibilidad del suplemento podrá calcularse mediante los métodos descritos anteriormente (método de la Diferencia y método de regresión).

Consumo de alimento. Normalmente, las pruebas de digestibilidad requieren el suministro de cantidades exactas de alimento durante largos períodos de tiempo. Sin embargo, en la alimentación ad libitum se generaran rechazos de alimento que afectan el experimento; por ello se ha sugerido que la ingesta debe limitarse para reducir el desperdicio y mejorar la precisión de la prueba. Por lo tanto, si el objetivo es estimar la digestibilidad del forraje, a sabiendas que el animal es capaz de realizar un nivel de selección, entonces la cantidad ofrecida debe estar muy cercana a consumo ad libitum estimado.

Preparación de los alimentos. El forraje que se ofrece a los animales en un ensayo de digestibilidad, debe ser picado y mezclarse para evitar la selectividad y asegurar que el animal está consumiendo muestras representativas del forraje investigado. Sin embargo, esta actividad puede afectar la digestibilidad, aunque es probable que el efecto sea muy pequeño. De otra parte, el forraje se puede ofrecer fresco o cosechado antes del experimento y conservado mediante secado o refrigeración. No puede

ensilarse para preservarla, a menos que el objeto del experimento sea estimar la digestibilidad del ensilaje.

Con forrajes, las partes superiores de la planta son más digestibles que las inferiores, por ello, los animales tienden a seleccionar las partes superiores, factor que debe considerarse cuando se toman muestras de pastos que está siendo consumidos por los animales directamente en la pradera.

Forraje fresco. Si se va a utilizar forraje fresco para alimentar los animales en jaulas, entonces tiene que ser cortado cada día. Esto implica que cualquier cambio en la composición del forraje durante el período del estudio puede afectar la digestibilidad, debido a que el forraje no será de composición constante durante todo el experimento. Dado que la estimación de la digestibilidad *In vivo* supone un estado estable y la misma composición durante todo el experimento, esto constituye un error potencialmente grave en este tipo de experimentos. Sin embargo, si el forraje se va a cortar a diario, se recomienda cortarlo por la tarde para suministrarlo en ese momento y la mañana siguiente. Cortar por la tarde evita la presencia del rocío de la mañana. El forraje que se almacena durante la noche se debe mantener en refrigeración, pero si esto no es posible, el forraje necesario se deberá cortar dos veces al día.

Congelación. Cosechar de antemano todo el forraje que se necesita para el experimento y conservarlo, resulta difícil, por lo que es preferible cortar el forraje fresco todos los días. No obstante si se pretende que la composición del forraje no cambie durante el experimento, el forraje cosechado debe ser completamente mezclado, embolsado y congelado. Las bolsas deben contener suficiente forraje para la alimentación de 1 día, y debe retirarse del congelador el día anterior al que se va a utilizar. El efecto de la congelación se considera despreciable sobre la DMS.

Secado. Este método de preservación de forrajes también resulta válido en las pruebas de digestibilidad y al igual que con la congelación, tiene la ventaja de asegurar que la composición del forraje se mantiene constante. Es importante que el forraje se seque rápidamente, y que la temperatura no exceda de 100 °C; aunque el secado cambia la estructura física del forraje y ello puede alterar su valor nutritivo.

Secado en frío. Este es un buen método de preservación, ya que minimiza los cambios en la composición química del forraje y elimina la necesidad de mantener instalaciones de almacenamiento en frío. Sin embargo, la liofilización es un proceso extremadamente caro para conservar forraje y, al igual que con el secado convencional, la naturaleza física del forraje cambia después de este proceso.

Pastoreo. En lugar de cosechar el forraje y luego ofrecerlo en comederos, los animales pueden pastar el material en la pradera. Esto tiene la ventaja de mantener al animal en condiciones más naturales. Sin embargo, la composición del pasto cambiará durante el experimento, y no es posible medir la ingesta directamente, así que debe utilizarse el método indirecto de estimación de la digestibilidad o alguna estrategia para determinar la cantidad de forraje consumido.

El ensilaje. Durante el proceso de ensilaje suceden cambios considerables en la composición química del forraje, de allí que este método de conservación no debe ser utilizado para preservar forrajes en ensayos de digestibilidad, si el objetivo del experimento es determinar la digestibilidad del forraje fresco. Sin embargo, si se debe evaluar la digestibilidad del ensilaje, este debe mezclarse bien antes de comenzar el experimento y almacenarse congelado, ya que la composición del ensilaje puede cambiar dentro del silo y con el tiempo.

Marcadores para determinación de digestibilidad. Una gran variedad de marcadores se ha utilizado para estimar la digestibilidad de forma indirecta. Los pro y contra de ellos se describen a continuación.

Sílice. El silicio está presente como sílice sólida y ácido monosilícico, y la relación entre estos dos compuestos varía con la especie y madurez de las plantas. La sílice fue utilizada por primera vez como marcador interno en 1874, y su determinación puede realizarse por colorimetría o por espectroscopia de absorción atómica. Se han reportado tasas de recuperación de sílice cercanas al 100%, lo que garantiza su uso como marcador.

Sin embargo, hay reportes que sugieren que una proporción del sílice es absorbido en el tracto digestivo y se excreta en la orina o encontrado en los nodos linfáticos y cálculos urinarios. Esto ha hecho que en la actualidad la sílice no se utilice ampliamente como indicador.

Cenizas insolubles en ácido. Buenas recuperaciones de CIA y una buena relación entre los resultados In vivo de la materia orgánica (DMO) y la digestibilidad predicha, avalan su uso. Sin embargo, se ha observado que este método arroja resultados inferiores a los métodos de fibra ácido detergente de la predicción de la DMS.

Lignina. La lignina es ampliamente utilizada como indicador y es considerada como un buen indicador por muchos autores. No obstante, hay evidencias de que la lignina no es completamente indigestible.

Los siguientes factores que podrían afectar la recuperación de la lignina:

1. que material no lignina del alimento podría contaminar la lignina en el ensayo; 2. que se pueden producir algunas pérdidas de lignina inmadura; 3. que puede formarse material fenólico soluble; 4. que las temperaturas de secado pueden afectar las heces y las muestras de forraje de forma diferente; y 5. que alguna partículas finas de lignina en las heces, no se puedan recuperar en los métodos gravimétricos. También sostiene que la técnica funciona bien si la dieta contiene de más de 6 % de lignina en la materia seca DM. También se observó que cuando el contenido de lignina aumenta en la dieta, el error estándar de su determinación disminuye.

Cromógenos. Cromógeno es un pigmento vegetal soluble en acetona acuosa al 85% y contiene principalmente productos de degradación de las clorofilas. Su recuperaciones en las heces son altas y existe una buena relación entre la estimación de la digestibilidad utilizando cromógeno y el observado a partir de una colección completa de las heces. Sin embargo, se anota que el cromógeno es inestable a la luz, por lo que la luz debe evitarse durante la extracción y los procesos de medición. El uso de la técnica también está limitado a los forrajes con una alta concentración de clorofila, y esto limita su idoneidad para forraje verde.

La técnica también requiere de la estandarización con la digestibilidad de anteriores ensayos, y la longitud de onda requerida para medir la concentración del pigmento en las heces varía con las diferentes especies de plantas y las etapas de crecimiento.

Fibra detergente ácido indigerible (FADI). Dado que una proporción de la pared celular es digerible, el uso de lignina como un marcador sigue en duda. Si las fracciones potencialmente digeribles de la lignina y la celulosa

podrían eliminarse, el residuo indigerible se podría utilizar como un indicador. La FADI se estimó mediante el tratamiento del forraje y heces con solución detergente ácido y luego tratar el residuo con celulasa. La fracción restante se considera que es la pared celular no digerible.

N-alcanos de cadena larga. Los n-alcanos de cadena larga o cadena impar (C-19-C-35) que se encuentran en la cera cuticular de plantas forrajeras, pueden servir como marcadores y se utilizan cada vez más en la estimación de la ingesta de forraje. La recuperación de estos marcadores en las heces aumenta con el aumento de longitud de la cadena, aunque C-35 tiene una recuperación de sólo el 93%, lo que puede limitar su utilidad para determinar la digestibilidad. Sin embargo, se ha observado que su uso permite calcular con mayor precisión la digestibilidad que la lignina. Otra ventaja radica en que la determinación de n-alcanos es más precisa que la de la lignina y son estables, mientras que los cromógenos no lo son.

Óxido de cromo. Este compuesto se utiliza como marcador externo y añadido a la ración, debe mezclarse a fondo; si se utiliza en forma de polvo tiende a separarse de la fracción gruesa y pasará a través del intestino a una velocidad diferente al resto de la dieta. Para lograr mejores resultados con este marcador, se sugiere mezclar con pulpa de papel y moler hasta un tamaño de partícula similar al de la fracción gruesa del alimento, lo que facilitará su mezcla con la dieta. Esto no es posible en condiciones de pastoreo.

En razón a que los animales necesitan ser dosificado con el óxido de cromo, buenos resultados se pueden lograr con los animales canulados introduciendo la preparación de óxido de cromo en rumen. Alternativamente, se han usado cápsulas de gel que contienen cromo. El uso de un bolo de liberación lenta de óxido crómico resulta en una estimación fiable de la producción fecal.

La recuperación de óxido de cromo a menudo no es completa y otra dificultad

es que presenta la variación diurna en su patrón de excreción, lo que implica que el muestreo aleatorio de las heces puede no proporcionar una muestra verdaderamente representativa de las heces. La variación diurna se reduce si el óxido de cromo se administra con mayor frecuencia (por lo menos dos veces al día) o si su liberación en el intestino es continua (por el uso de óxido de cromo impregnado en papel o en un bolo). También es

importante que se administre durante al menos 10 días antes de la toma de muestras fecales y muestras de las heces deben tomarse con mayor frecuencia (al menos cuatro veces al día).

En este tipo de ensayos se requiere una curva de calibración, para lo cual, se debe utilizar muestras fecales de animales que no ingirieron el cromo y es esencial que estas muestras fecales se obtengan de animales que pastan los mismos forrajes que los utilizados por los animales dosificados con el cromo.

Poliamida granulada. Este marcador se administra a través de cápsulas de gel cada 12 h, y se ha observado que en 4 días se obtiene un estado estable y su recuperación está cercana al 98% y no es afectado por el tipo de dieta o el nivel de consumo de alimento, a menos que la dieta contenga menos de 9,26 g N kg⁻¹ de MO. El uso de este marcador, requiere un programa de toma de muestras a lo largo del día, pero la ventaja es que es barato y no requiere técnicas analíticas sofisticadas.

Preparación de muestras para análisis. Las muestras de alimento y heces se deben secar rápidamente para conseguir mayor precisión de la DMS; el secado muy lento aumenta la pérdida de materia seca, pero si se secan a una temperatura demasiado alta, algunos compuestos se perderán por volatilización y los ensilajes son especialmente vulnerables a la pérdida de compuestos volátiles por secado en horno. El secado a una temperatura demasiado alta puede afectar también a la estimación de fracciones de fibra en el alimento y las heces, y esto afectará a los cálculos de su digestibilidad.

Generalmente, el alimento y las heces se secan en estufa a 60 °C y después de la determinación de materia seca y materia orgánica, se muelen a través de un tamiz de 1 mm para posteriores análisis. Sin embargo, el contenido de N y ácidos grasos volátiles del ensilaje, se debe calcular utilizando una muestra fresca, y el contenido de energía bruta de forrajes debe determinarse utilizando muestras de forraje fresco que han sido picadas en nitrógeno líquido.

5.3.2.3 Uso de las heces para pruebas de digestibilidad. La función principal del líquido ruminal es proporcionar una fuente de organismos fibrolíticos, lo que deja abierta la posibilidad de que estos podrían ser obtenidos en otros lugares. Muchos investigadores han encontrado que la actividad de los inóculos ruminales se ve afectada por la dieta de la donante.

Una desventaja es la necesidad de donantes fistulados para proporcionar el líquido, ya que esta práctica está restringida en muchos países, aparte de los costos de preparación y mantenimiento de los animales. Estas consideraciones llevaron a pensar en el uso de las heces como una fuente alternativa de organismos fibrolíticos.

El uso de organismos fecales para la estimación de la digestibilidad de los forrajes, fue primeramente explorado por, utilizando líquido procedentes de heces de ovejas. Ella usó un homogeneizado filtrado de las heces de oveja en saliva artificial, en lugar de líquido ruminal y demostró que el papel de filtro fue digerido por líquido fecal, obteniendo una correlación de 0,93 con la digestibilidad In vivo de materia seca. También se ha demostrado que las heces de equinos y bovinos contienen actividad apropiada para el método.

A pesar de algunos resultados contradictorios del efecto de la dieta sobre la actividad del líquido fecal, parece ser menor que el observado cuando se utiliza contenido ruminal. Por lo tanto el líquido fecal es útil cuando el material donante debe ser obtenido a partir de animales criados en libertad.

Validación del método de líquido fecal. El tiempo de solubilización de la materia seca de las muestras de forraje suspendido en el rumen en la técnica In situ, se aproxima a una asíntota, tomada para representar la degradabilidad potencial de la muestra. Bajo condiciones In vitro, en el método del líquido ruminal o fecal, la degradación de fibra sigue un curso similar. Si el líquido posee alta actividad, la degradación de la mayoría de los forrajes será casi completa en las primeras 48 h, produciendo resultados cercanos a la digestibilidad In vivo aparente. Desafortunadamente, no es fácil medir si la degradación de la fibra es completa cuando se alcanza el tiempo predeterminado. El líquido de baja actividad puede necesitar más de 48 h para alcanzar el potencial de degradación.

Para una mayor confiabilidad de los resultados de digestibilidad, la constante a de la siguiente ecuación debe ser muy pequeña y el coeficiente b debe aproximarse a 1, lo que indica que la digestión ha llegado a sus límites naturales:

$$\text{Digestibilidad In vivo aparente} = a + b \times \text{la digestibilidad In vitro}$$

Para lograr una digestión completa en henos de baja digestibilidad y pajas, puede ser necesario aumentar la relación líquida/muestra o aumentar la duración de la incubación. El líquido fecal ha sido utilizado

en investigaciones de la dinámica de producción gases, aunque esta situación puede ser complicada por la variabilidad de las preparaciones del líquido fecal, ya que los carbohidratos fibrosos se solubilizan lentamente, a una velocidad dependiente de la actividad del líquido y su velocidad de conversión de la producción de gas se ve limitada cuando han se agotan los compuestos solubles iniciales. Por lo tanto, mientras el volumen total de gas debe ser independiente de la calidad del inóculo, la tasa de producción de gas dependerá de la preparación del líquido y del alimento.

Factores que afectan la actividad del líquido fecal. Las heces de varias especies se han investigado, encontrando que el líquido de las heces de cabra y las de conejo (en tampón fosfato) produjeron fuertes correlaciones con In vitro con resultados donde se utilizó líquido fecal bovino. La digestibilidad total fue menor con heces de cuy, posiblemente porque los comprimidos fecales no proporcionaron un ambiente interno propicio para la sobrevivencia de un número suficiente de microorganismos celulolíticos.

Cuando se compararon diferentes líquidos fecales elaborados a partir de diferentes especies, las heces de las ovejas mostraron la mayor actividad fibrolítica, por ello se consideran la fuente fecal preferida.

Efecto de la dieta. Las heces obtenidas de ovejas alimentadas con heno o cantidades iguales de heno y concentrado, produjeron resultados similares. Residuos de alimento que llegan al intestino grueso proporcionan suficiente sustrato fibroso para sostener una población bacteriana celulolítica activa y la adición de concentrado a la dieta no influyeron en los resultados de digestibilidad In vitro.

También se observó que los inóculos provenientes de animales alimentados con heno y concentrado fueron más estables cuando se almacena en condiciones aerobias que los obtenidos a partir de donantes alimentados con una dieta de solo heno, por lo que se sugiere que la dieta de los animales donantes, deba contener suficiente fibra.

Duración de las heces. Los estudios sugieren utilizar las heces fecales dentro de 1 h posterior a la deposición, para que los comprimidos no pierdan el ambiente propicio para las bacterias celulolíticas. No obstante, se ha comprobado que las heces ovinas mantienen sus capacidades celulolíticas por un máximo de 24 h cuando se almacenan a temperatura ambiente o a 5 °C, en condiciones anaeróbicas.

De otra parte, se ha reportado que la producción de gas de heno, con líquido fecal se redujo después del almacenamiento de las heces durante 1 h bajo condiciones aeróbicas temperatura ambiente, lo que indica mayor sensibilidad de organismos celulolíticos que los no celulolíticos.

La mayoría de las investigaciones recientes han utilizado las heces recién evacuadas, encontrando que las heces obtenidas hasta 2 h antes de la preparación del inóculo, produjeron una correlación significativa ($r^2 = 0.85$) de la digestibilidad In vitro de líquido fecal, con el líquido ruminal In vitro, pero resulta inferior a la de otras investigaciones que utilizaron heces frescas.

Elección de la solución tampón. Se ha encontrado que la producción de gas es mayor cuando se utiliza tampón de bicarbonato a la obtenida con tampón de fosfato, ya que el tampón de bicarbonato

reacciona con los productos ácidos de la fermentación para liberar CO_2 . Adicionalmente, se encontró que las heces de ovejas y cabras eran igualmente eficaces para pruebas de digestibilidad In vitro, ya sea en un buffer fosfato o un bicarbonato. Las heces conejo, sin embargo, mostraron menor digestibilidad cuando se utilizó en un tampón fosfato que un bicarbonato.

Relación heces solución tampón. Usualmente se utiliza 60 g de heces por cada 300 ml^{-1} de saliva artificial, pero se ha encontrado que 60 g l^{-1} produce un inóculo más activo y la separación bacteriana resulta más eficiente cuando se utiliza una mayor proporción de tampón a heces. Adicionalmente se ha reportado que mayores concentraciones de heces (hasta 120 g l^{-1} de tampón) producen un aumento en la digestión In vitro y / o las tasas de producción de gas.

Diluciones de materia seca entre 1:20 y 1:50 producen similares volúmenes de gas; por encima o por debajo de estas, la producción de gas a partir de sustratos fibrosos se reduce. La disyuntiva parece existir entre la masa de heces utilizada y la potencia del inóculo. Un volumen demasiado pequeño de heces contiene insuficientes bacterias celulolíticas, mientras que si es demasiado grande, inhibe la separación de las bacterias.

Mezcla de muestra y líquido fecal. El líquido fecal debe mezclarse muy bien con la muestra de forraje. Las muestras de forraje seco pueden aglutinarse cuando se añade el inóculo, lo que reduce la superficie de

contacto disponible para la colonización, haciéndose necesario un sistema de agitación durante la incubación.

Las muestras se agitan durante 30 s para suspender los sólidos, después de añadir el líquido fecal, se sellan los tubos de digestión y se introducen en baño María con rotor.

Duración de la incubación. La colonización microbiana de un forraje fresco es rápida y se concentra en torno a los sitios de daño mecánico y estomas, para proseguir con la colonización de las células internas de manera irregular y lenta.

Se ha informado que la digestión celulolítica es completa después de 48 h de incubación con fluido ruminal y fecal para la mayoría de los forrajes. Sin embargo, para forrajes de alta digestibilidad, el período de incubación se puede reducir a 36 h, mientras que 72 h de incubación para la paja resultan necesarias para lograr una buena correlación con los datos *In vivo*. La presencia de taninos en los forrajes prolonga los tiempos de incubación con cualquiera de los dos inóculos.

Factores que afectan la segunda fase de incubación. Al igual que en el procedimiento de Tilley y Terry (1963), el residuo que queda después de la incubación se digiere adicionalmente en una segunda fase, utilizando pepsina ácida para solubilizar proteínas y los materiales ligados a proteínas, antes de que el residuo no digerido se seque y se pese. Para ello, el residuo se separa del inóculo antes de la acidificación, para evitar la formación de espuma en la solución tampón de bicarbonato. Al utilizar el tampón de fosfato no necesita extensa gasificación con CO₂ y permite acidificación directa sin formación de espuma. Se recomienda que la concentración de pepsina sea de 2 g a 4 g l⁻¹ y la duración de la incubación con pepsina se puede limitar a sólo 8 h.

Posteriormente se procede a la centrifugación de líquido fecal a 2000 g durante 20 min, una vez completado, requiere la eliminación sobrenadante con una pipeta.

La filtración es menos satisfactoria ya que el residuo fecal bloquea rápidamente el filtro, para lo cual se recomienda utilizar crisoles filtro. La filtración después de la digestión secundaria con pepsina ácida es más rápida y fácil.

Un agente proteolítico alternativo, el líquido de lavado biológica (Persil) en una cantidad de 0,2 a 1 ml por muestra, ha sido probado y su ventaja

es que no se requiere la acidificación, por lo que se evita la formación de espuma. Además, la separación final del sobrenadante se puede lograr por sedimentación.

Futuro de la técnica de líquido fecal. .La principal ventaja es su simplicidad y su bajo costo comparado con los métodos basados en inóculos ruminales, utiliza productos de desecho de fácil disposición en las granjas y ahorra el mantenimiento de animales fistulados.

Solo se requiere de animales sanos para obtener las heces, botellas, productos químicos baratos, dióxido de carbono, una incubadora, una centrífuga y una balanza analítica.

En laboratorios con condiciones técnicas prolijas, el método más limpio y rápido para la estimación de la digestibilidad, es la espectroscopía de reflectancia del infrarrojo cercano (NIRS). No obstante, el procedimiento de las heces resulta adecuado cuando no se dispone de equipo sofisticado y aventaja al NIRS, que siempre necesita un conjunto de estándares de calibración, que lo suelen tornar complejo.

5.4 Técnica de índices fecales

En el método de índices fecales, la digestibilidad se calcula solamente a través de la concentración del indicador en las heces. Este indicador no necesita ser totalmente indigerible o enteramente de origen exógeno.

La primera sustancia y todavía más ampliamente utilizada como índice fecal es el nitrógeno. Su uso surgió originalmente de los informes de, quienes prestaron atención al hecho de que mucha parte del nitrógeno de las heces de los rumiantes tenía un origen endógeno. Este nitrógeno metabólico fecal conocido como NMF incluye desperdicios de mucosas y de la población microbial principalmente del rumen y de las excreciones no absorbidas en el intestino.

Se han estudiado la fibra cruda, el nitrógeno y los cromógenos como índices fecales para el rango muy amplio de forrajes como concentración en las heces, en este caso el nitrógeno fue la sustancia indicada de preferencia por la simplicidad en su determinación. La cantidad excretada está relacionada con la cantidad de él en el alimento consumido y su concentración en las heces aumenta cuando la digestión es mayor. Entre el 5 – 10% del nitrógeno excretado en las heces se origina del presente en los alimentos, por lo tanto comúnmente tiene una digestibilidad verdadera del 90 – 95%.

Las sustancias que se emplean como índices fecales, se relacionan frecuentemente al factor de consumo $100/100 - D$, o alimento/heces (mejor que emplear digestibilidad (D) ya que este factor puede ser usado directamente para estimar el consumo de forraje). El consumo se calcula empleando la digestibilidad estimada por la ecuación:

$$\text{Consumo de MO (CMO)} = \frac{F}{100 - D} \times 100$$

El consumo de MO puede estimarse a partir de la excreción total del nitrógeno. Las relaciones se establecen por medio de experimentos de alimentación, en confinamiento pueden aplicarse a los animales en pastoreo para la predicción del consumo o la digestibilidad.

Sería adecuado discutir la precisión con la cual se puede realizar la estimación de la digestibilidad con el empleo de índices fecales.

Al comparar el nitrógeno, cobre, magnesio y sílice como sustancias indicadoras en forrajes clasificados desde uno extremadamente tosco y otro muy suave y de alta digestibilidad, se calcularon las regresiones entre el consumo y la excreción total de los indicadores. Las relaciones más precisas se obtuvieron con el nitrógeno como indicador fecal; la segunda relación de importancia fue del magnesio fecal. Para el nitrógeno la desviación estándar residual fue de ± 64 g. El sílice actuó mal como indicador del consumo.

En estudios se compararon la fracción soluble de las heces y el nitrógeno como índices fecales, también el nitrógeno fue el método más preciso y de mayor confianza en todos los alimentos evaluados. Con los métodos se encontraron diferencias significativas entre las ecuaciones de regresión para los diferentes piensos.

Desgraciadamente no se ha podido establecer una regresión general entre la digestibilidad, la relación de alimento a heces o al consumo y el % de nitrógeno o el total de nitrógeno en las heces, que se aplica a todos los forrajes. Además deben considerarse factores animales que incluyen la especie, el estado físico y fisiológico del animal, este último contempla el parasitismo que puede disminuir la digestibilidad, pero aumentar la pérdida de nitrógeno, y la disminución de la digestibilidad ocurre a medida que el nivel de ingestión se eleva y solo se ve compensado parcialmente por el cambio en la excreción de nitrógeno.

Estas son generalmente las fuentes más importantes de variabilidad, el factor de ingestión y el porcentaje de nitrógeno fecal pueden causar serios

sesgos en valores predichos de digestibilidad. Los valores atribuibles al forraje incluyen especie, parte de la planta consumida, época de crecimiento, variación en el contenido de nitrógeno a una digestibilidad dada y la aplicación de fertilizantes nitrogenado.

Es necesario por lo tanto limpiar el rango de forrajes a los cuales se aplican las regresiones. Para obtener altas precisiones, puede ser necesaria una regresión que se limite a una sola especie de forrajes cortada en una época del año. A estas se les llama regresiones “locales” considerando que los animales pastorean selectivamente; existe un riesgo considerable de error al aplicar la regresión obtenida con forraje cortado.

En forraje con un contenido bajo de nitrógeno, es probable que el método de nitrógeno fecal sea menos eficiente. En este caso la proporción de nitrógeno consumido que es retenido será relativamente más alto y por lo tanto la relación CMO – NF varía más con forrajes individuales. Otro problema con ovinos es el hecho de que la relación puede diferir, si el contenido de nitrógeno en el forraje está fuera del rango de 8 – 45 g por día.

5.5 Medición de la actividad celulolítica ruminal por el método del hilo de algodón

Material

1. Hilos de algodón secados al aire, los cuales se cortan a un largo que contenga unos 250 mg de muestra seca.
2. Animales fistulados y mantenidos durante la prueba con una dieta apropiada (ver lo sugerido para digestibilidad IN VITRO).

Procedimiento

Los hilos se colocan en la fistula de tal manera que cuelguen dentro del contenido ruminal procurando que no se adhieren a las paredes. Se puede atar un lastre para impedirlo. Se dejan en el animal por lo menos 48 horas. Al cabo de este tiempo se sacan los hilos, se lavan, se secan y se pesan; la pérdida de peso significa la actividad celulolítica. Algunos autores interpretan como la velocidad de digestión en función del tiempo que tarda el hilo en perder el 25% de su peso.

Nota: Se ha demostrado que el análisis de los ovillos de hilo (nitrógeno) después de los periodos de suspensión en el rumen correlacionan bien con la actividad microbiana.

5.6 Digestibilidad de forrajes por el método de las membranas de filtración (vivar)

Este método determina la actividad microbiana del rumen en un sistema semicerrado el cual sin embargo está en equilibrio con el medio ambiente del rumen.

Material

1. Medios nutritivos, inóculo y amortiguador semejantes a los descritos para las pruebas IN VITRO.
2. Se utilizan pequeños tubos de vidrio o acero inoxidable de 50 ml aproximadamente de capacidad los cuales van provistos de tapas para filtración (membranas bacteriológicas Millipore, etc.), el tipo de membrana se elige de acuerdo al tipo de selección que se espera hacer. El tamaño del poro de la membrana permitirá el paso de sustancias diferentes.
3. Animales fistulados ovinos o novillos como el caso de la prueba IN VITRO, de las bolsas de nylon, etc., alimentados a base de forrajes de buena calidad.

Procedimiento

Pesar 1 – 2 g de forraje seco y molido (criba de 1 mm) agregarle 30 ml del medio nutritivo y del amortiguador inóculo a 39 °C, tapar el tubo con la membrana deseada y colgarlo dentro del rumen, colocándolo de manera que quede en el centro. Incubar por 48 horas. Al cabo de este tiempo secar el tubo, filtrar en crisoles tarados, lavar secar y pesar. La pérdida de peso se define como la digestibilidad del forraje.

5.7 Técnicas enzimáticas para determinar digestibilidad

El desarrollo y aplicación de métodos de laboratorio para predecir la calidad nutritiva de los forrajes, ha sido un área activa durante los últimos tiempos. Una novedad importante ha sido la introducción de métodos biológicos, utilizando un inóculo microbiano ruminal como medio de digestión, en lugar del análisis químico de los componentes, especialmente los fibrosos. Aunque los métodos que utilizan inóculos microbianos se han utilizados ampliamente para diferentes forrajes, hay problemas inherentes a su uso. Por ello, la atención se ha centrado recientemente en la sustitución de inóculo microbiano por técnicas de enzimáticas que utilizan preparaciones de celulosa cruda.

Los métodos de determinación de digestibilidad utilizando inóculo microbiano ruminal han dado resultados bien correlacionados con los resultados de digestibilidad vivo. Sin embargo, se han reconocido algunos problemas en el uso de microorganismos.

1. La actividad de los microorganismos ruminales se pierde o se altera por congelación y secado u otros métodos de conservación. Por lo tanto, el fluido ruminal fresco debe estar fácilmente disponible, lo que implica tener ovejas o bovinos fistulados como animales donantes.
2. Los donantes deben ser mantenidos en un régimen de alimentación controlado para minimizar la variabilidad en la potencia del inóculo, lo que demanda mano de obra calificada para la alimentación y el cuidado de los animales.
3. Hay dificultades analíticas en el uso del líquido ruminal, como la necesidad de mantener condiciones anaeróbicas, la alta viscosidad de la digesta que complica la filtración, olores desagradables y la necesidad de mantener condiciones higiénicas estrictas para evitar riesgos de infecciones.
4. Existe controversia sobre el uso de animales modificados quirúrgicamente en experimentación, requiriéndose metodologías alternativas para estos propósitos.

Características y actividades necesarias para las técnicas enzimáticas. El uso de enzimas celulolíticas como alternativas al fluido ruminal, constituye una metodología interesante, más si su uso da resultados comparables a los de los métodos de inóculo, ya que elimina la necesidad de los animales fistulados y procedimientos anaeróbicos, simplificando los análisis y eliminando la variabilidad en la actividad entre lotes analíticos.

Los componentes químicos de los forrajes se pueden dividir en los que constituyen la estructura de la planta (pared celular) y las contenidas dentro de la célula (contenido celular). Estos últimos son completamente digestibles *In vivo* y comprenden carbohidratos solubles, almidón, proteínas, ácidos orgánicos, lípidos y minerales solubles. La pared celular contiene celulosa, hemicelulosa y lignina, cuya digestibilidad varía en función de la configuración de polímero, grado de cristalinidad y nivel de lignificación. La lignina es en gran medida no digerible en condiciones anaeróbicas y su presencia ejerce un importante efecto sobre la digestibilidad de las fracciones de pared celular asociadas con ella. La digestibilidad *In vivo* de la celulosa y la hemicelulosa, varía desde completamente digestible cuando no está lignificada hasta ser cuando está altamente lignificada; la cutícula y las ceras también son en gran medida indigeribles.

Las actividades enzimáticas como procedimientos analíticos se buscan para predecir la digestibilidad *In vivo* y deben reflejar los procesos digestivos en el rumiante. El análisis se necesita para eliminar los componentes solubles (contenido de células) y para solubilizar la fracción no lignificada e incluso lignificada moderadamente pared celular en un grado significativo. El grado de solubilización no tiene por qué ser tan completa como *In vivo*, pero necesita reflejar los efectos de la lignificación de una manera comparable y correlacionada. Los componentes solubles se eliminan fácilmente en los pretratamientos con pepsina ácida o detergente neutro, que forman parte de la mayoría de los métodos enzimáticos propuestos.

La presencia de almidón en ciertos cultivos forrajeros (maíz, cereales) necesita ser tomado en cuenta, ya que no se elimina por la pepsina ácida, detergente neutro o incubación con las enzimas que degradan la pared celular. Un tratamiento adicional con amiloglucosidasa o hidrólisis ácida suave, se requiere en el análisis de los forrajes que contienen almidón.

La enzima que degrada la pared celular debe ser lo suficientemente activa para lograr la solubilización de una cantidad significativa de la pared celular. Preparaciones de celulasa cruda están fácilmente disponibles en forma líquida o sólida, para hidrolizar tanto de celulosa y hemicelulosa.

Hay una gran disparidad en la actividad de celulasas fúngicas de diferentes fuentes y esto resulta esencial para establecer la actividad de la celulasa en función de la pared celular de plantas o papel de celulosa y no a los derivados solubles, tales como carboximetilcelulosa. Celulasas crudas de especies de *Trichoderma*, se ha encontrado que son las fuentes más confiables de celulasa cruda.

Fuentes de enzimas celulolíticas. Hongos y otros microorganismos que producen enzimas capaces de digerir la fibra de plantas, están ampliamente distribuidos en la naturaleza, aunque aquellos capaces de degradar la celulosa cristalina son menos comunes.

Existe una amplia variedad de fuentes potenciales de celulasas para su uso en análisis de forrajes. Idealmente, el sistema enzimático utilizado para predecir la digestibilidad *In vivo* se deriva de microorganismos ruminales. Los intentos de extraer preparaciones de celulasa activa de microorganismos ruminales para uso en ensayos enzimáticos han sido ineficaces en comparación con hongos aeróbicos, lo que se ha asociado con el hábito de crecimiento anaeróbico de microorganismos en el rumen, por ello, el rendimiento de hidrolasas extracelulares es pobre en comparación con la de los hongos aeróbicos.

Otros factores significativos en la producción de enzimas incluyen el hecho de que las celulasas bacterianas de rumen no son extracelulares, en tanto que las enzimas hidrolíticas producidas por los hongos anaeróbicos de rumen, son una excepción y los cultivos de estos organismos tienen una considerable actividad hidrolasa extracelular. Sin embargo, la capacidad de producir cantidades significativas de hidrolasas por los hongos intestinales está limitada debido a que estos organismos no son anaerobios.

En vista de las dificultades en la obtención de enzimas celulolíticas de rumen, la atención se ha dirigido hacia los hongos celulolíticos aeróbicos. La celulasa y los sistemas enzimáticos asociados de estos hongos son extracelulares y son por lo tanto fácilmente recuperables del fluido de cultivo, que contiene una mezcla de sales, nutrientes y celulosa. Después de un período de crecimiento de 7-10 días en condiciones aeróbicas, el fluido se retira por filtración y se conserva seco y en refrigeración.

Las celulasas de *Trichoderma*, se han identificado como más activas que las de otros hongos, por lo que los extractos de este hongo se han estudiado ampliamente para determinar la naturaleza del complejo de celulasa. Estos comprenden complejos de varias enzimas que incluyen exocelulasa y

endocelulasas, que atacan las formas amorfas del polímero de celulosa, la producción de polímeros de cadena más corta, y una celobiohidrolasa, que hidroliza la celobiosa a glucosa.

Limitantes de la técnica de celulosa. Los experimentos muestran que las técnicas basadas en celulosa para determinar la digestibilidad *In vivo*, son comparables en la precisión con los métodos de digestión con inóculo y tienen mayor precisión que los métodos químicos. El uso de una celulasa activa (por lo general de *Trichoderma*), en un proceso simple de digestión con celulosa, permite una estimación rápida, fiable y de bajo costo de la digestibilidad.

También se ha demostrado que la precisión de la prueba de digestibilidad *In vivo* mejora significativamente si el forraje se trata previamente con pepsina ácida, o detergente neutro o ácido clorhídrico a razón de 2 mol l⁻¹ antes de la digestión con celulosa, aunque este tratamiento eliminaría hemicelulosas y almidón, mientras que los métodos de detergente y la pepsina requieren una digestión adicional con amiloglucosidasa o hidrólisis ácida para su eliminación.

Se afirma que esta metodología es menos variable que el método *In vitro* de Tilley y Terry (1963) para predecir la digestibilidad *In vivo* de la hierba fresca; los métodos enzimáticos fueron menos afectados por factores como el año de cosecha, la edad del cultivo y la ubicación, pero se vieron afectados por las diferencias entre especies. Las ecuaciones para predecir la digestibilidad *In vivo* diferían significativamente entre estaciones.

Las relaciones entre la digestibilidad *In vivo* y la solubilidad enzimática para diferentes cultivos, suele variar bajo diferentes condiciones medioambientales, ya que estas pueden influir en el grado de lignificación de la pared celular. Las diferencias en la composición botánica también pueden ser importantes, ya que parece que las paredes celulares de las leguminosas se solubilizan más fácilmente con celulosa que las de gramíneas, adicionalmente, la digestión *In vivo* puede verse influenciada por factores que no afectan a la solubilidad de celulosa, como nivel de la alimentación, el picado o el contenido de nutrientes del alimento.

Otros factores que podrían influir en las ecuaciones de predicción para ensilajes son las pérdidas de componentes volátiles durante el secado de la muestra o la influencia del grado y tipo de fermentación sobre la función del rumen, haciéndose necesario realizar más estudios para determinar otras ecuaciones de predicción derivados de la solubilidad enzimática en diferentes condiciones ambientales y de otros tipos de forrajes.

De los métodos de celulasa actualmente en uso, el método de la pepsina-celulasa es el que permite obtener resultados en menor tiempo, es más fácil de manipular, utiliza material de vidrio y productos químicos de bajo costo, tienen una mayor exactitud analítica que la técnica de detergente y genera más eficiencia del operario, que con los métodos que implican reflujos con detergente o ácido fuerte.

5.8 Técnica de producción de gas para la evaluación de forrajes

La búsqueda de un método de laboratorio simple, barato y confiable para calcular el valor nutritivo de los alimentos para rumiantes, aunado a los actuales requerimientos de bienestar animales que plantean la necesidad de usarlos menos en la experimentación, han conducido a la búsqueda de procesos alternativos en la valoración de los forrajes.

En este sentido, se han planteado procesos digestivos que simulan en el laboratorio (*In vitro*), las condiciones que se suceden normalmente en un animal (*In vivo*). La técnica *In vitro* de producción de gas representa una metodología que permite determinar la extensión y la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo.

No obstante, la degradación microbiana de forrajes en el rumen es un proceso complejo que implica variadas interacciones, tanto entre los microorganismos presentes (bacterias, protozoos y hongos) y el huésped. Adicionalmente, existen otros factores que deben ser considerados cuando se trata de simular el ambiente del rumen y que incluyen la temperatura, pH, capacidad de amortiguación, anaerobiosis y fuente de nitrógeno.

Técnica *In vitro* de producción de gases. Las técnicas de producción de gas son de mucho interés en la valoración de los animales por su habilidad para evaluar las dinámicas de digestión y su potencial para simular los procesos de digestión en el rumen. La técnica de producción de gas *In vitro* caracteriza los alimentos por su cantidad de carbohidratos digestibles y por la tasa a la cual estos nutrientes son liberados. Este sistema resulta útil para evaluar rutinariamente los forrajes, porque produce resultados con alta precisión y repetitividad.

Limitaciones de la técnica. Los factores que afectan la medida de la producción de gas se pueden resumir en:

- La solubilidad de los gases en los líquidos
- Tipo de fermentación
- Producción de gas indirecta a partir del buffer del medio de cultivo
- Contenido de N de la muestra
- Tamaño de partícula
- Procesamiento de la muestra

Predicción de la digestibilidad. Se ha demostrado que la producción de gas está relacionada con la desaparición de la FDN y al respecto, se reporta que la relación entre ambos conceptos es lineal, con una pendiente marcadamente constante. Igualmente se ha encontrado una alta correlación entre la producción de gas *In vitro* y la disponibilidad del almidón en los granos de cereales. Adicionalmente se menciona que existen significativas correlaciones entre la tasa fraccional de desaparición de la MS *In situ* y la tasa fraccional de producción de gas. Por otra parte, se asegura que la diferencia entre los valores estimados de fermentabilidad de los forrajes empleando técnicas *In situ* e *In vitro* se presenta por la más baja fermentación de la fibra en el sistema *In vitro*, que pudiera obedecer a factores antinutricionales que se acumulan en el medio de incubación alcanzando niveles inhibitorios para los microorganismos, en tanto que en la técnica de la bolsa de nylon la toxicidad para los microorganismos se diluye.

Procedimiento

- a. **Preparación del sustrato.** El muestreo se debe realizar de acuerdo con las recomendaciones descritas en el acápite correspondiente, en función de la especie (herbácea, arbustiva, arbórea, tubérculo, heno, concentrado, ensilaje, etc.), y la fracción (hojas, tallos, raíces, flores, frutos, etc.) que se desea muestrear.

Una vez obtenida la muestra, el secado debe hacerse a baja temperatura (60 - 70°C), para pasar luego a molienda que favorezca la superficie de ataque microbiano y para ello se recomienda moler a través de una malla de 1 mm. La cantidad de muestra requerida en esta técnica es de 1 g.

- a. **Preparación de los frascos de incubación.** La incubación se debe realizar en frascos de vidrio (viales N20) con capacidad de 110 ml. Los cuales deben ser lavados con abundante agua, secados a 105°C por 12 horas y rotulados; posteriormente se pueden saturar con CO₂ y agregar 1 gramo del sustrato.
- b. **Preparación del medio.** Todos los medios en uso tienen en común tampón de bicarbonato y fosfato, un agente reductor, una fuente de nitrógeno, varios minerales, y resazurín como indicador de potencial redox. En todos los casos, el CO₂ es usado durante la preparación del medio para asegurar un bajo potencial redox al momento de la inoculación, ya que la ausencia de anaerobiosis resulta en pérdidas de bacterias celulolíticas y amilolíticas indican que el gaseo continuo con CO₂ y los agentes reductores promueven un menor tiempo de colonización y una más rápida digestión de la FDN.

A continuación se describe el procedimiento de preparación del medio de digestión para 100 botellas, el que se debe preparar un día antes de la inoculación.

- **Solución buffer (2).** En 3400 ml de agua destilada previamente calentada a 39°C se adicionan cuidadosamente 13,6 g de Carbonato ácido de Amonio (NH₄HCO₃) y 119 g de Carbonato ácido de Sodio (NaHCO₃) mezclando hasta conseguir una completa disolución. Esta solución se reserva en refrigeración y se marca como solución 2.
- **Solución macro-mineral (3).** En un recipiente que contenga 3400 ml de agua destilada previamente calentada a 39°C, se adiciona 15,2 g de Ortofosfato ácido di-sódico (Na₂HPO₄-12 H₂O), 21,08 g de Ortofosfato di-Hidrogenado de potasio (KH₂PO₄) y 2,04 g de sulfato de Magnesio (MgSO₄-7H₂O), esta solución se reserva como solución 3.
- **Solución micro-mineral.** En 10 ml de agua se adiciona 1,32 g de cloruro de Calcio di hidratado (CaCl₂-2H₂O), 1 g de cloruro de Manganeso tetra-hidratado (MnCl₂-4H₂O), 0,1 g de cloruro de cobalto hexahidratado (CoCl₂-6H₂O) y 0,8 g de cloruro férrico hexahidratado (FeCl₃-6H₂O), se mezcla y se reserva.

Solución de Resazurín. En 25 ml de agua se disuelven 0,025 g de resazurín.

- c. **Agente reductor.** En 400 ml de agua se mezclan la cisteína (2,5 g), el NaOH 1M (16 ml) y el sulfuro de Sodio (2,5 g). En caso de no disponer de NaOH 1M, se prepara mediante la disolución de 4 gramos de NaOH en 100 ml de agua.

Medio de digestión. Inicialmente se prepara la solución 1, en 1681 ml de agua destilada a la que se adiciona el triptycase peptona (3,4 g) y 1,7 ml de solución micro-mineral, homogenizando completamente. Se recomienda emplear peptona liofilizada, puesto que la que viene en roca resulta muy complicada de mezclar con el agua.

Una vez se tienen las soluciones 1, 2 y 3, junto con la solución de Resazurín y el agente reductor se proceden a mezclar en un recipiente amplio todas las soluciones, en el siguiente orden y cantidades.

- 1681 ml de solución (1)
- 3400 ml de la solución (2)
- 3400 ml de la solución (3) y
- 17 ml de solución de Resazurín

Una vez se ha homogenizado completamente se gasea por espacio de 5-10 minutos con CO₂.

Con la ayuda de una bureta, se agregan 85 ml de la mezcla a cada una de las botellas a incubar, las que deben contener 1 gramo del sustrato y se adicionan 4 ml de solución reductora la que permitirá obtener una coloración rosada.

Cuando las botellas contienen el sustrato, el medio y la solución reductora, se sellan con corchos plásticos y posteriormente con sellos de aluminio, con la ayuda del crimper manual, y se llevan a refrigeración hasta el día siguiente a una temperatura de 4-5 °C.

- d. **Inóculo.** Se recomienda coleccionar el inóculo antes de la alimentación de por lo menos de tres animales donadores que estén consumiendo la misma dieta. La incubación de un mismo sustrato puede conducir a diferentes resultados de producción de gas, lo que debe corregirse por la introducción de estándares de producción de gas conocida.

Preparación. El licuado incrementa en el inóculo el número de bacterias previamente adheridas a la fibra, la mayoría celulolíticas, pero también el número de partículas pequeñas del alimento, por lo que la producción de gas en los frascos de incubación y en los blancos puede aumentar. El licuado puede también aumentar el riesgo de exposición al oxígeno si el flujo de CO₂ no es suficientemente fuerte.

Inoculación. El día de colección del inóculo se alista previamente un termo precalentado a 39°C con agua caliente, suficiente gasa plegada en cuatro dobleces para el filtrado, un embudo y un recipiente amplio.

En el caso de coleccionar inóculo de animales fistulados, la colección se debe hacer en las primeras horas de la mañana, teniendo en cuenta que los animales estén siendo alimentados con una misma dieta básica, la que no necesariamente debe estar compuesta de las pasturas o especies a evaluar.

En el caso de coleccionar inóculo de tipo fecal, esta colección se debe de hacer también en horas de la mañana y *per rectum* con la ayuda de mangas plásticas, descartando siempre las primeras porciones encontradas a lo largo de la porción terminal del tracto digestivo.

Cuando se trata de una colección de inóculo ruminal de animales sacrificados, se debe asegurar que estos fueron alimentados antes del sacrificio y una rápida evisceración para evitar la muerte de la población ruminal. Una vez coleccionado el inóculo y depositado en los termos, este se debe transportar lo más pronto posible hasta el laboratorio, (30-45 minutos máximo) donde será filtrado a través de la gasa hacia un recipiente amplio y posteriormente aclimatado a 39°C y gaseado constantemente con CO₂ antes de la inoculación.

Cuando el inóculo proviene de heces, para facilitar el proceso de filtrado, dada su consistencia, se recomienda preparar una cantidad adicional de solución tampón para mezclarla con estas y así facilitar su homogenización.

La cantidad de solución tampón a utilizar se puede manejar en una proporción de 1 a 2, es decir 2 partes de inóculo fecal por 1 de solución tampón.

Tras el gaseo continuo, con ayuda de jeringas se adicionan 10 ml de inóculo a cada una de las botellas, las que previamente han sido sacadas de refrigeración y calentadas a 39°C.

Una vez inoculadas, se debe ajustar la presión de las botellas a cero y estas deben ser llevadas a temperatura constante de 39°C en un baño maría, donde se llevará a cabo todo el procedimiento de fermentación.

Finalmente cada una de las botellas deberá contener:

- a. 1 gramo de muestra
 - b. 85 ml de medio de digestión
 - c. 4 ml de agente reductor
 - d. 10 ml de inóculo
- e. Blancos.** Una serie de botellas blanco que deben contener medio e inóculo pero no sustrato, se deben incluir rutinariamente en cada corrida. El promedio de gas registrado por los blancos, que normalmente corresponde al 13-27% de la lectura final, es restado del el total de gas producido por los sustratos evaluados, para obtener el total de gas realmente derivado de la fermentación del sustrato investigado.
- f. Estándares.** Al igual que los blancos, los estándares (tres botellas con heno, heno+almidón, concentrado o pasturas de producción de gas conocida) deben correrse en cada experimento. Cada estándar tiene una producción de gas conocida, determinada por el promedio de muchas réplicas. Si el estándar incluido dentro de una corrida produce entre el 90 y el 110% del gas con respecto al valor promedio, entonces el fluido ruminal es calificado como normal y todas las medidas de volumen de gas son corregidas por el factor “promedio del volumen estándar/volumen estándar de la corrida”. Si, el volumen estándar de la corrida está por fuera del rango, los resultados no serán confiables.
- g. Lecturas de presión y volumen de gas.** La presión (psi=libras por pulgada cuadrada) originada por los gases acumulados en la parte superior de los frascos, se mide a través de un transductor de presión con lector digital conectado a una fuente de energía de 15 voltios y a una válvula de tres salidas. La primera salida se debe conectar a una aguja (0.7 mm), la segunda es conectada al transductor de presión y la tercera a una jeringa plástica que sirve para la medición del volumen de gas.

Para la medición de la presión, la aguja acoplada a la válvula debe ser insertada a través de la tapa de caucho, y para la medición del volumen,

los gases acumulados en la parte superior se retiran con el uso de una jeringa hasta el momento en que la presión registrada en el lector digital alcance a ser cero.

Las lecturas que permiten obtener una adecuada curva de degradación del material incubado, se realizan en horarios que van de las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 19, 24, 30, 36, 48, 60, 72 y 96 horas y los valores obtenidos deben ser sistematizados para su análisis.

Este proceso se repite en todos los frascos y después de las lecturas deben ser manualmente agitados y reubicados en el baño maría.

h. Muestras para cromatografía. Uno de los objetivos del empleo de la técnica, es lograr cuantificar la producción de gases con potencial de efecto invernadero, y para ello se requiere de la toma de muestras que posteriormente serán analizadas mediante cromatografía de gases, para lo cual se debe incubar una botella adicional por muestra corrida, de la que se extraen los gases acumulados y con ayuda de una jeringa se transfiere el gas a viales de vidrio de 10 ml previamente sellados y ajustados la presión a cero, los que se refrigeran a 4°C hasta tanto puedan ser analizados y posteriormente con ayuda de una jeringa se extraen de los viales y se inyectan al cromatógrafo para su lectura.

Para el caso de análisis y cuantificación de AGV's, de cada botella adicional que se incuba por muestra, se toma una alícuota de sobrenadante, la que se somete al siguiente procedimiento para el análisis cromatografico.

- Se colocan 2 ml de sobrenadante de cada muestra en tubos de ensayo de vidrio con tapa rosca, se les adiciona 2 ml de ácido fosfórico al 30% y se refrigeran a 4°C.
- Tras una refrigeración de mínimo 24 horas, las muestras se centrifugan a 8000 rpm por 10 minutos a fin de separar sólidos de líquidos.
- La fase liquida de cada muestra se transfiere a nuevos tubos de ensayo y se congela durante 12 horas.
- A cada muestra se le adicionan 2 ml de éter etílico y se agita manualmente por espacio de 3 minutos liberando el gas producido de forma gradual.
- Tras la agitación se formaran tres fases fácilmente identificables en el interior de los tubos. Una fase superficial denominada fase etérea u orgánica en la que se hallan contenidos los AGV's y demás compuestos apolares solubles en éter, una fase intermedia a especie de gel,

denominada fase de quelatos, la que contiene compuestos de mayor complejidad, y una fase inferior de consistencia más líquida formada por otro tipo de compuestos.

- Nuevamente las muestras se refrigeran mínimo por 24 horas, al cabo de las cuales se separa la fase etérea y de quelatos de los tubos, a cuyas porciones se le adiciona 1 ml de solución de NaCl al 10%, se agita y se refrigera por 3 horas con el fin de permitir mayor diferenciación de la fase etérea.
 - Posteriormente las muestras se sonicán en un equipo de ultrasonido por 15 minutos aproximadamente y una vez más se separa la fase etérea del resto de los componentes encontrados en la muestra.
 - El procedimiento siguiente es derivatizar mediante la adición de 5 ml de metanol ácido clorhídrico al 5%, dejar las muestras durante la noche en incubación a 50°C, posteriormente adicionar éter y agua destilada para separar las fases hasta obtener la fase etérea lo más diferenciada posible de la que 2 ml se inyectan en el cromatógrafo para su respectivo análisis e identificación de acetato, propionato y butirato principalmente.
- **Filtrado de residuos.** Una vez ha concluido el periodo de experimentación, las botellas se deben almacenar en refrigeración a 4°C hasta el filtrado.

Durante este proceso se debe cuidar minuciosamente el evitar la pérdida de residuo durante el lavado de las botellas, pues de ello depende una acertada determinación de la degradabilidad de la materia seca y demás componentes del alimento.

Después del filtrado a través de crisoles cada una de las muestras se seca en estufa a 105 °C para estimar la degradabilidad de la materia seca y luego el residuo se incinera en mufla a 600 °C para la determinación de la degradabilidad de la materia orgánica.

6

Otros análisis

En este Capítulo se consignan técnicas utilizadas en la determinación de compuestos que a pesar de no ser comunes en la bromatología animal, suelen ser necesarios para dilucidar el verdadero potencial nutricional de algunos alimentos, especialmente aquellos no convencionales.

Normalmente estas determinaciones también requieren de equipos especiales y experiencia del técnico en las valoraciones, hecho que debe visualizarse antes de pretender correr tales pruebas con el objeto de no perder tiempo y esfuerzos en actividades que pueden dejar resultados dudosos y en tal caso se aconseja utilizar los servicios de un laboratorio especializado.

6.1 Determinaciones especiales en compuestos nitrogenados

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

Reactivos

Solución de saliva artificial, g para 2 litros de solución NaHCO_3 19.6 g;
 K_2HPO_4

$3\text{H}_2\text{O}$ 14.0 g; HCL 1.14 g; NaCL 0.95 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.24 g; urea 1.82 g;
glucosa 1.83 g.

Procedimiento

Pesar 5 g de muestra en un matraz que este molida y que contenga 50 ml de la solución de saliva precalentada a 39 – 40°C. Incubar por 4 horas con agitaciones esporádicas a esa misma temperatura. Filtrar a través de un papel filtro Whatman No. 43. Lavar el residuo con 20 ml de solución de saliva, aforar a 100 ml con saliva, determinar en el N₂ por el método Kjeldahl a una alícuota de 10 ml del filtrado y a la muestra original.

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

a. Proteína soluble (nitrógeno soluble en buffer)

Reactivos

Solución Buffer Borato – Fosfato, pH 6.8

Fosfato monosódico (NaH₂PO₄·H₂O) 12.20 g / L

Tetraborato de sodio (Na₂B₄O₇·10H₂O) 8.91 g / L

Alcohol butyl terciario 100 ml/ L

Azida de sodio (Solución al 10% preparada el mismo día)

Procedimiento:

Pesar 0.5 g de muestra seca en Matraz de 125 ml.

Adicionar 50 ml de Sol. Buffer borato-fosfato.

Adicionar 1 ml de Sol. Azida de sodio.

Reposar por 3 horas a temperatura ambiente.

Filtrar a través de papel filtro Whatman # 541 usando vacío suave.

Lavar el residuo con 250 ml de agua destilada fría.

Estimar el N en el residuo por Kjeldahl. Esto representa la fracción de proteína insoluble. La proteína soluble es calculada como la diferencia con la proteína verdadera (determinada por la técnica de NNP) y la proteína insoluble.

Nota: Si se usa la técnica del ácido túngstico, la proteína soluble incluirá péptidos más cortos.

b. Solubilidad de proteína en 0.02N/NaOH.

Este método determina la proteína soluble en NaOH 0.02N en harinas de algodón. Según los autores del método la proteína soluble en NaOH 0.02N se correlaciona muy bien con el valor nutritivo de la harina para pollos.

Se toma 1 g de harina de algodón colocando en un matraz Erlenmeyer de 300 ml se le añaden 100 ml de NaOH de 0.02N. Se lleva a un agitador mecánico ubicado en una estufa a 37°C y se agita suavemente por 1 hora. De aquí se toman 50 ml de la suspensión y se lleva a una centrifuga por 5 minutos a 1000 rpm. Del líquido sobrenadante se toman 25 ml y se realiza con él una determinación de N total por Kjeldahl.

Nota: Los autores del método desarrollaron un proceso para hacer una evaluación química de la proteína de las harinas de algodón relacionando el contenido de gosipol total de la muestra con la solubilidad con NaOH 0.02N, y al cociente que resulta de dividirlos le dieron el nombre de “índice químico” el cual corresponde muy bien al valor de la harina para pollos de crecimiento.

6.1.2 Índice de nitrógeno soluble. Este método es aplicable a tortas de soya como una medida del grado de calentamiento a que fueron sometidas durante el proceso y se expresa como la relación entre el nitrógeno soluble en agua y el nitrógeno total x 100.

Pesar una muestra de 2 g en frascos de centrífuga de 250 ml marcado a 100 ml y 125 ml. Adicionar agua hasta la marca de 125 ml. Agitar con agitador magnético alrededor de 1000 rpm durante una hora (la barra del agitador recubierta de teflón). Centrifugar a 1900 rpm durante 15 minutos. Decantar el extracto en un matraz volumétrico de 250 ml y re extraer el residuo de 100 ml de agua por una hora. Con agitación llevar los extractos combinados al volumen marcado. Determinar el N₂ en un aparato Kjeldahl a alícuotas de 50 ml y a muestras de 0.8 g de la muestra original.

$$\text{INS} = \frac{\% \text{ nitrógeno soluble} \times 100}{\% \text{ de nitrógeno total}}$$

Nota: Se obtienen por estos procedimientos INS elevados de los cuales se reducen de 0.2 a 2.8 unidades de porcentaje cuando la relación de agua torta de soya se reduce por ejemplo de 10:1 seguida de 5:1 y el pH se reduce a 6.5.

Tortas de soya quemadas tienen INS hasta de 4.

Modificación al Método de INS

Pesar una muestra de 40 g y extraer dos veces a 30 °C, pH 7.2, con una relación de agua – torta de soya de 20:1 y 10:1. Agitar con agitador suavemente durante 1y ½ horas respectivamente. Centrifugar y determinar el nitrógeno soluble y total por el Método de Kjeldahl.

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

6.1.3 Proteína digestible en pepsina. La determinación de proteína bruta no brinda información sobre la digestibilidad de una proteína y dado que este componentes resulta ser uno de los más costosos en la elaboración de los suplementos o concentrados, si ha sido procesada inadecuadamente, no será bien digerida y contribuirá muy poco a solventar las necesidades de este nutriente. El análisis de digestibilidad por pepsina es un procedimiento que proporciona información adicional relacionada al verdadero valor nutricional de las fuentes proteicas, en especial las de origen animal.

Es importante tener en cuenta que el animal posee otras enzimas proteolíticas y que las condiciones en el tracto digestivo existen son mucho más complejas que las que pueden simularse en un laboratorio. Por lo tanto, los resultados obtenidos con este procedimiento, deberán tomarse como apoyo a estimación de la digestibilidad verdadera. El método es aplicable a harinas de carne, pescado, pluma sangre, etc., y estima los productos resistentes a la digestión con pepsina. La diferencia entre la proteína total y proteína indigestible se obtiene la proteína digestible en pepsina.

Reactivos

- a. Solución de pepsina 0.2%, disolver pepsina (NF 1:10.000) en ácido clorhídrico 0.075 N (6.1 ml/l de agua) en suficiente cantidad para las

muestras por analizar). Preparar únicamente la solución que se va a utilizar ese día.

b. Solución de pepsina al 0.0002% preparada con la anterior.

Procedimiento. Pesar 1000 g de muestra molida y desengrasada (extraída con éter en un Soxhlet o en el aparato Goldfisch durante 2 horas) en un frasco de polietileno de 200 ml con tapa de rosca. Agregar 150 ml de la solución de pepsina seleccionada a calentar a 42 – 45°C. Tapar los frascos y colocarlos en el agitador incubado a 45°C en posición vertical y agitar durante 16 horas.

Al cabo del tiempo de agitación filtrar a través de un papel filtro No. 1 y lavar tres veces con agua a temperatura ambiente, transferir el papel y el residuo húmedo a un matraz de Kjeldahl y determinar el nitrógeno en la forma usual, realizar un blanco con papel filtro.

Cálculos. Calcular la proteína indigestible en pepsina y restarla a la proteína cruda total para obtener la proteína digestible en pepsina 0.2% o 0.0002%.

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

6.1.4 Determinación de bases volátiles totales (nitrógeno amoniacal en carnes y pescado). Este método determina el nitrógeno amoniacal como indicador de hidrólisis de proteínas. Se utiliza para medir el grado de descomposición de la carne o el pescado con los que se hicieron las harinas respectivas.

Procedimiento. En un matraz Kjeldahl pesar 10 g de muestra molida o picada, 2 g de óxido de magnesio, 300 ml de agua y si es necesario un antiespumante y unas perlas de vidrio.

En el matraz recolector poner 25 ml de ácido bórico al 2%, unas gotas de indicador rojo de metilo. Conectar el aparato de destilación de Kjeldahl con el tubo dentro de la solución bórica. Calentar de manera que el matraz entre en ebullición en exactamente 10 minutos y usando el mismo calentamiento

destilar 25 ml exactamente. Lavar el tubo con agua destilada y titular el destilado con ácido sulfúrico 0.1N. Multiplicar la titulación menos el blanco por 14 para obtener las bases volátiles totales como mg N por 100 g de carne.

Las harinas de pescado para consumo humano deben tener 20 y 30 mg de N amoniacal/100 g, contaminada 450 – 500 mg/100 g y muy contaminada 1100 mg/100g.

6.1.5 Nitrógeno no-proteico. Este método determina el nitrógeno no proteico en alimento. El NPN puede provenir de urea, ácidos nucleicos, glucosaminas, etc.

Pesar de 1 – 2 g de muestra previamente molidos dentro de un matraz Erlenmeyer de 120 ml adicionar de 10 – 20 perlas de vidrio y 25 ml de agua. Agitar el contenido por 10 minutos y reposar 30 minutos. Al final del tiempo de reposo adicionar 25 ml de una solución de ácido tricloracético al 20% y agitar nuevamente el matraz durante 10 minutos, reposar dentro del refrigerador durante 3 horas y filtrar, el filtrado debe ser claro, refiltrando las primeras porciones si es necesario determinar el nitrógeno a una alícuota del filtrado. Calcular el porcentaje de nitrógeno no proteico del nitrógeno de la muestra.

Nota: El método es útil en harinas de pescado pues mide la cantidad de sustancias nitrogenadas no proteicas como escamas o caparazones de moluscos.

6.1.6 Nitrógeno no proteico (NNP con ácido tungstico)

Reactivos

Tungstato de sodio ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) al 10%, solución en agua, 0.30M.
Ácido Sulfúrico 1N (H_2SO_4). 27.2 ml/L = 1N

Procedimiento

Pesar 0.5 g de muestra en matraz de 125 ml.
Adicionar 50 ml de agua destilada fría.
Adicionar 8 ml de solución de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 10% *
Reposar a 20-25 °C por 30 min
Llevar a pH 2 adicionando 10 ml de H_2SO_4 1N (controlar pH con pHmetro).
Reposar toda la noche a temperatura ambiente.

Filtrar con papel filtro No. 54 o 541 (humedecer el papel filtro con agua destilada antes de adicionar la muestra), por gravedad o con vacío. Si el primer filtrado es turbio, refiltrar. Si se usa vacío, debe usarse un matraz que permita que cualquier filtrado turbio pueda ser reciclado al embudo.

Lavar dos veces con agua destilada fría.

Transferir el papel filtro a matraz Kjeldahl y determinar nitrógeno residual.

Calcular NNP restando el nitrógeno residual al nitrógeno total.

* Muestras con bajo contenido de proteína (< 20 %PC) pueden ser tratadas con 5 ml de solución de tungstato de sodio y 6 - 7 ml de ácido sulfúrico 1N.

6.1.7 Actividad ureasica. Mediante este método se hace la determinación de la ureasa como un indicador del proceso de calentamiento a que fue sometida la torta de soya.

Material y equipo

1. Baño de agua con termostato capaz de mantener la temperatura a 30 ± 0.5 °C.
2. Potenciómetro equipado con electrodos de vidrio.
3. Tubos de ensayo con tapón de 15 x 1.5 cm.

Reactivos

1. Indicador de rojo fenol 0.1%. Disolver 0.1 g de rojo fenol en 15 ml de NaOH 0.02N y diluir con agua a 100 ml.
2. Amortiguador de fosfato 0.05 N. Disolver 4.355 g de KH_2PO_4 en 100 ml de agua, combinar las dos soluciones y adicionar 10 ml del indicador rojo fenol, diluir a 100 ml con agua, ajustar el pH a 7.0 antes de usarlo, almacenar en refrigeración.
3. Solución amortiguadora de urea. Disolver 1.5 g de urea R.A en 50 ml de amortiguador de fosfato 0.05N, ajustar el pH a 7; esta solución se descompone por crecimiento de hongos por lo que hay que preservarla adicionando una pequeña porción de tolueno o prepararla al momento de usarla, almacenarla en refrigeración.

Para la preparación de los Reactivos se usa agua destilada recién hervida y fría, almacenar los Reactivos en frascos de vidrio ámbar bien tapados.

Preparación de muestras

Todas las muestras de frijol entero, torta, hojuelas y pastillas de soya deben molerse pasando por una criba No. 80.

Procedimiento

Preparar dos tubos para cada muestra como sigue:

- Tubo No. 1 (blanco). Pesar 0.2 g de la muestra y adicionar 10 ml del amortiguador de fosfato a 30°C y mezclar por inversión del tubo, poner inmediatamente a baño de agua y anotar el tiempo.
- Tubo No. 2 (prueba) Pesar 0.2 g de la muestra y adicionar 10 ml de la solución amortiguadora de urea a 30°C, mezclarla por inversión del tubo. Poner inmediatamente en el baño y anotar el tiempo.
- Entre el tubo 1 y 2 debe haber un intervalo de 5 minutos, agitarlos cada 5 minutos. A los 30 exactamente, leer el pH del primer tubo en un lapso menor de 5 minutos el pH del blanco.
- A los 30 minutos de incubación de tubo No. 2 leer el pH de la prueba al mismo tiempo que se lee el pH de los tubos, registrar el color del líquido como ámbar, rosa o rojo.

Interpretación de resultados. El incremento en pH es directamente proporcional a la actividad ureásica de la soya, un incremento de 0.3 indica que la soya ha recibido un tratamiento apropiado y que puede ser utilizado para alimentación de pollos y otras especies. Un incremento de 0.3 es indicio de estar subcocida y de no ser apropiada para monogástricos. La soya cruda contiene suficiente actividad ureásica para mostrar un incremento de pH de 1.8 a 2.1.

Un incremento de pH de 0.05 o menos hace sospechar un sobre cocimiento y por lo tanto no es apropiado para buena nutrición.

Cualquier soya que muestra un incremento de pH de 0.1 o menos generalmente da la prueba de Du Pont negativa, esta prueba se aplica para determinar si la soya se puede mezclar en forma segura con urea en condiciones extremas (húmedas y calientes) de almacenaje.

6.1.8 Actividad ureasica (por HCl), La torta de soya es un subproducto que se obtiene al procesar la soya para extraer destinado al consumo humano, resultando un ingrediente con alto nivel de proteínas (más del 40%), muy utilizado en la alimentación animal por ser una fuente proteica de buena calidad, muy común en dietas de aves, cerdos y vacas lecheras de alta producción como una fuente de proteína de sobrepaso. Sin embargo, si el proceso para obtención del aceite no fue el adecuado, algunas proteínas de la soya como los inhibidores de la tripsina, hemoaglutininas, inhibidores del crecimiento, lipoxidasas, lectinas, persisten en la torta y pueden causar una serie de trastornos en los animales. No obstante lo anterior, existe en la torta de soya mal procesada (insuficiente calor bajo) o en la soya cruda, una proteína con carácter de enzima llamada ureasa, la cual actúa sobre la urea desdoblándola hasta amoníaco (NH_3) y bióxido de carbono (CO_2).

Fundamento. El fundamento de la prueba de la actividad ureásica, consiste en poner en contacto a la torta de soya con una solución de urea, para cuantificar el desprendimiento de amoníaco vía cambio del pH (el amoníaco liberado es alcalino). En caso de que la torta de soya no haya recibido un calentamiento adecuado, la ureasa y probablemente otros compuestos antinutricionales se encontrarán activas, por lo tanto actuará sobre la urea causando desprendimiento de amoníaco (NH_3).

Si el calor que se aplicó durante su procesamiento fue el adecuado, la enzima ureasa se encontrará inactiva (inhibida), no se desprende por lo tanto amoníaco, el pH entonces se mantendrá sin cambio o con un cambio muy ligero.

Procedimiento

Material y equipo

- Vaso de precipitado de una capacidad de 250 ml
- pH-metro
- Pipeta graduada de 5 ml
- Baño de agua a una temperatura de 27°C
- Bureta de 25 ml de capacidad
- Solución de HCl 0.1N
- Solución de urea (1 g en 5 ml)

Método- Se pesa 1 g de soya y se coloca en un vaso de 250 ml, se adiciona 50 ml de agua destilada, se agita por 15 minutos y se determina el pH, se adiciona 5 ml de la solución de urea y se coloca el vaso en baño de agua a 27°C durante 30 minutos exactamente, se agita a ocasiones y se titula con HCl hasta regresar al pH original 1/.

Nota: El informe deberá indicar los ml de HCl gastados en 1 g de soya.

Cálculos

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

ml de HCl 0.1N	Calidad
0 - 5	muy buena
5 - 10	buena
10 - 15	regular 2/
15 - más	mala

1. Cuando se van a ensayar 2 o más matraces, la solución de urea debe agregarse a intervalos de 5 minutos para cada problema, en tal forma que quede tiempo suficiente para titular cada muestra.
2. Esta soya puede usarse en la elaboración de alimentos para aves y cerdos, suplementada con metionina, nunca para ganado que incluya en la dieta.

6.1.9 Determinación de lisina total. Esta determinación debe realizarse únicamente en aquellos cereales que tienen elevados niveles de triptófano. Aunque el método fue desarrollado para determinar lisina, puede aplicarse a leguminosas, se elaboran las curvas estándar apropiadas.

Reactivos

1. Solución de papaína. 4 mg de papaína (papaína Merk No. 7174) por ml de amortiguador de fosfato 0.03M, pH 7.4 (solución A-KH₂PO₄ 0.15 M, tomar 30 ml de sol A + 1.62 ml de sol B, aforar a un litro), la solución se prepara diariamente.
2. Amortiguador de carbonato 0.05 M, pH 9.0, solución NaHCO₃ (0.2M), solución B Na₂CO₃ 0.3M (mesclar 225 ml de sol A con 25 ml de sol B y aforar a 1 lt con agua), rectificar el pH.

3. Amortiguador de borato 0.05 M, pH 9.0 H_3BO_3 0.2 M + KCl 0.1M solución B NaOH 0.2M, mezclar 250 ml de A con 104 ml de B, aforar a 1 lt con agua, rectificar pH.

4. Suspensión de fosfato de cobre. Solución A 2.8 g de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ se disuelven en 100 ml de agua destilada. Solución B, se disuelven 13.6 g de $Na_3PO_4 \cdot 12 H_2O$ en 200 ml de agua destilada. Mezclar ambas soluciones poniendo A sobre B, centrifugar y eliminar el sobrante.

Suspender el precipitado 3 veces, centrifugar en cada ocasión en 15 ml de amortiguador de borato pH 9.0. Después del último lavado en 80 ml del mismo amortiguador de borato. El reactivo puede ser usado por una semana.

5. Solución de 2 cloro, 3.5 dinitropiridina. Preparar la solución en el momento de usar, pesando 30 mg de 2 cloro, 3.5 dinitropiridina por ml de metanol.

6. Solución de ácido clorhídrico 1.2 N

7. Mezcla de aminoácidos

Cistina	20 mg	Fenilalanina	40 mg
Metionina	20 mg	Valina	40 mg
Histidina	30 mg	Arginina	30 mg
Alanina	30 mg	Cerina	50 mg
Isoleucina	30 mg	Ac. Aspártico	60 mg
Treonina	30 mg	Ac. Glutámico	300 mg
Tirosina	30 mg	Leucina	80 mg
Glicina	40 mg	Prolina	80 mg

Pesar 100 ml de la mezcla de aminoácidos y disolver en 10 ml de amortiguador carbonato.

Procedimiento

- Pesar 100 mg de la muestra desengrasada y molida finamente en un vial o tubo con tapón y adicionar 5 ml de la solución de papaína. Asegurarse de que la muestra este dentro de la solución y agitar un par de veces durante la primera hora de incubación. Hacer dos blancos con la solución de papaína. Incubar durante toda la noche a 65°C. Sacar los hidrolizados de la incubación y agitar. Dejar reposar y enfriar a temperatura ambiente. Si el sobrenadante no es claro centrifugar (puede usarse una alícuota de 1 ml para determinar triptófano). Tomar con una pipeta una alícuota de 1 ml en un tubo de centrifuga y adicionar 0.5 ml de amortiguador de carbonato y 0.5 ml de suspensión de fosfato de cobre. Agitar la mezcla durante 5 minutos y centrifugar.
- Tomar con una pipeta una alícuota de 1 ml del sobrenadante en un tubo grande de ensayo y adicionar 0.1 ml de la solución de 2 cloro- 3.5 dinitro piridina y agitar bien.
- Reposar la mezcla por 2 horas a temperatura ambiente (agitando cada 30 minutos) Adicionar 5 ml de HCl 1.2 N y agitar bien.
- Adicionar 5 ml de etilacetato, tapar los tubos, mezclar bien invirtiendo los tubos por lo menos 10 veces. Entonces extraer la fase superior usando una jeringa adaptada a un tubo de polietileno 1/. Leer a 390 nm contra los blancos.
- Calcular el contenido de lisina de las muestras por comparación con una curva estándar e informar en % con base a proteína o al total.

▮ **Nota:** En lugar de usar la jeringa para extraer la fase superior se puede usar un bulbo plástico adaptado a una pipeta de Mohr.

Curva estándar. Preparar una curva estándar en un rango de 0 – 200 mcg de lisina por ml. Solución madre de lisina 62.5 mg de clorhidrato de lisina en 20 ml de amortiguador de carbonato (2500 mcg/ml). Diluir con amortiguador de carbonato la solución madre de lisina a 0, 250, 500, 750 y 100 mcg de lisina/ml.

De cada una de estas soluciones tomar 1 ml y adicionar 4 ml de la solución de papaína (5 mcg de papaína/ml de amortiguador fosfato). Tomar

con una pipeta 1 ml de c/solución en tubos de centrifuga, adicionar 0.5 ml de la mezcla de aminoácidos y 0.5 ml de la suspensión de fosfato de cobre y continuar con el procedimiento ya descrito.

6.1.10 Determinación de lisina disponible en proteínas. Este método determina como lisina disponible, aquella que tiene libre el grupo épsilon amino libre y que es capaz de unirse al ácido trinitrobencensulfónico.

Procedimiento

- En un tubo de ensayo de 10 ml con tapón, pesar 10 mg de la muestra (3 tubos por muestra) molida en un molino de martillos con una criba de 1 mm. Agregar 1 ml de NaHCO_3 al 4% agitar durante 10 min (en un baño con agitación a 40°C).
- Agregar 1 ml de ác. Trinitrobencensulfónico (TNBS) 1/. Al 0.1% y poner nuevamente en el baño con agitación por 2 horas.
- Agregar 3 ml de HCl conc. Tapar y poner en el autoclave a hidrolizar por 1 hora a 120°C (15 – 17 lb/pulg.) Enfriar y agregar 5 ml de agua. Filtrar a través de papel filtro (Ederol No.1). Extraer cada Tubo en un pequeño embudo de separación 2 veces en éter etílico. Eliminar el éter residual poniendo los tubos en un baño caliente por 5 minutos.
- Enfriar y leer a 346 nm contra un blanco llevado con el mismo procedimiento, excepto que se adiciona el ácido antes del TNBS.

Preparación de la curva estándar. Pesar 33.7 mg de épsilon- TNP-Lisina 2/. Agregar 1 ml de HCl 0.1N y aforar con agua a 25 ml en un matraz volumétrico.

Tomar alícuotas de 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 ml, agregarles 0.1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6 y 0.5 ml de agua destilada, agregar 1 ml de NaHCO_3 al 4% y 3 ml de HCl conc. Luego agregar 5 ml de agua destilada y extraer con éter la fase, como se indicó antes. Leer a 346 nm.

▮ **Nota:** No es necesario calentar ya que se obtiene una curva muy parecida en ambos casos.

134.8 mg E-TNP L lisina – HCl equivale a 50 mg de lisina 1 ml – 0.0005 g.

0.1 0.05 mg = 60 mcg

0.2 0.10 mg = 100 mcg

0.3 0.15 mg = 150 mcg

0.4 0.20 mg = 200 mcg

0.5 0.25 mg = 250 mcg

6.1.11 Determinación de metionina sintética. La D-L-metionina grado alimenticio debe cumplir con las siguientes especificaciones:

Pureza	98.00% mín.
Sulfato de sodio	0.05% máx.
Perdida por secado	0.50% máx.
Residuos por ignición	1.00% máx.
Metales pesados	20.00 ppm máx.
Arsénico	10.00 ppm máx.
Apariencia de solución Acuosa	100.0% transmitancia

a. Pureza de la metionina. Este método es para determinar la pureza de la metionina y verificar si cumple con las especificaciones establecidas. Se emplea con este fin, la titulación con tiosulfato.

Reactivos

- Solución de almidón al 1%
- Solución de yodo 0.1 N de concentración conocida
- Solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 N de concentración conocida
- Solución amortiguadora. Disolver 2 g de KH_2PO_4 , 5 g de K_2HPO_4 y 2 g de KI por cada 50 ml de agua destilada.

Procedimiento

- Colocar aproximadamente 0.3 g de muestra (previamente desecada), verter 50 ml de solución amortiguadora y 50 ml de solución de yodo 0.1 N en un matraz cónico de 250 ml, mezclar y dejar reposar durante 30 minutos.
- Titular con tiosulfato empleando indicador de almidón.
- Simultáneamente hacer un blanco.

Cálculos

$$\% \text{ metionina en peso} = \frac{0.07461 (V1 - V2) (F) \times N}{(W)} \times 100$$

En donde:

K = metionina % en peso

V1 = ml. de tiosulfato de sodio 0.1N gastados en el blanco

V2 = ml de tiosulfato de sodio 0.1N gastados en la titulación del problema.

F = Normalidad del tiosulfato de sodio

W = Peso de la muestra en gramos (0.07461 es el peso en (g) de metionina equivalente a 1 ml de solución de I₂ 0.01N)

Nota:

- a. Disolver la muestra totalmente
- b. Después de la adición de la solución de I₂ tapar el matraz perfectamente.
- c. El blanco debe hacerse en la misma forma que se determinó la muestra problema, con todos los reactivos excepto la muestra.

Concentraciones de sulfato de sodio. La muestra se adiciona a una mezcla de isopropanol, ácido acético y agua destilada, después de mezclarla bien se le agrega indicador de torina y se titula con BaCl₂ 0.01N.

Reactivos

- a. Iso-propanol (95% de pureza mínima)
- b. Acido acético glacial al 6%
- c. Cloruro de bario BaCl₂ 0.01N
- d. Solución de torina 0.2% (Acido 0 - 3.6 disulfa-2 hidrox-1-naftilazo bencenarsonico) Sigma Chem. Co. # T-2138

Procedimiento. Colocar en un matraz cónico de 250 ml, 40 ml de isopropanol, 1 ml de ácido acético y 10 ml de la muestra preparada. En un matraz volumétrico de 250 ml colocar de 100 - 150 ml de agua destilada.

Pesar en balanza analítica de 1 – 1.5 g de muestra y colocar en el matraz, calentar en baño de agua a 70-80 °C para disolver la muestra, enfriar a temperatura ambiente, aforar y mezclar.

Adicionar una gota de la solución de torina con BaCl₂ 0.01N hasta que una coloración anaranjada rojiza permanezca durante un minuto.

Obtener el contenido de sulfato de sodio mediante la siguiente formula:

$$K = \frac{V \times N \times F \times 0.071 \times 250}{W \times 100} \times 100$$

En donde:

K = Sulfato de sodio % en peso

V = ml de BaCl₂ 0.01N

F = Factor de BaCl₂ 0.01N

W = Peso de la muestra (g) (A 71.0 es la mitad del peso molecular del sulfato de sodio)

Notas:

- Un exceso de sulfato de bario precipitado dificulta la observación del punto final de la titulación; considérese por esto que 10 ml de la muestra deben contener menos de 2 mg de sulfato (equivalente a 5 ml de solución de BaCl₂ 0.01N).
- El color de solución al final de la titulación debe ser el mismo que se observó en la valoración del BaCl₂.
- Los materiales rojizos que se encuentran cerca del matraz de titulación pueden influir en la observación del punto final (rojo-anaranjado) por lo que se recomienda alejarlos del área.

Apariencia de solución acuosa

La turbidez que da la solución de la muestra al 2.5% se considera como patrón de apariencia de la solución acuosa cuando se compara con un estándar de turbidez que va de 1-10 grados.

Equipos

- a. Espectrofotómetro
- b. Celda de 50 mm

Reactivos

Solución estándar de turbidez. Pesar 1 g de caolín en un matraz de 1 lt, adicionar 10 ml de formalina y agua destilada hasta aforar. Se considera que esta solución tiene 100 ml (solución con 100 grados de turbidez). Medir 1,2,3 ... y 10 ml de la solución con 1,2,3 ... 10 grados respectivamente.

Procedimiento. Pesar exactamente 5 g de muestra y colocarlos en un matraz cónico de 300 ml, adicionar 200 ml de agua destilada y agitar el matraz para disolver bien la muestra durante 1 hora a la temperatura ambiente y leer densidad óptica a 660 nm empleando la celdilla de 50 mm.

Obtener la turbidez de la muestra interpolando la lectura en la curva estándar de turbidez.

Nota:

- a. Preparar la curva patrón de turbidez haciendo soluciones de concentración de 1 a 10 y midiendo la densidad óptica en celdilla de 50 mm en un espectrofotómetro a 660 nm. Graficar grados de turbidez contra densidad óptica.
- b. La velocidad de disolución de la muestra depende de la temperatura del agua en la cual se disuelve. Si la muestra no se disuelve bien, agitar frecuentemente el matraz hasta obtener una completa disolución.

Este análisis se emplea para determinar el contenido de humedad en el producto. La muestra se seca en un horno a 105 °C durante 4 horas.

Material

- a. Frascos para pesar
- b. Desecador

Procedimiento. Pesar con exactitud aproximadamente 1 g de muestra en un frasco para pesar (diámetro: 50 mm; altura 30 mm), previamente puesto a peso constante.

Después de secar la muestra durante cuatro horas a 105°C, enfriarla en un desecador y pesar para obtener la pérdida por secado.

El cálculo se hace en la siguiente forma:

$$K = \frac{W_1}{W_2} \times 100$$

Donde:

K = Pérdida por secado (% en peso)

W_1 = Pérdida por peso (g)

W_2 = Peso de la muestra (g)

Residuo por ignición. Método para determinar el residuo por ignición del producto terminado. La muestra se humedece con H_2SO_4 , se incinera en una mufla de 500°C y se cuantifica el residuo.

Equipos

- a. Mufla eléctrica a 500 °C
- b. Crisol de porcelana

Procedimiento

Pesar en un crisol previamente a peso constante 1 g de muestra, adicionar unas gotas de H_2SO_4 e incinerar en una mufla a 500 + 50°C hasta que el residuo esté completamente blanco (aproximadamente 1 hora). Enfriar el crisol en un desecador y pesar el residuo de la muestra.

Cálculos

$$K = \frac{(W_1)}{(W_2)} \times 100$$

Donde:

K = Residuo por ignición (peso %)

W_1 = Cantidad de residuo (g)

W_2 = Peso de la muestra (g)

Metales pesados. Se adiciona solución de sulfuro de sodio a la solución de la muestra en ácido acético. Esta mezcla da una coloración café que luego se compara con un estándar de color, preparado con soluciones que contienen diferentes concentraciones de plomo.

Se obtiene el contenido de metales pesados como plomo.

Equipos

- Tubos de Nessler para comparación de color

Reactivos

- a. Solución de sulfuro de sodio: pesar 5 g de sulfuro de sodio, mezclar con 30 ml de glicerol y 10 ml de agua destilada, agitar bien la solución y usar el líquido sobrenadante.
- b. Solución estándar de plomo 0.01 mg Pb/ml. Pesar 0.1598 g de nitrato de plomo en un matraz volumétrico de 1 lt, adicionar 1 ml de HNO_3 y agua destilada, disolver. Aforar a volumen, 10 ml de la solución anterior se llevan a 100 ml con agua destilada, 1ml de esta solución contiene 0.01 mg de Pb.
- c. Solución de ácido acético diluido 6% v/v

Procedimiento.

- Pesar un gramo de muestra y colocarlo en un tubo de Nessler, adicionar 40 ml de agua destilada para disolver la muestra, agregar 2 ml de ácido acético diluido y agua para completar un volumen de 50 ml.
- Verter 5,1.0, 1.5, 2.5 y 3.0 ml de la solución estándar de plomo en tubos de Nessler, respectivamente. Adicionar 2 ml de ácido acético diluido y completar el volumen a 50 ml con agua destilada.

- Una vez encontrado el color del estándar correspondiente a la muestra, calcular el contenido de plomo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$K = \frac{(a)}{(w)} \times 10$$

Donde:

K = Contenido de metales pesados como plomo (ppm)

a = Volumen de la solución estándar de Pb en ml

w = Peso de la muestra (g)

pH

Se mide el pH de la solución acuosa de la muestra al 1%

Equipos

pH metro

Procedimiento

- Disolver 1 g de muestra en 100 ml de agua destilada que no contenga CO₂. Medir el pH de esta solución en un pH metro, anotar la temperatura a la cual se hace la medición.
- **Arsénico.** Se determina el contenido de As en metionina por el método de Gutzite.

Reactivos

a. Solución estándar de arsénico

Pesar exactamente 1.32 g de ácido arsénico y colocarlos en un matraz volumétrico que contenga 6 ml de NaOH al 10% y aforar a 1 litro con agua destilada, 10 ml de la solución anterior se aforan con agua destilada a 1 litro, 1 ml de esta solución contiene 0.1 mg de As.

b. Solución de cloruro estañoso

Disolver 4 g de cloruro estañoso en 125 ml de HCl libre de arsénico, adicionar 125 ml de agua destilada y estaño metálico, granular, tapar y almacenar.

c. Solución de yoduro de potasio al 20%

Cinc metálico (polvo grueso libre de arsénico)

Solución de acetato de plomo al 12%, agregar 2 gotas de ácido por cada 100 ml

Papel impregnado de bromuro mercúrico

Sumergir una pieza de papel filtro en la solución de bromuro-mercúrico (disolver 5 g de HgBr_2 en 100 ml de etanol) durante 1 hora en un lugar oscuro (papel filtro No. 53 o uno de calidad equivalente cortado en círculo de aproximadamente 2 cm de diámetro). Sacar el papel después de 1 hora.

Procedimiento

- Disolver 1 g de muestra en 10 ml de agua destilada y colocarlos en el frasco generador, adicionar 5 ml de HCl libre de arsénico y mezclar bien, después de dejar reposar 2 a 3 minutos, adicionar 5 ml de solución de KI, agregar 5 ml de solución de cloruro estañoso y dejar en reposo nuevamente durante 10 minutos. Inmediatamente después adicionar 2 g de cinc metálico y conectar A y B como se muestra en la figura (B se conecta previamente a C y D). Sumergir el frasco generador "A" hasta el cuello en agua a 25 °C durante 1 hora (se puede hacer a temperatura ambiente).

Paralelamente a esta operación, colocar 1.0, 2.0, 10 ml de solución estándar de arsénico (0.1 mg/ml) en frascos generadores y efectuar la misma operación que en la muestra, comparar el color amarillo producido en la tira de bromuro mercúrico en la muestra con el color de las tiras del estándar, hasta encontrar una igualmente colorida.

Cálculos

$$K = \frac{W_1}{W_2} \times (10^4)$$

Donde:

K = Arsénico (% en peso)

W_1 = Peso del arsénico en la muestra mg

W_2 = Peso de la muestra (g)

6.1.12 Determinación de triptófano. Este método determina triptófano en granos de maíz. Dada la relación que encontraron los autores del método (Hernández y Bates) entre el contenido de triptófano y lisina en la proteína del endospermo de maíz (aproximadamente 1 a 4), el contenido de triptófano puede usarse como un simple parámetro para evaluar la calidad del maíz.

Reactivos

a. Reactivo A. Disolver 270 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 0.5 ml de agua destilada y diluir a un litro con ácido acético glacial.

Nota: Con cada botella de ácido acético hay que probar que no desarrolla color con triptófano.

b. Reactivo B. Ácido sulfúrico 30 N.

c. Reactivo C. Mezclar volúmenes iguales de los Reactivos A y B, 1 -2 horas antes de usarlo.

d. Solución de papaína. Disolver la papaína (papaína técnica Nutritional Biochemicals Corp) 4 mg/ml de amortiguador de acetato de sodio a pH 7.0. Preparar la enzima diariamente.

Procedimiento

- Pesar de 90 – 100 mg de grano completo o endospermo desengrasado de maíz en un pequeño frasquito y agregar 4 ml de solución de papaína. Tapar el frasco y agitarlo cuidadosamente, asegurarse de que la muestra se humedece completamente.
- Preparar blancos al mismo tiempo, usando únicamente solución de papaína.
- Incubar las muestras a 65 °C en un baño de agua o estufa durante toda la noche. Al cabo de ese tiempo agitar y enfriar a temperatura ambiente. El sobrenadante debe ser claro, si no es así, centrifugarlo.

- Tomar con una pipeta 1 ml de hidrolizado en un tubo de ensayo que contenga 4 ml de reactivo C. Agitar vigorosamente y dejar que se desarrolle el colo a 65°C durante 15 minutos.
- Enfriar y leer la D.O a 545 nm. Preparar una curva estándar usando d.l. triptófano con las concentraciones de 0 a 40 mcg/ml.
- Nota: Para obtener el endospermo de los granos tomar 10 semillas como representativas de cada mazorca. Lavar con agua destilada para eliminar los pesticidas, si han sido aplicados.
- Remojar las semillas con agua destilada por 30 min. Quitar el pericarpio y sacar el germen con unas pequeñas pinzas y una navaja. El tejido restante es el endospermo, secarlos toda la noche al aire. Moler la muestra en un molino Burr Mill con la criba más cerrada. Desgrasar las muestras en un extractor Soxhlet con hexano por 6 horas. Secar las muestras al aire y moler a un polvo fino en un pulverizador (Wig-L-Bug, amalgamator).
- Es necesario asegurarse de que se analiza el endospermo, ya que el embrión tiene un buen balance de aminoácidos sin importar la calidad de maíz. El pericarpio por su lado contiene pigmentos que interfieren con la determinación colorimétrica. Estos factores deben tenerse en cuenta al analizar el gramo completo.

6.1.13 Determinación de urea en alimentos

- **Prueba cualitativa – (Prueba del papel de ureasa - Bromotimol)**

Reactivos

- a. Solución de ureasa – Humedecer 0.2 g de ureasa con una pequeña porción de agua hasta hacer una pasta y diluir a 10 ml con agua.
- b. Solución de azul de bromotimol. Triturar en un matraz 0.15 de azul de bromotimol con 2.4 ml de NaOH 0.1N. Después que se disuelva el indicador, lavar el mortero y el pistilo con agua. La solución debe ser verde, pH aproximadamente de 7.0.

- c. Papel A. Mezclar 10 ml del indicador con 10 ml de la solución de ureasa, poner la mezcla en un vidrio de reloj y humedecer pequeñas tiras de papel filtro (Whatman No. 5) en la solución. Asegurarse de que el papel sea humedecido bien. Colgar los papeles a secar en un lugar libre de vapores de amonio, calor o corrientes fuertes de aire.

Almacenar en frascos ámbar secos y bien tapados.

- d. Papel B. Diluir la solución del indicador con una porción igual de agua, mojar y secar las tiras de papel en la misma forma que en el papel A.

Procedimiento

- Colocar en un matraz aproximadamente 5 g de muestra y agregar 25 ml de agua, agitar bien y filtrar, humedecer el filtrado en tiras de papel indicador A y B, dejarlas secar durante 30 – 60 segundos y observar. El desarrollo de color de ambas tiras de papel indica la presencia de partículas alcalinas. Si se observa coloración únicamente en el papel A, indica la presencia de urea.
- La coloración está relacionada con la cantidad presente de urea. Después de 20 minutos, la coloración tiene a desvanecerse.

• Prueba cuantitativa. Reactivos

- a. Solución antiespumante. Disolver 50 g de estearato de diglicerol en 375 ml de benceno, 75 ml de alcohol y 250 ml de ftalato de dibutilo, calentando si es necesario. La parafina picada es también un buen antiespumante o emulsión antiespumante B (Dow Corning Corp.).
- b. Solución de ureasa. Preparar una solución reciente cada vez. Disolver ureasa en agua en concentración tal que 10 ml de la solución neutralizada conviertan en nitrógeno por lo menos 0.1 g de urea pura.

Estandarización de la ureasa. Determinar la alcalinidad de la ureasa, disolviendo 0.1 g de ureasa en 50 ml de agua y titular con HCl 0.1 usando como indicador rojo metilo.

Adicionar la misma cantidad de ácido a cada 0.1 g de ureasa que se prepare.

Para determinar la actividad enzimática preparar aproximadamente 50 ml de una solución neutralizada de ureasa al 1%. Adicionar diferentes cantidades de solución a muestras de 0.1 g de urea pura siguiendo el procedimiento de destilación descrito para la muestra. Calcular la actividad de la solución de ureasa mediante la cantidad de ureasa necesaria para convertir a nitrógeno 0.1 g de urea adicionada.

- c. Solución de cloruro de calcio. Disolver 25 g de CaCl_2 en 100 ml de agua.

Procedimiento

- Poner 2 g de muestra en un matraz de Kjeldahl con aproximadamente 250 ml de agua. Adicionar 10 ml de la solución de ureasa, tapar bien y reposar durante una hora o 20 minutos y a 40°C. Si se calentó, enfriar a temperatura ambiente. Usar más solución de ureasa si el alimento contiene más del 5% de urea (equivalente al 12% de proteína).
- Lavar el tapón y el cuello del matraz con unos mililitros de agua. Adicionar 2 g o más de MgO (tipo pesado), 1 ml de solución de CaCl_2 y 1 ml de solución antiespumante y conectar el matraz a un bulbo condensador de Kjeldahl. Destilar 100 ml recogiendo 25 ml de ácido clorhídrico 0.1N y titular con NaOH 0.1N usando rojo de metilo como indicador, o recogiendo un ácido bórico al 4% y titulando con HCl 0.1N usando el indicador de verde de bromocresol-rojo de metilo descrito en el método Kjeldahl.
- La urea contenida en la muestra se calcula teniendo en cuenta los mililitros empleados y la actividad de la solución de la ureasa.

6.1.14 Análisis cualitativos especiales. Gosipol

- a. Colocar aproximadamente 1 g de muestra sobre un porta objetos. Dejar caer sobre ella 1 ml de H_2SO_4 conc. La aparición de manchas rojas indica la presencia de gosipol. (Es preferible observar al microscopio).
- b. El gosipol, que reacciona con azufre en presencia de disulfuro o de carbono para producir un compuesto colorido (prueba de Halphen).

Determinación:

- Preparar el reactivo de Halphen mezclando azufre y CS₂, con alcohol amílico.
- Disolver la grasa o aceite con el reactivo de Halphen
- Calentar en baño María de salmuera saturada
- Registrar la aparición de color rojo La prueba se transforma en cuantitativa al realizar la reacción en mezclas conocidas de aceite de algodón y cualquier otro aceite vegetal, comparando la intensidad del color producido.

Urea. Colocar aproximadamente 1 g de muestra en un tubo de ensayo pequeño. Adicionar agua destilada hasta cubrir las partículas. Agregar 5 ml de solución de ureasa al 2%. Suspender una tira de papel tornasol sosteniéndola con un tapón de caucho. En presencia de urea el papel se torna azul o verde oscuro.

Acido urico. Colocar aproximadamente 1 g de muestra en un portaobjetos con depresión precalentado en la estufa a 100°C. Adicionar una gota de HNO₃ al 32% de tal modo que corra hacia la muestra. Evaporar a sequedad en 1 minuto, calentar 1 a 3 min. Si las partículas toman un color rojo – naranja hasta rojo purpura, pueden estar presentes el ácido úrico o sus sales.

Para confirmar enfriar la placa, tocar el área coloreada con una varilla de vidrio impregnada en solución de NaOH al 50%. Si desarrolla un color púrpura intenso si hay ácido úrico.

6.2 Determinación especial en material graso

6.2.1 Índice de saponificación. Este método determina el índice de saponificación, el cual está relacionado con el peso molecular de la grasa. Se define como un 1 mg de hidróxido de potasio requerido para saponificar 1 g de grasa, es decir los mg de KOH necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres y los combinados como glicéridos.

Reactivos

- a. Ácido clorhídrico 0.5 N en solución acuosa de concentración conocida.
- b. Hidróxido de potasio solución al 0.5N en etanol al 95%.
- c. Indicador de fenolftaleína solución al 1% en etanol.

Procedimiento

- Pesar exactamente en un Erlenmeyer de 200 ml con la boca esmerilada alrededor de 4 g de aceite filtrado. Adicionar 50 ml de KOH alcohólico con una pipeta volumétrica. Colocar al matraz un refrigerante con la entrada también esmerilada. Calentar el matraz para que se disuelva la grasa. Hervir la solución por 30 minutos después de que se ha disuelto la grasa. Agregar 1 ml de indicador de fenolftaleína y titular con HCl 0.5 N hasta el cambio a incoloro.
- Hacer un blanco al mismo tiempo utilizando la misma cantidad de KOH 0.5N alcohólico.

Cálculos

$$\text{Indice de saponificación} = \frac{56.1 (\text{mlHCl Muestra} - \text{mlHCl Blanco} \times \text{NHCl})}{\text{Peso muestra}}$$

Nota: Una solución de KOH alcohólica estable puede prepararse así: Hervir 1 lt de etanol a reflujo con 8 g de KOH y 5 g de granalla de aluminio durante una hora y entonces destilar el alcohol. Disolver la cantidad requerida de KOH en el etanol destilado. Reposar la solución por 1-2 días, para que se asiente el K_2CO_3 formado y decantar la solución a un frasco oscuro con tapón de rosca.

Con algunas muestras como cebos a veces es necesario aumentar la concentración de la solución alcohólica de hidróxido de potasio, así como el tiempo de saponificación (1N ó 2N/ 1-2 horas).

6.2.2 Material insaponificable. Este método determina la materia insaponificable natural contenida en aceites, generalmente está formada por esteroides, hidrocarburos y materia orgánica insaponificable no volátil a 100°C (en aceites minerales).

Reactivos

- a. Solución alcohólica de hidróxido de potasio aproximadamente 1N. Hervir 1 lt de etanol con 8 g de KOH y 5 g de granalla o alambre de aluminio a reflujo durante 1 hora y destilar. Disolver 56 g de KOH libre de carbonatos por 1 lt de alcohol destilado. Dejar reposar la solución por unos días y decantar.
- b. Eter dietílico
- c. Solución de KOH 0.5N
- d. Indicador de fenolftaleína – solución alcohólica al 1% (en etanol de 95%).
- e. Solución valorada de KOH 0.1N.

Procedimiento

- Pesar con exactitud 5 g de aceite en un matraz de bola de 250 ml con boca esmerilada, agregar 50 ml de solución alcohólica de KOH 1N. Reflugar durante una hora en baño maría, agitando de vez en cuando. Transferir el contenido a un embudo de separación de 500 ml y lavar el matraz con 100 ml de agua y 100 ml de éter etílico, agregar el agua y el éter al embudo. Agitar el embudo vigorosamente y dejar separar las capas. Si se forma una emulsión agregar gotas de ácido clorhídrico 1N. Drenar la capa acuosa en el matraz en el que se saponificó. Poner la capa etérea en un segundo embudo de separación a 40 ml de agua. Regresar la capa acuosa al primer embudo y extraer 2 vs con 100 ml de éter cada vez, reuniendo los extractos etéreos en el segundo embudo. Agitar y suavemente separar las capas y drenar, la capa acuosa lavar 2 veces y drenar. Agregar 40 ml de KOH 0.5N agitar y drenar. Agregar 40 ml de agua hasta que sean neutras a la adición de fenolftaleína.
- Transferir los extractos etéreos a un matraz de bola de 500 ml con boca esmerilada, destilar hasta que queden únicamente unos ml de éter. Adicionar unos cuantos ml de acetona y evaporar a sequedad, sumergiendo el matraz con cuidado, con posición inclinada en baño maría, al final con una corriente de aire seco y limpio enfriar y pesar nuevamente el matraz. Disolver en residuo en 20 ml de etanol y

titular con KOH alcohólico 0.1N usando fenolftaleína. Si la solución usada en la titulación es superior a 0.1 ml de KOH 0.1N, repetir la determinación.

$$\% \text{ materia insaponificable} = \frac{(\text{peso matraz} + \text{residuo g} - \text{matraz g}) \times 100}{\text{peso muestra}}$$

Nota:

1. Se puede expresar la materia insaponificable como porcentaje de otras impurezas (agua y otros volátiles).
2. Si la grasa tiene materia insaponificable volátil, agregar 5 ml de un aceite sin compuestos volátiles antes de secar el residuo, con objeto de reducir la pérdida de materia volátil insaponificable.

6.2.3 Índice de yodo (Método de WIJS). Este método mide la instauración de los ácidos grasos en el aceite. El método de Wijs descrito se basa en medir los mg de cloruro de yodo que son fijados por la muestra.

Reactivos

- a. Tetracloruro de carbono
- b. Yoduro de potasio al 10% libre de yodo y yodatos
- c. Tiosulfato de sodio 0.1N ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) solución acuosa de concentración conocida
- d. Indicador de almidón. Agitar 10 g de almidón soluble y 10 mg de cloruro mercuríco y 30 ml de agua y agregar esta mezcla a 1 lt de agua hirviendo. Hervir la solución durante 3 minutos y agitar. Esta solución preparada así es estable por un período de un mes.
- e. Solución de Wijs (I Cl al 0.2N). Esta solución se puede adquirir comercialmente o prepararse como sigue: Disolver cerca de 9 g de tricloruro de yodo en una mezcla de 700 mm de ácido acético (pureza por lo menos de 99% y 300 ml de tetracloruro de carbono).

Valorar la solución como se indica en seguida; tomar 5 ml de solución con pipeta volumétrica o bureta y adicionarle 5 ml de KI al 10% y 30 ml de agua, titular con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1N usando almidón como indicador. Después mientras se agita la solución, agregar yodo metálico poco a poco en cantidad tal (alrededor de 10 g) que 500 ml de la solución después de la disolución de yodo consuman $1 \frac{1}{2}$ veces la cantidad de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utilizada antes. Hay que asegurarse que hay yodo en exceso.

Filtrar o decantar la solución y diluir con ácido acético glacial o una mezcla de acético y tetracloruro de carbono hasta que 5 ml de la solución consuman 9.97 – 10.03 ml de tiosulfato, la solución debe almacenarse en frascos oscuros bien tapados en lugar fresco.

Procedimiento

- Pesar 0.15 g del aceite en balanza analítica en un Erlenmeyer con un tapón de vidrio esmerilado y disolverlo con 15 ml de tetracloruro de carbono. Agregar 20 ml de la solución de Wijs de una bureta. Tapar el matraz, mezclar y dejar reposar en la oscuridad a 20°C durante una hora si no hay material oxidado o 2 horas si se supone que lo hay.
- Indicar en el informe el tiempo de reacción. Después de agregar 20 ml de KI al 10% y aproximadamente 150 ml de agua destilada. Titular con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ con agitación utilizando almidón como indicador. Hacer simultáneamente un blanco con las mismas cantidades de los reactivos y bajo las mismas condiciones.

Cálculos

$$\text{Índice de yodo} = \frac{(\text{ml } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ muestra} - \text{ml } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ blanco}) 12.96 \times N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}{\text{Peso muestra g}}$$

Redondear los resultados para índice de yodo menor de 100 al primer decimal y más de 100 al 0.5 de unidad.

Nota: a. El ácido acético glacial y el tetracloruro de carbono no deben tener sustancias oxidables. Esto puede probarse al agitar de 1-2 ml de líquido con una pequeña cantidad de H_2SO_4 y unas gotas de dicromato de potasio solución saturada. Si no hay coloración verde son adecuados para usarse.

- b. Asegurarse de que hay realmente un exceso de yodo en la solución de Wijs porque si hay tricloruro de yodo libre se forman reacciones colaterales.
- c. Si al disolver la muestra son insuficientes los 15 ml de $C Cl_4$ agregar más e indicarlo.
- d. En la reacción debe quedar por lo menos el 70% del halógeno presente en la solución Wijs.
- e. Es indispensable que las soluciones de Wijs, para la muestra y el blanco estén a la misma temperatura.
- f. El método descrito es lento de realizar, por lo que se han hecho modificaciones para acelerarlo. Uno de estos métodos es el de Hoffmann y Green.

6.2.4 Índice de yodo (Método Hoffmann y Green). El presente método es una modificación al Método de Wijs. El fundamento del método es el mismo pero el tiempo de reacción es menor. Los resultados obtenidos son generalmente más bajos que los observados con el de Wijs, alrededor de 1 unidad para índices de yodo superior a 50.

Reactivos

Los mismos que en el método Wijs y además acetato mercúrico al 2.5% en ácido acético.

Procedimiento

El mismo que en el método de Wijs con la siguiente modificación: Después de agregar la solución de Wijs adicionar 10 ml de la solución de acetato mercúrico y reducir el tiempo de reacción a tres minutos.

Cálculos. Los mismos que el método de Wijs pero aclarando el método utilizado.

6.2.5 Índice de peróxidos. Este método se utiliza para determinar peroxidaciones en aceites y grasas. El principio del método es la oxidación del Yoduro de Potasio por los peróxidos presentes en la muestra.

Reactivos

- a. Disolvente: Mezclar dos volúmenes de ácido acético glacial y un volumen de cloroformo.
- b. Yoduro de potasio-solución saturada. Disolver 4 partes de KI en 3 partes de agua destilada. Guardar la solución en frascos oscuros. Cuando la titulación del blanco es superior a 0.2 ml de tiosulfato de sodio 0.002 N, cambiar la solución.
- c. Tiosulfato de sodio 0.002 N o 0.02N en solución acuosa. Preparar esta solución diariamente de una solución valorada 0.1N.
- d. Indicador de almidón-solución al 1% recientemente preparada.

Procedimiento

- Pesar 1 g de la muestra con exactitud de 5 mg dentro de un Erlenmeyer con tapon de vidrio esmerilado de 200 ml del disolvente. Adicionar 1 ml de la solución de KI. Generalmente se tiene una solución homogénea, dejar reposar en la oscuridad 1 minuto (si la muestra no es homogénea) hacer reposar después de agitar por 1 minuto. Agregar 35 ml de agua y titular con el tiosulfato de sodio 0.002N o 0.02N, usar 1 ml del indicador de almidón. Simultáneamente hacer un blanco, generalmente el consumo de tiosulfato en el blanco es de 1 o 2 gotas.

Cálculos

$$\text{Índice de peróxido} = \frac{100(\text{ml Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ muestra} - \text{ml Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ blanco}) N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}{\text{Peso muestra g}}$$

Dar los resultados inferiores a 20 con una aproximación de 0.1 y los superiores a 20 con aproximación de 0.5.

Notas:

- a. Hay que utilizar apropiadamente los resultados del índice de peróxido. Si una muestra tiene un índice superior a 20, puede ser que sea una grasa o aceite con un índice aún más alto, los peróxidos se han descompuesto.

En estos casos es preferible hacer prueba de estabilidad al almacenaje, la cual consiste en burbujear aire filtrado y seco a través de aceite o grasa la cual es calentada dentro de un cilindro especial a 130°C durante 1 a 4 horas; se determina el índice de peróxido antes y después de la prueba para observar la estabilidad del aceite.

- b. El valor "lea", utilizado con frecuencia en la literatura se expresa en milimoles de peróxido-oxígeno por kg de grasa, numéricamente el índice de peróxido es dos veces menor que el valor "lea".
- c. Los aceites líquidos deben agitarse cuidadosamente con un agitador antes de pesarse, teniendo cuidado de que no se airee demasiado el aceite. Las grasas sólidas no deben ser fundidas, la muestra debe ser tomada del centro.
- d. En algunos libros se recomienda burbujear CO₂ al matraz después de agregar el disolvente, pero generalmente se obtienen los mismos resultados si esto no se hace.
- e. Los aceites frescos usualmente tienen valores de peróxido a bajo de 5 ml de Na₂S₂O₃ 0.002N/g
- f. El sabor rancio se empieza a detectar cuando el índice de peróxido está entre 10 y 20.

6.2.6 Prueba de rancidez. Uno de los productos de la oxidación de las grasas es ephidrialdehído, el cual da coloración con el floroglucinol. La prueba de Kreis se basa en esta reacción.

Pruebas de kreis. Poner 5 ml de la grasa o aceite en un tubo de ensayo y adicionar 5 ml de ácido clorhídrico (libre de cloruro de nitrosilo). Tapar el tubo con un tapón y agitar por 30 segundos, adicionar 5 ml de la solución al 0.1% de fluoroglucinol, en éter, volver a tapar y agitar oros 30 segundos. Dejar reposar durante 10 minutos o centrifugar de 2 a 3 minutos.

Si se observa color rojo en la capa oleosa proceder como sigue:

Hacer dos diluciones de la muestra original 1+9 de petrolato líquido y 1+19 de petrolato líquido. Con estas mezclas hacer la prueba como se indicó a alícuotas de 5 ml. En estas condiciones los resultados pueden agruparse en 4 grupos.

1. No reacción – no rancidez
2. Reacción positiva en la muestra sin diluir indica que no hay rancidez en cuanto a olor y sabor se refiere, pero la muestra pronto estará rancia.
3. Reacción positiva en la dilución 1+9 pero no en la diluida 1+19, indica rancidez incipiente, que ya es detectable por el olor y el sabor.
4. Reacción positiva en dilución 1+19 indica rancidez definida

Un color rojo a rosa indica reacción positiva, los que produzcan colores amarillos, naranja y rosado deben ser eliminados, los aceites vegetales crudos por ejemplo. Deben interpretarse con cuidado los resultados en el caso de aceites vegetales crudos o parcialmente refinados.

6.2.7 Determinación de ácidos grasos libres. Esta prueba es apropiada para la determinación de ácidos grasos libres, como resultado de daño en granos de cereales y otras semillas durante el almacenaje.

Reactivos

- a. Hidróxido de potasio 0.1N en isopropano
- b. Indicador de fenolftaleína

Procedimiento

- La muestra se muele en un molino con criba de 20 mallas, se pesa una cantidad apropiada de muestra, suficiente para titular de 3 – 10 ml de KOH – alcohol etílico 0.01N 1. /, en un dedal de papel filtro y extraer durante 5 horas con éter absoluto. Eliminar el éter con vapor y finalmente con nitrógeno. Al aceite residual agregar 10 ml de disolvente osopropanol – benceno 50:50 y 6 gotas de fenolftaleína y titular con el KOH 0.01N.

El contenido de ácidos grasos libres expresados como ácido oleico, se calcula como sigue:

1. / El KOH 0.01N en alcohol isopropílico se prepara de una solución 0.1N en el alcohol isopropílico valorado.

$$\% \text{ AGL} = \frac{(\text{ml KIH problema} - \text{ml KOH blanco}) \text{ normalidad de KOH} \times 2820}{\text{Peso muestra} \times \% \text{ aceite}}$$

El blanco se realiza titulando el extracto de varios dedales vacíos.

6.2.8 Gosipol en aceites. Este método determina la cantidad total de gosipol y pigmentos semejantes al gosipol en aceites normales de algodón.

Reactivos

- a. Disolvente de alcohol isopropilico – hexano (punto de destilación 146 – 150 °F). Mezclar 600 ml de alcohol isopropílico y 400 ml de hexano.
- b. Ácido acético glacial.
- c. p-Anisidina- Disolver 40 g de p-Anisidina (Eastman Kodak P-28 o sigma No. A- 0881), en 1 litro de agua caliente (75°C). Agregar aproximadamente 2 g de sulfito de sodio y 20 g de carbón para decolorar. Agitar durante 5 minutos. Filtrar a través de una capa doble de papel filtro de retentividad media sobre un embudo Buchner. Si el filtrado es turbio debido al carbón, filtrar a través del mismo papel. Poner la solución en un refrigerador o en baño de agua a 32 – 36°F durante 4 horas, o preferiblemente toda la noche para que cristalice.
- d. Filtrar sobre un embudo Buchner aplicando succión y lavar los cristales con una mínima cantidad de agua fría (32 -36 °F).
- e. Secar los cristales en un desecador de vacío sobre pentóxido de fosforo ácido sulfúrico durante toda la noche. Transferir el contenido a un frasco ámbar y almacenar en refrigerador. Almacenadas bajo estas condiciones la p-Anisidina purificada es estable por un año. Recristalizar la p-Anisidina cuando el blanco muestra una densidad óptica superior a 0.002. En el mercado se encuentra p-Anisidina ya purificada como la sigma No. A-0756.

f.. Solución p-Anisidina. Pesar un gramo de p-Anisidina purificada en un frasco pequeño de color ámbar con tapón de vidrio, agregar 48 ml del disolvente de alcohol isopropílico-hexano, 2 ml de ácido acético y agitar para disolver. Preparar diariamente estas soluciones.

Hexano. Almacenar en frasco color ámbar con tapón de vidrio.

g. Solución estándar de gosipol. Pesar exactamente 100 mg de gosipol puro y disolver en el alcohol isopropílico hexano, calentando si es necesario, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 250 ml y diluir a volumen con el disolvente. Tomar con pipeta 25 ml de la solución concentrada de gosipol en un matraz volumétrico de 500 ml y diluir a volumen con alcohol isopropílico-hexano. Si se pesaron exactamente 100 mg de gosipol, esta solución contiene 0.02 mg de gosipol por ml.

Preparación de la muestra. La muestra no debe contener material suspendido. Calentar la muestra alrededor de 50°C, mezclar bien y filtrar a través de papel filtro.

Analizar la muestra filtrada el mismo día o almacenar en refrigerador si no se va a analizar el mismo día.

Tamaño de la muestra. El contenido de gosipol en aceite de algodón es variable y depende de las condiciones de extracción de la semilla. Para precisión máxima la alícuota de la muestra debe contener alrededor de 0.1 mg de gosipol. En el cuadro se indican las condiciones apropiadas para diferentes contenidos de gosipol.

Tabla 18. Condiciones apropiadas para diferentes contenidos de gosipol

Contenido esperado	Peso de la muestra (g)	Tamaño del matraz para la muestra	Alícuota para del análisis
0.00 – 0.01	5.0	25	5 – 10
0.01 – 0.03	3.0	25	5
0.03- 0.05	1.0	25	5
0.05 – 0.10	1.0	25	2
0.10 – 0.20	0.8	25	2
0.20 – 0.40	0.5	25	2
0.40 – 0.60	0.25	25	2
0.60 – 0.80	0.40	50	2
0.80 – 1.00	0.25	50	2
Más de 1.00	0.25 – 0.50	100	2

Procedimiento

- Pesar dentro del matraz volumétrico apropiado la muestra sugerida, de acuerdo con el cuadro anterior. Disolver en el acohol isopropílico-hexano; diluir a volumen y mezclar bien. Tomar con pipeta alícuotas duplicadas que contengan 0.1 mg de gosipol, en matraces volumétricos de 25 ml. A una de las alícuotas designarla como A, agregar 5 ml de la solución de A.A y aforar con el isipropílico-hexano.
- A la otra alícuota designarla como B, agregar 5 ml de solución p-Anisidina y mezclar por agitación el matraz. Poner los matraces tapados en un baño de agua a 75°C y calentar por 1 hora. Al mismo tiempo llevar durante todo el proceso un blanco consistente en 5 ml de p-Anisidina y 5 ml de alcohol isopropílico-hexano. Al fin del periodo de calentamiento sacar los matraces del baño, enfriar a temperatura ambiente y aforar con el acohol isipropílico-hexano y mezclar. Leer la DO del blanco ajustado el cero del aparato con el isopropílico-hexano. La DO del blanco debe ser inferior a 0.022. Ajustar el cero del aparato con la solución A y leer la DO de la solución B.
- Corregir la lectura de B restándole la lectura del blanco con el valor corregido, calcular la cantidad de gosipol usando la curva estándar.

Preparación de la curva estándar. Tomar con una pipeta duplicados de alícuotas de la solución estándar de gosipol 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 ml en matraces volumétricos de 25 ml al grupo A, agregarle 5 ml de la solución de A.A y aforar con el disolvente, mezclar bien.

Al grupo B y a los blancos que contienen 5 ml de disolvente, adicionarles 5 ml de la solución p-Anisidina y seguir las instrucciones dadas para la muestra.

Determinar la DO de las soluciones usando las alícuotas A como referencia como se indicó en la muestra. Graficar los resultados obtenidos y calcular la pendiente de la curva estándar obtenida.

6.3 Ácido láctico en ensilajes (Método Enzimático)

Principio. En un extracto acuoso del ensilaje, ácido láctico (D- y L-lactato) es oxidado por nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) a piruvato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH). Una segunda reacción es catalizada por transaminasa piruvato glutamato (GPT) para formar NADH. Esta se mide utilizando un espectrofotómetro a 340 nm, que es estequiométricamente equivalente al ácido láctico presente.

Equipo

- Centrífuga
- Espectrofotómetro
- Balanza de precisión

Reactivos

- Kit enzimático para la determinación de D- y L-ácido láctico.
- Lactato (D + L) estándar.

Procedimiento

- Colocar 100 g de ensilaje en un matraz aforado de 1 litro y añadir agua destilada hasta la marca. Dejar en remojo durante 16 horas (toda la noche) en un refrigerador (4-8°C). Filtrar a través de un papel de filtro.
- Analizar inmediatamente o coloque el extracto en el congelador. En este último caso, tomar el extracto de ensilado del congelador y colocarlo en el refrigerador (4-8°C) un día antes del análisis.
- Pipetear 5 ml de la muestra en un tubo de plástico de 10 ml y centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.
- Todas las soluciones del kit de enzimas, estarán listos para usar, con la excepción de la Solución NAD.
- Transferir a cubetas de cuarzo con 2 ml de la solución tampón, NAD, GPT, agua destilada y la muestra en las cantidades de acuerdo con

las instrucciones del kit de enzimas. Incluir También un blanco y una solución patrón.

- Colocar las cubetas en el espectrofotómetro y leer la absorbancia después de exactamente 5 minutos (A1).
- Añadir la solución de D-LDH en las cubetas, colocar en el espectrofotómetro y leer la absorbancia después de exactamente 40 minutos (A2).
- Añadir la solución de L-LDH de las cubetas, coloque en el espectrofotómetro y leer la absorbancia después de exactamente 40 minutos (A3).
- Si A3 es > 1, el extracto tiene que ser diluido.

Cálculos

Acido D-láctico en g/l = $(A2 - A1) \times 0,3204 \times FD$

Acido L-láctico en g/l = $(A3 - A2) \times 0,3232 \times FD$

Corregir los resultados del contenido de materia seca (MS) de la muestra:

D-/L-ácido láctico $\times (1000 - MS) / 1000$

Dónde:

A1 = absorbancia después de 5 minutos,

A2 = absorbancia después de la adición de D-LDH,

A3 = absorbancia después de la adición de L-LDH,

FD = factor de dilución, y

MS = contenido en materia seca en%.

A medida que el extracto se obtiene por dilución de una muestra de 100 g para 1 litro, el resultado es en% del ensilaje.

6.4 Ácidos grasos volátiles (AGVs) en ensilaje (Cromatografía de gases)

Principio. El extracto acuoso del ensilaje se acidifica y se centrifuga. Los alcoholes y ácidos grasos volátiles se separan en la cromatografía de columna en función de su peso molecular para luego ser detectados.

Equipo

- Cromatógrafo de gases provisto de un detector de ionización de llama.
- Columna capilar CE-1000 (L= 30 m, ID = 0.53 mm) con una fase estacionaria de ácido polietilenglicol modificado (espesor = 1,20 μm)
- Integrador (software o registrador gráfico).
- Centrífuga
- Mezclador Vortex
- Balanza de precisión

Reactivos

- Acido oxálico deshidratado (disolvente); hacer soluciones de 0.12 y 0.03 M
- Iso-butanol 99,9%; hacer una solución de 10 $\mu\text{mol/ml}$
- Acido Iso-caproico 99,0%; hacer una solución de 10 $\mu\text{mol/ml}$
- Mezcla estándar: pipetear 12,5 ml de solución de ácido oxálico (0.12 M) en un matraz aforado de 50 ml y añadir 65.40 μl de ácido acético, 10.6 μl de ácido propiónico, 5.2 μl de ácido iso-butírico, 13.0 μl de ácido butírico, 2.48 μl de ácido iso-valérico, 2,98 μl de ácido valérico, 4.0 μl de metanol, 72.4 μl de etanol, 5,74 μl de propanol y 1,98 μl de butanol y completar hasta la marca con agua destilada.
- Hacer blanco de disolvente (Bs): 5 ml de solución de ácido oxálico (0.03 M)
- Hacer blanco estándar interno (Bis): 4 ml de solución de ácido oxálico (0.03 M) + 0,5 ml de solución de isobutanol y 0,5 ml de solución de iso-caproico.
- Hacer patrones de calibración: 3,5 - 3,0 - 2,5 - 2,0 - 1,5 ml de solución de ácido oxálico (0.03M) + 0.5 ml de solución de isobutanol y 0,5 ml de solución isocaproico + 0.5 - 1.0 - 1.5 - 2.0 - 2,5 ml de la mezcla estándar

- Hacer un control positivo mediante la adición de 0.2 ml de solución de isobutanol y 0,2 ml de la solución isocaproico, a 1.6 ml de la mezcla estándar

Procedimiento

- Pesar 100 g de ensilaje en un matraz aforado de 1 litro y añadir agua destilada hasta la marca
- Dejar el ensilado en remojo durante 16 horas (toda la noche) en el refrigerador (2-8 ° C). Filtrar a través de papel de filtro
- Analizar inmediatamente o poner el extracto en el congelador. En el último caso, sacar el ensilado del congelador y transferir al refrigerador (2 -8 ° C) el día anterior al análisis
- Pipetear 2,0 ml de solución 0.3 M de ácido oxálico, 0.5 ml de solución de isobutanol, 0,5 ml de solución de iso-caproico y 2 ml del extracto del ensilaje en un tubo de 10 ml
- Mezclar utilizando un vórtex; centrifugar a 2600 r durante 5 minutos; llenar un vial con 1.25 ml y enjuagar con nitrógeno
- Ajuste el cromatógrafo de gases, de acuerdo con las instrucciones del fabricante; Entre otros: el flujo de helio a 7.2 ml/minuto, puerto de inyección a 220 °C, la columna a 200 °C y el detector a 220 °C.
- La serie comienza con dos disolventes blanco, luego el estándar interno, luego el control positivo y finalmente, el estándar interno blanco. La serie termina con el análisis de estándar interno blanco, un control positivo y finalmente un estándar blanco interno
- Inyectar 1 µl de la muestra preparada por medio de un inyector (split 1/10) en el orificio de la columna capilar. Los componentes volátiles se separan por medio del helio y el medio polar de la fase estacionaria (ácido polietilenglycol modificado) utilizando un gradiente de temperatura (80 °C durante 5 minutos, 10 ° C/ minuto hasta a 200 °C y 200 °C durante 8 minutos), y son detectados por el detector de ionización de llama

▮ **Nota:** Entre dos inyecciones la solución de ácido oxálico (0.03 M) se utiliza para enjuagar la columna.

Cálculos. La identificación y cuantificación de los componentes se basa en una calibración estándar interna multinivel. Para cada componente se miden el tiempo de retención relativo y la superficie bajo el pico.

Para cada componente se establece una curva de calibración. De esto se deriva la concentración del componente ($\mu\text{mol/ml}$) en la muestra teniendo en cuenta el factor de dilución. La concentración porcentual en el forraje, se calcula multiplicando por el peso molar.

7

Determinación de Tóxicos y Compuestos Antinutricionales

Los factores antinutricionales son compuestos naturales que se presentan en los alimentos y que causan diferentes efectos como la alteración de la función reproductiva, reducen el consumo de alimento y pueden limitar la disponibilidad de nutrientes. Se pueden dividir en dos grupos principales, 1. Aquellos inestables al calor y 2. Los estables al calor.

Al primer grupo pertenecen: Lectinas, inhibidores de proteasas, cianógenos, galactósidos y aminoácidos tóxicos y al segundo grupo: ácido fítico, taninos, alcaloides, saponinas y fitoestrógenos.

En este capítulo se describirán aquellas técnicas usuales, para la determinación de los compuestos tóxicos o antinutricionales de mayor presencia en los alimentos o insumos utilizados en alimentación animal.

7.1 Determinación de taninos en sorgo

Los taninos son polifenoles de alto peso molecular que se encuentran en plantas superiores incluyendo muchas plantas utilizadas como alimentos. Estos al ser ingeridos por los animales pueden afectar la utilización de proteína, mediante la formación de complejos insolubles con proteínas y con el hierro.

Este método determina taninos por el procedimiento de la vainilla acidificada. Los taninos se extraen con metanol y el color producido se lee en un espectrofotómetro.

Reactivos

- a. Solución reactiva de vainilla. Mezclar volúmenes iguales de ácido clorhídrico al 8% en metanol y vainilla al 4% en metanol (preparado diariamente), mezclar el reactivo antes de usarlo y no usarlo si presenta color.

b. Catequina

Preparación de la curva estándar. Preparar una curva estándar pesando 100 mg de catequina y disolverla en 50 ml de metanol. Preparar varias diluciones de esta solución de 0 a 10 con metanol. Pipetear dos veces 1 ml de cada dilución en un par de tubos, agregar 5 ml de la solución reactiva de vainilla acidificada y leer después de 20 min a 500-525 nm.

Trazar una curva usando las concentraciones y la transmisión obtenida. Usar como blanco el reactivo solo.

Procedimiento

- Pesar un gramo de muestra molida con una criba de 20 o menor en un matraz con tapón de rosca de 125 ml, agregar 50 ml de metanol, tapar y agitar con movimientos rotatorios ocasionales durante 20-28 horas (usar el mismo tiempo siempre). Al final de este tiempo agitar y dejar asentar. Tomar con pipeta dos veces 1 ml del sobrenadante en un par de tubos y seguir como se indicó para la curva estándar.
- Si se extraen todas las muestras por analizar al mismo tiempo, se pueden hacer mejores comparaciones, en general se supone que un aumento de 10% en la transmisión corresponde a un incremento de 1% de taninos.

Determinación visual y espectrofotométrica. Este método distingue entre cero, bajo, intermedio y alto contenido de taninos en diferentes variedades de sorgo. El método espectrofotométrico se ha desarrollado para detectar bajas concentraciones de taninos y otros polifenólicos por la formación de un complejo azul de Prusia (Ferricianuro ferroso). El método visual se puede realizar en 1-10 minutos el espectrofotométrico en 20 minutos.

Reactivos

- a. Solución de cloruro de hierro FeCl_3 0.10M en HCl 0.1N; 0.008M en HCl 0.008 N. Filtrar las soluciones después de preparadas.
- b. D-catequina (sigma Chemical Co). La etiqueta indica 2.5 moles de agua de hidratación.

- c. Sulfato ferroso amónico RA, para la curva estándar de hierro II.
- d. Solución de ferrocianuro de potasio (($K_3Fe(CN)_6$) 1) – 0.003M.2) 0.004 M;3) 0.0015M en agua.
- e. Ácido clorhídrico 0.1N y 0.008 N.

Equipo

- Espectrofotómetro con cubas de 1 cm.

Método 1. Moler el grano. Tomar con una cuchara graduada de 2 ml una medida rasa del grano molido y ponerlo en un matraz de 125 ml con 50 ml de agua. Agitar con movimiento rotatorio por 3 minutos. Tomar una alícuota de 1 ml del extracto después de 4 minutos de reposo. Agregar 1 ml de $FeCl_3$ 0.008M en HCl 0.008N y 1 ml de $K_3Fe(CN)_6$ 0.003M. El color desarrollado se observa después de 1 minuto.

Método 2. Tomar 2 ml del grano molido en la misma forma y con la misma cuchara graduada y ponerlo en un matraz de 250 ml. Agregar 200 ml de $K_3Fe(CN)_6$ 0.004 y 10 ml de $FeCl_3$ 0.008N. El color se desarrolla en segundos y se oscurece después de unos minutos cuantos más taninos haya.

Método 3. Partir 3 granos longitudinalmente y ponerlos en un tubo de ensayo pequeño. Agregar 0.3 ml de $K_3Fe(CN)_6$ 0.0015 M 0.5 ml de $FeCl_3$ 0.008 M HCl 0.008 N. Agitar los tubos ocasionalmente, observar el color después de 10 minutos.

El criterio de colores para los tres métodos visuales es:

Color	Contenido de taninos	Calificación
Azul oscuro	Alto	1
Azul	Alto	2
Turquesa	Moderadamente alto	3
Verde oscuro	Moderadamente alto	4
Verde	Intermedio	5
Verde limón	Bajo	6

Método colorimétrico. Preparar los matraces como se indica en el método 1 de la estimación visual.

Agitar los matraces ocasionalmente durante 20 minutos, después de reposar por 10 minutos, tomar alícuotas de 1 ml, agregarles 2 ml de $K_3Fe(CN)_6$ 0.008M en HCl 0.008 N y 10 ml de $K_3Fe(CN)_6$ 0.0015M, leer la absorción con un colorimétrico a 720 nm, después de 30 minutos.

Preparar blancos haciendo la extracción de la misma manera, usando 5° ml de NaCl 0.2M en lugar de agua. Restar la absorción del blanco de la muestra. Calcular la concentración comparando con una curva estándar.

Método espectrofotométrico. Pesar 10 mg del grano molido, en un tubo de ensayo, agregar 3 ml de metanol, filtrar el extracto de un embudo Bucher haciendo vacío (el vacío debe aplicarse desde antes de adicionar el extracto), lavar el tubo con otros tres ml de metanol y adicionar al embudo.

Mezclar el filtrado con 50 ml de agua y filtrar (analizar) en menos de una hora. Si se hace la extracción con agua, usar 5 ml y lavar con la misma cantidad de agua. Agregar 50 ml más de agua.

Se pueden cambiar las muestras y agua si se usan las curvas estándar apropiadas. Agregar 3 ml de $FeCl_3$ 0.1M en HCl 0.1, seguidos inmediatamente por la adición de 3 ml de $K_3Fe(CN)_6$ 0.008M. Seguir el mismo patrón de adición del reactivos a todas las muestras, si la extracción con metanol $FeCl_3$ debe adicionarse a los mismos intervalos de tiempo, ya que hay cierto incremento en la DO, después de 10 minutos en cubas de 1 cm a 720 nm, usando agua como referencia. Se pueden usar blanco empleando todos los reactivos excepto el extracto de sorgo y restar esa lectura de la muestra.

Preparación de la curva estándar. Preparar diariamente una curva estándar con D-catequina. El ion ferroso producido por oxidación de los taninos para producción de los taninos para la curva estándar se obtiene adicionando $FeSO_4$ Q.P.

Las concentraciones de catequina usadas para la curva estándar pueden seleccionarse de acuerdo a los contenidos de taninos encontrados en diferentes cantidades de sorgo. Martin y Butler (1977) determinaron 0.04 mg de catequina/100 mg de sorgo, para contenidos de taninos bajos; 0.33 – 0.36 mg para contenido intermedio y 0.56 – 0.58 mg para contenidos altos. La curva puede prepararse al pesar 10 mg de D-catequina, disolverlos en 100 ml de agua, tomar 20 ml de esta solución y diluirlos a 100 ml con agua (0.02 mg de catequina/ml), de esta solución tomar 0,1,2,5,10,15,20 y 30 ml y ponerlos en Erlenmeyer de 125 ml, agregarles con una bureta 50,49,48,45,40,35,30 y 20 ml de agua, agregarles a cada uno 3 ml de $FeCl_3$

0.1M en HCl 0.1N, seguidos por 3 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.008M. Para la adición de los reactivos hay que seguir un mismo patrón de tiempo. Leer la absorción a 720 nm después de 10 minutos y trazar una curva comparando absorción contra concentración de catequina.

7.2 Determinación de gosalol libre

Este método determina el gosalol libre (no unido a proteínas en torta de algodón).

Reactivos

- Solución de acetona al 70% en agua.
- Solución de alcohol isopropílico al 80% en agua.
- Anilina recién destilada
- Estándar del complejo gosalol – ácido acético

Preparación de la curva estándar. Pesar exactamente 27.9 mg del complejo gosalol – ácido acético, disolver en acetona y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 250 ml. Añadir 75 ml de agua. Diluir con acetona hasta la marca y homogenizar. Esta solución contiene 0.02mg de gosalol/ml y es estable por 24 horas si se protege de la luz. Si se desea puede prepararse una cantidad menor del complejo de gosalol-ácido y diluirla en una cantidad proporcional.

- Colocar con una pipeta en matraces volumétricos de 25 ml alícuotas de la solución estándar de gosalol (0.02 mg/ml) por duplicado 0.1.2.4.7.10 ml.
- Diluir un grupo de alícuotas designadas con la letra A con la solución acuosa del alcohol isopropílico 80% y determinar la DO a 440 nm (el blanco es únicamente alcohol isopropílico al 80%).
- Al otro grupo de alícuotas designado como B, añadir 2 ml de anilina destilada y calentar en baño de agua hirviendo durante 30 minutos (preparar un blanco matraz 0) usando 10 ml de acetona acuosa al 70% y 2 ml de anilina y calentarlo también durante 30 minutos en baño de agua.

4. Añadir solución de alcohol isopropílico para aforar la solución, dejar enfriar y terminar el aforo.
5. Determinar la densidad óptica D.O a 440 nm con el blanco preparado. Para probar la anilina del blanco usar la solución acuosa del alcohol isopropílico, para ajustar al 100%. Si la D.O del blanco es mayor de 0.02 repetir la prueba usando anilina redestilada.
6. Corregir la D.O de cada alícuota del grupo B como sigue.

$$D.O \text{ corregida} = D.O B - D.O A$$

7. Preparar una curva de calibración graficando gosipol/125 ml contra D.O corregida. Calcular el factor como sigue:

$$F = \frac{\text{mg de gosipol}/25}{D.O \text{ corregida}}$$

Promediar todos los factores.

Procedimiento

1. Pesar con precisión aproximadamente 1 g, colocarlo en un matraz para yodo, cubrir el fondo con perlas de vidrio, agregar 50 ml de acetona al 70%, agitar por 1 hora, filtrar por papel, descartar las primeras porciones y colocar un vidrio de reloj sobre el embudo.
2. Tomar con pipeta las alícuotas del filtrado de 10 ml cada una en matraces volumétricos de 25 ml (matraz A y B).
3. Proceder como se indica en los puntos 2,3,4,5 y 6 de la preparación de la curva
4. Calcular la cantidad de gosipol de la muestra multiplicando por la pendiente obtenida en la curva estándar.
5. Determinar la D.O a 440 nm con el blanco preparado

Para probar la anilina del blanco usar la solución acuosa del alcohol isopropílico, para ajustar al 100% T. Si la D.O del blanco es mayor de 0.02, repetir la prueba usando anilina redestilada.

7.3 Determinación de gosipol total

Este método determina la cantidad total de gosipol y compuestos semejantes al gosipol de harinas de algodón, bajo las condiciones de la prueba.

Equipo

- Baño maría para calentar a $75 \pm 1^\circ\text{C}$, equipada con pinzas para sostener matraces volumétricas de 100 ml.
- Baño de agua para calentar a $99 - 100^\circ\text{C}$ equipado para sostener matraces volumétricos de 25 ml.
- Molino de cuchillas de laboratorio con cribas de 1 y 2 mm.
- Molino de martillo de laboratorio.
- colorímetro espectrofotómetro para leer a 440 nm.

Reactivos

- Solución de acetona a 70%, mezclar a 700 nm de acetona RA y 300 nm de agua destilada.
- Solución de alcohol isopropílico a 80%, mezclar a 800 nm de alcohol isopropílico RA y 200 ml de agua destilada.
- Azeotropo de metil-etil-cetona, mezclar 1106 ml de metil-etil-cetona RA y 100 ml de agua y destilar a través de una columna de Vigreux, desechando los primeros 100 ml del destilado. El azeotropo destila a 73.5°C . Debe almacenar en un frasco oscuro.
- Solución de ácido oxálico 0.1 M de azeotropo de metil-etil-cetona agua. Disolver 12.6 g de ácido oxálico ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) en un litro de azeotropo de metil-etil-cetona. Almacenar en frasco oscuro.
- Anilina recién destilada. Destilada anilina RA sobre una pequeña porción de polvo de zinc, desechando el primero y el último 10% del destilado. Almacenar en un frasco oscuro en refrigerador. Redestilar cuando el blanco tenga D.O superior a 0.002.
- Solución de acetato de bario 0.5M. Disolver 136.73 de acetato de bario RA ($\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{CO}_2)_2$) en agua destilada y aforar a 1 lt.

g. Ácido acético RA

h. Solución estándar de gosipol. Pesar exactamente 10 mg de gosipol estándar, disolver en acetona pura y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 ml usando alrededor de 10 ml de acetona para transferir. Agregar 6.0 ml de agua destilada, mezclar y diluir a volumen con acetona pura. Esta solución concentrada tiene 0.4 mg de gosipol/ml, es estable por 24 horas si se protege de la luz.

Transferir los 25 ml de solución concentrada de gosipol dentro de un matraz volumétrico de 500 ml. Agregar 1.5 ml de ácido acético y aforar con acetona acuosa. Esta solución diluida contiene 0.002 mg de gosipol/ml.

Preparación de la muestra

a. Semillas de algodón. Mezclar aproximadamente 50 g de muestra en un molino de martillos con las placas separadas para que quiebre las semillas pero no las pulverice. Separar las cascarillas, tamizando la muestra y moliendo las semillas sin cascarilla en el molino con criba de 1 mm. Debe evitarse cualquier sobrecalentamiento con el fin de que no haya pérdida de aceite.

b. Tortas cocidas. Reducir el contenido de agua a 5% o menos. Moler en molino con criba de 2 mm.

c. Tortas o harinas. Moler 50 g de muestra en un molino con criba de 1 mm.

Tamaño de la muestra. La elección del tamaño de la muestra y la alícuota dependerá del contenido de gosipol total de la muestra del tipo, de colorímetro usado para la lectura. Para máxima precisión la alícuota debe contener más de 0.1 mg de gosipol.

Tabla 19. Estimación de contenido de gosipol

Contenido esperado de gosipol total %	Tamaño de la muestra (g)	Tamaño de la alícuota (ml)
Debajo de 0.1	1.0	10
0.1 – 0.2	0.5	10
0.2 – 0.5	0.5	5
0.5 – 1.5	0.5	2
Arriba de 1.5	0.25	2

Para la mayoría de las muestras es suficiente una muestra de 0.5 g y una alícuota de 2 ml. Sin embargo el anterior cuadro puede servir de guía para otros materiales con un contenido diferente de gosipol total.

Procedimiento

1. Transferir la muestra exactamente pesada a un matraz volumétrico de 100 ml con tapón de vidrio y adicionar 25 ml de la solución de ácido oxálico con una pipeta volumétrica lavando bien las paredes del matraz.
2. Preparar un blanco colocando con pipeta 25 ml de la solución de ácido oxálico en otro matraz volumétrico de 100 ml.
3. Colocar ambos matraces en el baño de agua a 75 ± 1 °C/ 6-7 horas. Si es mas conveniente la muestra puede calentarse toda la noche (16 horas).

Colocar los matraces después de equilibrar y mantenerlos tapados durante el calentamiento. Enfriar a temperatura ambiente y agregar alrededor de 25 ml de la solución de acetona al 70%.

4. Agregar 5 ml de la solución de acetato de bario, con pipeta volumétrica a la muestra y al blanco, mezclar bien y aforar con acetona al 70%.

Reposar los matraces por 10 minutos para que se precipite todo el oxalacetato de bario y filtrar a través de un papel de retentividad media, recogiendo el filtrado en un matraz pequeño con tapón de vidrio, eliminando la primera porción del filtrado.

5. Tomar con pipeta alícuotas duplicadas de cada filtrado en matraces volumétricos de 25 ml. Tomar las mismas alícuotas para el blanco y

para la muestra. Diluir una de las alícuotas de la muestra y del blanco con alcohol isopropílico al 80%, designándolos como alícuotas A.

6. A las otras alícuotas designarlas como B agregarles 2 ml de anilina redestilada (usar una pipeta de vaciado rápido) y calentar en baño hirviente/30 minutos. Enfriar los matraces y aforar con alcohol isopropílico al 80%.
7. Medir la D.O de la alícuota A a 440 nm contra el disolvente.
8. Medir la D.O de la alícuota B a 440 nm contra el blanco.
9. Calcular la D.O corregida de la muestra, restando la lectura de A a la de B y utilizando una curva estándar determinar los mg de gosipol presente.

Preparación de la curva estándar

1. Tomar con pipeta alícuotas duplicadas de 1,2,3,4,5,6,7,8,9 y 10 ml de la solución estándar de gosipol en matraces volumétricos de 25 ml. Diluir un juego de alícuotas designadas con A con alcohol isopropílico al 80% y medir la D.O a 440 nm contra el disolvente como referencia.
2. Al otro juego designado como B, agregarle 2 ml de anilina redestilada y proceder como se indicó con la muestra. No es necesario preparar blanco con cada alícuota de la solución estándar. Como blanco preparar un matraz que contenga 5 ml de acetona al 70% y 2 ml de anilina y proceder al mismo tiempo y del mismo modo con los estándares.

Calcular la D.O corregida para cada concentración. Dibujar una curva estándar en la cual el eje de las abscisas indique concentración en mg de gosipol/25 ml y al de las ordenadas D.O corregida (D.O.B – D.O.A) y calcular la ecuación de la curva estándar.

Cálculos

$$\% \text{Gosipol total} = \frac{10 \times G}{W V}$$

Donde:

G : mg de gosipol en la alícuota de la muestra

W : peso de la muestra en gramos

V : volumen de la alícuota tomada

7.4 Detección de aflatoxinas

Este procedimiento debe sugerirse para la protección o detección presuntiva, cualitativa y cuantitativa de aflatoxinas en maíz. Se aplican tres pruebas, la primera utiliza luz ultravioleta (luz negra) para detectar la presencia de hongos, las muestras positivas deben analizarse para determinar aflatoxinas. La segunda es la técnica de la minicolumna que detecta cantidades hasta de 2 ppb en diferentes productos, aunque no funciona con todos los alimentos; esta técnica es rápida de realizar pues se hace en aproximadamente 10 minutos. La tercera es la técnica cuantitativa en placa fina. Este método se describe más adelante y es el recomendado por la A.O.A.C.

Muestreo y preparación de muestras, es muy importante para realizar un buen análisis. En ocasiones un saco roto que muestra granos quebrados o apelmazados es más indicativo que una muestra representativa.

Cuando se pretende determinar niveles de aflatoxinas inferiores a 50 o 100 ppb la muestra deberá ser aproximadamente 5 kg de una muestra representativa del lote, estadísticamente se ha probado que muestras menores decrecen la probabilidad de detectar contaminaciones de 20 ppb (la cantidad permitida por la FDA para alimento de animales).

La muestra deberá ser molida en forma gruesa, si es positiva a la prueba de la luz negra, mezclar y tomar 1 kg para el análisis.

7.4.1 Técnica de la luz negra. Esta técnica es la más posible presencia de aflatoxinas. Esta prueba detecta fluorescencia verde amarilla (FVA) en semillas, producida generalmente por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* cuando crecen sobre semillas vivas de maíz, sorgo, algodón, trigo o cebada. Las semillas que han sido muertas por acción de altas temperaturas generalmente no producen FVA. Las semillas de soya generalmente no fluorescen, aunque semillas sanas sin cubierta dan una fluorescencia verde oscuro. La FVA está generalmente confinada a la parte amilácea de la semilla y las partes periféricas del germen. La FVA aparentemente se produce por reacción entre el ácido koyico del hongo y una peroxidasa de la semilla, la cual es característica de semillas vivas. Así la FVA no es una característica de aflatoxinas sino del crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Hay algunas cepas de *aspergillus* que producen FVA, aunque pocas aflatoxinas. La mayoría de las cepas productoras de aflatoxinas pueden producirse, sin embargo, en semillas muertas y por lo tanto sin mostrar FVA,

parece ser que hay una buena relación del número de partículas FVA y la cantidad de aflatoxinas.

Pueden cometerse errores (falsos positivos) con algunos granos y raciones balanceadas debido a que la cubierta de algunas semillas fluoresce en verde azul muy parecido a la FVA. Las alas de abejas que pueden estar en algunas semillas fluorescen en amarillo, en general los falsos positivos no fluorescen en forma tan brillante. Sin embargo, estos errores se pueden evitar:

1. Comparando con una verdadera FVA obtenida de crecimiento de *Aspergillus* sobre semillas vivas.
2. Comparando contra un color estándar.
3. Comprobar si el material fluorescente es soluble en agua. Los falsos positivos no lo son.
4. Confirmar que el material fluorescente es del endospermo emiláceo o de fragmento del germen.

Si la prueba de la luz negra se aplica a granos completos, algunas pruebas positivas se pueden perder, aunque de esta manera el analista puede separar pelillos o material extraño fluorescente. Si la muestra se muele va a obtenerse un mayor número de muestras positivas aunque también se incrementen las falsas positivas.

Las muestras pueden quebrarse con molinos de disco, o los usados para café. El molido fino para el análisis se deberá realizar en un molino con criba No. 20.

Procedimiento. El exámen con la luz ultravioleta se deberá realizar en un cuarto oscuro con una lámpara de luz ultravioleta de onda larga, 365 nm. No usar luz UV de onda corta o lámpara germicida. Para hacer el examen hay que proteger los ojos de la luz.

Cuando la muestra es positiva de FVA se deberán realizar los otros análisis. Es importante no dar un juicio sobre la presencia de aflatoxinas hasta no realizar los otros análisis. El método de la placa fina, aunque reuniera mayor trabajo, debe realizarse para asegurar suficiente precisión.

7.4.2 Prueba de minicolumna. En otro lugar del manual se describen los métodos par detección de aflatoxinas por el método de la minicolumna (Pons *et al.* 1973 Jemali 1973). Aquí se describirá la técnica de Holanda y Ladsen la cual ha probado ser útil para detectar aflatoxinas en maíz ya que requiere material poco costoso y también se puede realizar en aproximadamente 10 min. Esta técnica no diferencia los tipos de aflatoxinas, aunque B₁ es casi siempre la predominante. Ocasionalmente se observan falsas positivas con esta técnica.

Reactivos

- a. Tolueno o benceno RA
- b. Metanol – Agua (80 - 20)
- c. Solución salina. Disolver 600 ml de NaCl, 600 g de acetato de cinc y 15 ml de ácido acético glacial en 4 lt de agua destilada.
- d. Solución de hexano – acetona (80+ 20)
- e. Florisil de 100 – 200 mallas
- f. Alumina neutra (100 – 200 mallas, actividad IV o E actividad Merk I). Secarla a 100°C/2 horas y adicionar 15% de agua destilada por peso, mezclar bien y reposar por lo menos 2 horas.

Material. Todo el material de vidrio que se use debe lavarse con una solución de hipoclorito laboratorios usan material de plástico desechable, los que deben enjuagarse con el hipoclorito antes de eliminarlos.

- a. Licuadora, preferiblemente una a prueba de explosión.
- b. Bomba para hacer vacio, de motor o de agua
- c. Minicolumnas. Se pueden adquirir ya hechas en el comercio, pero hay que asegurarse del tipo deseado (Ag Science, Shumman Chemical Laboratories) o pueden hacerse como se indica:

Empaque de las minicolumnas. Usar tubo de vidrio de 5.5 mm de diámetro interno y 160 mm de largo, tapar con un pedacito (4 -6 mm) de pulpa de papel en uno de los extremos, adicionar 90 mm de florisil

- y 15 mm de alúmina neutra y para tapar con un pedacito de pulpa de papel de (4 – 6 mm).
- d. Tubos de ensayo con tapón de rosca
 - e. Probetas graduadas 10 o 25 ml y 100 ml
 - f. Pipetas de 1 ml
 - g. Un bulbo de plástico para llenar la pipeta (no deben tomarse las soluciones con la boca). Pipetas automáticas para la solución salina y el tolueno facilitan el trabajo.
 - h. Filtro de lana vidrio de 12 cm
 - i. Papel filtro (Whatman 2 v o 114 de 18.5 cm) el tamaño.
 - j. Embudos
 - k. Lámpara de luz ultravioleta de onda larga

Procedimiento

- Llevar a cabo todo el procedimiento con cuidado y trabajar en lugares bien ventilados o dentro de campanas para extracción de gases.
- Moler la muestra a través de la criba No. 20, pesar 100 g de muestra ponerlos en la licuadora y adicionar 200 ml de metanol y agua, licuar a alta velocidad por 1 minuto. Se puede usar una muestra de 50 g adicionando 100 ml de disolvente. Filtrar y recoger 10 ml del filtrado en un tubo de ensayo con un tapón de rosca cubierto en el interior con plástico, los tubos pueden marcarse a los 10 ml. Agregar 10 ml de solución salina y agitar vigorosamente por 5 a 10 minutos.
- Filtrar 15 ml de contenido a través de un filtro de lana de vidrio en un segundo tubo. Agregar 3 ml de tolueno, tapar el tubo y agitar vigorosamente por 10 segundos. Si se forman emulsiones, la agitación debe ser menor. Dejar que se separen las capas y tomar con una pipeta 1 ml de la capa superior de tolueno en la microcolumna. Asegurarse de que no se toma la capa inferior.
- Hacer vacío a la minicolumna y cuando esté terminado de pasar la solución problema, agregarle 5 ml de solución lavadora de hexano-

acetona y volver a hacer vacío hasta que toda la solución lavadora se haya evaporado de la minicolumna.

- No hacer vacío muy fuerte por que puede romperse la columna o hacer difícil la adaptación y observación de la banda fluorescente. Si, no se aplica vacío y se permite la separación de gravedad, el tiempo de análisis se incrementa a 20-30 minutos. Observar inmediatamente la minicolumna bajo una lámpara de luz UV.
- Una lámpara de alta intensidad permite una observación más aguda, una banda azul fluorescente debajo de la interfase de florisil y de la alumina indica por lo menos 5 ppb de aflatoxinas.
- La cantidad de líquido de la capa de tolueno determina el límite de detección del método y puede ser usado para diseñar un sistema de adición a varios niveles aproximado como se indica: 10 ml 2 ppb; 1 ml 4 ppb; 0.5 ml ppb; 0.2 ml 20 ppb y 0.1 ml 40 ppb. Hay que tener en cuenta esos niveles de aproximación cuando se tiene que adicionar a la columna cantidades inferiores a 1 ml con tolueno. Por ejemplo, en lugar de adicionar 0.2 ml se le agregan 0.8 ml de tolueno y se coloca 1 ml de solución en la columna.

7.5 Detección rápida de contaminación por aflatoxinas

Este método es lo suficientemente sensible para hacer la determinación del método semicuantitativo.

Reactivos

- Disolvente grado reactivo o espectrofotométrico: Acetonitrilo (CH_3CN) benceno, cloroformo (CHCl_3) y 2-propanol.
- Disolvente de extracción: Mezclar 800 ml de CH_3CN y 200 ml de agua
- Disolvente de desarrollo: CHCl_3 - CH_3CN - PROPANOL (93= +5+2)
- Solución CH_3CN de acetato de plomo neutro al 20%, disolver 200 g de acetato de plomo neutro $3\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada, calentar un poco en baño de agua; agregar 3 ml de ácido acético y diluir a 1 litro.

- e. Alúmina acídica de 80-200 mallas (Beckman actividad 1 (- - Fisher Scientific Co No. A - 948)) ajustar la actividad en gradi II, adicionando 3% de agua, agitar bien y equilibrar toda la noche.

Pueden utilizarse otras alúminas acídicas.

- f. Algodón absorbente. Agitar en CHCl_3 caliente, exprimir y secar al aire.
- g. Ayuda filtra. Célite o Hyflo super cel, lavado con ácido (Johns Mansville Corp).
- h. Silica gel – 7086 silica AR CC – 4 (Mallinckrodt Chemical Works No. 7086) 7081. Silica AR CC-7 (7087) o silica gel (0.05 – 0.2 mm). El Merk No. 7734 puede sustituirse pero es mejor el CC-4. Secar a 110 °C/2 horas y almacenar en desecador. Es importantísimo el uso de silica de gel seca en minicolumnas.

Equipos

- a. Licuadora de alta velocidad, con vaso de acero inoxidable de 1 litro con tapa de fricción.
- b. Gabinete para observación equipado con lámpara de luz ultravioleta de onda larga (Black ray UVL22, Ultraviolet Products). Las columnas se observan en el gabinete en el cuarto oscuro.
- c. Minicolumnas 20 cm de largo, 6 mm de diámetro externo y 4 mm de diámetro interno. Para facilitar el llenado se puede agrandar en la parte superior en formas de embudo, aunque no es indispensable.

Empaques de las minicolumnas. Tapar uno de los extremos de la columna con un pedacito de algodón bien apretado.

Agrandar la alúmina acídica hasta una altura de 1.5 cm (se puede usar cucharillas graduadas para facilitar la adición). Agregar silica gel seca a una altura de 9 cm, tapar la columna con un pedacito de algodón y empacar golpeando varias veces sobre la mesa, apretando bien el algodón. No debe tener separación la columna y debe estar bien empacada.

Procedimiento

- Pesar 50 g de la muestra molida que pase la malla No. 20 en un vaso de licuadora, adicionar 150 ml de disolvente de extracción y 10 g de ayuda filtro y mezclar en la licuadora por 3 minutos a alta velocidad. Filtrar a través de papel filtro Whatman No. 4 o su equivalente de 18.5 cm de diámetro. Recoger 50 ml de filtrado. Poner en un vaso de 250 ml del filtrado en 20 ml de solución de acetato de plomo y 130 ml de agua destilada y reposar durante 3 minutos, para permitir la floculación o precipitación. Adicionar aproximadamente 10 g de ayuda filtro, agitar y filtrar a través del papel como arriba. Si el filtrado no es claro, refiltrar la primera porción (aproximadamente 30 ml).
- Medir 100 ml del filtrado obtenido dentro de un embudo de separación de 125 ml. Adicionar 3 ml de benceno y agitar vigorosamente durante 1 minuto. Cuando se separen las fases, drenar y descartar la fase interior acuosa. Lavar la fase bencénica con 50 ml de agua destilada, invertir en el embudo suavemente diez veces para impedir emulsiones. Drenar y descartar la fase acuosa, transferir la fase bencénica a un frasco pequeño de 6 a 8 ml. Adicionar una pizca de Na_2SO_4 anhidro y agitar para eliminar cualquier residuo de agua.
- El extracto Bencénico debe ser claro y estar libre de turbidez.
- Meter la columna dentro del extractor bencénico, permitiendo que el disolvente ascienda hasta 1 cm arriba de la capa de alúmina. Sacar la columna, limpiarla por fuera inmediatamente ponerla dentro de un frasco que contenga 5 ml de disolvente desarrollador. Desarrollar la columna 5 minutos en dirección ascendente.
- Examinar la columna desarrollada inmediatamente bajo luz UV de onda larga en el gabinete o de manera que se protejan los ojos en un cuarto oscuro. La presencia de aflatoxinas se evidencia por la presencia de una banda azul fluorescente aproximadamente 1 cm arriba de la capa de alúmina.
- Si la banda de fluorescencia es muy clara indica contaminación aproximadamente 10 mcg/kg; si la fluorescencia es muy intensa, la contaminación es mayor. Con algunas muestras sin aflatoxinas se observan bandas fluorescentes blancas o grises. La presencia se caracteriza por fluorescencia azul.

- En caso de que se desee una mejor estimación de la contaminación con aflatoxinas, se puede comparar la fluorescencia de las columnas con estándares desarrollados en la misma forma.

Preparación de los estándares. Preparar una solución que contenga 10 mcg de aflatoxinas B₁/ml de benceno – acetonitrilo (98+2). En 4 frascos con tapón de rosca, preferiblemente recubierto de teflón poner 8.4, 16.7, 41.8 y 83.5 mclt (microlitros) del estándar de B₁ y evaporar el disolvente en atmósfera de nitrógeno. Agregar a cada frasco 3 ml de benceno-acetonitrilo (98+2), tapar y agitar por un minuto. Esto nos da estándares de 10, 20, 50 y 100 mcg/kg. Dependiendo del nivel de contaminación la muestra desarrolla 2 columnas y 2 de estándares y la muestra. Si es necesario se pueden preparar otras concentraciones del estándar.

Nota: El tratamiento con acetato de plomo elimina la interferencia por clorofila, xantofilas y flavonas, las cuales migran al mismo R_f que las aflatoxinas interfiriendo con su estimación.

7.6 Detección de aflatoxinas en alimentos para animales

Este método estima en forma rápida la presencia de aflatoxinas y tiene la ventaja de que el tipo de columna usada permite confirmar la presencia de aflatoxinas B₁, además es desechable.

Reactivos

- a. Tubo de celulosa de 10 mm de diámetro externo y pared delgada (Poly Labo P. Block France o Curtin No. 077 024), este material se obtiene en rollos y se usa como membrana para diálisis.
- b. Sílica gel para columnas cromatográficas de 0.063 – 0.2 mm (E. Merck No. 7754).
- c. Alúmina ácida para columna cromatográfica (E. Merck No. 1078).

Empaque de las columnas. Preparar columnas de 15 cm de largo, poner un tapón de algodón en un extremo del tubo, agregar 1 cm de alúmina ácida, 1 cm de Na₂SO₄ anhidro, 9 cm de sílica gel y otro

tapón de algodón. Usar presión manual para llenar las columnas uniformemente. Se pueden llenar 4 columnas al mismo tiempo, tomando 80 cm de tubo de celulosa. Abrir un extremo con una varilla de vidrio y agregar material suficiente para dos columnas, por el otro extremo hacer lo mismo, almacenarlas en un desecador sobre P_2O_5 , cortarlas antes de usarlas al largo deseado.

Procedimiento

- Seguir el procedimiento indicado en el método rápido de Ponset (1973), para la extracción de la muestra.
- Para el desarrollo de la columna, insertarla dentro del extracto benecénico y permitir que el disolvente alcance 1 cm arriba de la zona de Na_2SO_4 . Desarrollar 5 minutos en $CHCl_3$ -acetoneitrilo - 2 propanol (93+5+2). Examinar la columna desarrollada bajo luz ultravioleta de onda larga. La presencia de aflatoxinas se observa como una banda fluorescente 0.5 cm arriba del Na_2SO_4 . Para confirmación de presencia de aflatoxinas, picar la columna con aguja 3-4 veces y sumergirla por 10 segundo dentro de un frasco que contenga Na_2SO_4 al 50%. Examinar nuevamente la columna bajo la lámpara de luz UV; una fluorescencia amarilla confirma la presencia de aflatoxinas.
- Nota: Si se hacen comparaciones con estándares, como se sugirió en el método de Pons *et al* (1973), se pueden detectar niveles de aflatoxinas de 4 ppb (mcg de B1/kg) en maíz.

7.7 Determinación de glucosidos cianogénicos

El método determina glucósidos cianogénicos en alimentos para animales.

7.7.1 Pruebas cualitativas. Preparar papel de picrato de sodio, humedeciendo tiras de papel filtro en una solución de ácido pícrico al 1%, dejar secar y humedecer nuevamente en una solución de Na_2CO_3 al 10% y secar. Almacenar estos papeles en frascos cerrados.

Picar finamente una pequeña cantidad de la planta y ponerla en un tubo de ensayo. Introducir una tira de papel de picrato de sodio humedecido

teniendo cuidado de que no toque el material. Agregar unas gotas de cloroformo, tapar el tubo y agitar. El papel de picrato de sodio cambia de color anaranjado a rojo brillante si hay glucósidos cianogénicos.

La prueba funciona bien con plantas frescas, con muestras secas, particularmente semillas, deben molerse y humedecerse con agua y tapar el tubo para que se realice la hidrólisis de los glucósidos.

Nota: La prueba es muy sensible y el cambio de color de papel de picrato de sodio será más rápido cuanto mayor sea el contenido de glucósidos cianogénicos.

7.7.2 Prueba cuantitativa

- a. Titulación ácida. Poner 10-20 g de muestra molida a través de una criba No.20 en un matraz Kjeldahl de 800 ml, agregar 100 ml de agua y macerar a temperatura ambiente durante 2 horas. Agregar 100 ml de agua, destilar, recoger el destilado en 20 ml de agua y de AgNO_3 0.02 N acidificado con 1 ml de HNO_3 . Antes de destilar recoger e introducir la punta del destilante dentro la solución de AgNO_3 . Destilar aproximadamente 150 ml, filtrar a través de un crisol de Gooch, lavar el matraz en que se recibió el destilado y el Gooch con un poco de agua. Titular el exceso de AgNO_3 en el destilado y los lavados, con KSCN 0.02N, usando 1 ml de alumbre férrico como indicador.

1 ml de AgNO_3 0.02N = 0.54 mg de HCN

- b. Titulación alcalina. Poner 10-20 g de muestra molida a través de una criba No. 20 en un matraz de Kjeldahl, agregar aproximadamente 200 ml de agua y dejar reposar de 2-4 horas, la hidrólisis debe realizarse en el aparato para destilación ya conectado. Destilar, recoger de 150 – 160 ml del destilado en la solución de NaOH (0.5 de NaOH en 20 ml de agua), diluir a un volumen definido.

A 100 ml de destilado (es preferible diluir a 150 ml y tomar una alícuota de 100 ml), agregar 8 ml de NH_4OH 6N a 2 ml de solución de yoduro de potasio al 5%, titular con AgNO_3 0.02N usando una microbureta. El punto final se observa por una turbidez ligera pero permanente la cual es fácil de observar si se colocan los matraces contra el fondo oscuro.

1 ml AgNO_3 AgNO_3 0.02N = 1.08 mg HCN

Nota: Para destilar se puede usar el aparato de Kjeldahl, teniendo cuidado de que la punta del refrigerante esté dentro de la solución receptora (HN-O_3 titulación ácida a NaOH, titulación alcalina). Con objeto de evitar pérdidas de HCN, se debe colocar el matraz Kjeldahl en el aparato de destilación ya listo durante el periodo de hidrólisis.

Cuando se determina glucósidos cianogénicos en tubérculos de yuca fresca o deshidratados, durante la destilación se forma mucha espuma, para evitarla se puede adicionar antes de destilar, algún antiespumante. La parafina funciona bien para éste propósito, es barata y fácil de conseguir.

7.7.3 Determinación espectrofotométrica de glucosidos cianogénicos.

Este método tiene la ventaja sobre los métodos de titulación con HNO_3 de que es posible determinar el HCN con precisión a pesar de que el destilado sea colorido.

Reactivos

- a. Cloramina T al 1% (1g de p-tolueno sulfocloramida en 100 ml de agua)
- b. Solución reactiva. Se suspenden 3 g de ácido barbitúrico en 20 ml de agua, se añaden 30 ml de piridina y 5.5 ml de ácido clorhídrico concentrado. Se afora a 100 ml con agua.
- c. Acetato de sodio al 2% en agua.

Procedimiento

- Pesar de 10 – 20 g de muestra y colocarla en un matraz de Kjeldahl de 800 ml, agregarles 200 ml de agua acidulado al ácido clorhídrico, unas perlas de vidrio y algún antiespumante, (pequeños pedacitos de parafina son efectivos).
- Conectar el matraz al destilador de Kjeldahl, en el matraz colector poner 25 ml de agua.
- Hay que tener cuidado de que el tubo del condensador quede dentro de la solución.

- Dejar reposar 2 horas. Al cabo de este tiempo empezar lentamente la destilación cuidando que no pase espuma al matraz colector. Destilar aproximadamente 100 ml.
- Aforar el destilado a 100 o 150 ml de agua. Tomar una alícuota de 25 ml (el pH debe estar entre 2 y 10) y ponerlos en un matraz volumétrico de 50 ml; agregarle 1 ml de solución de cloramina, agitar, tapar y dejar reposar durante 1 minuto. Agregar 3 ml de reactivo, aforar con agua. Leer después de 8 minutos a 570 nm contra un blanco.

Preparación de la curva estándar. Preparar una curva estándar poniendo cantidades crecientes de KCN equivalente a 0, 2, 5, 7.5 y 10 mcg de CN.

Pesar 0.125 g de KCN (equivalentes a 0.050 g de CN), disolver en agua, aforar a 100 ml. Tomar 1 ml y diluirlo a 100 ml. De esta solución tomar 0, 5, 10, 15 y 20 ml en matraces volumétricos de 50 ml y agregarles 25, 20, 15, 10 y 5 ml de agua, adicionarle 1 ml de cloramina y continuar el procedimiento como se indicó para las muestras.

7.8 Determinación de óxido de cromo

Método espectrofotométrico

Reactivos

- a. Ácido nítrico concentrado Q.P
- b. Ácido sulfúrico concentrado Q.P
- c. Mezcla oxidante. Disolver 20 g de molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{Mo}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 300 ml de agua; colocar el matraz en baño de agua helada y añadir cuidadosamente y con agitación constante 300 ml de H_2SO_4 concentrado. Finalmente agregar 400 ml HCl al 70%.
- d. Dicromato de potasio Q.P

Procedimiento

1. Pesar la muestra con exactitud (2 a 3 g de dieta ó 0.5 a 5 g de excreta seca) e introducir a un matraz Kjeldahl de 100 ml aforado a 110 ml.
2. Añadir 10 ml de HNO₃ concentrado y de preferencia dejar reposar varias horas para facilitar la digestión.
3. Calentar y evaporar casi a sequedad, evitando carbonización excesiva de la muestra.
4. Añadir 15 ml de la muestra oxidante, calentar suavemente hasta que la evolución tumultuosa de gases cese y entonces hervir hasta que el color vire de verde al amarillo intenso; asegurarse de que no queden partículas sin digerir y continuar el calentamiento intenso por un minuto más.
5. Sumergir el matraz en agua fría y diluir el contenido cuidadosamente con 50 a 60 ml de agua.
6. Añadir 20 ml de H₂SO₄ concentrado y mezclar por agitación cuidadosamente. Añadir agua casi hasta el aforo, dejar enfriar a temperatura ambiente, diluir con agua a 110 ml, mezclar y dejar reposar no menos de 12 horas para permitir la sedimentación de cristales y otros materiales insolubles.
7. Permitir la absorción en un espectrofotómetro a 444 nm. Usar agua como blanco, calcular el equivalente de Cr 203, por comparación en la curva estándar preparada como se detalla a continuación.

Curva estándar para K₂Cr₂O₇. Pesar 0.213 g K₂Cr₂O₇ anhidro, disolver y aforar a 100 ml con agua, de esta solución transferir los siguientes volúmenes 0, 5, 10, 15, 20 y 30 ml a matraces Kjeldahl de 100 ml, seguido de aproximadamente 60 ml de agua y 20 ml de H₂SO₄ concentrado. Determinar la absorción de 444 nm. Construir una gráfica en papel milimétrico en la cual las ordenadas sean los valores de D.O x 10³ y las abscisas representan mcg de Cr₂O₃ ml⁻¹ (0, 50, 100, 150, 200 y 300 respectivamente). Calcular la ecuación de la línea recta.

Nota: Tener mucho cuidado al sumergir los matraces de Kjeldahl al agua, ya que pueden romperse o presentarse proyecciones.

7.8.1 Modificación a la técnica del óxido de cromo

Reactivos

Los mismos detallados en los incisos a, b, c, y d del método espectrofotométrico, además de una solución C.18M de H_2SO_4 (17.64 g H_2SO_4 /litro, equivalente a 10 ml/litro de H_2SO_4 de p.e 1.84).

Procedimiento

1. Pesar con exactitud entre 2 y 3 g del alimento o 1 a 1.2 g de excreta seca, e introducir en matraces Kjeldahl de 100 ml.
2. Añadir con probeta 10 ml de HNO_3 concentrado y dejar reposar una noche.
3. Hervir en un digestor micro-Kjeldahl hasta que el contenido del matraz empiece a carbonizarse.
4. Añadir con probeta 15 ml de mezcla oxidante, hervir a calor moderado hasta que la evolución tumultuosa de gases cese y entonces calentar al máximo hasta que el color vire del verde al amarillo y por 15 minutos más a partir de este punto.
5. Sumergir el matraz en agua fría y añadir lentamente y con agitación constante aproximadamente 100 ml de agua destilada.
6. Transferir cuantitativamente el contenido del matraz a un matraz aforado de 500 ml, enjuagando repetidas veces, aforar a volumen con agua destilada, una vez que el contenido del matraz alcance la temperatura ambiente.

Dejar reposar una noche a fin de permitir la sedimentación de materiales insolubles.
7. Determinar la absorción a 350 nm, utilizando como blanco la solución de H_2SO_4 0.18M. Calcular el equivalente de Cr_2O_3 comparando con la curva patrón que se detalla a continuación.

Curva patrón para Cr_2O_3 . Pesarse exactamente 0.4843 $K_2Cr_2O_7$ seco y aforar a 500 ml con solución de H_2SO_4 0.18M (1 ml = 0.1mg Cr_2O_3 equiv). Transferir los siguientes volúmenes 0, 10, 20 y 40 ml de esta solución a

matraces aforados de 500 ml, completando con solución 0.18M de H₂SO₄ (equivalente en mg Cr₂O₃/500 ml a 5, 10 y 20) determinar la absorción a 350 nm y graficar en papel milimétrico.

Cálculos

$$X = \frac{Y}{m}$$

Donde

X = mg Cr₂O₃ en un gramo de muestra Y= absorción x 10³

m= pendiente de la curva patrón

Cuando se use una muestra de 3 g de dieta y 1 g de excreta, corregir el cociente en la siguiente forma:

$$\frac{\text{Cr}_2\text{O}_3/\text{g dieta}}{\text{Cr}_2\text{O}_3/\text{g excreta}}$$

Cociente corregido = (cociente obtenido x 1.11) – 0.045

Esta corrección elimina la cantidad de luz que se absorbe a 350 nm en la dieta y excreta.

7.8.2 Determinación de óxido de cromo en alimentos y heces. Este método determina el óxido de cromo en alimentos y heces y ofrece varias ventajas con respecto al de la fusión alcalina y al de Czarnocki. El óxido de cromo de la muestra se oxida a CrO₃, el cual en solución acuosa se polimeriza por pérdida de agua ácido dicrómico, tricrómico y polímeros superiores.

Reactivos

Mezcla digestora. Disolver 10 g de molibdato de sodio deshidratado con 500 ml de una muestra compuesta por 150 ml de agua, 150 ml de ácido sulfúrico y 200 ml de ácido perclórico.

Procedimiento

Pesar muestras de heces y alimentos que contengan entre 20 y 60 mg de Cr_2O_3 (aproximadamente de 2 a 3 g de alimentos y de 1 a 1.2 g de heces secas) en pequeños vasos de precipitado de 30 ml, incinerar toda la noche a 450°C , después de enfriar agregar 15 ml de mezcla digestora y calentar sobre placa caliente, superficie por lo menos a 300°C , hasta que se desarrolle un color amarillento o rojizo. Prolongar el calentamiento 10 a 15 minutos más. Enfriar y transferir cuantitativamente a matraces volumétricos de 200 ml con agua destilada y aforar. Centrifugar 10 ml de éste digerido en frascos o poliestireno a 700 rpm durante 5 minutos. Leer la absorción óptica a 440 nm en celdas de 1 cm. Preparar varios blancos, pesando heces y alimentos que no contengan Cr_2O_3 .

Preparación de la curva estándar. Pesar porciones de Cr_2O_3 de 5, 20, 35, 50 y 60 mg en vasos de precipitado de 30 ml y tratarlos en la misma forma que se describió para los alimentos y heces. Con esta curva calcular el contenido de Cr_2O_3 en la muestra.

Nota: El reposo durante toda la noche de los digeridos no es suficiente por lo que se debe centrifugar para evitar interferencias.

La eliminación de la materia orgánica elimina el peligro del ácido perclórico, sin embargo, debe recordarse que si se evapora a sequedad hay peligro de explosión por formación de ácido perclórico anhidro.

7.9 Actividad inhibidora de tripsina

Reactivos. Solución amortiguadora tris (0.05M, pH 8.2) CaCl_2 (0.02M).

1. Disolver 6.0 g de tris (hidroximetilamino metano) y 2.94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 900 ml de agua. Ajustar al pH a 8.2 y aforar a 1 litro con agua
2. Disolver 40 mg de clorhidrato de Na- benzoil D.L arginina-p-nitroamilida (BAPNA) en 1 ml de dimetil sulfóxido y diluir a 100 ml con el amortiguador de tris precalentado a 37°C . La solución de BAPNA debe prepararse diariamente.

3. Disolver 4 mg de tripsina cristalizada, libre de sales), en 200 ml de HCL 0.001M. Esta solución puede guardarse en refrigeración, hasta por 3 semanas.

Procedimiento. Pesar 1 g de muestra molida a través de una criba de 1mm, en un matraz de 120 ml y agregarle 50 ml de NaOH 0.001N y reposar durante 3 horas. Comprobar que el pH de la suspensión está entre 8.4 y 10.0 (si es inferior usar NaOH). Diluir esta suspensión a un punto tal que 1 ml produzca una inhibición de tripsina del 40 al 60 %, generalmente esto se logra diluyendo 1 ml de la suspensión a 50 o 60 ml con la misma solución de NaOH.

Prepara dos series de tubos, tomando con pipeta 0.0, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8 y 2.0 ml de la suspensión diluida de la muestra; agregar agua suficiente para obtener 2 ml y mezclar bien. Adicionar mezclando bien 2ml de la solución de tripsina a cada tubo, excepto al tubo que contiene los 2.0ml de la suspensión de la muestra. Colocar los tubos en baño maría a 37°C y agregar 5ml de la solución de BAPNA precalentada a 37°C a cada tubo, mezclar bien, para la reacción a los 10 minutos exactamente adicionando 1ml de ácido acético al 30%, mezclar bien. Agregar al tubo 2.0, 2 ml de tripsina y mezclar. Filtrar el contenido de cada tubo a través de papel filtro de alta retención (Whatmann No. 3) y medir la densidad óptica a 410 nm.

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

- 1000 g peso de la muestra.
- Se suspende en 50 ml de NaOH y 1 ml de esta solución se diluyó a 50 ml con NaOH 0.01 N.

Tabla 20. Actividad inhibidora de tripsina

Tubo	D.O.	Muestra (mg)	UIT/mg
0	0.530		
0.6	0.450	0.24	33.0*
1.0	0.365	0.40	41.2
1.4	0.310	0.56	39.2
1.8	0.255	0.72	38.2

$$\frac{\text{D.O. tubo 0} - \text{D.O. tubo 0.6}}{0.01} = \text{UIT en la alícuota tomada}$$

$$\frac{\text{UIT en la alícuota tomada}}{\text{muestra en la alícuota}} = \text{UIT/mg}$$

$$\frac{0.530 - 0.450}{0.01} = 8 \quad \begin{array}{l} 8 \text{ ----- } 0.24 \\ x \text{ ----- } 1.0 \end{array} \quad X = 33.33$$

*Esta dilución con frecuencia se desvía

7.10 Saponinas

Las saponinas se pueden definir como compuestos no volátiles, ampliamente distribuidos en los vegetales. Las saponinas comprenden un gran grupo de compuestos estructuralmente relacionados que contienen un esteroide o triterpenoide aglicona unido a uno o más oligosacáridos por enlaces glicosídicos.

Las saponinas están presentes en diferentes familias vegetales, como Amaryllidaceae, Agavaceae, Dioscoreaceae, Liliaceae, solanáceas, Scrophulariaceae, leguminosas y Rhamnaceae. Su contenido depende de factores como la variedad, la edad, la ubicación geográfica y el estado fisiológico de la planta. Poseen factores dietéticos altamente tóxicos para los animales de sangre fría, debido a su propiedad hemolítica y reducir la utilización de nutrientes y la conversión en rumiantes; en monogástricos, actúa como inhibidor del crecimiento ya que reduce la ingesta de alimento debido al sabor amargo y la actividad irritante de la garganta. Afecta la digestibilidad de proteínas porque inhiben enzimas digestivas como la tripsina y quimotripsina.

Determinación cualitativa y cuantitativa de saponinas

Prueba de espuma. La propiedad de formación de jabón de las saponinas se puede utilizar como un marcador para detectar la presencia de saponinas. Aproximadamente 2 g de muestra molida se hierve en 20 ml de agua destilada en un baño de agua. La filtración se hace utilizando papel de filtro; tras un proceso de ebullición. 5 ml de agua destilada se añaden a 10 ml de filtrado. La mezcla se agita vigorosamente para la formación de una espuma y persistente. 3 gotas de aceite de oliva se añaden a la espuma y se continúa con la agitación vigorosa. La formación de emulsión indica un resultado positivo.

Prueba de saponificación. La presencia de las saponinas se puede detectar cualitativamente por la formación de espuma tipo panal de abeja con una altura de más de 2 cm. 1 g de muestra molida se pesó en un matraz cónico en el que se añadió y se hierve durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo 10 ml de agua destilada estéril. La mezcla se filtró usando un papel de filtro. 2,5 ml de filtrado se añadió a 10 ml de agua destilada estéril en un tubo de ensayo. El tubo se detuvo y se agitó vigorosamente durante aproximadamente 30 segundos. Unas gotas de solución de carbonato de sodio al 5% se pueden añadir para basificar el extracto si este tiene poca formación de espuma. Después los tubos se dejaron en reposo durante media hora. Se observó la formación de espuma tipo panal de abeja.

Preparación de extracto de saponinas. Las muestras previamente se desgrasan. Diez g de muestra finamente molida se empapan con n-hexano en una proporción de 1: 5. La suspensión se agita durante 45 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se deja durante la noche a temperatura ambiente y se filtra a través de papel de filtro moderadamente retentivo. El residuo restante se desgrasada de nuevo después de la filtración. Las muestras desgrasadas se secan durante la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se secan las muestras desgrasadas a 40 °C durante 1 hora para eliminar el residuo de n-hexano.

10 g de muestra desgrasada fue tomada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadió metanol acuoso (50%, 100 ml). La suspensión se agita en un agitador magnético durante toda la noche a temperatura ambiente. Los contenidos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos y se recoge el sobrenadante. La extracción con el mismo disolvente se repite por agitación

en un agitador magnético durante la noche. El primer sobrenadante se combina con el segundo después de la centrifugación. La filtración se hace en papel de filtro.

El metanol se evapora de la solución a aproximadamente 42°C. La fase acuosa se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos para eliminar los materiales insolubles. La fase acuosa se transfiere a un embudo de separación y un volumen igual de cloroformo (tres veces) para eliminar pigmentos. Las saponinas concentradas se extraen en la solución acuosa con un volumen igual de n-butanol (dos veces). La n-butanol disolvente se evaporó a una temperatura no superior a 45°C. La fracción seca que contiene saponina se disuelve en 5 - 10 ml de agua destilada y la solución se transfiere a un vial separado y se liofiliza. Se calcula el porcentaje de recuperación de saponinas.

Determinación de saponinas totales. Para preparar la curva estándar se coloca en tubos de ensayo de 100, 125, 150, 175, 200, 225 y 250 μl de la solución estándar de saponina y los volúmenes se ajustan con metanol acuoso (80%, 0,25 ml). La Solución estándar de saponina se prepara por disolución de 10 mg de diosgenina en mezcla de metanol (16 ml) y agua destilada (4 ml). Para las alícuotas de cada tubo, se añade reactivo de vainillina (8%, 0,25 ml) y se añade lentamente por la pared ácido sulfúrico (72% v/v, 2,5 ml). Las soluciones se mezclan bien y los tubos se transfieren a un baño de agua 60 °C. Después de 10 minutos de incubación, los tubos se enfrían en un baño de agua helada durante 3 - 4 minutos. La absorbancia se mide a 544 nm frente al blanco de reactivo. 0,1 g de la muestra seca se disuelve en metanol acuoso (80%, 0,1 ml). Se toma 0,25 ml de alícuota para la determinación espectrofotométrica de saponinas totales a 544 nm.

Determinación de saponinas esteroidales totales. Para preparar la curva estándar, 0, 20, 40, 60, 80 y 100 μl de la solución patrón de diosgenina (0,1 mg /ml), se colocan en tubos de ensayo y se lleva el volumen hasta 2 ml con acetato de etilo. La solución estándar de diosgenina se prepara al disolver 10 mg de diosgenina en acetato de etilo (99,5%, 100 ml). Se añade 1 ml de reactivo A y 1 ml de reactivo B. El reactivo A se prepara mezclando anisaldehído (0,5 ml) y acetato de etilo (99,5%, 99,5 ml); EL reactivo B es la mezcla de ácido sulfúrico concentrado (95-98% w/w, 50 ml) y acetato de etilo (99,5%, 50 ml). Después de agitar, los tubos de ensayo se colocan a temperatura ambiente durante 30 minutos. La absorbancia se mide a 430 nm frente al blanco de reactivo.

Para la determinación de la muestra, una cantidad conocida de saponina cruda liofilizada se disuelve en metanol acuoso (80%, 1 ml). Para la evaluación se colocan alícuotas que contengan 0 - 40 μ g de sapogenina en tubos de ensayo. Los tubos se colocan en un baño de agua hirviendo para eliminar el alcohol. Después de enfriar, se añade acetato de etilo (99,5%, 2 ml) a los tubos de ensayo y la determinación espectrofotométrica se realiza a 430 nm frente al blanco de reactivo.

7.11 Alcaloides

Los alcaloides se pueden clasificar en cinco grupos principales: alcaloides verdaderos, protoalcaloides, pseudoalcaloides, alcaloides de poliaminas y de péptidos y alcaloides ciclopéptidos, de amplia distribución en el reino vegetal, en el cual se han identificado más de 21.000 alcaloides. Sin embargo, la principal fuente de alcaloides está en aquellas plantas con flores o angiospermas.

Los alcaloides son considerados como metabolitos secundarios que juegan un papel importante en las interacciones entre planta y los animales, pues actúan como atrayente para promover la polinización de las plantas o alcaloides como brucina, estricnina, quinina y poseen un sabor amargo que evita su consumo por los herbívoros. Una alta ingestión de alcaloides produce efectos tóxicos, especialmente en actividades fisiológicas y neurológicas, aunque, en dosis bajas pueden mediar importantes actividades farmacológicas, tales como analgésico, la reducción de la presión arterial, la eliminación de células tumorales, estimulación de la circulación y la respiración.

Determinación. Para la evaluación cuantitativa de los alcaloides mediante ensayos gravimétricos, se requiere de ácido acético y solución de hidróxido de amonio. Para la evaluación cualitativa por cromatografía en capa fina, se requiere ácido acético, etanol 95%, n-butanol, hidróxido de amonio, cloroformo, cloruro de platino, ácido clorhídrico, metanol y yoduro de potasio.

Evaluación cualitativa de los alcaloides mediante prueba gravimétrica. Se pesa 5 g de muestra molida y se colocan en 50 ml de ácido acético

al 10% en metanol. La suspensión se agita en incubadora a 120 rpm y 30 °C. Se deja en reposo durante 4 horas antes de la filtración. Se filtra usando papel de filtro; el filtrado se evapora hasta $\frac{1}{4}$ de su volumen original usando placa de cocción. Se añade gota a gota hidróxido de amonio concentrado (30%) para precipitar los alcaloides del filtrado. Un papel de filtro previamente pesado se utiliza para filtrar el precipitado y luego se lava con solución de hidróxido de amonio (1%). El papel de filtro con los alcaloides precipitados se seca a 60 °C en horno durante 30 minutos. El papel de filtro se transfiere desde el horno a desecador para enfriamiento. El papel de filtro con alcaloides se seca y se vuelve a pesar hasta obtener un peso constante. El contenido de alcaloides se determina por la diferencia de peso en el papel de filtro y se expresa en porcentaje.

Identificación de alcaloides por cromatografía en capa fina. 8 g de muestra extraída en ácido acético (10%, 40 ml) en metanol. La mezcla se debe mantener durante 4 horas en condiciones de oscuridad en incubadora de agitación a 120 rpm y a temperatura ambiente; el contenido se centrifuga a 7000 rpm durante 50 minutos. El extracto se concentra a un cuarto del volumen original usando un evaporador rotatorio. Los alcaloides se precipitaron mediante la adición gota a gota de hidróxido de amonio concentrado (30%). El precipitado se recoge por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos y se lava con solución de hidróxido de amonio (1%). Debido a no formación de precipitado, los alcaloides se extraen tres veces con cloroformo, 40 ml de cada vez. El volumen de extracto alcaloide se reduce mediante el uso de un evaporador rotatorio a 35 °C a alrededor de 2 a 4 ml.

Una alícuota del extracto (de 5 - 10 μ l) se aplica sobre las placas de sílicagel. La placa se coloca en el tanque con una mezcla de disolventes de hidróxido de amonio en metanol/concentrado. El tanque se equilibra durante al menos 1 hora con el disolvente de desarrollo antes de insertar la placa de TLC. La presencia de alcaloides en la placa se detecta mediante la observación de la fluorescencia bajo luz ultravioleta. La posición de la mancha se marca y el valor del Factor Retención, R_f se calcula de la siguiente manera:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el centro de la zona}}{\text{Distancia recorrida por el frente desarrollador}}$$

Bibliografía

- Abreu, A., Carulla, J. E., Kreuzer, M., Lascano, C. E., Díaz, T. E., Cano, A., & Hess, H. D. (2016). Efecto del fruto, del pericarpio y del extracto semipurificado de saponinas de *Sapindus saponaria* sobre la fermentación ruminal y la metanogénesis in vitro en un sistema RUSITEC. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 16(2), 147-154.
- Acamovic, T., & Brooker, J. D. (2005). Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(03), 403-412.
- Adeniji, S.A., Orjiekwe, C.L., & Ehiagbonare, J.E. (2008). Determination of alkaloids and oxalates in selected food samples in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 8(1), 110 - 112.
- Adeniyi, S. A., Orjiekwe, C. L., & Ehiagbonare, J. E. (2009). Determination of alkaloids and oxalates in some selected food samples in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 8 (1).
- Akhter, S., Owen, E., Fall, A., O'Donovan, F., & Theodorou, M. K. (1994). Use of fresh or frozen cow faeces instead of sheep rumen liquor to provide microorganisms for in vitro digestibility assays of forages. *Anim. Prod*, 58(3), 452.
- Altaf, U.R., Mauricio, R., Mould, F.L., Smith, T., Owen, E., Phipps, R.H. and Theodorou, M.K. (1998) Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as sources of microorganisms for the *in-vitro* gas production technique for assessing silages of maize and maize plant fractions. In: *Proceedings of the British Society for Animal Sciences*. British
- Anchía, I. A., & Hernández, J. A. M. (Eds.). (2003). *Alimentos: composición y propiedades*. McGraw-Hill Interamericana.
- Aniszewski, T. (2015). *Alkaloids: Chemistry, Biology, Ecology, and Applications*. Elsevier.

- Aniszewski, T. (2015). *Alkaloids: Chemistry, Biology, Ecology, and Applications*. Elsevier.
- Anklam, E., Burke, A., & Isengard, H. D. (2001). Water determination in food—a challenge for the analysts. A selection of papers from the 1st international workshop, Ispra, Italy, 6–7 April 2000. *Food Control*, 12(7), 393-498.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (1990). Official methods of analysis. *Assoc Anal Chem*.
- AOAC International (2007) Official methods of analysis, 18th edn, 2005; Current through revision 2, 2007 (On-line). AOAC International, Gaithersburg, MD
- Araújo, J. (2004). Química de alimentos: teoria e prática. In *Química de alimentos: teoria e prática*. UFV.
- Araújo, S., Deminicis, B., & Oliveira, V. (2008). Sistema CNCPS para avaliação da qualidade de forrageiras tropicais. *PUBVET*, 2(10).
- Astiasarán, I. (2003). *Alimentos y nutrición en la práctica sanitaria*. Ediciones Díaz de Santos.
- Aurand, L. W. (Ed.). (2013). *Food composition and analysis*. Springer Science & Business Media.
- Barnes, R. F., & Baylor, J. E. (1995). Forages in a changing world. *Forages*, 1, 3-13.
- Barnes, R. F., Miller, D. A., & Nelson, C. J. (1995). Forages. Volume I: An introduction to grassland agriculture. *Publisher: Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA*, 205-473.
- Be Miller JN (2010) Carbohydrate analysis. Ch. 10. In: Nielsen SS (ed) *Food Analysis*, 4th edn. Springer, New York.
- Bello Gutierrez, J. (2000) *Ciencia bromatológica. Principios generales de los alimentos*. Ed. Díaz de Santos. Madrid.
- Belmar, R. (2001). Importancia de los factores antinutricionales en la alimentación de animales no rumiantes. In *congreso de veterinaria.(10: 2001: trujillo) Memorias del X congreso de veterinaria. yucatán. universidad autónoma de yucatán. Facultad de Medicina veterinaria Zootecnia* (pp. 34-54).
- Berchielli, T. T., Garcia, A. D. V., Oliveira, S. D., Berchielli, T. T., Pirez, A., & Oliveira, S. G. (2006). Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudo de nutrição. *Nutrição de ruminantes. Jaboticabal: FUNEP*.

- Blu, M., & Ørskov, E. R. (1993). Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 40(2), 109-119.
- Blummel, M. and Ørskov, E.R. (1993) Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology* 40, 109–119.
- Bognár, A., & Piekarski, J. (2000). Guidelines for recipe information and calculation of nutrient composition of prepared foods (dishes). *Journal of food composition and analysis*, 13(4), 391-410.
- Borba, A. E. S. D., & Ribeiro, J. R. (1996). A comparison of alternative sources of inocula in an in vitro digestibility technique. In *Annales de zootechnie* (Vol. 45, No. 1), pp. 89-95). Elsevier/INRA.
- Bradley Jr, R. L. (2010). Moisture and total solids analysis. In *Food analysis* (pp. 85-104). Springer US.
- Broderick, G. A., & Albrecht, K. A. (1997). Ruminant in vitro degradation of protein in tannin-free and tannin-containing forage legume species. *Crop Science*, 37(6), 1884-1891.
- Brum, A. A. S. *Métodos de extração e qualidade da fração lipídica* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Büning-Pfaue, H. (2003). Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 82(1), 107-115.
- Buwembo, F. (1996) *In vitro* digestibility and gas production of selected carbohydrates and forages when incubated in faeces liquor. MSc thesis, University College of North Wales, Bangor.
- Buwembo, F. (1996). *In vitro digestibility and gas production of selected carbohydrates and forages when incubated in faeces liquor* (Doctoral dissertation, MSc thesis, University College of North Wales, Bangor).
- Caldas, G. V., & Blair, M. (2004). Cuantificación de taninos condensados e identificación de QTLs asociados a su acumulación en fríjol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Taninos en la Nutrición de Rumiantes en Colombia*, 43.
- Calsamiglia, S., Castillejos, L., Busquet, M., & i dels Aliments, D. C. A. (2005). Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno lechero. *XXI Curso De Especialización, FEDNA; España*, 161-185.

- CAMPESTRINI, E. (2005). Utilização de Equipamento NIRS (Near Infrared Reflectance Spectroscopy) nos Estudos de Valores Nutricionais (Composição Química e Digestibilidade) de Alimentos Para não Ruminantes. *Revista Eletrônica Nutritime*, 2(5), 240-251.
- Campos, F. P. D., Sampaio, A. A. M., Vieira, P. D. F., & Bose, M. L. V. (2001). Digestibilidade in vitro/gás de volumosos exclusivos ou combinados avaliados pelo resíduo remanescente da digestão da matéria seca e produção de gás. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(5), 1579-1589.
- Cappelle, E. R., Valadares Filho, S. D. C., Silva, J. D., & Cecon, P. R. (2001). Estimativas do valor energético a partir de características químicas e bromatológicas dos alimentos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(6), 1837-1856.
- Cappelle, E. R., Valadares Filho, S. D. C., Silva, J. D., & Cecon, P. R. (2001). Estimativas do valor energético a partir de características químicas e bromatológicas dos alimentos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(6), 1837-1856.
- Carpenter, C. (2010). Determination of fat content. In *Food analysis laboratory manual* (pp. 29-37). Springer US.
- Carpenter, C. (2010). Determination of fat content. In *Food analysis laboratory manual* (pp. 29-37). Springer US.
- Carvalho, F. A. N., Barbosa, F. A., & McDowell, L. R. (2005). Nutrição de bovinos a pasto. 2ª edição. *Belo Horizonte. Editora Papel from*.
- Casali, A. O., Detmann, E., Valadares Filho, S. C., Pereira, J. C., Cunha, M., Detmann, K. D. S. C., & Paulino, M. F. (2009). Estimativa de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(1), 130-138.
- Castellanos, R. A., Llamas, L. G., & Shimada, A. (1990). Manual de técnicas de investigación en rumiología. *México: Sistema de Educación Continua en Producción Animal en México*.
- Chang SKC (2010) Protein analysis. Ch. 9. In: Nielsen SS (ed) Food analysis, 4th edn. Springer, New York.
- Chaplin, M. F., & Kennedy, J. F. (1994). *Carbohydrate analysis: a practical approach* (No. Ed. 2). IRL Press Ltd.
- Cheeke, P. R. (1995). Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. *Journal of Animal Science*, 73(3), 909-918.

- Cheeke, P.R. (1998) *Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants*. Interstate, Danville, Illinois, 479 pp.
- Cheng, K. J., Forsberg, C. W., Minato, H., & Costerton, J. W. (1991). Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*, 595-624.
- Christie, W. W. (2003). Lipid analysis. Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids. Bridgewater.
- Coultate, T. P., Carmen, T., Justino, T., Casado, P., Ott, D. B., Solans, C., & Garcilazo, J. (1998). *Manual de química y bioquímica de los alimentos*. Acricbia.
- Cozzolino, D. (2002). Uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis de alimentos para animales. *Agrociencia*, 6(2), 25-32.
- Crespo, R. J., & Castaño, J. A. (2003). Determinación de materia seca con el horno microondas en especies forrajeras puras [Comunicación]. In *Congreso Argentino de Producción Animal. 26. 2003 10 22-24, 22-24 de octubre de 2003. Mendoza. AR*.
- Crespo, R. J., Castaño, J. A., & Capurro, J. A. (2007). Secado de Forraje con el horno microondas: efecto sobre el análisis de calidad. *Agricultura Técnica*, 67(2), 210-218.
- Cunnif, P. (ed) (1995) Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th edition, USA
- Dabrowski, W. M., & Sikorski, Z. E. (Eds.). (2004). *Toxins in food*. CRC Press.
- De Ramus, H. A., Clement, T. C., Giampola, D. D., & Dickison, P. C. (2003). Methane emissions of beef cattle on forages. *Journal of Environmental Quality*, 32(1), 269-277.
- de SOUZA, G. B., Nogueira, A. D. A., Sumi, L. M., & Batista, L. A. R. (1999). Método alternativo para a determinação de fibra em detergente neutro e detergente ácido. *Embrapa Pecuária Sudeste. Boletim de pesquisa*.
- Detmann, E., Paulino, M. F., Zervoudakis, J. T., Valadares Filho, S. D. C., Euclides, R. F., Lana, R. D. P., & Queiroz, D. D. (2001). Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(5), 1600-1609.
- Digestibility of forages by *in vitro* digestion of cell walls. Proc. 10 th Int. Grassland Congress. Helsinki. P 438-441

- Dini, I., Tenore, G. C., & Dini, A. (2009). Saponins in Ipomoeabatatas tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties. *Food Chemistry*, 113(2), 411-419.
- D'Mello, J. F. (1997). *Handbook of plant and fungal toxicants*. CRC Press, Boca Raton, 356 pp
- D'Mello, J. F. (Ed.). (2000). *Farm animal metabolism and nutrition*. Cabi.
- Dongmeza, E., Steinbronn, S., Francis, G., Focken, U., & Becker, K. (2009). Investigations on the nutrient and antinutrient content of typical plants used as fish feed in small scale aquaculture in the mountainous regions of Northern Vietnam. *Animal Feed Science and Technology*, 149(1), 162-178.
- Dowman, L. M. G. (1993). Modifications to the neutral detergent cellulase digestibility method for the prediction of the metabolisable energy of compound feedstuffs containing palm kernel meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61(3), 327-331.
- Dowman, L. M. G. (1993). Modifications to the neutral detergent cellulase digestibility method for the prediction of the metabolisable energy of compound feedstuffs containing palm kernel meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61(3), 327-331.
- Eitenmiller, R. R., & Lee, J. (2004). *Vitamin E: food chemistry, composition, and analysis*. CRC Press.
- Elizalde, A. D. D., Pismag Portilla, Y. A. M. I. D., & Chaparro, D. C. (2009). ANTINUTRITIONAL FACTORS IN EATABLE SEEDS. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 7(1), 45-54.
- Englyst, H. N., & Cummings, J. H. (1987). Improved method for measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 71(4), 808-814.
- Espinosa Martos, I., & Rupérez Antón, P. (2006). Soybean oligosaccharides. Potential as new ingredients in functional food.
- Evans, E. M., & Potter, J. F. (1984). The reproducibility of in vivo estimates of digestibility and voluntary digestible organic matter intake of grass varieties by sheep. *Grass and Forage Science*, 39(2), 101-106.
- Exler, J., Lemar, L., & Smith, J. (1996, March). Fat and fatty acid content of selected foods containing trans-fatty acids. In *FASEB JOURNAL* (Vol. 10, No. 3, pp. 4587-4587). 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998: FEDERATION AMER SOC EXP BIOL.

- Ezequiel, J., & Galati, R. (2007). Técnicas in vitro e in situ para estimativa da digestibilidade ruminal de alimentos. *SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM AVANÇOS EM TÉCNICAS DE PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE RUMINANTES, Pirassununga. Anais... Pirassununga*, 16-71.
- Faza, A. M. (1991). *A study of factors affecting the efficiency and accuracy of a method for the in vitro estimation of digestibility of fibrous forages* (Doctoral dissertation, MSc thesis, University College of Wales, Bangor, UK).
- Federation, W. E., & American Public Health Association. (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA*.
- Felix, J.P., & Mello, D. (2000). *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. United Kingdom: CABI.
- Fennema, O. W. E. N. (2000). Química de los alimentos. *Acribia. Zaragoza, España*, 433-469.
- Ferreira, G., & Mertens, D. R. (2007). Measuring detergent fibre and insoluble protein in corn silage using crucibles or filter bags. *Animal Feed Science and Technology*, 133(3), 335-340.
- Follett, R. F., & Wilkinson, S. R. (1995). Nutrient management of forages. *Forages*, 2, 55-82.
- Fondevila, M., Castrillo, C., Gasa, J., & Guada, J. A. (1995). Rumen-undegradable dry matter and neutral detergent fibre as ratio indicators of digestibility in sheep given cereal straw-based diets. *The Journal of Agricultural Science*, 125(01), 145-151.
- Food Standard Agency. (2014). *McCance and Widdowson's the composition of foods*. Royal Society of Chemistry.
- Foods, L. (2002). Tabla de composición de alimentos de América Latina. *Washington, DC: FAO*.
- Francis, G., Makkar, H. P., & Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199(3), 197-227.
- FUKUSHIMA, R. (2007). Otimização de método analítico para a determinação do teor de lignina. *AVANÇOS EM TÉCNICAS DE PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE RUMINANTES*, 254-279.

- Gebhardt, S. E., Lemar, L. E., Cutrufelli, R. L., Haytowitz, D. B., Howe, J. C., Pehrsson, P. R., ... & Showell, B. A. (2005). USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release No. 18. *Washington, DC: US Department of Agriculture*.
- Givens, D. I., Cottyn, B. G., Dewey, P. J. S., & Steg, A. (1995). A comparison of the neutral detergent-cellulase method with other laboratory methods for predicting the digestibility in vivo of maize silages from three European countries. *Animal Feed Science and Technology*, 54(1), 55-64.
- Goering, H. K., & Van Soest, P. J. (1970). Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). *USDA Agr Handb*.
- Gonçalves, L. M. B. O., & Borba, A. E. S. (1996). Study of gas production capacity by three sources of inocula. *The Journal of Agricultural Science*, 127(04), 511-515.
- Gonçalves, L. M. B. O., & Borba, A. E. S. (1996). Study of gas production capacity by three sources of inocula. *The Journal of Agricultural Science*, 127(04), 511-515.
- Gondim, J. A. M., Moura, M. F. V., Dantas, A. S., Medeiros, R. L. S., & Santos, K. M. (2005). Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 825-827.
- Greenfield, H., & Southgate, D. A. (2003). *Food composition data: production, management, and use*. Food & Agriculture Org. (pagina principal disponible en ingles en <http://www.crop.cri.nz/home/index.jsp>)
- Greenfield, H., & Southgate, D. A. T. (2006). Datos de composición de alimentos. *Obtención, gestión y utilización*. *Burlingame BA, Charrondiere UR, editores. FAO, INFOODS, Roma*.
- Gurr, M. I., Harwood, J. L., & Frayn, K. N. (2002). *Lipid biochemistry* (Vol. 409). Oxford: Blackwell Science.
- Hall, M. B. (2000). *Neutral Detergent Soluble Carbohydrates Nutritional Relevance and Analysis: A Laboratory Manual*. University of Florida.
- Hall, M. B., Hoover, W. H., Jennings, J. P., & Webster, T. K. M. (1999). A method for partitioning neutral detergent-soluble carbohydrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(15), 2079-2086.
- Hall, M. B., Lewis, B. A., Van Soest, P. J., & Chase, L. E. (1997). A Simple Method for Estimation of Neutral Detergent-Soluble Fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(4), 441-449.
- Harborne, J. B. (1973). Phenolic compounds. In *Phytochemical methods* (pp. 33-88). Springer Netherlands.

- Harborne, A. J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer Science & Business Media.
- Harris, D. M., Barlet, A., & Chamberlain, A. T. (1995). The use of dairy cow faeces rather than rumen liquor in the gas pressure transducer technique for assessing digestion kinetics in vitro. *Anim. Sci*, 60, 541.
- Haytowitz, D. B., Pehrsson, P. R., & Holden, J. M. (2002). The identification of key foods for food composition research. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(2), 183-194.
- Heng, L., Vincken, J. P., van Koningsveld, G., Legger, A., Gruppen, H., van Boekel, T., ... & Voragen, F. (2006). Bitterness of saponins and their content in dry peas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(8), 1225-1231.
- Holden, J. M., Eldridge, A. L., Beecher, G. R., Buzzard, I. M., Bhagwat, S., Davis, C. S., ... & Schakel, S. (1999). Carotenoid content of US foods: an update of the database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12(3), 169-196.
- Holden, J. M., Bhagwat, S. A., & Patterson, K. Y. (2002). Development of a multi-nutrient data quality evaluation system. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(4), 339-348.
- Holt, N. W. (1993). Calibration curves for the determination of low levels of chromium in feces. *Canadian Journal of Animal Science*, 73(1), 109-115.
- Horwitz, W. (2000). *Official methods of analysis of the AOAC International* (Vol. 18). The Association.
- Horwitz, W. (Ed) 2005. *Official methods of Analysis of AOAC International*, 18th
- Hostettmann, K. & Marston, A. (2005). *Saponins. Chemistry and pharmacology of natural products*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Huhtanen, P., & Kukkonen, U. (1995). Comparison of methods, markers, sampling sites and models for estimating digesta passage kinetics in cattle fed at two levels of intake. *Animal Feed Science and Technology*, 52(1-2), 141-158.
- Huhtanen, P., Kaustell, K., & Jaakkola, S. (1994). The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3), 211-227.
- Huntington, J.A. and Givens, D.I. (1995) The *in situ* technique for studying the rumen degradation of feeds: a review of the procedure. *Nutrition Abstract Reviews Series B* 65, 64-93.

- Huntington, J.A. and Givens, D.I. (1997) Studies on *in situ* degradation of feeds in the rumen 3. The effect of freezing forages before and after rumen incubation. *Animal Feed Science and Technology* 68(1), 131-138.
- Jones, R. J., & Barnes, P. (1996). In vitro digestibility assessment of tropical shrub legumes using rumen fluid or faecal fluid as the inoculum source. *Tropical Grasslands*, 30, 374-377.
- Jumba, I. O., Suttle, N. F., & Hunter, E. A. (1995). Effects of soil origin and mineral composition and herbage species on the mineral composition of forages in the Mount. *Tropical Grasslands*, 29, 40-46.
- Kao, T. H., Huang, S. C., Inbaraj, B. S., & Chen, B. H. (2008). Determination of flavonoids and saponins in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 626(2), 200-211.
- Kennedy, G., & Burlingame, B. (2003). Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. *Food Chemistry*, 80(4), 589-596.
- Khazaal, K., Dentinho, M. T., Ribeiro, J. M., & Ørskov, E. R. (1993). A comparison of gas production during incubation with rumen contents in vitro and nylon bag degradability as predictors of the apparent digestibility in vivo and the voluntary intake of hays. *Animal Science*, 57(01), 105-112.
- Kjeldahl, J. (1883). A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Z. Anal. Chem*, 22(1), 366-382.
- Knudsen, K. E. B. (1997). Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Animal feed science and technology*, 67(4), 319-338.
- Komarek, A. R., Manson, H., & Thiex, N. (1996). Crude fiber determinations using the ANKOM System. *ANKOM Technology Corporation, Publication*, (102).
- Kreuzer, M., & Hindrichsen, I. K. (2006, July). Methane mitigation in ruminants by dietary means: the role of their methane emission from manure. In *International Congress Series* (Vol. 1293, pp. 199-208). Elsevier.
- Kuhnlein, H. V., Chan, H. M., Leggee, D., & Barthelet, V. (2002). Macronutrient, mineral and fatty acid composition of Canadian Arctic traditional food. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(5), 545-566.
- Lana, R. D. P. (2005). Nutrição e alimentação animal (mitos e realidades). *Viçosa: UFV*, 2.ed

- Lees, R., Silveiro, C., Merida, J. C., Diaz, M. E., Gonzalez, M. S., Pedrero, M. S., ... & Stevens, N. A. (1982). *Análisis de los alimentos: métodos analíticos y de control de calidad*. Acribia.
- Licitra, G., Hernandez, T. M., & Van Soest, P. J. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 57(4), 347-358.
- Lin, J.T., & Yang, D.J. (2008). Determination of steroidal saponins in different organs of yam (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). *Food Chemistry*, 108 (2008), 1068 - 1074
- Llamas, L. G., & Tejada, H. I. (1990). Técnicas de laboratorio para el análisis de forrajes para rumiantes. *Manual de Técnicas de Investigación en Ruminología. Sistema de Educación Continua en Producción Animal en México, AC Castellanos, RA, Llamas, LG y Shimada, AS (eds). México, DF, 29-42.*
- Lopez, S., Hovell, F. D., Manyuchi, B., & Smart, R. I. (1995). Comparison of sample preparation methods for the determination of the rumen degradation characteristics of fresh and ensiled forages by the nylon bag technique. *Animal Science*, 60(03), 439-450.
- Luginbuhl, J. M., Pond, K. R., Burns, J. C., & Fisher, D. S. (1994). Evaluation of the Captec controlled-release chromic oxide capsule for fecal output determination in sheep. *Journal of animal science*, 72(5), 1375-1380.
- Machmüller, A., & Clark, H. (2006, July). First results of a meta-analysis of the methane emission data of New Zealand ruminants. In *International congress series* (Vol. 1293, pp. 54-57). Elsevier.
- Madrid, E. (1998). Federación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA), 1996: 95-105. Bellisle F, Diplock AT, Hornstra G. Functional food science in Europe. *J Nutr*, 80.
- Madsen, J. M., Hvelplund, T., Weisbjerg, M. R., Bertilson, J., Olsson, I., Spöndly, R., ... & Huhtanen, P. (1995). The AAT/PBV protein evaluation system for ruminants. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences, Supplement*.
- Mahler, F., Schlecht, E., Sangare, M., & Becker, K. (1997). Granulated polyamide as external marker to estimate total faecal excretion of grazing cattle in extensive management systems. *British Journal of Nutrition*, 78(05), 785-803.
- Makkar, H. P. (2003). *Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual*. Springer Science & Business Media.

- Makkar, H. P., Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). *Plant secondary metabolites*. Humana Press.
- Matissek, R., Steiner, G., & Schnepel, F. M. (1998). *Análisis de los alimentos: fundamentos, métodos, aplicaciones*. Acribia.
- Mauricio, R. M., Goncalves, L. C., Resende, A. C., & Rodriguez, N. M. (1996). Apparent digestibility using total fecal collection, chromic oxide and lignin as markers in equids. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 48(6), 703-711.
- Mazza, G. (1998). *Alimentos funcionales: Aspectos bioquímicos y de procesado*. Acribia.
- Mc Allister, T. A., Bae, H. D., Jones, G. A., & Cheng, K. J. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of animal science*, 72(11), 3004-3018.
- McCleary, B. V., Gibson, C. C., & Mugford, C. C. (1997). Measurements of total starch in cereal products by amyloglucosidase ct-amylase method. Collaborative study. *J. AOAC Int*, 80, 571-579.
- McCleary, B. V., McNally, M., & Rossiter, P. (2002). Measurement of resistant starch by enzymatic digestion in starch and selected plant materials: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 85(5), 1103-1111.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., & Morgan, C. A. (1995). *Animal Nutrition*, 5th edn, (Harlow, Longman Scientific and Technical).
- McDowell, L. R., Conrad, J. H., Ellis, G. L., & Loosli, J. K. (1997). *Minerals for grazing ruminants in tropical regions*. (University of Florida, Gainesville).
- McDowell, L. R., & Arthington, J. D. (2005). *Minerals for grazing ruminants in tropical regions*. (Ed. 4).
- Meadow, C. T., Cochrane, P., Lanaud, C., Sounigo, O., Kennedy, A. J., Elliott, H., ... & Pray, C. (1981). *Basics of online searching* (No. C30 M482). IFARD, The Hague (Países Bajos). ISNAR, The Hague (Países Bajos). EMBRAPA, Brasilia, DF (Brasil).
- Mendoza, E., & Calvo, C. (2010). *Bromatología. Composición y propiedades de los alimentos*. Editorial Mc Graw Hill, México, México, 159.
- Merrill, A. L., & Watt, B. K. (1973). *Agriculture Handbook No. 74. Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture*.
- Mertens, D. R. (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC international*, 85(6), 1217-1240.
- Metzger, L. E. (2010). Nutrition Labeling Using a Computer Program. In *Food Analysis Laboratory Manual* (pp. 1-7). Springer US.

- Miguel, L. P. D. R. (1994). *A study of application of sheep faecal organisms to the estimation of dry matter degradability of forages by ruminants* (Master's thesis, University of Wales(U. C. N. W., Bangor: World Animal Production)).
- Miller, R. O. (1998). Extractable chloride, nitrate, orthophosphate, potassium, and sulfate-sulfur in plant tissue: 2% acetic acid extraction. *Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*, 115-118.
- Min DB, Ellefson WC (2010) Fat analysis. Ch. 8. In: Nielsen SS (ed) *Food analysis*, 4th edn. Springer, US.
- Minson, D. J. (1990). Intake of grazed forage. *Forage in Ruminant Nutrition. Academy Press. San Diego. USA.*
- Miraglia, N., Bergero, D., Bassano, B., Tarantola, M., & Ladetto, G. (1999). Studies of apparent digestibility in horses and the use of internal markers. *Livestock Production Science*, 60(1), 21-25.
- Moreels, E., & Amylum, N. V. (1987). Measurement of the starch content of commercial starches. *Starch-Stärke*, 39(12), 414-416.
- Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., & Martin, M. (2000). Analytical methods for determination of compounds with no nutritive value. In *Handbook on Common Bean Related Laboratory Methods* (p. 11-26). Spain:Galicia.
- National Research Council. 1995. *Building a North American Feed Information System*. Washington, DC: National Academy Press.
- Nielsen, S. S. (Ed.). (1994). *Introduction to the chemical analysis of foods*. Sudbury, MA: Jones and Bartlett.
- Nielsen, S. S. (Ed.). (1998). *Food analysis* (Vol. 86). Gaithersburg, MD: Aspen Publishers.
- Nielsen, S. S. (2007). *Análisis de los alimentos: manual de laboratorio*. Acribia.
- Nielsen, S. S., & Finkenzeller, M. U. (2009). *Análisis de los alimentos*.
- Nielsen, S. S. (Ed.). (2010). *Food analysis* (p. 550). New York: Springer.
- Nielsen SS (2010) Introduction to food analysis, Ch. 1. In: Nielsen SS (ed) *Food analysis*, 4th edn. Springer, New York.
- Nielsen, S. (Ed.). (2012). *Instructor's Manual for Food Analysis: Answers to Study Questions*. Springer.

- Nielsen, S. (Ed.). (2014). *Food analysis*. Springer Science & Business Media.
- Nogueira, A. D. A., Machado, P. L. O. A., Santana Do Carmo, C. D., & Ferreira, J. R. (1998). *Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos*. EMBRAPA-CPPSE.
- Noguera, A. (2005). Souza, GB (Org.). *Manual de Laboratórios: Solo, água, Nutrição vegetal, Nutrição animal e alimentos*. 1ª. ed. São Carlos: Gráfica & Editora Guillen e Andrioli, 1.
- Nollet, L. M., & Toldrá, F. (Eds.). (2012). *Food analysis by HPLC* (Vol. 100). CRC Press.
- Nsahlai, I. V., & Umunna, N. N. (1996). Comparison between reconstituted sheep faeces and rumen fluid inocula and between in vitro and in sacco digestibility methods as predictors of intake and in vivo digestibility. *The Journal of Agricultural Science*, 126(02), 235-248.
- O'donovan, F. (1995). A comparison of faeces sources and buffers in the application of the faecal liquor technique. *M. Sc. Thesis*.
- Ojeda, Á., Matos, A. A., & Cardozo, A. R. (2010). Composición química, degradabilidad y producción de gas in vitro del follaje de doce cultivares de batata (*Ipomoea batatas* Lam).
- Oleszek, W., Price, K. R., Colquhoun, I. J., Jurzysta, M., Ploszynski, M., & Fenwick, G. R. (1990). Isolation and identification of alfalfa (*Medicago sativa* L.) root saponins: their activity in relation to a fungal bioassay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 38(9), 1810-1817.
- Omed, H. M., Faza, A., Axford, R. F. E., Dewi, L. A., & Givens, D. I. (1998). A low tech in vitro procedure using faecal liquor for the estimation of digestibility of forages. *Animal Science*, 59-59.
- Ørskov, E.R. (1992) *Protein Nutrition in Ruminants*, 2nd edn. Academic Press, London and New York.
- Ørskov, E. R. (1994). Recent advances in understanding of microbial transformation in ruminants. *Livestock production science*, 39(1), 53-60.
- Ørskov, E. (2000). Degradability in Ruminants. *Forage evaluation in ruminant nutrition*.
- Osborne, D. R., & Voogt, P. I. (1978). *The analysis of nutrients in foods*. Academic Press Inc.(London) Ltd., 24/28 Oval Road, London NW1 7DX.
- Osborne, B. G., Fearn, T., & Hindle, P. H. (1993). *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis*. Longman scientific and technical.

- Panhwar, F. (2005). Anti-nutritional factors in oil seeds as aflatoxin in ground nut. *Digitalverlag gmbh, Germany*, 1-7.
- Pastorini, L. H., Bacarin, M. A., & Abreu, C. M. (2002). Secagem de material vegetal em forno de microondas para determinação de matéria seca e análises químicas. *Ciência agrotécnica*, 26, 1252-1258.
- Pearson, D. (1976). *Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos*. Acribia.
- Pegg, R. B., Landen Jr, W. O., & Eitenmiller, R. R. (2010). Vitamin analysis. In *Food Analysis* (pp. 179-200). Springer US.
- Pehrsson, P. R., Haytowitz, D. B., Holden, J. M., Perry, C. R., & Beckler, D. G. (2000). USDA's national food and nutrient analysis program: food sampling. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13(4), 379-389.
- Peltekova, V. D., & Broderick, G. A. (1996). In vitro ruminal degradation and synthesis of protein on fractions extracted from alfalfa hay and silage. *Journal of dairy science*, 79(4), 612-619.
- Penfield, M. P., & Campbell, A. M. (1990). *Experimental food science*. Academic press.
- Pereira, J. C., & de Queiroz, A. C. (1997). Apparent digestibility of Elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum) and sugar cane (*Saccharum officinarum*) in different proportions, fed to horses. *Revista Brasileira de Zootecnia (Brazil)*.
- Perez, J. (1997). Sistemas para a estimativa de digestibilidade "in vitro". *Simpósio Internacional de digestibilidade em Ruminantes*. TEIXEIRA, Júlio César Teixeira, ed. Lavras: UFLA-FAEPE, 55-68.
- Petruzzi, H. J., Stritzler, N. P., Ferri, C. M., Pagella, J. H., & Rabotnikof, C. M. (2005). Determinación de materia seca por métodos indirectos: utilización del horno a microondas. *Boletín de divulgación Técnica*, 88, 8-11.
- Pilling, D. (1997). *The study of the effect of diet types and the age of faeces on the quality of faeces liquor for in vitro digestibility* (Doctoral dissertation, MSc thesis, University of Wales, Bangor, UK).
- Pinto, R., Ramírez, L., Vera, J. K., & Ortega, L. (2002). Especies arbóreas y herbáceas forrajeras del sureste de México. *Pastos y Forrajes*, 25(3).
- Pires, F. F., & PRATES, E. (1998). Uso da técnica da espectrofotometria de refletância no infravermelho proximal (NIRS) na predição da composição química da alfafa (*Medicago sativa*, L.). *Rev. Bras. Zootec*, 27, 1076-81.
- Pomeranz, Y. (Ed.). (2013). *Food analysis: theory and practice*. Springer Science & Business Media.

- Posada, S. L., & Noguera, R. R. (2005). Técnica in vitro de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*, 17(4), 12-19.
- Qin, G. W., & Xu, R. S. (1998). Recent advances on bioactive natural products from Chinese medicinal plants. *Medicinal research reviews*, 18(6), 375-382.
- Raffauf, R.F (1996). *Plant Alkaloids: A guide to their discovery and distribution*. New York: Springer.
- Ramakrishna, V., Rani, P. J., & Rao, P. R. (2006). Anti-nutritional factors during germination in Indian bean (*Dolichos lablab* L.) seeds. *World J Dairy Food Sci*, 1(1), 6-11.
- Ranilla, M. J., López, S., Giráldez, F. J., Valdés, C., & Carro, M. D. (1998). Comparative digestibility and digesta flow kinetics in two breeds of sheep. *Animal Science*, 66(02), 389-396.
- Ratliff, T. A. (2005). *The Laboratory Quality Assurance System: A Manual of Quality Procedures and Forms*. John Wiley & Sons.
- Reed, J. D. (1995). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of animal science*, 73(5), 1516-1528.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). *A guide to carotenoid analysis in foods* (p. 65). Washington, DC: ILSI press.
- Rubinson, J. F., Teresa, M., Rubinson, T., Kenneth, A., Lees, R., Allinger, N. L. C., & Calvin, L. (2000). *Química analítica contemporánea*. Prentice-Hall Hispanoamericana.
- Ruggiero, J., Freitas, K., & Rosa, B. (2002). Determinação da matéria seca de forrageiras pelo método do micro-ondas. *REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA*, 40, 109.
- Ryan, J., Estefan, G., & Rashid, A. (2007). *Soil and plant analysis laboratory manual*. ICARDA.
- Rymer, C., Huntington, J. A., Williams, B. A., & Givens, D. I. (2005). In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 9-30.
- Sampaio, C. B., Detmann, E., Valente, T. N. P., Souza, M. A. D., Valadares Filho, S. D. C., & Paulino, M. F. (2011). Evaluation of fecal recovering and long term bias of internal and external markers in a digestion assay with cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(1), 174-182.

- Santos, R. A. D., Teixeira, J. C., Pérez, J. R. O., Paiva, P. C. D. A., Muniz, J. A., & Arcuri, P. B. (2015). Estimativa da degradabilidade ruminal de alimentos utilizando a técnica de produção de gás em bovinos, ovinos e caprinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 27(1), 689-695.
- Sen, S., Makkar, H. P., & Becker, K. (1998). Alfalfa saponins and their implication in animal nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 131-140.
- Senger, C. C., Kozloski, G. V., Sanchez, L. M. B., Mesquita, F. R., Alves, T. P., & Castagnino, D. S. (2008). Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, 146(1), 169-174.
- Shreve, B., Thiex, N., & Wolf, M. (2006). National Forage Testing Association Reference Method: Dry matter by oven drying for 3 hours at 105 C. NFTA Reference Methods. National Forage Testing Association, Omaha, NE.
- Sileshi, Z., Bediye, S., & Owen, E. (1996). Faeces as source of microbial inoculum in vitro digestibility of forages. In *4th National Conference of the Ethiopian Society of Animal Production, Addis Abeba (Ethiopia), 18-19 Apr 1996*. ESAP.
- Silva, D. J. (2006). *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. ufv.
- Silva, D. J., & Queiroz, A. D. (1981). *Análise de alimentos. Métodos químicos e biológicos*, 3, 235.
- Skoog, D. A., West, D. M., & Holler, F. J. (2005). *Fundamentos de química analítica*, 8a edn. Paraninfo S.A., Madrid.
- Smithard, R., McNab, J. M., & Boorman, K. N. (2002). Secondary plant metabolites in poultry nutrition. *Poultry feedstuffs: supply, composition and nutritive value*, 237-278.
- Solangi, A. A. (1997). *Studies in the use of faecal organisms in the in vitro assessment of forages* (Doctoral dissertation, University of Wales Bangor: (Animal Nutrition).
- Sosa, A., Galindo, J., & Bocourt, R. (2007). Metanogénesis ruminal: aspectos generales y manipulación para su control *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, vol. 41, núm. 2, 2007, pp. 105-114 Instituto de Ciencia Animal La Habana, Cuba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 41(2), 105-114.
- Souza, G. B., & Nogueira, A. R. A. (2005). *Manual de laboratório: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos*. São Carlos, *Embrapa Pecuária Sudeste*. 334p.

- Sparg, S.G., Light, M.E., & Staden, J.V. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacol* 94 (2004), 219 – 243
- Sprinkle, J. E., Kress, D. D., Doornbos, D. E., Anderson, D. C., Tess, M. W., Ansotegui, R. P., ... & Roth, N. J. (1995). Chromic oxide contamination of pasture previously used in marker studies. *Journal of Range Management*, 194-197.
- Stensig, T., Weisbjerg, M. R., & Hvelplund, T. (1998). Evaluation of different methods for the determination of digestion and passage rates of fibre in the rumen of dairy cows. *Acta Agriculturae Scandinavica A—Animal Sciences*, 48(3), 141-154.
- Stern, M. D., Bach, A., & Calsamiglia, S. (1997). Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *Journal of Animal Science*, 75(8), 2256-2276.
- Taverniers, I., De Loose, M., & Van Bockstaele, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), 535-552.
- Taylor, B. (1995). *Guide for the Use of the International System of Units (SI): The Metric System*. DIANE Publishing.
- Tejada de Hernandez, I. R. M. A. (1992). *Control de calidad y análisis de alimentos para animales* (No. SF95. T44 1992.).
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal feed science and technology*, 48(3), 185-197.
- Tilley, J. M. A., & Terry, R. A. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass and forage science*, 18(2), 104-111.
- Undersander, D. J., Mertens, D. R., & Thiex, N. J. (1993). Forage analyses procedures.
- Valente, T. N. P., Detmann, E., Valadares Filho, S. C., Queiroz, A. C., Sampaio, C. B., & Gomes, D. I. (2011). Avaliação dos teores de fibra em detergente neutro em forragens, concentrados e fezes bovinas moídas em diferentes tamanhos e em sacos de diferentes tecidos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(5), 1148-1154.
- Van Soest, P. J., Wine, R. H., & Moore, L. A. (1966). Estimation of the true digestibility of forages by the in vitro digestion of cell walls. *Estimation of the true digestibility of forages by the in vitro digestion of cell walls*.
- Van Soest, P. J. (1967). Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. *Journal of animal Science*, 26(1), 119-128.

- Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell University Press.
- Vanzant, E. S., Cochran, R. C., Titgemeyer, E. C., Stafford, S. D., Olson, K. C., Johnson, D. E., & St Jean, G. (1996). In vivo and in situ measurements of forage protein degradation in beef cattle. *Journal of animal science*, 74(11), 2773-2784.
- Vanzant, E.S., Cochran, R.C., Titgemeyer, E.C., Stafford, S.D., Olson, K.C., Johnson, D.E. and St Jean, G. (1996) *In vivo* and *in situ* measurements of forage protein degradation in beef cattle. *Journal of Animal Science* 74, 2773–2784.
- Volden, H., Velle, W., Harstad, O. M., Aulie, A., & Sjaastad, O. V. (1998). Apparent ruminal degradation and rumen escape of lysine, methionine, and threonine administered intraruminally in mixtures to high-yielding cows. *Journal of animal science*, 76(4), 1232-1240.
- Ward RE, Carpenter CE (2010) Traditional methods for mineral analysis. Ch. 12. In: Nielsen SS (ed) *Food analysis*, 4th edn. Springer, New York .
- Ward, R. E., & Carpenter, C. E. (2010). Traditional methods for mineral analysis. In *Food Analysis* (pp. 201-215). Springer US.
- Ward, R. E., & Carpenter, C. E. (2010). Traditional methods for mineral analysis. In *Food Analysis* (pp. 201-215). Springer US.
- Wehr, H. M., Frank, J. F., & American Public Health Association (Eds.). (2004). *Standard methods for the examination of dairy products* (pp. 327-404). Washington, DC: American Public Health Association.
- Weiss, W. P. (1993). Predicting energy values of feeds. *Journal of Dairy Science*, 76(6), 1802-1811.
- Wilhelm, W. W., Arnold, S. L., & Schepers, J. S. (2000). Using a nitrate specific ion electrode to determine stalk nitrate–nitrogen concentration. *Agronomy Journal*, 92(1), 186-189.
- Wilkerson, V. A., Klopfenstein, T. J., & Stroup, W. W. (1995). A collaborative study of in situ forage protein degradation. *Journal of animal science*, 73(2), 583-588.
- Windham, W. R., & Barton, F. E. (1991). Moisture analysis in forage by near-infrared reflectance spectroscopy: Collaborative study of calibration methodology. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists (USA)*.
- Wink, M. (1998). Chemical ecology of alkaloids. In *Alkaloids* (pp. 265-300). Springer US.

- Wood, R., Nilsson, A., & Wallin, H. (1998). *Quality in the food Analysis Laboratory*. Royal society of Chemistry.
- Wood, R., Nilsson, A., & Wallin, H. (1998). *Quality in the food Analysis Laboratory*. Royal society of Chemistry.
- Woods, V. B., Moloney, A. P., Mulligan, F. J., Kenny, M. J., & O'Mara, F. P. (1999). The effect of animal species (cattle or sheep) and level of intake by cattle on in vivo digestibility of concentrate ingredients. *Animal Feed Science and Technology*, 80(2), 135-150.
- Zenebon, O., Pascuet, N. S., & Tiglea, P. (2008). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1020.
- Zeoula, L. M., Martins, A. D. S., Prado, I. D., Alcalde, C. R., Branco, A. F., & Santos, G. D. (1999). Solubilidade e degradabilidade ruminal do amido de diferentes alimentos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 28, 898-905.