

EVALUACION DE LOS ALIMENTOS A TRAVES DE LOS DIFERENTES METODOS DE DIGESTIBILIDAD.

Tobal C. F.

OBJETIVOS

- ANALIZAR DIFERENTES METODOS DE DIGESTIBILIDAD.
- ANALIZAR METODOS DE DIGESTIBILIDAD PARA LA VALORACION DE ALIMENTOS EN RUMIANTES.
- ANALIZAR LAS VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE CADA UNO DE LOS METODOS EMPLEADOS PARA LA VALORACION DE LOS ALIMENTOS.

INTRODUCCION

Historicamente, se ha ido desarrollando métodos tendientes a medir en forma lo más precisa posible el valor nutritivo de los alimentos. En la medida que se ha ido avanzando y se han intensificado las técnicas de alimentación animal, se ha hecho más importante encontrar un método óptimo.

La tecnificación experimentada por la producción animal y en especial los avances obtenidos en nutrición y alimentación animal, requieren de información cada vez más precisa y rápida respecto del valor nutritivo de los alimentos, y dentro de éste, de la digestibilidad (Cerde et al., 1986).

En los centros experimentales dedicados a la investigación en producción animal, es de gran importancia contar con resultados simples, rápidos y exactos para estimar la digestibilidad de los alimentos, o para medir su tasa de degradación (Cerde et al., 1986).

Para considerar que un ser vivo se encuentra libre de enfermedades o debilidades y a su vez alcance su máxima performance productiva y reproductiva es necesario que esté bien nutrido.

Para que un animal esté bien nutrido es necesario suministrar una ración balanceada que aporte la cantidad, calidad y proporción adecuada de todos los principios nutritivos que requiere un animal.

El valor potencial de una ración balanceada que suministra ciertos nutrientes puede ser determinado mediante análisis químico, pero el valor real que tiene para el animal solamente puede ser determinado teniendo en cuenta las pérdidas inevitables que tienen lugar durante la digestión, la absorción y el metabolismo (McDonald 1986)

La evaluación de la digestibilidad supone la determinación de la cantidad de un determinado nutriente que desaparece en el tracto digestivo (Church 1974).

McDonald (1986), define la digestibilidad de un alimento como la proporción del alimento que no es excretado con las heces y que se supone, por lo tanto, que ha sido absorbido.

La digestibilidad es determinada convencionalmente restando de la cantidad consumida de un determinado nutriente la cantidad excretada con las heces.

Como las heces contienen cantidades importantes de materiales de origen no dietético, propios del animal como fluidos digestivos y células descamadas de la mucosa intestinal (Nutrientes Metabólicos Fecales), los coeficientes de digestibilidad determinados de esta manera son aparentes.

Los coeficientes de digestibilidad determinados en muchos estudios sobre nutrición hacen referencia a la fracción de un determinado alimento o dieta que desaparece durante su paso a través del conducto gastrointestinal, suponiendo así que el proceso de absorción interviene también en la determinación del valor nutritivo (Church, 1993).

La capacidad de los alimentos para soportar las funciones de mantenimiento y de producción de los animales es sumamente variable y depende de su capacidad para suministrar energía y nutrientes esenciales a los animales que lo consumen.

Los coeficientes de digestibilidad en sí mismos son expresiones limitadas del valor nutritivo, aunque son procedimientos comunes para valorar los alimentos. Si bien la digestibilidad por sí sola es una expresión muy simplificada del valor nutritivo, los datos que aporta son útiles.

La proporción de una dieta o de un alimento que desaparece durante su paso a través del tracto digestivo, o digestibilidad aparente, suele medirse y emplearse como un indicador del valor nutritivo.

Los valores de la digestibilidad aparente no reflejan la naturaleza de los productos finales de la digestión que son absorbidos ni la cantidad de energía perdida como resultado de los procesos digestivos.

El valor energético de los alimentos no representa la energía realmente disponible en la célula animal, lugar donde será utilizada. Más aún, si se considera que los alimentos no son totalmente absorbidos en el cuerpo animal, existe entonces una parte de la energía del alimento que realmente no entra al cuerpo y se pierde en las heces (IICA, 1992)

Una de las formas más utilizadas para evaluar los alimentos es conociendo su aporte de energía para los procesos que se realizan en el cuerpo; por consiguiente, el valor de energía es un factor común para expresar su valor nutritivo.

Las pérdidas fecales de energía representan la pérdida individual más importante en la utilización de la mayoría de los alimentos y resulta necesario conocer su cuantía para asignar valores energéticos significativos a los distintos alimentos.

RAZONES PARA ESTUDIAR LA DIGESTIBILIDAD

La evaluación de la digestibilidad supone la determinación de, qué cantidad de un determinado nutriente o sustancia alimenticia desaparece del tracto digestivo o dicho de otra forma, que cantidad de material no se degrada ni se absorbe mientras pasa a través del animal.

Este es un aspecto importante en la utilización de los nutrientes, ya que los residuos no digeridos y las excreciones fecales asociadas con la digestión son la única pérdida de

mayor relevancia en la utilización de los alimentos, llegando a ser cercano al 40% (Church, 1974).

Las pruebas de digestión se realizan con varios propósitos:

1. Evaluar la utilización por el animal de un determinado nutriente, o de una ración.
2. Establecer cuantitativamente el aporte de sustancia nutritivas digestibles.
3. Utilización de la digestibilidad en estudios experimentales.

El punto 3 hace referencia al estudio del efecto de los distintos métodos de preparación de los alimentos, del empleo de aditivos, combinaciones óptimas de los ingredientes de una ración, de la edad, de las diferencias entre las distintas especies, etc.

MÉTODOS UTILIZADOS

• METODOS DIRECTOS

1. Métodos “in vivo”

La digestibilidad, o el contenido de energía digestible o metabolizable, se determina generalmente mediante ensayos de balance nutritivo, utilizando animales vivos.

El método in vivo descrito por (Crampton y Lloyd 1959, citados por Cerda 1986) es sin duda, el que da la mejor estimación de la digestibilidad de un alimento.

Este método denominado también, de digestibilidad aparente por colección total de heces fecales es el que mide más exactamente la digestibilidad de un alimento, aunque presenta un leve sesgo respecto de la digestibilidad real debido al material endógeno que se elimina a través de las heces.

En los estudios convencionales acerca de la digestión, los animales se confinan en un box o establo con el fin de facilitar la recolección de heces y orina.

Existen diversos métodos para recoger las heces, dependiendo de la especie, del tipo de animal, y en las condiciones que se encuentra (estabulado o pastoreo).

En estos tipos de ensayos realizados con mamíferos se usan machos con preferencia a las hembras, porque con ellos es más fácil recoger la orina y las heces por separado (Mac Donal, 1986).

Generalmente en este método de la determinación in vivo está muy difundido el uso de ovinos, aún cuando la mayoría de los alimentos para rumiantes es consumido por bovinos, sin embargo ambas especies presentan algunas diferencias con respecto a necesidades de alimentos y espacio físico, y como si eso fuera poco diferencias en cuanto a digestibilidad (Griffiths y O’Shea, 1974; Thomas Campling, 1979 citados por Riveros, 1986).

Lascano et al, (1990), señalan que tanto en ovinos como con bovinos se pueden utilizar jaulas individuales de madera o metálicas, que permitan la colección de heces, ya sea por medio de separadores o con el uso de bolsas colectoras.

Las jaulas usadas para el método in vivo, llamadas jaulas de digestibilidad, tiene como objetivo disminuir el movimiento del animal, estas además deben tener piso ranurado, para evitar el exceso de humedad y poder recoger las heces fecales (Cañas, 1995). Las heces fecales en este tipo de jaula caen en el recipiente de más atrás y la orina es conducida al recipiente de adelante.

El uso de estas jaulas queda limitado para ovinos por su característica de excreción fecal (boñiga), pero trae dificultades en terneros por ej, donde puede disminuir la recolección de heces fecales.

La recolección de heces se puede también realizar con la ayuda de sacos atados al animal llamados bolsas colectoras, conteniendo en su interior bolsas de polietileno utilizadas para recibir las heces fecales, permitiendo de esta manera ser retiradas de los arneses en cada ocasión para ser posteriormente pesadas, rotuladas y conservadas a - 20 °C hasta su correspondiente análisis en el laboratorio.

Muchos autores (Church, 1974; Mc Donald, 1986; Church, 1993; Cañas, 1995) coinciden en que debe existir un período preliminar en el cual se alimenta el animal con la dieta experimental, con el fin de que se acostumbre a ella y de que se elimine del tracto digestivo cualquier resto de alimentos precedentes.

Se les suministra a cada animal un alimento uniforme y cuidadosamente pesado, de la misma manera se pesan y toman muestras de la parte rechazada por el animal, y se recogen las heces (Church, 1974).

Normalmente se suele habituar al animal a la ración que queremos estudiar durante un período de tiempo suficiente para permitir la adaptación de los microorganismos del rumen y para ajustar la toma de alimentos hasta un nivel estable, algo por debajo del consumo máximo, con la finalidad de asegurar la totalidad de su consumo y reducir la variación en la medición de Digestibilidad aparente en la etapa de recolección de heces, por un efecto de arrastre del consumo ad-libitum (D'Ascanio et al., 1995).

La toma de alimentos se estabiliza con el fin de reducir la selectividad, debido a que una fluctuación en el consumo produciría fluctuaciones de la excreción.

Sin embargo, la excreción de alimentos fibrosos puede retrasarse hasta 10 días, por lo que es prácticamente imposible identificar las excreciones con el consumo de un día determinado.

En las especies monogástricas, algunos investigadores han seguido la práctica de suministrar colorantes tales como azul de metileno, o rojo de carmín al principio y al final de un período, iniciando la recolección de heces cuando aparece el primer colorante y deteniéndola cuando desaparece el segundo colorante.

En los rumiantes, debido a la mayor complejidad de su sistema digestivo, el tiempo de permanencia del alimento en el tracto digestivo es más largo lo que dificulta la recolección de heces fecales pertenecientes al alimento en estudio; por esta razón la metodología de la sustancia coloreada no resulta una buena práctica en estos casos (Cañas, 1995).

Si la prueba con el animal es completa, se dispone de datos acerca de la cantidad del alimento consumido, peso de las heces húmedas excretadas, que complementado con el correspondiente análisis químico del alimento y las heces, nos permite entonces calcular

la diferencia entre la cantidad de un determinado nutriente consumido y la cantidad excretada por el animal.

El nivel fijo de alimentación normalmente se utiliza cuando se quiere medir la digestibilidad de un alimento a un nivel de consumo que se aproxime a mantenimiento. Sin embargo Lascano et al., (1990) señala que lo más común es medir digestibilidad y consumo en condiciones de alimentación ad libitum, tomando como nivel un 15% más de alimento sobre el consumo máximo observado.

De la misma manera Cañas, (1995) considera que estos ensayos de digestibilidad donde las variaciones pueden ser alta, es conveniente realizarlas en dos niveles de consumo, el primero a nivel máximo de consumo (ad libitum) y el segundo a nivel mínimo (nivel de mantención), a fin de poder medir el aprovechamiento real de un alimento en donde la variación de digestibilidad puede ser hasta de 0.8 puntos de porcentaje.

El régimen de alimentación a diferentes niveles se recomienda en la evaluación de gramíneas y leguminosas tropicales, esto se debe a que con niveles crecientes de oferta de especies forrajeras tropicales se observan incrementos en consumo voluntario, principalmente debido a una mayor oportunidad de selección de hojas en relación a tallos (Deschamps, 1994).

Mac Donald, (1986) señala que el período de recolección de heces debe durar de 3 a 14 días, mientras más largo sea el período, más exactos son los resultados obtenidos. Cañas, (1995) considera además que debiera existir como mínimo 3 repeticiones.

Si se recogen las heces por ejemplo, durante un período variable de 5 a 10 días, que podría comenzar un lunes a las 7.30 de la mañana y terminar el sábado a las 7.30 de la mañana, se puede esperar que las heces son representativas de los alimentos ingeridos durante el período de los días anteriores al lunes, en el que se habrá pesado el alimento. Los animales deberán pesarse al inicio y al final de la prueba, desparasitarse antes de iniciar el período de acostumbramiento, controlar que se encuentren en buen estado de salud y durante el período de colección de heces no variar el régimen alimenticio previamente escogido (Lascano et al., 1990).

La digestibilidad determinada por este método como anteriormente fue descrita se expresa habitualmente como digestibilidad aparente o real, según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Dig. aparente} = \frac{\text{cant de M.S. ingerida} - \text{cant. de M.S. excretado}}{\text{cant. de M.S. ingerido}} * 100$$

$$\text{Dig. real} = \frac{\text{material ingerido} - \text{material excretado} - \text{excreción endógena}}{\text{cant de alimento ingerido}} * 100$$

Esta última relación plantea la dificultad de poder separar la excreción endógena (descamación, secreción del jugo digestivo y cuerpos bacteriales) de lo exógeno.

Se puede obtener el coeficiente de digestibilidad de cualquier componente de la dieta a partir de la fórmula anteriormente planteada, mediante la siguiente relación:

$$D1 = \frac{(y - x) + xD}{y} * 100$$

Donde :

- D1 = Coeficiente de digestibilidad del componente de interés.
- y = Porcentaje del componente en el alimento en base seca.
- x = Porcentaje del componente en heces en base seca.
- D = Porcentaje de digestibilidad de la M.S.

A continuación se presenta un ejemplo de la determinación del coeficiente de digestibilidad de paja suministrada a tres ovejas en un ensayo realizado con este objetivo. Los resultados se encuentran en forma parcializada para los diferentes cálculos que es necesario realizar.

Cuadro 1. Cálculos para la determinación del coeficiente de digestibilidad de la paja suministrada a ovejas.

	M.O. %	P.C. %	E.E. %	F.C. %	EN.N %
Paja	91,9	9,3	1,5	35,0	46,1
Heces	87,0	11,0	1,5	31,7	42,8

De los resultados obtenidos se calcula la cantidad de MS y sus componentes consumidos, excretados y por diferencia, lo que ha sido digerido.

	M.S. Kg	M.O. Kg	P.C. Kg	E.E. Kg	F.C. Kg	E.NN Kg
Consumo	1.63	1.5	0.15	0.02	0.57	0.75
Heces	0.76	0.66	0.08	0.01	0.24	0.33
Digerido	0.87	0.84	0.07	0.01	0.33	0.42

Los coeficientes de digestibilidad se calculan expresando los kilos digeridos como porcentaje de los kilos consumidos.

M.S. %	M.O. %	P.C. %	E.E. %	F.C. %	E.NN %
53.4	56	46.7	50.0	57.9	56.0

Finalmente, la composición de la paja es calculada en términos de sus nutrientes digestibles como porcentaje de la materia seca.

M.O.D %	P.C.D. %	E.E.D. %	F.C.D. %	E.NN.D. %
51.5	4.3	0.8	20.3	25.8

Ventajas y desventajas:

- Es un método relativamente exacto pero demora mucho tiempo, poco práctico
- El método in vivo es sin duda el que da la mejor estimación de la digestibilidad de los alimentos.
- Presenta un leve sesgo respecto de la digestibilidad real debido al material endógeno que se elimina a través de las heces.
- Esta técnica requiere de grandes cantidades de muestras, largos períodos y su costo es elevado ya que requiere de infraestructura especial.
- Este método “in vivo” a pesar de lo real que son las evaluaciones, se producen variaciones entre determinaciones debido tanto a factores propios del animal, como así también factores propios de las plantas o alimentos.
- En la práctica el método presenta ciertas dificultades, como son el asegurarse de que todas las excretas sean recogidas, evitar que se mezclen con la orina, impedir que se produzcan trastornos digestivos, y otros (Lascano et al, 1990)
- El método directo requiere de mucho personal para medir el consumo, recolectar las heces fecales lo que se traduce además en un mayor tiempo y laborioso aumentando considerablemente los costos.
- Se requiere para la prueba utilizar varios animales con la finalidad de eliminar la diferencias que pudieran existir de origen digestivo en individuos de la misma especie, edad, y sexo.
- Se restringe mucho la selectividad natural del animal, siendo menor el consumo que en el caso ad libitum.

METODOS INDIRECTOS

1. Método por “diferencia”

En muchos casos puede desearse evaluar la digestibilidad de una sustancia alimenticia cuando se administra mezclada con una o más sustancias. Un ejemplo podrían ser los suplementos de proteínas o granos (alimentos que normalmente no constituyen raciones completas) en estos casos hay que determinar la digestibilidad por diferencia.

Cuando se da un concentrado balanceado no hay problema en determinar los nutrientes de cada alimento o ingrediente que lo constituyen, en cambio en las heces fecales es imposible hacer esa separación, frente a estas circunstancias es donde toma validez la utilización del método de digestibilidad por diferencias.

El método consiste en determinar previamente el alimento que va a acompañar el alimento problema, generalmente el alimento base es un forraje al cual se le determina la digestibilidad. La digestibilidad del alimento problema se calcula por diferencia entre la digestibilidad total de la ración y la digestibilidad del alimento conocido (Cañas, 1995).

Existen variaciones de la técnica por diferencia para disminuir el error como son el suministro de alimentación suplementaria, dando dos alimentos en diferentes proporciones o por medio de ecuaciones de regresión (Cañas, 1995).

El siguiente ejemplo determina la digestibilidad aparente de la proteína del maíz en novillos. Se utilizó heno de alfalfa como ración base determinándose que el valor de digestibilidad aparente de la proteína era de 6.7%, la proteína cruda del maíz utilizado fue de 10% y para las heces correspondió a 7.3%.

Cuadro 2. Consumo y excreción en promedio en dietas de Maíz, Heno de Alfalfa y Maíz más Heno de Alfalfa.

	Heno de alfalfa	Maíz	Heno de alfalfa + Maíz
Consumo (Kg/d)			
Materia seca	12	1	13
Proteína	1.812	0.1	1.912
Heces fecales (Kg/d)			
Proteína	0.5889	0.0535	0.6424

Ventajas y Desventajas:

Desventajas con relación al método in vivo.

- Utiliza la misma cantidad de animales y el mismo procedimiento que la digestibilidad in vivo
- Tiene el mismo costo que la determinación directo “in vivo”
- Introduce a error, ya que supone que la digestibilidad de los componentes de una ración es la misma cuando se suministra solos o en mezcla.
- No considera los efectos asociativos (con los alimentos puede no haber un efecto de adición).

Ventajas con relación al método in vivo.

- Es muy práctica.

Es una variante del método “in vivo”, es útil en casos que se quiere evaluar un alimento que sólo, produciría graves trastornos metabólicos.

2. Método del “Indicador”.

Existe ocasiones en que, por falta de material apropiado, personal o por la naturaleza del ensayo, es imposible controlar la ingestión de comida o la excreción de heces o ambas cosas.

Este es el caso, en que se alimenta a los animales en grupo donde no se puede precisar la cantidad ingerida por cada uno, en estos casos es posible calcular la digestibilidad si el

alimento contiene alguna sustancia que sea totalmente indigestible, midiendo su concentración en el alimento y en pequeñas muestras de heces de cada animal; la relación que exista entre estas concentraciones nos da una medida de la digestibilidad.

En este método se determina el contenido de una sustancia que sea muy indigestible en el alimento y que por lo tanto aparezca en las heces fecales; estas pueden ser partes del alimento, indicador natural, o ser adicionada, sustancia extraña, o pueden usarse ambas formas.

Los indicadores naturales o internos son materias no digestibles que presentan naturalmente los alimentos y comprenden sustancias tales como lignina, sílice, ceniza insoluble en ácidos. Los indicadores externos son materias que bien se añaden a la dieta o se administran oral o intra ruminalmente a los animales, los más utilizados son el sesquióxido de cromo, colorantes, polietilenglicol, óxido férrico, óxido crómico, tierras raras, fibra tratada y elementos hidrosolubles (Church, 1974; Mc Donald, 1986; Church, 1993; Cañas, 1995).

Para considerar a una sustancia como un marcador ideal (Kobt y Luchey, 1972 citado por Church, 1993) determinaron las características que, por orden debe cumplir:

- Debe ser inerte y carecer de efectos tóxicos.
- No debe ser absorbida ni metabolizada en el conducto gastrointestinal.
- Debe carecer de volumen apreciable.
- Debe mezclarse íntimamente con y mantenerse uniformemente distribuido en la digesta.
- No debe influir sobre las secreciones gastrointestinales, digestión, absorción o motilidad normal.
- No debe influir sobre la microflora del tracto gastrointestinal.
- Debe poseer propiedades físico químicas, fácilmente discernibles en la totalidad del tracto gastrointestinal, que permitan su determinación cuantitativa de forma simple y exacta.

Es difícil que exista algún indicador que reúna todas estas especificaciones, aunque un número de las mismas son suficientemente adecuadas para proporcionar datos significativos, además los distintos marcadores gozan de propiedades diferentes y que los marcadores apropiados, métodos de administración y planes de muestreo dependen del tipo de datos que se pretenden obtener.

Los marcadores se emplean no solamente para calcular los coeficientes de digestibilidad sino para valorar la digestión fraccional en diversos segmentos del tracto alimentario y también para medir el tiempo de retención de la digesta.

Marcadores internos

Lignina: esta sustancia ha sido considerada como indigestible y en consecuencia utilizada como marcador en estudios de digestión, sin embargo existe problemas

importantes en su determinación y recuperación total de esta sustancia en las heces (Fahey y Jung, 1983), ellos indicaron que su estructura es degradada o modificada durante su paso a través del tracto gastrointestinal consecuentemente las cantidades recuperadas en las heces son bajas.

Fahey y Jung, 1983 afirman la desaparición de la lignina, demostrando que la mayor parte de esta estructura es modificada durante el paso por el rumen.

La determinación incompleta de lignina o de cualquier otro marcador determina una infravaloración de la digestibilidad, aumentando la magnitud del error según se incrementa la cuantía de la pérdida y disminuye el contenido de lignina de la dieta.

Muntifering, (1982) demostró que la elección de la técnica para determinar el contenido en lignina (lignina ácido detergente, lignina soluble en acetyl bromuro) puede afectar drásticamente sobre la recuperación de lignina como así también en la medición de su excreción fecal.

Fahey y Jung, 1983 explican las razones por la cual existen bajas recuperaciones de lignina en las heces; digestión aparente resultante de la formación de complejos solubles lignina carbohidrato que no se recuperan (lignina en heces), destrucción parcial de lignina fecal durante el análisis y diferencias físicas y/o químicas entre el alimento y las heces en la naturaleza de los materiales empíricamente como lignina.

El empleo de lignina como marcador debería limitarse en situaciones en las que pueda confirmarse la recuperación fecal total.

Sílice: En principio se encontró que el sílice era indigestible, por lo que se usó como marcador, posteriormente se descubrió una recuperación excesiva de sílice en las heces, principalmente en animales a pastoreo y aquellos estabulados con piensos contaminados con polvo o tierra, razón por la cual se llevó a pensar en una infravaloración en la ingestión de sílice, y además excreciones por orina (Kobt y Luchey, 1972).

Cenizas insoluble en ácidos: el empleo de una fracción de cenizas del pienso que no se disuelve en HCL hirviendo, proporciona resultados similares a los obtenidos mediante la recogida fecal total, esto fue demostrado por Van Deulen y Young, (1977) cuando realizó prueba de digestibilidad en ovejas con cenizas insolubles en ácidos (CIA) concluyendo que estas sustancias pueden actuar como un marcador fiable, porque se aprecia poca variación diurna en el contenido de las heces en (CIA) y porque las técnicas analíticas son bastante precisas.

La precisión de la ceniza insoluble en ácido como marcador es menor cuando se consumen alimentos con una baja concentración en CIA (cereales y alfalfa) debido a la magnitud del error analítico con relación al contenido absoluto en CIA del pienso.

Marcadores externos

Alimentos teñidos: Las partículas teñidas de pienso tienen ciertas ventajas como marcador porque permiten la identificación de partículas específicas durante su paso a través del tracto alimentario y porque pueden usarse tintes diferentes para marcar de forma indeleble distintos alimentos que componen una dieta mixta.

El análisis de las partículas teñidas debe realizarse mediante inspección visual y recuento de las partículas teñidas en una determinada muestra, cosa que resulta laborioso y sometido a error humano.

Oxido crómico: en los estudios sobre nutrición se han utilizado varios óxidos metálicos insolubles como marcadores, pero el más comúnmente usado es el óxido crómico; este ofrece ciertas ventajas como marcador ya que según muchos estudios se recupera totalmente en las heces y existen varios métodos analíticos fiables.

El óxido crómico es un polvo denso que se mantiene en suspensión y su velocidad de pasaje es independiente de la correspondiente tanto a la fase acuosa como a la particulada, es por esta razón que no resulta apropiado como marcador en estudios para determinar los tiempo de retención de la digesta (Kobt y Luchey, 1972), así como también formar un sedimento en el retículo rumen y ser transferido esporádicamente al tracto gastrointestinal, en consecuencia, la excreción de óxido crómico con las heces está sometida a variación tanto diurna como diaria.

Resulta útil como marcador para determinar la digestibilidad y el flujo pos ruminal de la digesta mediante administración frecuente del marcador y o muestro fecal o de digesta, para explicar esta variación en la excreción.

El óxido crómico se ha usado frecuentemente para corregir los flujos de digesta obtenidos en animales con cánulas reentrantes durante un plazo de 24 hs, sin embargo (Mc Rae, 1974; Faichney, 1980 mencionados por Church, 1993) aseguran que el empleo de óxido crómico, o de cualquier marcador, resulta inadecuado para la determinación exacta del flujo de la digesta en animales provisto de cánulas simples en el tracto postruminal.

Elementos de tierras raras: los elementos de tierras raras como Lantano (La), samario (Sm), Cerio (Ce), Iterio (Yb) y Disproso (Dy), han sido investigados y usados como marcadores tanto en estudios de digestibilidad como de velocidad de paso.

El quelato de rutenio de tris (1,10 fenantrolina) (Ru-pheb) ha sido considerado, como las tierras raras, con una elevada capacidad para fijarse a las partículas de materia, las ventajas que tiene como marcador son muy similares a las tierras raras, excreción cuantitativa con las heces y existencia de técnicas fiables, como así también produce cierta emigración y disociación de Ru-phen durante la digestión y paso a través del tracto digestivo (Church, 1993).

Fibra tratada al cromo mordante: Un procedimiento llamado "mordante" determina la formación de fuertes complejos entre el cromo y la membranas de las células vegetales (Unden, Colucci y Van Soest, 1980 citados por Ehle, 1980). Este complejo es el marcador más específico, por consiguiente tiene un valor considerable como marcador tanto para estudiar la digestibilidad como el avance de la digesta.

El inconveniente más grave que tiene el empleo de cromo mordiente consiste en el intenso tratamiento químico recibido durante la preparación y la indigestibilidad resultante de la partícula tratada, que puede comportarse de distinta forma que las restantes partículas del pienso en una determinada dieta, Ehle y col., 1983 demostraron que la concentración de Cr en el mordiente influye sobre la densidad del material.

A pesar de dichos problemas, la fibra tratada con Cr mordiente será considerada como un marcador provisto de un potencial considerable debido a su marcado irreversible de

partículas específicas y al hecho de que puede ser cuantificado fácilmente (Church, 1993).

Marcadores hidrosolubles: Existen varios materiales con un comportamiento casi ideal como marcadores de la fase líquida de la digesta, El polietileno glicol (PEG) es muy soluble en agua, se recupera casi totalmente en las heces y ha sido utilizado durante muchos años como marcador en estudios efectuados con rumiantes, sin embargo las técnicas resultan imprecisas para el análisis del PEG, pero algunos investigadores han superado esta limitación mediante el empleo de PEG radiomarcado (C¹⁴, H³).

Otros investigadores (McRae, 1974; Ellis, Lascano y Owen, 1982 citados por Church, 1993) indican que el PEG pueden absorber ciertos tipos de ingredientes de la dieta o que puede ser precipitado en presencia de taninos.

Existen materiales que están reemplazando al PEG como marcadores, por ácidos etilendiaminotetracético y Cr (CrEDTA) y Co (CoEDTA) por tener además de una buena solubilidad un análisis simple y muy exactos.

La digestibilidad se calcula por la relación entre los nutrientes y la substancia, el coeficiente de digestión se obtiene en función del cociente entre cada uno de los subnutrientes con respecto a la substancia indigestible, en el consumo y heces fecales (Cañas, 1995).

$$\text{CD de la M.S.} = 100 - 100 * \frac{\% \text{ indicador en la M.S. del alimento}}{\% \text{ indicador en la M.S. del las heces fecales}}$$

$$\text{CD nutriente} = 100 - 100 * \frac{\% \text{ indicador alimento} * \% \text{ nutriente heces fecales}}{\% \text{ indicador heces fecales} * \% \text{ nutriente alimento}}$$

Si el 100 % del indicador no se recupera en las heces fecales, la ecuación de digestibilidad será:

$$\text{CD nutriente} = 100 - \% R * \frac{\% \text{ indicador alimento} * \% \text{ nutriente heces fecales}}{\% \text{ indicador heces fecales} * \% \text{ nutriente alimento}}$$

donde:

% R= porcentaje de recuperación.

La medida de digestibilidad de los pastos es un problema, puesto que puede pensarse que la lignina nos proporcionaría un indicador adecuado, pero es muy difícil determinar la lignina de los pastos que comen los animales que pasten libremente, debido a que lo hacen de una manera selectiva, eligiendo las plantas jóvenes antes que las más maduras y las hojas con preferencia a los tallos, por lo que el contenido real en lignina del pasto que consumen es menor que el de una muestra de pasto cortado.

- Situaciones apropiadas para el empleo de indicadores.

1. Cuando es conocido el consumo de pienso aunque no pueden realizarse recogidas totales de materia fecal, en este caso pueden emplearse marcadores bien internos o externos.

Los animales son alimentados con dietas que contienen el marcador o son dosificados oralmente con el marcador a intervalos regulares, posteriormente se toman muestras de heces cuando son excretadas o directamente del recto.

Las muestras fecales pueden tomarse a intervalos que se determinan en relación con el momento del consumo o dosificación del marcador para evitar influencias causadas por variaciones diurnas en la excreción del marcador. Las muestras fecales son analizadas para determinar el contenido de sustancia marcadora.

2. Cuando no se conoce ni el consumo de alimento ni la producción de heces, en este caso debe usarse un marcador interno.

3. Cuando no se conoce ni el consumo de alimentos ni la producción fecal y se desea calcular tanto la digestibilidad como el consumo. En este caso la digestibilidad puede ser determinada mediante el empleo de un marcador interno, el rendimiento fecal se mide al mismo tiempo usando un marcador externo y el consumo puede calcularse como sigue:

$$\text{Consumo de SS} = \frac{\text{producción fecal}}{\% \text{ de indigestibilidad de la SS}} * 100$$

SS= sustancia seca.

Alcanos: este marcador es utilizado para determinar digestibilidad de los pastos son introducidos en forma de pelex, pero tiene varios inconvenientes como ser las variaciones entre días en la excreción fecal, se introduce en forma de pelet.

La concentración de alcanos en las heces es influenciado por el crecimiento de los pastos, del mismo modo esta indicando que existe interacción con los días de muestreo. Tiene menor variación diurna siendo de mayor importancia las variaciones entre días (Malossini et al., 1994)

La elevada variación residual en las heces se ha debido a una gran variación en el contenido de n-alkanos en las diferentes especies de pasturas.

Debido a la gran variación entre muestra y a la variación en la excreción fecal de n-alkanos, se puede solucionar en este marcador, colocando una fistula esofagica para determinar el consumo de n - alcanos provenientes de los pastos; el cual no podría ser aplicado porque causaría severas interferencias en la producción (Le Du y Penneng, 1982) pero si es correcto la aplicación en condiciones que se quiera determinar la ingestión o el consumo del animal. De esta forma podría servir para estudios experimentales mas precisamente.

Ventajas y desventajas:

- Variante del método directo "in vivo", realizado para ciertas circunstancias como animales a pastoreo libre o rotatorio.

- Problemas de selectividad.
- Se requiere de menos personal, reduce los costos
- No se requiere conocer el consumo, y la recolección de heces es poca cantidad
- La excreción no es uniforme, produciendo una recuperación más alta o más baja del indicador, que repercute a su vez sobre el valor de la digestibilidad en el sentido de elevarla o disminuirla respectivamente.
- Son muy utilizados en experimentos para estudiar las alteraciones en el material digerido que ocurren en el tubo digestivo y para valorar la importancia de la digestión que se realiza en los distintos segmentos (digestión parcial).

Limitación de los métodos (Alderete, 1991).

Los dos Métodos utilizados más ampliamente, usando los indicadores internos lignina y cromógenos, tienen problemas para llenar los requisitos que deben tener los indicadores.

La lignina tiene los siguientes problemas:

- Se ha encontrado que no es completamente indigestible.
- Existen problemas en la recuperación fecal.
- El pastoreo selectivo puede conducir a errores de muestreo de los forrajes.
- Algunos estudios sugieren que los microorganismos del tracto gastrointestinal pueden ser los responsables de la degradación y o modificación de la estructura química de la lignina.
- Los métodos de análisis requieren de mucho tiempo.
- La lignina no es una entidad química bien definida.

Los indicadores externos.

- La recuperación del óxido crómico varía mucho en animales en estabulación en comparación con animales en pastoreo; por lo que los resultados obtenidos en condiciones de estabulación no deberán aplicarse a estudios en condiciones de pastoreo.
- Los resultados obtenidos en diferentes estudios son muy variables, por lo que no se deben comparar resultados obtenidos en una época, o bajo ciertas condiciones, con otros obtenidos en otra época y bajo otras condiciones.
- Los animales utilizados deberán ser los más similares posible, con el fin de evitar errores experimentales.
- No se han encontrado grandes diferencias en cuanto a la forma en que se administre el óxido crómico (papel impregnado, en polvo, en cápsula)
- Hay indicaciones de que la administración a los animales de dos dosis diarias de óxido crómico produce un patrón de excreción más uniforme que una diaria, aunque no es concluyente.

- Se recomienda que se utilice un período preliminar de administración de óxido crómico, mínimo de cuatro días antes de iniciar la colección de heces.
- El muestreo de las heces puede ser hecho a cualquier hora del día, teniendo cuidado de tomar el suficiente número de muestras para evitar la variación entre días y entre animales.
- Deberá tenerse un cuidado especial cuando se analicen las muestras por óxido crómico, asegurarse que para una investigación específica, todas las muestras:
 1. Sean probadas bajo condiciones analíticas uniformes.
 2. Sean comparadas con los mismos valores estándar.
 3. Sean analizadas por la misma persona.
 4. Sean analizadas como un grupo, al mismo tiempo y lo más pronto posible.

3. Método “in vitro”

Los ensayos de digestibilidad son tan laboriosos de llevar a cabo que se han hecho numerosos intentos para reproducir en el laboratorio las reacciones que tienen lugar en el tracto digestivo del animal, con objeto de poder determinar la digestibilidad de los alimentos por métodos rápidos.

Uno de estos métodos es el de digestibilidad in vitro que, de acuerdo a un gran número de trabajos, predice digestibilidad in vivo con alto grado de precisión (Clard y Mott, 1960; Tilley y Terry, 1963; citados por Lascano, 1990).

Smith, (1971) indica que, las posibilidades de imitar las reacciones que ocurren a nivel ruminal son la base de las técnicas in vitro desarrolladas por los científicos desde los años sesenta.

El método de digestibilidad in vitro con licor ruminal inicialmente pretendió simular las condiciones del rumen, al fermentarse una muestra de alimento de composición conocida en un recipiente con una cantidad determinada de fluido ruminal y, posteriormente a un período de incubación, se decantaba la muestra y se determinaba por diferencia la degradabilidad de la materia seca, corrigiendo por el residuo obtenido con el inóculo del rumen. Las correlaciones con respecto a digestibilidad in vivo no eran altas, debido a que en el animal la digestión ruminal es seguida por una digestión enzimática en abomaso e intestino (IICA, 1992).

Por lo tanto, estas técnicas fueron reemplazadas por la digestibilidad in vitro en dos etapas, que agrega a esta fermentación inicial una digestión enzimática, simulando así las condiciones encontradas en el abomaso e intestino delgado del rumiante. Esta técnica, como la mayoría de los métodos utilizados para determinar digestibilidad in vitro de los forrajes, está diseñada para lograr un resultado que permita predecir los parámetros in vivo.

El método Tilley y Terry (1963) fue el precursor del método de fermentación in vitro en dos etapas, generalmente los métodos desarrollados posteriormente son en su mayoría modificaciones de este, como el propuesto por Schimid et al. (1975) que incorpora “buffer” como fuente de nitrógeno. Otra modificación al método Tilley y Terry es la de Van Soest et al., (1966) que sustituye la pepsina de la segunda etapa por solución

detergente neutro para determinar FDA, es decir, solubiliza la pared celular bacteriana y los productos endógenos, además de la proteína (Cañas, 1995).

Las características que condicionan la validez de los resultados obtenidos por técnicas *in vitro*, que emplean licor ruminal en la evaluación de forraje, son más difíciles de establecer que los métodos químicos. Sin embargo este método es un método biológico, que considera la estructura física como la composición química de la muestra de forraje, puesto que ésta es digerida por microorganismos del rumen.

La digestibilidad *in vitro* es un método, que se basa en el principio de someter una muestra de forraje en un recipiente a la acción de inóculo de líquido ruminal, con el fin de asimilar las condiciones naturales que ocurren en el rumiante. Después de un determinado tiempo se mide la cantidad de materia seca (MS), materia orgánica (MO) o celulosa que ha desaparecido durante la incubación, la proporción desaparecida se denomina digestibilidad *in vitro*.

El método *in vitro* presenta un inconveniente en la determinación de la digestibilidad de MO y de la MS, esto se debe a la baja correlación de éstas con los valores correspondientes a las digestibilidades *in vivo* (Van Soest, 1964).

Esto se debía a una fracción proteínica, asociada a la pared celular, la cual no se hacía soluble ante el tratamiento con licor ruminal, subestimando los valores de digestibilidad de MO y MS. Para resolver este problema, se propuso tratar las muestras con pepsina diluida en HCL, carbonato de sodio (NaCO₃) y tripsina en buffer de carbonato de sodio, entre otros, con el objetivo de solubilizar la proteína, simulando lo que ocurriría en condiciones naturales en el abomaso de un rumiante.

Dentro de los muchos métodos químicos y biológicos descritos para predecir la digestibilidad *in vivo* de los alimentos, el propuesto por Tilley y Terry (1963) aún se reconoce como uno de los más interesantes. Este conocido como "two - Stage", se basa en la acción de dos tratamientos consecutivos, uno biológico y el otro químico, sobre la muestra a analizar.

El tratamiento biológico se refiere a una digestión anaeróbica de una muestra seca de forraje con microorganismos ruminales, a 38 °C por 48 hs y bajo oscuridad. Esta digestión debe hacerse en tubos de vidrio asegurándose que la producción de gas, como consecuencia de la fermentación mantiene la condición de anaerobiosis. Además del licor ruminal se debe agregar un cierto volumen de solución buffer, capaz de mantener un pH adecuado para la digestión.

El segundo paso de este método, el tratamiento químico, consta de una digestión en pepsina, cuya finalidad es solubilizar la gran proporción de proteína que resiste al tratamiento biológico previo (Tilley y Terry, 1963).

En condición importante en este método que la digestión sea anaeróbica, a una temperatura de 39 - 40 °C y a un pH constante de 6.8 a 6.9. Esto último se consigue utilizando soluciones tampones o "salivas artificiales" de manera que el grado de acidez final no exceda del normal en el rumen (Tilley y Terry, 1963). Así, también se han usado proporciones diferentes de inóculo / tampón y del número de bacterias presentes en el inóculo.

Se observó que aunque el método original indica agitar los tubos de incubación 3 o 4 veces al día (Tilley y Terry, 1963), hay autores que indican que esto no es necesario (Nefzaoui y Vanbelle, 1984, citados por Riveros, 1986). Sin embargo, trabajos de

Mellemberger et al (1970), determinaron que la agitación aumentaba la tasa de desaparición de la MS, produciendo mayores coeficientes de digestibilidad.

Tilley y Terry (1963) fijaron el tiempo de incubación en 48 hs, aun cuando exista evidencia experimental de que la digestión de la celulosa puede prolongarse más que ese tiempo, aumentando el valor de digestibilidad obtenido y disminuyendo los coeficientes de variación. Considerando que al cabo de las 48 hs el proceso de digestión de los carbohidratos estructurales es prácticamente completa, lo que no ocurre en este período sería la solubilización de la proteína potencialmente digestible del forraje. Esto explica en parte el fenómeno del aumento aparente de la digestibilidad, cuando la incubación se prolongaba más allá del tiempo indicado.

En base de esto, se propuso la incorporación de una segunda etapa del método consistente en una digestión proteica con pepsina. Esta etapa no requiere de condiciones anaeróbicas; pero se necesitan otras 48 hs más a 39 - 40 °C (Osbourn y Terry, 1977 citados por Riveros, 1986). Aún con este procedimiento, autores como (Goto y Minson, 1977 citados por Riveros, 1986) observaron que la digestibilidad seguía aumentando en función del tiempo de incubación.

Silva et al., (1984) señala que es habitual que la digestibilidad in vitro se evalúe con alguna modificación a través de la técnica creada por Tilley y Terry, (1963). En los laboratorios donde se usa esta metodología en forma rutinaria, los animales donantes del licor ruminal se alimentan con una alimentación estándar, como por ejemplo, heno de alfalfa de regular calidad.

Este hecho podría ser adecuado para determinada circunstancia; pero podría inducir a alteraciones de importancia cuando se evalúe material proveniente de ambientes diferentes. Así, en el ejemplo recién citado, esta alimentación podría ser adecuada en Chile para forraje de riego, sin embargo, su utilización en forrajes provenientes de praderas mediterráneas senescentes o en paja de trigo, podría modificar substancialmente la digestibilidad que tienen estos forrajes.

El método in vitro tiene la dificultad que presupone el tener que mantener animales fistulados en el rumen, que deben ser de la misma especie, ya que se ha observado que con la utilización de jugo ruminal de especies diferentes, se obtienen resultados distintos (Wanapat et al., 1980; Brood y Urness, 1984; citados por Riveros 1986).

Se ha observado que el método in vitro subvalora la digestibilidad en aquellos rangos inferiores a 65 %, lo cual puede deberse a falta de tiempo de fermentación con licor ruminal, especialmente en forrajes de menor calidad. Por otra parte, la fase de hidrólisis con pepsina ácida, en forrajes que son bajos en proteínas, podría eliminarse (Cerdeira et al., 1987).

Capacidad de predicción del método in vitro

Numerosas investigaciones han establecido relaciones cuantitativas entre la digestibilidad in vivo e in vitro y /o algunos constituyentes químicos del forraje. El objeto ha sido predecir la digestibilidad aparente usando una ecuación de regresión previamente determinada.

Van Soest et al, (1966) citado por Illanes, (1989), señalan una relación estrechamente lineal entre la digestibilidad in vitro de los constituyentes de la pared celular y la digestibilidad real in vivo, obteniéndose regresiones cuyos coeficientes de correlación fueron iguales a 0.98 y un error estándar de 1.7.

Así mismo, Gaumgard et al., (1962) citado por Illanes, 1989) establecieron coeficientes de correlación de 0.72 entre el porcentaje de TDN medidos in vivo y los TDN provenientes de la fermentación de los carbohidratos in vitro, y de 0.84 entre la diestabilidad in vivo de la materia orgánica y la digestibilidad in vitro de la celulosa, mientras que (Hersberger et al., 1954 citado por Illanes 1989), obtuvieron un $r = 0.97$ entre la digestibilidad in vivo y digestibilidad in vitro de la celulosa y un $r = 0.92$ entre energía digestible y digestibilidad in vitro de la celulosa.

Silva et al., 1984, obtuvieron un $r = 0.83$ entre la digestibilidad in vitro, (DIV) e in vivo o aparente (DAP), los resultados in vitro tienden a sobrestimar o a subestimar los valores de digestibilidad aparente dependiendo de la calidad del forraje.

Manterola et al (1983) citado por Illanes (1989), determinaron en paja de trigo una digestibilidad in vitro de la materia orgánica (DIVMO) del 31.96 % siendo el valor de la digestibilidad aparente de la materia orgánica (DAPMO) de 55.18 %. Silva et al (1984) encontraron que la digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) de alfalfa sobrestimada el valor in vivo en 4.8 unidades.

Factores que afectan los resultados.

- Variación en la población microbial debida principalmente a la dieta del animal, fuente del inculo, del cual se obtiene el líquido ruminal. La fuente del inculo influye significativamente sobre la digestión de la MS y de la celulosa, por lo que es cuestionable la validez de utilizar inculo de una animal nutrido con un alimento diferente al que se está evaluando in vitro. Sin embargo, la especie de animal utilizada como fuente de líquido ruminal no es importante, si el animal donador es alimentado con una dieta similar a la dieta en evaluación.
- Variación debida al almacenamiento, molido, y procesamiento de las muestras.
- Variación en procedimiento; por ejemplo, tiempo de digestión, procesamiento del líquido ruminal, errores en la pesadas, etc. Se ha encontrado que la digestión de la celulosa aumenta con el tiempo de fermentación de 12 a 48 hs. El tiempo de fermentación que se ha considerado como estándar para las dos etapas de digestión es de 48 hs.
- Por otra parte, ha sido demostrado que la sílica reduce la digestibilidad in vitro en dos unidades porcentuales por cada unidad de incremento en sílica en el forraje, por lo que los datos de digestibilidad in vitro deberán ser presentados en base materia orgánica.

Ventajas y Desventajas

El método in vitro, permite el estudio de un gran número de muestras en un tiempo menor, requiere de pequeñas cantidades de muestra y tiene un costo menor en comparación con el método in vivo o colección total.

El método in vitro presenta un inconveniente en la determinación de la digestibilidad de MO y de la MS, esto se debe a la baja correlación de éstas con los valores correspondientes a las digestibilidades in vivo

Este método, además de ser reproducible y muy fácil de manejar, entrega valores de digestibilidad in vitro similares a los obtenidos con métodos in vivo, utilizando ovejas, siendo posible su introducción a la evaluación rutinaria de muestras de alimentos.

El método in vitro tiene la dificultad que presupone el tener que mantener animales fistulados en el rumen, que deben ser de la misma especie, ya que se ha observado que con la utilización de jugo ruminal de especies diferentes, se obtienen resultados distintos .

Se ha observado que el método in vitro subvalora la digestibilidad en aquellos rangos inferiores a 65 %, lo cual puede deberse a falta de tiempo de fermentación con licor ruminal, especialmente en forrajes de menor calidad.

La técnica de digestibilidad in vitro o del rumen artificial ha sido utilizada ampliamente para estimar la digestibilidad de los forrajes, debido sus principales ventajas.

- Los coeficientes de digestibilidad pueden ser determinados simultáneamente en un gran número de muestras.
- El tiempo requerido por muestra es mínimo en comparación con otras técnicas.
- Se requiere únicamente una muestra pequeña para determinar la digestibilidad.
- El grado de precisión obtenido es muy alto, para estimar o predecir la digestibilidad in vivo. Tilley y Terry (1963) sugieren que la digestibilidad in vitro (x), por medio de la siguiente ecuación: $Y = 0.99 x - 1.01$, $r = 0.98$
- Holechek (1980) concluyó que la digestibilidad in vitro está más fuertemente correlacionada con el comportamiento productivo del ganado que la PC, la FDA y la lignina, en estudios realizados en pastizales nativos.
- La digestibilidad in vitro puede ser convertida en energía digestible por medio de las ecuaciones de Rittenhouse y otros 1971.

$$ED = 0.07 \text{ DIVMO} - 8.13 \quad r = 0.956$$

$$ED = 1.02 \text{ DIVMS} + 0.54 \quad r = 0.939$$

Donde :DIVMO (digestibilidad in vitro de la materia orgánica).

DIVMS (digestibilidad in vitro de la materia seca).

Producción de gas in vitro.

Las técnicas in vitro prometen en el futuro ser una herramienta importante para la evaluación de alimentos para el rumiante.

Los primeros estudios de estequiometría de fermentación ruminal (Mende y Ehrensvard. 1974) citados por Mende et al. (1980). Ellos observaron que el grado de producción de gas era constante (CO₂ y CH₄) con el mismo sustrato y la misma cantidad.

Menke et al., 1980 estimaron a través de modelos de regresiones la relación existente entre medidas in vivo e in vitro. Todas las comparaciones fueron hechas en base a

Materia Seca. En donde la producción de gas (Gb) es definida como el aumento total del volumen ($v_{24} - v_0$) menos el volumen inicial (Gb0), multiplicado por la media de los factores Fh y Fhs (ml/24Hs).

$$Gb = (v_{24} - v_0 - C_{bo}) (F_h + F_{hs})/2.$$

La materia orgánica (DO, g/Kg OM) es dada por la siguiente ecuación:

$$DO = 7.65 (+ 0.0062) Gb + 353 (+ 0.59)$$

Siempre la producción de gas fue más reflejada en el contenido de carbohidratos digestible que de proteína y grasa en análisis de regresión múltiple donde contenían esos nutrientes en forma cruda.

$$DO = 13.3 (+ 0.22) Gb - 0.05 (+ 0.002) Gb^2 + 511 (+ 5.7) XP + 76 (+ 25.0) XL + 91.2 (+ 0.31). R = 0.96.$$

Donde = XP y XL es proteína cruda y grasa cruda respectivamente.

Para calcular la energía metabolizable (ME; MJ/Kg M.S.) se utilizó:

$$ME = 15.2 DP + 34.2 DL + 12.8 DF + 15.9 DX.$$

Donde : DP, DL, DF, DX = g proteína cruda digestible, grasa, fibra y extractos libres de Nitrógeno/g M.S. de el alimento respectivamente, medidos en trabajos de digestión con ovinos.

La explicación del alto grado de correlación entre producción de gas in vitro y digestibilidad de EM in vivo puede ser probablemente fundamentada en el hecho que estos métodos no son basados en los procesos de filtración para separar el material digestible del indigestible y en este paso difieren entre casi todas las otras técnicas in vitro.

Además la separación de esto materiales no puede dar información completa en cuanto a digestibilidad, porque algunas sustancias totalmente indigestible o menos digestible pueden pasar el filtro.

La diferencia entre in vivo e in vitro con los alimentos es por lo tanto debido a diferencia de grados de pasaje entre ellos y tiempo de retención en el rumen y de la mejor utilización en el intestino delgado de esos nutrientes cuando escapan fermentación microbial en el rumen.

La incubación por 24 Hs puede ser apropiada para alimentos con grado de pasaje medio, pero no para esos con largos tiempos de retención en el rumen.

Otro posible factor de interferencia son la presión atmosférica, el pH de la muestra y el contenido de ácidos orgánicos en el alimento

Metodología

Este método se realiza in vitro, mediante el cual se mide la cantidad de gas producido en un determinado momento, de una muestra con inóculo obtenido de una animal fistulado que recibe una dieta constante a base de heno de alfalfa.

El fundamento de esta técnica es que la producción de gas es proporcional a la masa microbiana, donde la mayor cantidad del gas producido deriva fundamentalmente de los carbohidratos.

En la producción de gas la materia orgánica fermentada, se distribuye entre AGV, gases, y microbios; sin embargo a igual cantidad de M.O. fermentada la producción de gas puede ser distinta según la tasa metabólica utilizada (Beuvind et al., 1994). Por lo tanto si existe una nueva fermentación de microbios estos pueden producir AGV y gas, que no representaría a la muestra en estudio.

La muestra a estudiar se coloca en pequeños frascos de 100 ml con varias repeticiones, simulando las condiciones de rumen, a 39 °C asegurándose un medio de anaerobiosis por el cual se gasifica con CO₂. En estas incubaciones que se realizan se puede registrar la cantidad de gas producido a diferentes tiempos.

Cada botella se conecta, a través de una válvula de triple entrada, al traductor, a una jeringa de plástico graduada de 5 o 10 ml de capacidad y una aguja hipodérmica que se inserta en la botella de fermentación a través del tapón de goma.

Las lecturas de gas acumulado en el tiempo se realizan con un transistor de presión (Bianco A. M. 1997 comunicación personal).

Actualmente existe sistemas computarizados donde en una única muestra incubada se puede medir el gas producido en diferentes tiempos y durante largo periodos, donde el gas es recolectado por un terminal conectado a una computadora (comunicación personal Ana Bianco, 1997).

ESTUDIOS IN VITRO PARA DETERMINAR LA FERMENTACIÓN RUMINAL Y ACTIVIDAD DE LOS MICROORGANISMOS.

Los métodos utilizados se pueden dividir dentro de dos grandes categorías: 1) Los que se basan en la incubación con fluido ruminal y 2) aquellos que utilizan enzima purificadas.

El interés se ha focalizado principalmente en las tasas de producción de AGV, gas o tasas de desaparición de sustrato. La medición de la producción de gas es relativamente fácil y sencilla. Sin embargo la interpretación no es fácil ya que el gas producido deriva de dos fuentes: la producción directa de CO₂ y metano y la producción indirecta de CO₂ proveniente de la acción de los AGV sobre el bicarbonato en el fluido ruminal y del buffer adicionado y además éste varía con la mezcla de AGV (Beuvind, 1993)

El método con enzimas purificadas ha recibido atención como consecuencia de las tasas de ruptura del almidón con enzimas de origen animal y de los microorganismos (Cone, 1991) También se han usado enzimas purificadas, como la amilasa bacteriana (Bruni M.A. 1997)

Las técnicas in vitro o in situ empleadas en estudios de cinética de digestión, basadas en análisis de residuos no digeridos o fermentados a diferente tiempos de incubación, presentan una serie de desventajas, entre las que se pueden mencionar, alto costo cuando se quiere estudiar la cinética del proceso, y el hecho de que no se puede determinar el rol de los componentes solubles del forraje (Pell y Schofield, 1993; citados por Bruni, 1997).

Bruni, 1997; utilizó como alternativa a la desaparición de sustrato, la medición de la producción de gas como medida del metabolismo del carbono. Esta técnica puede ser utilizada para estudiar la fermentación de los alimentos, tomando en cuenta los eventos de las primeras etapas del proceso de digestión.

Ventajas y desventajas

- Es una técnica muy difícil de interpretar en cuanto a la producción de gas se refiere.
- No resulta comparable entre diferentes laboratorios, puesto que no tiene un mismo comportamiento el gas producido, se rige por la ley de los gases, varía de acuerdo a la altitud y latitud.
- La producción de gas no es propia de la degradación de Hidrato de Carbono (dioxido de carbono y metano) si no que además existe una producción indirecta de dioxido de carbono que es proveniente de los AGV sobre el bicarbonato en el fluido ruminal.
- Se utiliza un gran número de muestras, es un método rápido.
- Se puede determinar la digestibilidad o digestión de la muestra a distintas horas.
- En forma manual es muy laborioso, demanda mucho tiempo, personal y aumenta los costos.
- En el sistema computacional actual se utiliza una botella para determinar la producción de gas a lo largo de un período, en cambio en el sistema manual se necesitan tantas muestras como número de lecturas se realicen.
- Permite estudiar la digestión a diferentes tiempos.

Método Enzimático.

Muchos intentos se han realizado para hacer técnicas simple para determinar la digestibilidad de alimentos para rumiantes, uno de los más antiguos es el método de Fibra Cruda, que no proporciona una medida verdadera de los componentes de la fibra. Asociados a los métodos de las fibras es el uso de detergentes neutro introducido por Van Soest., (1967) que proporciona una medida de los constituyentes totales de la pared celular, celulosa, hemicelulosa y lignina y la Fibra Detergente Acido contenidos de celulosa y lignina; el método presenta correlación inversa con los valores de digestibilidad porque varía con la digestibilidad de la pared celular de las plantas (Dowman et al., 1982)

La técnica de Tilley y Terry es la que estima la digestibilidad mas precisa que muchos métodos químicos simples. Sin embargo la técnica de fermentación ruminal es dependiente del licor ruminal proveniente de un animal fistulado alimentado bajo condiciones controladas.

Ultimamente se han desarrollado técnicas de predicción de la digestibilidad in vitro de alimentos de ganado, utilizando enzimas con el fin de reproducir la actividad celololítica que presentan los microorganismos ruminales.

Los valores de energía son determinados por la composición química y la digestibilidad de los animales, la determinación in vivo es poco practica, lo que trajo aparejado el desarrollo de métodos laboratoriales, simulando los procesos de digestión, para tal fin se usaron fluidos ruminales obteniendose mucha precisión pero moderadamente reproducibles y desagradable para el animal fistulado (Rohr and Potthast, 1991) estas desventajas pueden ser evitadas con el uso de enzimas comerciales.

Con el objetivo de reemplazar el licor ruminal, Jones y Hayward, (1975) emplearon la preparación con enzimas. Con las técnicas enzimáticas es importante que el material sea preparado de una manera determinada para que la enzima sea capaz de penetrar y reaccionar con el sustrato.

Muchos trabajos observaron que el pre - tratamiento de material molido, seco y diluido con pepsina en ácido clorhídrico, al parecer produce una porosidad sobre la pared celular que facilita la adherencia de la enzima para que esta pueda actuar o bien causa la degradación del material proteico (Kirchessner and Kellner citado por Dowman 1982).

Dowman et al., 1982 realizaron seis técnicas con enzimas con la finalidad de predecir la digestibilidad in vivo de los alimentos.

Los reactivos utilizados derivados de las celulasas fueron de *Trichoderma viridae* y *Aspergillus niger* los cuales fueron disueltos en acetato, y el pH fue ajustado a 4.8 por la acción de hidróxido de sodio.

Las técnicas seleccionada fueron la versión modificada por Jones y Hayward, (1975) La muestra fue molida y pasada a través de una criba de 0.75 mm , 0.2 g de muestra fueron incubadas a 40 °C con 20 ml al 0.2 % de pepsina diluida en ácido clorhídrico por 24 Hs. El líquido sobrenadante es recogido, se le adiciona 20 ml de solución de celulasa (10 g celulasa litro⁻¹) y la muestra es llevada al incubador por 24 Hs a 40 °C.

El residuo fue colectado secado y pesado, se lleva a mufla 520 °C por 4 hs, es enfriado y pesado, consecutivamente se determina el porcentaje de materia orgánica digestible.

Otros trabajos prefieren realizar la prueba con mayores concentraciones de celulasas por lo que podría resultar en una mejor descomposición del material celulolítico y dar valores de correlación más cercano con los de digestibilidad in vivo.

La versión utilizada por Clark y Beard, (1977) usando celulasa derivada de *Aspergillus niger* fue probada para ensilajes, pastos secos y cereales considerando que los resultados de estas mediciones son eficientes.

Los trabajos realizados por Roughan y Holland, (1977) difieren de los otros anteriormente mencionados porque fue usada solución de fibra detergente neutro para separar la pared celular antes de ser atacado por celulasas acondicionadas.

Resultados para alimentos individuales.

Los datos mostrados por Dowman , (1977) utilizando las diferentes versiones de celulasas pueden ser usados para predecir la digestibilidad de los alimentos con bastante precisión comparada con la técnica de Tilley y Terry (1963).

La celulasa derivada de *Trichoderma viridae* dan mejores correlaciones para forrajes que celulasas derivadas de *Aspergillus niger* pero esta última presento mejores correlaciones para productos altos en almidones.

Existe como problemas en las comparaciones con otras pruebas in vivo puesto que ciertos alimentos no se pueden dar solos como ingredientes en la dieta de los animales porque producirían trastornos metabólicos y en el peor de los casos la muerte.

Resultados en alimentos completos.

Las correlaciones obtenidas para las diversas técnicas con enzimas muestran correlaciones altas ($r^2 = 0.94$) lo que sugiere que todos los métodos descritos pueden ser usados para predecir las alimentos completos.

Recomendación:

Estos trabajos demuestra que las técnicas de predicción de digestibilidad a través del uso de enzimas, especialmente *T. viridae.*, pueden usarse en los laboratorios como método de rutina.

Sin embargo, cuando se utiliza pepsina - celulasas, se subestima la digestibilidad de la fruta de palma y otros. Boever et al., (1994) adicionaron gamanasas con lo cual el concluyó en su trabajo, que con el uso de gamanasa y celulasas se logra una mejor estimación de la digestibilidad de estos productos que cuando se dan solos.

En general, en los forrajes verdes de alta digestibilidad in vivo, los métodos enzimáticos han dado resultados muy eficientes. Sin embargo, a medida que el valor de la digestibilidad in vivo de la Materia Organica disminuye y / o se incluye muestras heterogeneas en su composición química, los resultados ya no son tan satisfactorios (Riveros et al., 1994)

Ventajas y desventajas

- Permite estudiar un gran número de muestras, en un menor tiempo y con un menor costo.
- Este método es fácil de reproducir en los laboratorios, comparables entre ellos y entrega valores muy correlacionados a los métodos in vitro.
- El método con enzimas tiene la ventaja de no necesitar de un animal fistulado.
- Requiere de menores cantidades de muestra, y se puede determinar la digestibilidad a un gran números de muestras simultaneamente.

Método “in situ”

Un método alternativo, dentro de los que se realizan bajo condiciones in vivo, es el método de la bolsa de nylon o in situ que tiene la ventaja, que la muestra es fermentada dentro del rumen del animal.

Los valores obtenido debieran ser cercanos a la digestibilidad aparente (DAP). Además, es un técnica simple que no requiere infraestructura especial y que permite el estudio de un mayor número de muestras que la (DAP). Este método ha sido utilizado en diversos países para determinar el grado y tasa de degradación de forrajes, alimentos toscos, suplementos proteicos y sus constituyentes.

Tiene la ventaja de permitir el estudio de la evolución de la degradabilidad en función del tiempo de permanencia en el rumen, y de medir los efectos de diferentes factores ruminales sobre la tasa de digestibilidad de los distintos nutrientes.

Esta técnica ha sido estudiada por diversos investigadores, tanto para determinar su valor de estimación de la digestibilidad (Mehrez y Orskov, 1977; Lusk et al., 1962 citados por

Cerda et al., 1986), o para estudiar la tasa de degradación de los forraje y de sus componentes nutritivos de los alimentos en el rumen (Orskov et al., 1980).

El éxito de la técnica *in situ* va estar determinado por diversos factores como: el material de la bolsa, tratamiento, preparación y tamaño de la muestra, posición del rumen, tiempo de incubación, repeticiones, número de bolsas incubadas, dieta del animal, y lavado de la bolsa.

Este método está afectado por diversos factores que es necesario estudiar para obtener su adecuada validación del método y seguridad en su valor predictivo.

Se ha utilizado diferentes materiales indigestibles en la confección de las bolsas. Se utilizaron bolsas de tela de nylon sencilla Mehrez y Orskov, 1977 utilizaron material de dacrón obtenido de un paracaídas viejo.

Existen dos factores que determinan el tamaño de la bolsa. Por una parte, se requiere de una bolsa lo suficientemente grande en relación a la muestra, que asegure la entrada de líquido ruminal y le permita mezclarse con la muestra; como así también debe ser suficientemente pequeña, para que pueda ser retirada sin dificultad a través de cánula. el tamaño recomendable de la malla en las bolsas de nylon deberá ser de 20 a 40 (micra, lo que proporciona orificios de aproximadamente 400 a 1600 (micra cuadradas).

Orskov et al., (1988) señalan que el tamaño más usado es de 14 x 9 cm para la incubación de 5 gr. de muestra; sin embargo, otros investigadores utilizan bolsas de tamaño variado.

La preparación de muestras, cuando se trabaja con forrajes frescos y alimentos succulentos, presenta un grado de dificultad, esta se hace sencilla cuando se trata de alimentos secos.

El tamaño de la partícula determina la superficie del sustrato expuesta a la acción microbial, y por lo tanto, afecta la tasa de desaparición de la materia seca.

Algunos trabajos han indicado que existe movimiento pasivo de partículas parcialmente digeridas desde y hacia el rumen; sin embargo, debido a que los valores de digestibilidad para los métodos *in vivo* e *in situ* similares, se ha concluido que esta fuente de error es muy pequeña.

Mehrez y Orskov 1977 incubaron cuatro bolsas en el rumen de ovejas durante veinticuatro horas y obtuvieron un incremento promedio después de la incubación de 0.03 gr. Este es un error aceptable según autores.

En todos los experimento, aproximadamente el 1 % de la muestra, se pierde pasivamente a través de la bolsa, así señalan Hopson et al 1963. Otras investigaciones con hierba deshidratada han encontrado pérdidas de hasta un 20%, y de un 60% con bagazo de caña de azúcar finamente molida Orskov et al 1980.

La cantidad de muestra es un factor que está relacionado con el tamaño de la bolsa; sin embargo, la muestra debe tener un tamaño mínimo que provea material suficiente y adecuado para el análisis posterior a la incubación.

La posición de las bolsas en el rumen es otro factor importante, Mehrez y Orskov 1977 indican que es posible que algunas de las bolsas floten en el contenido ruminal y probablemente no se sumerjan; por lo tanto, no son sometidas a la acción microbial.

Se coincide en varias investigaciones en la utilización de pesos amarrados a las bolsas para anclarlas en el saco ventral del rumen. Mehrez y Orskov 1977 ataron un peso de 40 gr. al fondo de cada bolsa para evitar que flotarán; sin embargo, no se redujo la variabilidad en la desaparición de materia seca entre bolsas.

Los tiempos de fermentación constituyen uno de los factores determinantes, y al respecto Orskov et al 1980 indican que los concentrados requieren de 12 a 36 hs; los forraje de alta calidad, de 24 a 48 hs y los forrajes de menor calidad de 48 a 72 hs. Van Keulen y Heinemann, 1962 citados por Cerda et al, 1986 determinaron que en heno de alfalfa el tiempo de estabilización se alcanzó a las 24 hs y en el pasto ovillo a las 96 hs.

Otro factor importante para Cerda et al., 1986 es el número de repeticiones tanto de bolsas por animal como de animales por muestra. Al respecto, Mehrez y Orskov 1977 indican que la varianza entre animales es mayor que entre las bolsas dentro de un animal, y algo inferior entre series de repeticiones. Estos mismos autores señalan que es preferible no incubar más de cinco bolsas en el rumen de cada oveja al mismo tiempo, a fin de evitar dificultades técnicas al sacarlas del rumen.

La dieta del animal puede tener un efecto importante sobre la tasa de degradación del material que se incuba, ya que determinará el tipo de microorganismos existentes y el nivel de actividades de éstos, lo que influye en la velocidad de degradación del material que se incuba. Orskov et al 1980 citan, un ensayo en el que, los animales reciben un alto suministro de concentrado, tienen una reducida actividad celulolítica en el rumen. Así este mismo autor encontró que los suplementos proteicos de origen vegetal son degradados más lentamente en animales alimentados con concentrados que en aquellos alimentados con forrajes.

Validez del método "in situ"

De acuerdo con numerosos estudios se ha podido concluir que el método de digestibilidad in situ constituye un buen estimador de la digestibilidad aparente de los alimentos.

Hopson et al 1963 encontraron que los coeficientes de digestibilidad obtenidos a través de los ensayos convencionales, tuvieron una escasa relación con los datos obtenidos a través de la digestibilidad en bolsa, a excepción de la digestibilidad de la celulosa que dio coeficientes de correlación de 0.52 y 0.54 a las 36 y 42 hs, respectivamente.

Indicaron que el uso de períodos mayores que 48 hs podían haber determinado correlaciones cercanas con los datos de digestibilidad aparente para los demás nutrientes.

Una correlación de 0.83 entre el método de la bolsa y nylon y el método convencional para la digestibilidad de la celulosa encontró Wanapat et al 1980. Estos autores usaron muestras de 3.0 gr y períodos de incubación de 48 y 72 horas, compararon el efecto de diferentes tratamientos sobre el valor nutritivo de la paja de cebada a través de los métodos de DAP (digestibilidad aparente) y DIS (digestibilidad in situ).

Encontrando que la DIS estaba altamente correlacionada con la DAP ($r=0.95$). También observaron que la DIS subestimó la DAP de la paja sin tratar, pero la DIS fue mayor que la DAP en el caso de la paja tratada con Na OH húmedo.

Ventajas y Desventajas

- Esta técnica requiere únicamente de un mínimo de equipo de laboratorio (balanza analítica, y horno de secado)
- Requiere una cantidad pequeña de muestra.
- Requiere de poco tiempo para realizarla.
- No requiere de personal altamente entrenado.
- Esta técnica no toma en cuenta la digestión de los forrajes que se lleva a cabo en el tracto digestivo posterior, por lo que los resultados obtenidos son invariablemente mayores a los obtenidos con otros métodos.
- Los resultados obtenidos son muy variables.
- La precisión de esta técnica no ofrece una buena confiabilidad en los datos para calcular el consumo de forraje.
- Permitir el estudio de la evolución de la degradabilidad en función del tiempo de permanencia en el rumen, y de medir los efectos de diferentes factores ruminales sobre la tasa de digestibilidad de los distintos nutrientes.
- Estudios indican que la varianza entre animales es mayor que entre las bolsas dentro de un animal, y algo inferior entre series de repeticiones

Método NIRS

Este método conocido como near - infrared spectroscopy, es una variante del método in vitro que consiste en tomar una muestra pequeña de un alimento y a través de la absorción de luz de rayos infrarojos poder evaluar los mismos.

Este método trabaja con un espectro de luz por el cual la absorción de rayos infrarojos a diferentes frecuencias es proporcional a la cantidad en que se encuentran los grupos químicos.

La literatura actual, ahora tiene evidencia convincente para varios tipos de forrajes con exitosas calibraciones, el NIRS pueden ser desarrolladas para medir la digestibilidad y concentración de energía metabolizable medidas in vivo (Barker et al., 1994).

Este método sirve para predecir la calidad de forraje que se aporta en la dieta, como así también para determinar las muestras fecales, a través de un método no tradicional, en forma rápida y precisa convirtiéndose de esta manera en una herramienta extremadamente útil tanto para el area de producción como para investigaciones (Lyons et al., 1991).

Así es como trabajos realizados con extrusados (Holechek et al., 1982; Stuth et al., 1989) e investigaciones llevadas a cabo por Brooks et al. (1984) y Coleman et al. (1989) con materia fecal recomiendan el análisis de NIRS para determinar la digestibilidad de los forraje.

Las muestras fecales podrían tener algunos aspectos por el cual se podría descomponer rápidamente y alterar la precisión del análisis de NIRS puesto que este método es muy sensible a las variaciones que pudieran existir (Lyons et al., 1991)

El NIRS tiene varios factores como ser el molido, hidratación y el proceso de secado de las muestras que causan problema en la predicción tanto del forraje como en la materia fecal y por lo tanto requiere una mayor investigación .

De esta manera Williams (1987) mencionado por Lyons et al., (1991) concluye que el aumento de la temperatura que ocurre durante el molido de la muestra, es un factor que altera la precisión del análisis del NIRS debido a la sensibilidad de este método por lo tanto es importante examinar los efectos de molienda para predicciones de materia fecal.

En la metodología usada por Lyons et al., (1991), se tomaron las muestras seleccionadas se secaron con horno con aire forzado a 60 °C por 48 Hs, después del secado las muestras fueron pulverizadas para facilitar la rehidratación, debido a que las ecuaciones usadas fueron desarrolladas con calibraciones en el cual las muestras fueron rehidratadas en ambientes húmedos.

Posterior al período de rehidratación las muestras fueron molidas con molinos y cribas de 1 mm, para reducir el tamaño de partícula y asegurar la uniformidad del tamaño mejorando la precisión de los resultados.

Estas muestras fueron introducidas en un recipiente tapados con una ventana de cuarzo y sobre esta una cartulina para evitar una difusa refractancia (Williams 1987; citado por Lyons et al., 1991).

Las muestras posteriormente fueron sometidas al scann 4 Hs después del molido, el espectro producido por el scann fueron usados para predecir la digestibilidad in vitro de la materia orgánica (DIVMO) y proteína cruda con ecuaciones predictivas por el método NIRS.

Estas ecuaciones están desarrolladas por regresiones múltiples usando forraje obtenido de cánulas esofágicas y la muestra es analizada por DIVMO (Tilley y Terry, 1963; Van Soest and Wine, 1967) y la proteína cruda por el proceso de micro Kjeldahl (AOAC, 1975).

En trabajos realizados por Barber et al. (1991) demostraron que el método NIRS, basados en ecuaciones de regresiones múltiples usando períodos de 8 espectro es el mejor predictor de la digestibilidad de materia orgánica (OMD) in vivo de ensilaje en comparación con métodos basados en mediciones de fibra, técnicas enzimáticas y métodos in vitro.

Lyons et al. (1991) concluye que no fueron estables por un tiempo sustancial después del secado y este factor estaría impidiendo el rápido análisis de la muestra, además la rehidratación tubo un marcado efecto en la predicción (DIVMO) Y (PC) por NIRS en donde la PC fue mas rápida y más consistente que la predicción de (DIVMO).

Baker y Barners (1990) informaron sobre algunos problemas encontrados cuando introducen ecuaciones predictivas NIRS para ensilaje como método de rutina. Estos incluyen errores introducidos por variaciones en el tamaño de la partícula y la humedad residual contenida en la muestra.

Además, los resultados de ensayos con rehidratación sugiere que la humedad de la muestra debe ser considerada en los procesos de calibración, para que sean reproducibles cuando se analicen muestras desconocidas. De esta manera si la humedad de la muestra no es tomada en cuenta por los laboratoristas para calibrar el NIRS, nunca habría seguridad que la muestra desconocida fue bien analizada.

Winch y Major (1981) en sus primeros trabajos demostraron que cuando usan el método NIRS para predecir digestibilidad in vitro e in vivo, las predicciones más precisas fueron obtenidas con forrajes de (920 - 950 g/Kg) que con forrajes de menor (870 - 910 g/Kg) contenido de Materia Seca. Esta fue también confirmado por estudios más recientes con heno (Kjos, 1991).

La influencia de humedad residual en el espectro de ensilajes es también evidente en el trabajo realizado por Barker et al., (1994) como el principal efecto en la región de 1850 - 2000 nm.

Queda demostrado por Barker. (1994) de la sensibilidad de las calibraciones con respecto a las pequeñas variaciones en el contenido de humedad en las muestras, por lo tanto a futuro habría que encontrar calibraciones satisfactorias para más componentes como nitrógeno y ácidos grasos volátiles en ensilajes frescos (Abrams et al., 1988.)

Williams, 1987 fundamenta la importancia de estandarizar los niveles de humedad debido a la posibilidad de que una muestra con dos constituyentes uno de baja humedad y otro con alta afinidad por el agua, reduce el estado de hidratación del otro constituyente. De esta manera puede ocurrir cambios en la orientación espacial de la moléculas resultando en diferentes near-IR absorbidos favoreciendo al constituyente privado de humedad.

Ventajas y desventajas

- Es un método rápido, preciso y confiable
- Requiere de una pequeña cantidad de muestra.
- El tiempo requerido por muestra es menor con relación a otros métodos.
- Requiere de personal capacitado, de mucho tiempo laboratorial y diferentes muestras para una correcta calibración.
- No considera los efectos asociativos o interrelaciones entre nutrientes.
- Una vez calibrado requiere de menos personal laboratorista, que por su puesto se traduce en menor tiempo y a un menor costo.

Este método es fácil de reproducir en los laboratorios, comparables entre ellos.

Factores que afectan la digestibilidad. (Church, 1974)

1. Nivel de nutrición Forbes y Mitchell demostraron que un aumento en el nivel de nutrición produce una disminución en la digestibilidad de los alimentos energéticos, aunque el efecto es menos claro sobre otros nutrientes si se miden en términos de digestibilidad aparente. La digestibilidad verdadera para los alimentos orgánicos, probablemente disminuye a medida que aumenta el aporte, debido a su paso más rápido a través del tubo digestivo.
2. Cantidad de fibra y / o lignina en el alimento. Como norma general, disminuye la digestibilidad de los alimentos a medida que aumenta el porcentaje de fibra. Sin embargo, el contenido en lignina está altamente relacionado con el contenido en fibra, por lo que es muy difícil separar ambos efectos. El efecto de enmascaramiento físico y químico de la lignina, aparentemente impide la acción de las celulasas microbianas sobre la fibra en tales casos. En un ejemplo citado por Blaxter (1962) la energía digestible disminuyó de un 83% en un primer corte del raigrás hasta el 63 % en el cuarto corte. Al menos una parte de esta disminución se debe al aumento en fibra y lignina. En los forrajes, el factor fibra-lignina es uno de los principales factores que producen el descenso.

3. Diferencias entre las distintas especies. Hay muchos estudios comparativos entre las distintas razas de ganado vacuno europeo y de ovejas, aunque los resultados son poco concluyentes. En un estudio comparativo de los datos publicados, Cipalloni et al., (1951) encontraron que el ganado vacuno digería mejor los alimentos groseros que la oveja, mientras que esta última digería más eficazmente los concentrados, particularmente las fracciones del extracto etéreo. Swift y Bratzler (1959) compilaron datos procedentes de muchas estaciones experimentales sobre 28 clases de forrajes, encontrando que no había diferencias significativas entre ambas especies en cuanto a la digestibilidad de materia seca, proteína bruta o energía digestible. Alexander et al., (1962) publicaron también resultados comparables. La digestibilidad de gran variedad de henos de hierba de baja calidad o bajo contenido en proteínas mejor que el ganado vacuno.

Hungate et al., (1960) realizaron estudios sobre la digestión del rumen, indicando que el cebú produce fermentaciones más rápidas que las razas europeas. Ichhponani et al., (1962) encontraron que la celulosa digerida por el búfalo acuático lo es más rápidamente en el rumen que en el cebú. Pant et al. (1963) sitúan al búfalo, oveja y cabra, en este orden, respecto a la eficacia de la utilización ruminal. En consecuencia, basándonos en los estudios sobre fermentaciones en el rumen, podemos concluir que hay probablemente diferencias entre las distintas especies.

4. Deficiencias nutritivas. Muchos experimentos indican que una deficiencia absoluta o relativa de proteínas produce una marcada reducción en la energía digestible. En los rumiantes se debe probablemente en su mayor parte al efecto depresor de esta carencia sobre la actividad microbiana. Otras deficiencias, como las de vitaminas A, ejercen su efecto por la diarrea que provocan. A veces se ha achacado también al fósforo como causa de deficiencias, pero su efecto parece ser relativamente pequeño.
5. Factores que afectan el apetito. Cualquier cosa que modifique significativamente la toma de alimentos, cabe esperar que produzca algún efecto. Esto podría incluir la naturaleza física de la ración, así como la presencia o ausencia de factores nutritivos o apetitosos incluido el agua.
6. Frecuencia de la alimentación incrementa la digestibilidad, como han demostrado Gordon y Tribe (1953), Campbell y Merilan (1961) y Clark y Keener (1962). Además, los datos presentados por Gordon y Tribe (1952), Rakes et al., (1961) y Graham (1967) indican que hay menos pérdida de calor y mejor retención de N, aunque piensan que puede haber escasa diferencia en cuanto a la digestibilidad.
7. Preparación del alimento. Se ha escrito mucho acerca de este tema. Los resultados indican, en general, que el molido, rotura o troceado de los granos aumentan su digestibilidad. El granulado se ha demostrado que tiene escaso efecto sobre los granos y produce un descenso en la digestibilidad de los forrajes, aunque aumenta significativamente el consumo de los mismos. El calor puede mejorar algunas proteínas, pero un exceso llega a reducir la digestibilidad. El macerado o tratamiento con vapor mejora la utilización de los hidratos de carbono de los granos.
8. Efecto asociativo de los alimentos. Hemos hablado propiamente a propósito de este hecho, pero por desgracia la información acerca de su importancia es muy escasa. Los pocos ejemplos que conocemos indican que puede ejercer un efecto muy sustancial sobre la digestibilidad.

9. Adaptación a las modificaciones de la ración. Al contrario de lo que sucede en los monogástricos, los rumiantes no crecen bien si se les administran dietas muy variables, ya que producen variaciones en la población microbiana del rumen, que requieren cierto tiempo para ajustarse al nuevo alimento. Una consecuencia de las variaciones de la ración puede ser el descenso de la digestibilidad hasta que ocurre tal adaptación. Datos procedentes de diferentes autores indican que los animales necesitan de 2 a 3 semanas para poder ajustarse a estas variaciones cuando se van a hacer ensayos de digestión, con el fin de conseguir una estimación razonablemente buena de la digestibilidad. Naturalmente, el tiempo que se requiere dependerá de la magnitud del cambio que introduzcamos.

Conclusión:

La digestibilidad total del conducto gastrointestinal no tiene en cuenta el punto de la digestión de los diversos nutrientes y en consecuencia, no reflejan la naturaleza de los productos finales digestivos que son absorbidos desde el tracto gastrointestinal.

La digestibilidad depende en gran parte de la composición en nutrientes del alimento/dieta estudiado, aunque se ve afectada también por factores no relacionados con la composición.

CONCLUSIONES PERSONALES

Los forrajes, como todos los alimentos para el ganado, están compuestos por una diversidad de moléculas de diferentes tamaños y propiedades, lo que determina una gran variabilidad en la eficacia del proceso digestivo de un determinado animal para los diversos alimentos.

Esto hace que la valoración de los alimentos se constituya en una herramienta fundamental, pues permite evaluar un alimento dado para contribuir a satisfacer las necesidades nutritivas de los animales y medir características definidas que potencien o limiten su inclusión en una ración para animales.

BIBLIOGRAFIA

- Abrams, S.M., Shenk, J.S. and Harpster, H.W., 1988. *Potencial of near infrared reflectance sepectroscopy for analysis of silage composición*. J. Dairy Sci., 71 : 1955 - 1959.
- Alderete G., J.L., 1991. *Nutrición de Rumiantes en Pastoreo*. Colección textos universitarios Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Barber, G.D., Offer, N.W. and Givens, D.I., 1989. *Predicting the nutritive value of silage*. In: W. Haresign and D.J.A. Cole (Editor), Recent Advances in Animal Nutricion - 1989. Butterworths, London, pp. 141 - 158.
- Barker, C.W. and Barnes, R.J., 1990. *The application of near Infrared Spectroscopy to Forage Evaluation* in ADAS. In: J. Viseman and D.J.A. Cole (Editors), Feedstuff Evaluation. Butterworths, London, pp. 337 - 352 (mencionado por Barker 1994).
- Barker C.W.; Givens D.I.; Deaville E.R. 1994. *Prediction of organic matter digestibility in vivo of grass silage by near infrared Reflectance Spectroscopy; effect of calibration method, residual moisture an particle size*. Animal Feed Science an Techonology 50: 17 - 26.

- Beuvink, J.M.W. 1993. *Measuring and modelling in vitro gas production kinetics to evaluate ruminal fermentation of feedstuffs*.
- Beuvink J.M.W. and Spoeltra, S.F. 1994. *In vitro gas production kinetics of grass silages treated with different cell wall degrading enzymes* Grass and Forage Science 49:277 - 283.
- Boever, J.L.; Cottyn, B.G. J.M.; Banacker, Ch.; Boucqué, V. 1994. *An improved enzymatic method by adding gamma-mananase to determine digestibility and predict energy value of compound feeds and raw materials for cattle*. J. Animal Feed Science and Technology 47 : 1- 18.
- Broods, III, J., Anderson, M. And Urness, P.J., 1984. *Infrared reflectance analysis of forage quality for elk*. J. Wildl. Manage.,48: 254 - 258.
- Bruni M.A. 1997. *Cinética de fermentación ruminal in vitro de pared celular incubada con extractos de diferentes ensilajes de alfalfa*. Tesis Magister, Pontificia Universidad Católica, Dto Zootecnia.
- Cañas, R.; Aguilar, C; Garcia, F.; Quiroz, R. 1992. *Simulación de sistemas pecuarios*. IICA. Red investigación en sistemas prod. animal de latino américa.
- Cañas, R., 1995. *Alimentación y Nutrición Animal*. Colección en Agricultura Facultad de Agronomía Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Cerda, D.A.; Manterola, H.; Sirhab L.; Alwyn, P., 1986. Validación y Estudios Comparativos de Métodos Estimadores de la Digestibilidad Aparente de Alimentos para Rumiantes. Avances en Producción Animal N° 11 (1-2); 41 -52.
- Cerda, D.A.; Manterola, H.; Sirhab L., 1986. *Validación y Estudios Comparativos de Métodos Estimadores de la Digestibilidad Aparente de Alimentos para Rumiantes*. Avances en Producción Animal N° 11 (1-2); 53 -62.
- Church, D. C., 1974. *Fisiología Digestiva y Nutrición de los Rumiantes*. Vol.1 Fisiología Digestiva. Editorial Acribia. Zaragoza (España).
- Church, D.C. 1993. *El Rumiante, Fisiología digestiva y nutrición*. Editorial Acribia. Zaragoza España.
- Coleman, S.W., Holloway, J.W. and Stuth, J.W., 1989. *Monitoring the nutrition of grazing cattle with near infrared analysis of feces*. XVI Int. Grassl. Congr., Nice, France, 26: 881 - 882.
- D Ascanio 1995. Estudio Dirigido. Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Deschamps, F.C. 1994. *Degradabilidad ruminal da materia seca e da proteína de algunos alimentos utilizáveis na alimentação de rumiantes*. Rev. Soc. Bras. Zoot. Vol 23 N°6.
- Dowman M.G., Collins F. C. 1982. *The use of Enzymes to Predict the Digestibility of Animal Feeds*. J.Sci. Food Agric. 33 689 - 696
- Ehle, F.R. et al., 1983. J.Dairy Sci. 66:181 Supl. 1. En Church, 1993.
- Fahey, J.R., G.C. and H.G.Jung. 1983. *Lignin as a Marker in Digestion Studies*. J. Animal Sci 57: 220.
- Holechek, J.L., Shenk, J.S., Vavra, M. And Arthun, D., 1982. *Prediction of forage quality using near infrared reflectance spectroscopy on esophageal fistula samples from cattle on mountain range*. J. Anim. Sci., 55: 971 - 975.
- Hopson, J.D. et al. 1963. *Evaluation of the dracon bag technique as a method of measuring cellulose digestibility and rate of forage degestión*. J. Ani. Sci. 24:448-453.
- Illanes, A.R. 1989. *Estudio comparativo de las digestibilidades in vitro, in situ y enzimático para 7 forrajes de uso en rumiantes*. Tesis Univesidad de Chile Facultad de Cs Agrarias y Forestales. Escuela de Agronomía.
- Kjos, N.P. 1991. *Evaluation of the feeding. Value of Fresh Forages, Silaje and Hay. Using near infrared reflectance analysis*. J.Agric.Sci 5 : 91 - 78.
- Kotb, A.R. and T.D. Luckey. 1972. *Marker in Nutrición*. Nutr. Abstr. Rev. 42: 28.

- Lascano, C. E. et al., 1990. *Recomendaciones sobre Metodología para la Medición de Consumo y Digestibilidad "in vivo"*. In: M. Ruix y A. Ruiz (De), Nutrición de Rumiantes: Guía metodológica de investigación. ALPA, San José, Costa Rica.
- Le Du, Y.L.P. and Penneng, P.D., 1982. *Animal base techniques for estimating herbage intake*. In: J.D. Leaver (Editor), Herbage Intake Handbook. Br. Grassl. Soc., Hurley, pp. 37 - 75.
- Lyons R.K. and Stuh J.W. 1991. *Procedures for processing cattle fecal samples for NIRS analysis*. Animal Feed Science and Technology. 35 - 21- 36.
- Malossini, F.; Bovolenta, S.; Piasentier, E.; Valentiniotti, M. 1994. *Variability of alkane content in a natural pasture and in faeces of grazing dairy cows*. J. Animal Feed Science and Technology 50: 113 - 122.
- Mc Donald, 1986. *Nutrición Animal*. 3 De. Editorial Acribia, Zaragoza (España).
- Mehrez, A. y Orsdov, E. 1977. *A study of the artificial fiber bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen*. Journal of Agricultural Science Cambridge 88: 645 - 650.
- Menke K.H., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritx D. And Sneider W. 1980. *The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro*. J. Agric. Sci. Camb. 93: 217 - 222
- Mellemburge, R.W. et al. 1970. *An in vitro technique for estimating digestibility of treated and untreated wood*. Journal of Animal Science 30: 1005 - 1011.
- Multifering, R.B. 1982. J. Animal Sci. 55: 432 En Church, 1993.
- Orskov, E.R., Howell, F.D. y Mould, F. 1980. *Uso de la técnica de la bolsa de nylon para la evaluación de los alimentos*. Prod. Animal. Tropical 5: 195-213.
- Riveros, E., 1986. *Digestibilidad de los forrajes como Expresión de su Valor Nutritivo*. Avances en Producción Animal, 11, (1-2), 3 - 25
- Riveros, E; Alvarez, L 1994. *Eficiencia predictiva de un método enzimático para estimar la digestibilidad in vivo de la Materia Organica de una pradera natural mediterranea*. Avances en Producción Animal. 19 (1-2): 77 - 86.
- Rohr, K. And Potthast, V., 1991 *Schätzung des Nettoenergiegehaltes mit der cellulamethode*. Kraftfutter, 12: 566 - 570 citado por Boever, 1994
- Silva, G.M. et al. 1984. *Evaluación del método de digestibilidad in vitro para algunos forrajes en la zona central de Chile*. Avances en Producción Animal 9 1-2:43-50.
- Smith, A.C. 1971. *Determinación de la Ecuación de Predicción de la Digestibilidad in vivo a partir de la Digestibilidad in vitro: Estimaciones in vitro de los elementos nutritivos Digestibles totales (ENDT)*. Tesis. Dpto. Zootecnia. Fac. Agr. Pont. U. Católica de Chile.
- Stuth, J.W., Kapes, E.D. and Lyons, R.K., 1989. *Use of near infrared spectroscopy to assess nutritional status of cattle diets on rangeland*. XVI Int. Grassl. Congr., Nice, France, 26: 889 - 890.
- Tilley, J.M.A. y Terry, R.A. 1963. *A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops*. Journal of British Grassland Society 18:104-111.
- Van Keulen, J. and B.A. Young. 1977. J. Animal Sci. 44:282.
- Van Soest, P.J. 1964. *Development of a comprehensive system of feed anayse and its application to forages* Journal Animal Science 26:119-128.
- Williams, R.C. 1987. *Variables affecting near - infrared technology in the Agricultural and Food Industries*. pp 143 - 167.
- Winch, J.E. and Major, H., 1981. *Predicting nitrogen and digestibility of forge using near infrared reflectance photometry*. J. Can. Plant. Sci., 61: 45 - 51.