

Propuesta de terminología para los reportes de laboratorios de nutrición animal. Nota Técnica

Proposed terminology for animal nutrition laboratory reports. Technique Note

Jaurena¹, G., Wawrzkievicz¹, M. y Colombatto², D.

CISNA - Centro de Investigación y Servicios en Nutrición Animal
Cátedra de Bovinos para carne
Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires

Resumen

La valoración nutricional de los alimentos constituye un eslabón fundamental para el correcto funcionamiento de la agroindustria asociada con la alimentación de animales. El creciente desarrollo de las técnicas analíticas y la mayor difusión de los controles de calidad sobre los ingredientes y alimentos terminados ha generalizado el uso de términos asociados con la calidad de los alimentos, muchas veces pobremente definidos. Los objetivos de este artículo fueron: resaltar algunos conceptos relevantes para determinar el valor de los alimentos para animales; contribuir a mejorar el uso e interpretación de los resultados analíticos; llamar la atención sobre algunos procedimientos y estimaciones que dan lugar a confusiones o malas interpretaciones. Asimismo se propuso un listado de siglas para identificar algunas de las fracciones analíticas frecuentemente usadas en la evaluación de alimentos para rumiantes.

Palabras clave: evaluación de alimentos, incertidumbre, error, fuentes de variación, procedimientos analíticos.

Summary

The nutritional evaluation of feedstuffs is a fundamental link to the proper functioning of the agro-industry associated to feeding animals. The growing development of analytical techniques and wider dissemination of ingredients and finished food quality controls have generalized the use of terms associated with the food quality, often poorly defined. The objectives of this article were: highlighting some relevant concepts in determining the value of feedstuffs; contribute to improving the use and interpretation of analytical results; draw attention to some procedures and estimates that give rise to confusion or misinterpretation. It was also proposed a list of acronyms to identify some of the analytical fractions frequently used in the assessment of food for ruminants.

Key words: feedstuff assessment, uncertainty, error, source of variation, analytical procedures.

Recibido: julio de 2011

Aceptado: abril de 2012

1. Ing.Agr., MSc., PhD, Profesor Asoc. Nutrición Animal. gjaurena@agro.uba.ar

2. Cátedra de Bovinos para Carne.

Introducción

La valoración nutricional de los alimentos constituye un punto clave para predecir la productividad animal en respuesta a diferentes planes de alimentación, diseñar raciones, planificar la compra y cotización de alimentos, programar la necesidad de pasturas y verdes, y la producción de forrajes conservados. Asimismo, es la base para establecer los parámetros de composición normal (o típicos) para las distintas clases de alimentos, y las especificaciones de composición mínimas comprometidas en los balanceados comerciales. Además, contribuye con información básica para los tomadores de decisiones y para los programas de fitomejoramiento forrajero.

El área de la evaluación de alimentos es un componente sumamente importante dentro del campo de la Nutrición, tanto en sus aplicaciones comerciales como científicas. Sin embargo, las investigaciones específicas dentro de esta área suelen ser ignoradas y raramente destacadas o promovidas en las publicaciones de Producción Animal (Uden et al., 2005).

La importancia de que los resultados provistos por los laboratorios sean confiables y comunicados correctamente sin ambigüedades excede las exigencias de los especialistas, dado que en forma creciente la evaluación de concentrados, subproductos, forrajes y silajes es utilizada por extensionistas, productores agropecuarios, industriales y comerciantes. El problema no es exclusivo de nuestras latitudes, ni de nuestro campo disciplinar, sino que ha sido reconocido en otros países y periódicamente ha dado origen a notas editoriales y artículos que intentan consensuar criterios y denominaciones (Southgate, 1973; FAO, 2003; Uden et al., 2005).

La creciente aparición de errores y malas interpretaciones en publicaciones técnicas y científicas, así como en tesis de grado y posgrado, y en presentaciones en reuniones técnicas, llevaron a los autores a considerar la necesidad contribuir a subsanar esta situación. Los objetivos de este artículo fueron:

- Resaltar algunos aspectos relevantes para el área de la Evaluación de Alimentos.
- Contribuir a mejorar el uso e interpretación de los resultados analíticos de los alimentos para animales.
- Llamar la atención sobre algunos procedimientos analíticos y estimaciones frecuentemente solicitados a los laboratorios de evaluación de alimentos para animales que dan lugar a confusiones o malas interpretaciones.
- Proponer un listado unificado para el ámbito de la lengua castellana de las siglas empleadas para identificar algunas de las fracciones analíticas frecuentemente usadas en la evaluación de alimentos para rumiantes.

Fuentes de Variación de la Calidad de los Alimentos

La calidad de los alimentos, tal como la percibimos dentro del campo de la Nutrición Animal, es la expresión de la interacción entre el animal y el material que consume. Con el propósito de acotar la magnitud de estas interacciones, y de darle al sistema de evaluación de alimentos un marco de racionalidad relativamente sencillo, es necesario estandarizar algunas condiciones básicas de medición (e.g. salud animal, nivel de consumo).

El sistema de evaluación de alimentos intenta calificar a los alimentos, principalmente por su capacidad de suministrar nutrientes y energía, y de transformarlos en productos (e.g. trabajo, carne, leche). En este contexto, suele asumirse que la respuesta animal es comparativamente reproducible (una vez definida la especie y categoría), y por el contrario, se asume (tácitamente) que la calidad del alimento es variable (Van Soest, 1994; Jaurena y Danelón, 2006). Este enfoque particular orienta buena parte de la forma en que se estudia la interacción entre alimentos y animales.

Los alimentos varían ampliamente por su capacidad para sostener los procesos de mantenimiento y producción (e.g. crecimiento,

reproducción y lactación) del ganado, debido fundamentalmente a las variaciones en el contenido de nutrientes y sus propiedades físico-químicas. La evaluación de los alimentos involucra la correcta obtención e identificación de la muestra, el trabajo analítico propiamente dicho y la interpretación de los resultados y, cuando fuera necesario, realización de las predicciones sobre la productividad animal probable.

Como en cualquier sistema de medidas, los resultados de la evaluación de alimentos están sujetos a variación. La variabilidad en la composición y valor nutritivo de los alimentos obedece a causas propias del alimento (intrínsecas) o ajenas a su composición (extrínsecas) (Gizzi y Givens, 2004).

La evaluación de los alimentos involucra mediciones sobre propiedades químicas, físicas y microbiológicas. Un análisis del funcionamiento del sistema de valoración de alimentos muestra que los resultados reportados para los distintos alimentos presentan diferentes fuentes de variación, algunas propias de los alimentos, otras generadas por el proceso de muestreo y análisis, y otras incluso asociadas a imprecisiones en las denominaciones de los analitos.

Variación intrínseca de la calidad de los alimentos

Cada alimento presenta características que le son propias y que lo distinguen de otros. La Variación Intrínseca (VI) corresponde a las diferencias en características de un mismo alimento y surge de las discrepancias reales de calidad entre distintos tipos o partidas del alimento. Estas variaciones están asociadas, entre otras razones, a diferencias genéticas, ambientales y de procesamiento [e.g. la variación en el contenido de proteína bruta (PB) entre granos de maíz de diferentes orígenes].

La VI representa la variación propia de cada alimento; en un sistema de evaluación de alimentos "ideal" (sin errores, ni incertidumbres), justamente es la magnitud de la característica analizada que importa mensurar. De no existir VI, los valores típicos de las tablas

de alimentos serían suficientes para caracterizar a los distintos ingredientes alimenticios.

Desde otro punto de vista, la VI en las propiedades físicas, químicas y nutricionales de los distintos alimentos es la variación remanente luego de caracterizar sin ambigüedades las diferentes clases (e.g. concentrados energéticos y proteicos), y tipos de alimento dentro de una misma clase (e.g. grano de sorgo granífero y grano de maíz; o alfalfa en principio de floración proveniente de dos potreros o dos años diferentes).

No obstante lo anterior, es importante tener en cuenta que parte de la VI proviene de la imperfecta definición de los alimentos, inconveniente que es subsanable hasta cierto punto. En este sentido, la caracterización de los forrajes, constituye un caso de particular importancia, dado que el estado de desarrollo de los mismos suele estar sólo groseramente definido (e.g. *Cenchrus ciliaris* en estado vegetativo, pero donde para muestras con la misma descripción anterior subsisten por ejemplo diferencias asociadas con el número de hojas expandidas y temperaturas prevalentes durante el rebrote). Una situación similar se presenta para los subproductos donde las diferencias en el procesamiento contribuyen a las variaciones observadas entre partidas del mismo ingrediente. En ambos casos, el sistema de evaluación de alimentos debería propender a refinar cada vez más la correcta identificación de los alimentos.

Cabe destacar que la preponderancia, dentro del campo de la evaluación nutricional de alimentos, de métodos de naturaleza empírica (donde el método define lo que se mide, e.g. fibra en detergente neutro, fibra cruda, carbohidratos solubles) contribuye a la falta de reproducibilidad de los resultados (Hall, 2007), ya que cualquier desviación del procedimiento genera resultados diferentes.

Variación extrínseca de la calidad de los alimentos

Las fuentes de Variación Extrínseca VE son ajenas a la naturaleza del alimento y surgen fundamentalmente por las imperfeccio-

nes del sistema de evaluación (e.g. asociados con el muestreo, procedimiento analítico, calidad de reactivos, desempeño de los analistas) y del sistema de comunicación de dichos resultados. Estas fuentes de variación dificultan conocer el valor verdadero de la característica del alimento bajo estudio. No obstante lo anterior, es importante tener presente que en general son controlables.

El muestreo probablemente sea la fuente de error mas importante. Es necesario tener en cuenta que la muestra a enviar al laboratorio debe ser representativa cuali y cuantitativamente del material sobre el cual se habrán de aplicar las conclusiones.

Una fuente de VE frecuentemente inadvertida surge debido a las diferentes técnicas analíticas empleadas por los distintos laboratorios (Barber, 1983) o a la imprecisión en la definición de la característica medida. Por ejemplo, el almidón puede ser medido por técnicas enzimáticas o basadas en la hidrólisis ácida, lo que dependiendo de qué matriz se trate podrá generar diferentes resultados. Por otro lado, bajo la denominación "fibra insoluble en detergente neutro" (FDN) pueden obtenerse FDN con o sin cenizas y con o sin agregado de alfa-amilasa termoestable, lo cual da origen a cuatro entidades diferentes.

La variación originada en la actividad de los laboratorios presenta dos causas principales: la asociada a la técnica dentro de un mismo laboratorio (variabilidad intralaboratorio), y aquella observada entre distintos laboratorios (variabilidad interlaboratorios). Ambas fuentes de variación deben ser controladas y mantenidas debajo de umbrales aceptables.

Las diferencias observadas para una misma técnica entre laboratorios pueden originarse por las pequeñas discrepancias en las rutinas que cada laboratorio aplica, o debido a los distintos equipos y reactivos empleados. Es importante resaltar que hoy día, con las técnicas estadísticas disponibles, los desvíos entre laboratorios son fácilmente detectables; antes que esto, lo que interesa es identificar si los distintos laboratorios son capaces de medir un determinado analito en una matriz específica (e.g. afrechillo de trigo)

con un error aceptable. Para garantizar el empleo de resultados analíticos confiables es importante que los laboratorios se ciñan a protocolos específicos y que ejecuten controles de calidad sobre los equipamientos y procedimientos que aplican. En este sentido, una herramienta frecuentemente empleada es la participación en pruebas interlaboratorio (e.g. "Programa para el mejoramiento de la evaluación de forrajes y alimentos" PROMEFA, 2010) que permiten controlar y mejorar las rutinas de trabajo. Además, el desarrollo de protocolos analíticos específicos para cada rutina facilita la comparación entre laboratorios y consecuentemente la reproducibilidad de los resultados dentro de rangos aceptables.

Adicionalmente, no solo es importante tener claro qué se espera obtener de la evaluación químico-nutricional, sino conocer a través de qué técnica se obtienen los resultados reportados. Frecuentemente la discrepancia entre los resultados de los laboratorios obedece a diferencias en las técnicas aplicadas, por ejemplo para carbohidratos no estructurales [CNE] (por hidrólisis enzimática o química), y digestibilidad *in vitro* de la materia seca (por Tilley y Terry o Goering y Van Soest). Un escenario aun peor se presenta a la hora de conocer las concentraciones energéticas de los alimentos, ya que raramente se explicitan a través de que medios se han obtenido las estimaciones de TND (total de nutrientes digestibles), EM (energía metabolizable) o EN (energía neta).

La falta de consenso en el uso de la nomenclatura (e.g. FDN, la misma sigla puede corresponder a FDN con o sin cenizas residuales) promueve errores cuando se comparan resultados que no representan estrictamente el mismo analito. La creciente disponibilidad de técnicas y "entidades analíticas" para describir la calidad de un alimento ha generado un aumento en el uso de siglas y denominaciones, muchas veces pobremente definidas. Es así que la ausencia de una nomenclatura especializada se ha constituido en uno de los obstáculos adicionales para alcanzar una correcta interpretación de los resultados analíticos.

En este último aspecto, cabe a los responsables de los laboratorios informar correctamente los procedimientos seguidos y las unidades de expresión de modo de minimizar las interpretaciones equívocas por parte de los usuarios. Pero, también es cierto, que la interpretación de los resultados esta sujeta a la idoneidad del profesional solicitante.

Fraciones Problemáticas

Las siglas empleadas para identificar los diferentes analitos que caracterizan a los alimentos han sido ampliamente difundidas y son conocidas por los usuarios de servicios de laboratorios (e.g. FDA, fibra insoluble en detergente ácido, CNE, carbohidratos no estructurales). Sin embargo, las siglas comúnmente empleadas no especifican las variaciones que existen en los protocolos de la determinación.

Siguiendo algunas propuestas sugeridas en publicaciones internacionales (Uden et al., 2005), aquí se propone mejorar la descripción del método analítico y la forma de expresión del resultado mediante un sistema de siglas acompañantes en posiciones pre y post respecto a la sigla genérica (Figura 1). Cada caso particular será tratado a continuación para el analito correspondiente.

Carbohidratos Disponibles

La denominación "Carbohidratos disponibles" es usada en algunos reportes para referirse a los carbohidratos libres que pueden ser usados como fuente de energía para las plantas (azúcares solubles, fructosanos y almidón). Por otro lado, dentro del campo de la nutrición humana los carbohidratos disponibles corresponden a aquellos que pueden ser digeridos por las enzimas en el tracto digestivo del hombre y utilizados para su metabolismo, también denominados carbohidratos glucogénicos (FAO, 2003).

A su vez, dentro del área de la nutrición animal, el término resulta aún más confuso, dado que los rumiantes y otros animales pueden obtener energía a partir de carbohidratos presentes en las paredes celulares. En este sentido, los carbohidratos disponibles para los rumiantes (principalmente a través de la acción de los microorganismos del rumen) también incluyen pectinas, β -glucanos, hemicelulosa y celulosa.

El nombre de Carbohidratos Disponibles para que sea correctamente interpretado debe estar acompañado de la identificación del destino metabólico para el cual se hace la referencia de disponibilidad. Los destinos metabólicos pueden ser variados y entre ellos

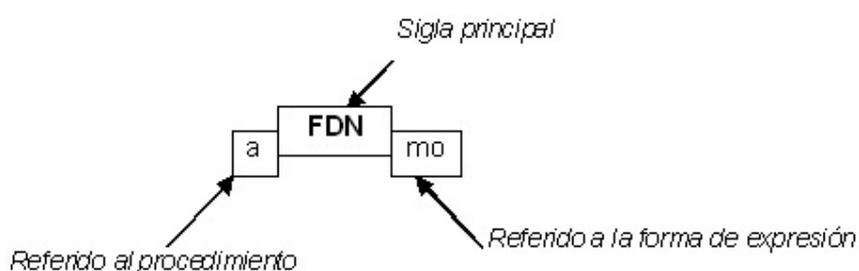


Figura 1: Esquema de la estructura propuesta para las siglas.
Figure 1: Scheme of the proposed structure for acronyms.

se pueden mencionar el metabolismo energético de un vegetal, la obtención de energía por parte de microorganismos aerobios o anaerobios (e.g. referido a forrajes conservados) y procesos digestivos de animales monogástricos y fermentadores pre y postgástricos.

Para evitar confusiones, en el campo de la nutrición animal y para la descripción del valor nutricional de forrajes y alimentos, sería preferible optar por la denominación: Carbohidratos no estructurales (Minchin et al., 2000).

Carbohidratos No Estructurales (CNE)

Los CNE agrupan a aquellos carbohidratos distribuidos dentro de las células de las plantas y que usualmente son más digeribles que los carbohidratos estructurales presentes en las paredes celulares. Es importante destacar que el resultado obtenido por estos métodos es diferente al reportado como carbohidratos no fibrosos (CNF) (Hall, 2003).

Se trata de una fracción que incluye mayoritariamente sacarosa, almidón y fructosanos (NRC, 2001). Existen numerosas técnicas para medirlos, aunque presentan diferente grado de precisión dependiendo del tipo de alimento sobre el que se aplique. Básicamente se pueden agrupar por los métodos de solubilización e hidrólisis (enzimática o química) empleados (Smith et al., 1964; Kartchner y Theurer, 1981; Kozloski et al., 1999). En general, las técnicas que utilizan hidrólisis enzimática fueron reportadas como las de mayor precisión (Grotelueschen y Smith, 1967; Kozloski et al., 1999). A fin de diferenciar el método de solubilización usado se proponen las siglas eCNE y qCNE para las hidrólisis enzimática y química, respectivamente.

La denominación Carbohidratos No Estructurales Totales (CNET) se refiere a la misma fracción que CNE (NRC, 2001).

Carbohidratos No Fibrosos

El contenido de CNF se calcula por diferencia entre el total de la materia seca del alimento y la sumatoria de los contenidos de las demás fracciones (PB, FDN -determinada

con β -amilasa termoestable-, extracto etéreo y cenizas). En la gran mayoría de los casos esta integrada principalmente por ácidos orgánicos, azúcares solubles, oligosacáridos, pectinas, fructosanos, β -glucanos, galactanos y almidón (Mertens, 2003).

Al igual que la fracción CNE, la fracción CNF es una estimación de los carbohidratos que suelen degradarse rápidamente en el rumen. Sin embargo es importante destacar que se trata de entidades diferentes, aunque altamente correlacionadas.

Hay dos formas de cálculo y se proponen dos denominaciones diferentes:

$$\text{CNF}_{\text{ap}} \text{ (g/kg MS)} = 1000 - (\text{PB} + \text{aFDNmo} + \text{EE} + \text{Cen}), \text{ propuesta en el NRC (2001)}$$

$$\text{CNF}_{\text{real}} \text{ (g/kg MS)} = 1000 - [\text{PB} + (\text{aFDNmo} - \text{PB-FDN}) + \text{EE} + \text{Cen}]$$

Donde:

CNF_{ap}: carbohidratos no fibrosos, aparente

CNF_{real}: carbohidratos no fibrosos, real

PB (g/kg MS): proteína bruta

aFDNmo(g/kg MS): fibra detergente neutro libre de cenizas

PB-FDN (g/kg MS): proteína bruta ligada a la FDN

EE (g/kg MS): extracto etéreo

Cen (g/kg MS): cenizas

Carbohidratos solubles

Corresponde a las fracciones de carbohidratos de bajo peso molecular, con alta solubilidad y degradabilidad ruminal. Genéricamente, y dependiendo de la técnica aplicada, bajo el nombre de Carbohidratos Solubles (CSol) se reune azúcares, oligosacáridos, pectinas, fructosanos, dextrinas, etc.

Actualmente, existe una creciente y sostenida demanda por este tipo de análisis para describir materiales empleados para confeccionar ensilajes de planta entera de maíz y sorgo, y de distintas forrajeras, estudios sobre horarios de pastoreo, cinéticas de digestión ruminal, etc.

Probablemente se trate de una de las fracciones donde mayor discrepancia se puede observar entre lo que los laboratorios ofrecen y lo que los usuarios creen recibir. En una comparación entre laboratorios desarrollada recientemente se proveyó de muestras estandarizadas a un grupo de participantes y se les solicitó que reportaran (lo que ellos entendían por) "Carbohidratos solubles", los resultados obtenidos variaron desde 0,5 a 201 g/kg de materia seca; el análisis posterior de las encuestas mostró que la divergencia entre resultados respondía a la aplicación de diferentes protocolos analíticos. Sin embargo estas discrepancias probablemente pasen desapercibidas para una gran mayoría de los usuarios.

Los CSol, constituyen una fracción diversa y condicionada por la técnica de preparación de la muestra, extracción y procedimientos químicos o enzimáticos que se apliquen. El primer aspecto a definir con precisión es la solución y condiciones empleadas para la extracción (e.g. agua, etanol, mezclas de agua con etanol, soluciones tampón, temperatura).

Los métodos para cuantificar los carbohidratos solubilizados durante la extracción son por reducción, condensación, enzimáticos o por cromatografía; los dos primeros son los más simples y rápidos. Sin embargo, la determinación de los carbohidratos solubles por comparación del poder reductor de los azúcares extraídos respecto a una solución patrón de glucosa requiere una hidrólisis. De este modo se garantiza la liberación de todos los monosacáridos correspondientes, en caso contrario sólo se cuantificarán las terminales reductoras de las cadenas de los carbohidratos, subestimando el contenido real de carbohidratos solubles extraídos del material vegetal.

Para evitar los inconvenientes antes mencionados se propone que se deje indicado antes de la sigla "CSol" la solución de extracción (e.g. agua, etanol, i.e. respectivamente agCSol y etCSol).

Fibra Detergente Ácido

La fracción denominada "fibra en detergente ácido" (FDA) es el residuo indigestible en detergente ácido que recupera mayoritariamente la fracción del tejido vegetal compuesta por celulosa, lignina y una pequeña fracción de cenizas, las denominadas insolubles. El principal uso de FDA es preparar un residuo pobre en N para la subsiguiente determinación de lignina (Uden et al., 2005), y además basado en su reconocida relación negativa con la digestibilidad de los alimentos (Van Soest, 1994), se la suele emplear (con resultados inciertos) para predecir la densidad energética de los alimentos (Schmid et al., 1976; Rohweder et al., 1978; Gambetti et al., 2011; Martínez et al., 2011).

El método fue originalmente publicado por Van Soest en (1963) y la determinación directa (no secuencial luego de hacer FDN en la misma muestra) fue aprobada por la "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC, Official Method 973.18) de los EEUU (Uden et al., 2005). Se recomienda el lavado con acetona cuando las muestras tienen más de un 10% de extracto etéreo (Mertens, 2003) o (siguiendo un criterio más práctico para el trabajo de rutina) siempre que se trate de alimentos concentrados (Jaurena y Wawrzkievicz, 2011).

Actualmente, existen algunas variantes del procedimiento analítico y formas de reportarlo, por lo que se proponen las siguientes siglas: FDA directo (FDA) o secuencial (sFDA); o expresado libre de cenizas siguiendo el procedimiento directo (FDAmo) o secuencial (sFDAmo).

Fibra en Detergente Neutro

La fracción insoluble en detergente neutro (i.e. fibra en detergente neutro, FDN) refleja principalmente el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina, pero presenta cantidades variables de proteína y cenizas. La técnica fue descrita originalmente por Van Soest y Wine (1967) y luego en sucesivas publicaciones (Goering y Van Soest, 1970b; Robertson y Van Soest, 1981; Van Soest et al., 1991; Mertens, 2002; Mertens, 2003).

En el caso de herbívoros en general, y ruminantes en particular, la FDN es la determinación de preferencia para describir el contenido de fibra dietética de un forraje o ración. Sin embargo, las pectinas y los β -glucanos (que son parte de la pared celular vegetal) se disuelven con el tratamiento de detergente neutro por lo que son contabilizados como parte del contenido celular. Los carbohidratos de la pared celular de los vegetales solubles en detergente neutro se agrupan en la Fibra Soluble en Detergente Neutro (FSDN). Esta inconsistencia, no es juzgada de relevancia en el campo de la nutrición de ruminantes dado que son sustancias que se digieren rápida y completamente en el rumen (en forma análoga a los contenidos celulares).

Existen variaciones del procedimiento que tienen importantes consecuencias sobre los resultados (Mertens, 2003). Las sigla FDN (*strictu sensu*) identificaría a la FDN obtenida sin emplear α -amilasa e incluyendo las cenizas insolubles (Uden et al., 2005). El empleo de detergente neutro con α -amilasa termoestable, pero sin sulfito de sodio (Na_2SO_3) da lugar al denominado "Residuo en Detergente Neutro" (aRDN; alternativamente puede reportarse como aRDNmo cuando se expresa libre de cenizas).

Actualmente se ha impuesto el procedimiento propuesto por Mertens (2002) que utiliza sulfito de sodio (para la extracción de proteínas) y α -amilasa termoestable (aFDN), y que corresponde a la técnica que ha sido aprobada por el AOAC (AOAC, 2002; Mertens, 2002; Uden et al., 2005). La aFDN se puede expresar con o sin cenizas residuales (respectivamente aFDN o aFDNmo) (Uden et al., 2005).

Lignina

La lignina es un compuesto orgánico sumamente resistente al ataque enzimático que no es degradado por las enzimas digestivas de los mamíferos, ni por los organismos anaeróbicos del tracto digestivo (Uden et al., 2005). Químicamente se trata de un polímero amorfo de derivados del fenil-propano. No es un carbohidrato, sin embargo dada su íntima

asociación con los carbohidratos estructurales (lignocelulosa) juega un papel crucial en la reducción del ataque microbiano a las paredes celulares y por esta razón suele tratarse asociado a estos compuestos.

Existen diferentes métodos para determinar el contenido de lignina de los forrajes que conducen a resultados no comparables (Jung et al., 1997). La técnica de Lignina en Detergente Ácido (LDA) propuesta por Van Soest y Wine (1967) reconoce dos alternativas: una hidrólisis con ácido sulfúrico sobre el residuo de FDA, y otra por oxidación con permanganato de potasio (KMnO_4), ambas constituyen fracciones orgánicas y se expresan libres de cenizas. La alternativa más difundida en el campo de la nutrición animal es la LDA hidrolizada con sulfúrico pero, en los últimos años, la popularización de los equipos ANKOM (Ankom Technology, Macedon, New York, EEUU) contribuyó a difundir las LDA obtenidas con sulfúrico o permanganato pero incluyendo la fracción de cenizas residuales (procedimientos sin ignición final). Siguiendo un criterio análogo al empleado para las fracciones de fibra se sugiere utilizar para las ligninas detergente ácido con cenizas por los métodos con Ácido Sulfúrico y Permanganato de Potasio respectivamente las siglas asLDA y pmLDA y cuando se expresen libres de cenizas adoptar asLDAmo y pmLDAmo.

Digestibilidad

La digestibilidad es la proporción del alimento ingerido por el animal que no aparece en las heces, y constituye la primera y más importante fuente de variación de la calidad entre distintos alimentos (explicada por las pérdidas sólidas incurridas durante la digestión ruminal). La técnica in vivo para medir la digestibilidad de la materia seca (DMS) o de la materia orgánica (DMO) se realiza empleando animales, pero debido al tiempo necesario para obtener los resultados, los costos, y los requerimientos de instalaciones y personal entrenado, no sirve para la evaluación comercial de alimentos, empleándose exclusivamente para investigación y para calibrar otras técnicas más económicas y sencillas. Alterna-

tivamente, pueden realizarse estimaciones a partir de técnicas *in vitro*, *in sacco* o a partir de fórmulas basadas en la composición química del alimento.

Los métodos *in vitro* intentan simular la digestión ocurrida en el tracto digestivo de los animales y por ello es importante especificar la especie para la cual se realiza la determinación.

En el caso de rumiantes, básicamente existen dos aproximaciones: empleando inóculos obtenidos a partir de animales o enzimas comerciales.

Las técnicas más difundidas para predecir la digestibilidad del tracto completo de los rumiantes son Tilley y Terry (1963), y Goering y Van Soest (1970), ambas requieren una primera etapa de incubación de la muestra con licor ruminal y buffer en condiciones controladas durante 48 h y están respectivamente asociadas con la digestibilidad de la materia seca aparente y real. Pese a tratarse de dos entidades diferentes, frecuentemente son denominadas simplemente como "digestibilidad *in vitro*" lo cual da lugar a interpretaciones equívocas. Además, es necesario tener presente que existen numerosas modificaciones de los métodos originales como ser tiempo de digestión (Tilley y Terry, 1967; Broderick y Cochran, 2000), uso de enzimas purificadas como inóculo y equipamiento de laboratorio entre otros, que provocan cambios en los resultados obtenidos. En el mismo sentido, también es necesario tener en cuenta el procedimiento usado para acondicionar la muestra como ser el tipo secado (estufa y temperatura, liofilización) (Ferreira y Mertens, 2005) y el tamaño medio de partícula alcanzado con la molienda (Valentin et al., 1999; Damiran et al., 2008). Cualquiera de los tratamientos mencionados afecta el resultado y por eso debiera ser claramente especificado para facilitar la comparación entre resultados. Mínimamente, sería importante dejar establecido el tiempo de digestión empleado (e.g. 24, 30, 48 h; Cuadro 1).

La técnica de Tilley y Terry (1963) es la que más se ha difundido y los resultados pueden reportarse como Digestibilidad *in vitro* de la Materia Seca (ivDMS) o de la Materia Orgánica (ivDMO), asociadas respectivamente con las Digestibilidad Aparente de la Materia Seca y Orgánica (ivDMSap y ivDMOap).

La técnica de Goering y Van Soest (1970a) ha crecido en aceptación con el transcurso del tiempo, especialmente a partir de la difusión de equipamiento que permite el procesamiento de un número considerable de muestras en forma simultánea. Si bien se asocia con la digestibilidad real, la aplicación de coeficientes sencillos de corrección, permite la expresión como ivDMSap.

La técnica de Goering y Van Soest (1970a) permite estimar la FDN Digestible (dFDN) que es la proporción de la FDN digerida por los animales y expresada en g/kg MS y la Digestibilidad de la FDN (DFDN; proporción de la FDN digerida por los animales y expresada en % FDN).

La relación entre DFDN y dFDN queda establecida por la siguiente fórmula:

$$\text{DFDN (g/100 g FDN)} = \text{dFDN} / \text{FDN} \times 100$$

Producción de gas in vitro

En los últimos años ha habido un creciente interés en emplear la técnica de producción de gas *in vitro* para describir la degradabilidad de los alimentos en el rumen. La relación entre MS o MO, y la producción de gas *in vitro* está debidamente fundamentada (Menke et al., 1979; Schofield, 2000), y en general se la emplea para estudios sobre la digestibilidad y cinética de digestión de los alimentos (Schofield, 2000). Una de las principales áreas de interés para el uso de la técnica es describir el comportamiento de las fracciones solubles de los alimentos (Schofield, 2000).

Durante la implementación de la técnica, en paralelo con las muestras de alimentos se incuban botellas "blanco" o control conteniendo medio e inóculo pero sin sustrato. El em-

Cuadro 1: Siglas propuestas para las distintas fracciones analíticas.

Table 1: Proposed abbreviations and acronyms for different analytical fractions.

Sigla	Descripción
Carbohidratos Estructurales	
LDA	LDA, no especifica procedimiento ni forma de expresión
asLDA	LDA con Ácido Sulfúrico (incluye las cenizas residuales)
pmLDA	LDA con Permanganato de Potasio (incluye las cenizas residuales)
asLDAmo	LDA con Ácido Sulfúrico (libre de cenizas residuales)
pmLDAmo	LDA con Permanganato de Potasio (libre de cenizas residuales)
FDA	Fibra insoluble en Detergente Ácido por el método directo
sFDA	Fibra insoluble en Detergente Ácido por el método secuencial
FDAmo	FDA (directo), expresado libre de cenizas residuales
sFDAmo	sFDA (secuencial), expresado libre de cenizas residuales
FDN	Fibra insoluble en Detergente Neutro;
aFDN	FDN con α -amilasa termoestable (incluye cenizas residuales)
aFDNmo	FDN con α -amilasa termoestable y libre de cenizas residuales
FSDN	Fibra soluble en Detergente Neutro
aRDN	Residuo en Detergente Neutro con α -amilasa termoestable y sin Sulfito de Sodio (incluye cenizas residuales)
aRDNmo	Residuo en Detergente Neutro con α -amilasa termoestable y sin Sulfito de Sodio (libre de cenizas residuales)
Carbohidratos no Estructurales	
agCSol	CSol en Agua
etCSol	CSol en Etanol
CNE	Carbohidratos no Estructurales
CNET	CNE Totales
CNF	Carbohidratos no Fibrosos
CNFap	CNF aparente
CNFreal	CNF real
CSol	Carbohidratos Solubles
Digestibilidad	
dFDN	FDN digestible por kg de MS (g/kg MS)
DFDN;48h	Digestibilidad de la FDN (g FDN /100 g FDN), 48 h de digestión
ivDMO	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica
ivDMOap;48h	Digestibilidad <i>in vitro</i> aparente de la Materia Orgánica, 48 h de digestión
ivDMS	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la Materia Seca
ivDMOreal;48h	Digestibilidad <i>in vitro</i> real de la Materia Orgánica, 48 h de digestión
ivDMSap;48h	Digestibilidad <i>in vitro</i> real de la Materia Seca, 48 h de digestión
ivDMSreal;48h	Digestibilidad <i>in vitro</i> aparente de la Materia Seca, 48 h de digestión
Producción de gas	
PGB	Producción de gas bruta (sin corregir por los blancos)
PGN	Producción de gas neta (corregida por los blancos)

pleo de los blancos contribuiría a mejorar la repetibilidad de los resultados gracias a la corrección de las diferencias en presión atmosférica y por la materia orgánica fermentable incorporada con el inóculo (Rymer et al., 2005). El valor promedio del gas producido por los blancos es sustraído de la producción registrada para los sustratos bajo evaluación para cada horario de medición, y de esta forma se obtiene el gas realmente producido por el sustrato (Schofield, 2000). No obstante lo anterior, es evidente que el curso de la fermentación de los blancos no es estrictamente comparable al de los frascos con inóculo y sustrato, ya que mientras que en los primeros los microorganismos hallan un ambiente empobrecido, en los segundos encuentran sustrato nuevo sobre el cual desarrollar. Esta diferencia induce una anticipación en el inicio del recambio microbiano en los blancos ("turnover") (Schofield, 2000), adicionalmente se ha señalado la fuerte influencia que tiene la forma de corregir por los blancos sobre los resultados y consecuente interpretación de los resultados (Carro et al., 2005; Rymer et al., 2005). Por estos motivos, algunos autores han incluso señalado que la corrección por blancos no debería efectuarse (Cone et al., 1997), sino simplemente reportarse en forma separada (Williams, 2000).

En muchos reportes no queda claramente establecido si los resultados crudos o modelados corresponden a las lecturas directas del sustrato o luego de haber corregido por los blancos. En este sentido, proponemos la denominación "producción de gas bruta" (PGB) a la que incluye al sustrato, al medio y al inóculo, y "producción de gas neta" (PGN) a aquella que hace referencia a los valores corregidos por los blancos (Makkar, 2004).

Bibliografía

- Allison J.G., Wannemacher J., R. W. and Banks J., W.L. 1963. Influence of dietary proteins on protein biosynthesis in various tissues., Fed. Proc. pp. 1126.
- Anderson B.K. and Jackson N. 1970. Conservation of herbage of varying dry matter content in air-tight metal containers with reference to the carbohydrate fraction. Journal of the Science of Food and Agriculture 21:228-234.
- ANKOM. Acid detergent lignin in beakers, In: ANKOM (Ed.), United States of America. pp. 3.
- AOAC. 2002. Official Method 2002.04. Amylase-Treated Neutral detergent Fiber in Feeds., AOAC Official Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Barber W.P. 1983. Data quality: how it is assessed and improved and what affects it, In: G. E. Robards and R.G. Packham (Eds.), Feed information and animal production. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK. pp. 57-78.
- Broderick G.A. and Cochran R.C. 2000. *In vitro* and *in situ* methods for estimating digestibility with reference to protein degradability, In: M. K. Theodorou and J. France (Eds.), Feeding systems and feed evaluation models, CABI Publishing, London (UK). pp. 53-85.
- Carro, M.D., Ranilla, M.J. and Tejido, M.L. 2005. Using an *in vitro* gas production technique to examine feed additives: Effects of correcting values for different blanks. Animal Feed Science and Technology 123-124: 173-184.
- Cone, J.W., van Gelder A.H. and Driehuis, F. 1997. Description of gas production profiles with a three-phasic model. Animal Feed Science and Technology 66:31-45.
- Damiran, D., DelCurto, T., Bohnert, D.W. and Findholt, S.L. 2008. Comparison of techniques and grinding size to estimate digestibility of forage based ruminant diets. An. Feed Sci. and Tech. 141:15-35.
- FAO. 2003. (Ed.)^(Eds.) FAO Food and Nutrition paper 77. Food energy - methods of analysis and conversion factors, FAO Food and Agriculture organization of the United Nations, Rome (Italy). pp. Pages.
- Ferreira, G. y Mertens, D.R. 2005. Chemical and physical characteristics of corn silages and their effects on *in vitro* disappearance. J. Dairy Sci. 88:4414-4425.
- Gambetti, P., Wawrzkievicz, M., Tulesi, M., Gaggiotti, M. y Jaurena G. 2011. Validación de dos modelos de predicción de la digestibilidad para forrajes secos. 34º Congreso de la Asociación Argentina de Producción Animal. Rev. Arg. Prod. Anim. 31 (Supl. 1).

- Gizzi, G. y Givens, D.I. 2004. Variability in feed composition and its impact on animal production, *In: FAO (Ed.), Assessing quality and safety of animal feeds*, FAO, Rome (Italy).
- Goering, H.K. and Van Soest, P.J. 1970a. Estimation of nutritive value from chemical data, *Agr. Handbook N°379 Forage Fiber - Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications) Laboratory handbook Nr. 379* USDA, Agricultural Research Services, Washington, D. C. (USA). pp. 18-19.
- Goering, H.K. y Van Soest, P.J. 1970b. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications) Laboratory handbook Nr. 379 USDA, Agricultural Research Services, Washington, D. C. (USA).
- Grotelueschen, R.D. and Smith, D. 1967. Determination and identification of nonstructural carbohydrates removed from grass and legume tissue by various sulfuric acid concentrations, takediastasa and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 15:1048-1051.
- Hall, M.B. 2003. Challenges with nonfiber carbohydrate methods. *J. Anim Sci.* 81: 3226-3232.
- Hall, M.B. 2007. Methodological challenges in carbohydrate analyses. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36:359-367.
- Jaurena, G. y Danelón, J.L. 2006. Tabla de composición de alimentos para rumiantes de la región pampeana Argentina. 1° Ed. 2001 ed. Hemisferio Sur S. A., Buenos Aires.
- Jaurena, G. y Wawrzkievicz, M. 2011. Programa para el Mejoramiento de la Evaluación de Forrajes y Alimentos (PROMEFA). Guía de procedimientos, Centro de Investigación y Servicios en Nutrición Animal (Facultad de Agronomía - Univ. de Buenos Aires), Buenos Aires (Argentina).
- Jung, H.G., Mertens, D.R. and Payne, A.J. 1997. Correlation of Acid Detergent Lignin and Klason Lignin with Digestibility of Forage Dry Matter and Neutral Detergent Fiber. *Jour. Dairy Sci.* 80:1622-1628.
- Kartchner, R.J. and Theurer, B. 1981. Comparison of hydrolysis methods used in feed, digesta, and fecal starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29:8-11.
- Kozloski, G.V., Rocha, J.B.T., Ribeiro Filho, H.M.N. and Perotton, I.J. 1999. Comparison of acid and amyloglucosidase hydrolysis for estimation of non-structural polysaccharides in feed samples. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79:1112-1116.
- Makkar, H.P.S. 2004. Recent advances in the *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources, *In: FAO (Ed.), Assessing quality and safety of animal feeds*, FAO, Rome (Italy). pp. 55-88.
- Martínez, R., Gambetti, P., Tulesi, M., Gaggiotti, M., Wawrzkievicz, M., Palladino, A. y Jaurena, G. 2011. Validación de dos modelos de predicción de la digestibilidad para forrajes secos. 34° Congreso de la Asociación Argentina de Producción Animal. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 31 (Supl. 1).
- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. and Schneider, W. 1979. 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.
- Mertens, D.R. 2002. Gravimetric Determination of Amylase-Treated Neutral Detergent Fiber in Feeds with Refluxing in Beakers or Crucibles: Collaborative Study. *J. AOAC International* 85:1217-1240.
- Mertens, D.R. 2003. Challenges in measuring insoluble dietary fiber. *J. Anim Sci.* 81:3233-3249.
- Minchin F.R., Winters, A., Kingston-Smith, A. and Robbins, M. 2000. Can Protein losses be reduced during the conversion of legume protein into animal protein?, *In: T. L. Bell and A. J. Smit (Eds.), Plant form and function. Adaptation to stress.*, University of Western Australia, Nedlands, 6907, Western Australia. pp. 45-47.
- NRC. 2001. National Research Council. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th Rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.
- PROMEFA. 2010. Programa para el Mejoramiento de la Evaluación de Forrajes y Alimentos, Centro de Investigación y Servicios en Nutrición Animal (Facultad de Agronomía - Univ. de Buenos Aires), Buenos Aires (Argentina).
- Robertson, J.B. and Van Soest, P.J. 1981. Chapter 9. The detergent system of analysis, *In: W. P. T. James, Theander, O. (Ed.), The Analysis of Dietary Fibre in Food*, Marcel Dekker, New York (USA). pp. 123-158.
- Rohweder, D.A., Barnes, R.F. and Jorgensen, N. 1978. Proposed Hay Grading Standards Based on Laboratory Analyses for Evaluating Quality. *J. Anim Sci.* 47: 747-759.

- Rymer, C., Huntington, J.A., Williams, B.A. and Givens, D.I. 2005. *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Sci. and Technol.* 123-124:9-30.
- Schmid, A.R., Goodrich, R.D., Jordon, R.M., Marten, G.C. and Meiske, J.C. 1976. Relationships among agronomic characteristics of corn and sorghum cultivars and silage quality. *Agronomy Journal* 68:403-406.
- Schofield, P. 2000. Gas production methods, *In: J. P. F. D'Mello* (Ed.), *Farm animal metabolism and nutrition*, CABI International, New York (USA). pp. 209-232.
- Smith, D., Paulsen, G.M. and Raguse, C.A. 1964. Extraction of Total Available Carbohydrates from grass and legume tissue. *Plant Physiology* 39:960-962.
- Southgate, D.A.T. 1973. Fibre and the other unavailable carbohydrates and their effects on the energy value of the diet. *Proc.Nutr.Soc.* 32:131.
- Tilley J.N.A. and Terry R.A. 1967. Técnica *in vitro* para la determinación de la digestibilidad de los forrajes Departamento de Especialización - INTA, Balcarce - Castelar.
- Uden, P., Robinson, P.H. and Wiseman, J. 2005. Use of detergent system terminology and criteria for submission of manuscripts on new, or revised, analytical methods as well as descriptive information on feed analysis and/or variability. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 118:181-186.
- Valentin, S.F., Williams, P.E.V., Forbes, J.M. and Sauvant, D. 1999. Comparison of the *in vitro* gas production technique and the nylon bag degradability technique to measure short- and long-term processes of degradation of maize silage in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78:81-99.
- Van Soest, P.J. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fibre residues of low nitrogen content. *Assoc. Off. Agr. Chem. J.* 46:825-829.
- Van Soest, P.J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2nd ed. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca and London.
- Van Soest, P.J. and Wine, R.H. 1967. Use of detergent in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. *J. Assoc. Off. Ana. Chem.* 50:50-55.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3568-3597.
- Williams, B.A. 2000. Cumulative gas production techniques for forage evaluation, *In: D. I. Givens, Owen, E., Axford, R.F.E., Omed, H.M.* (Ed.), *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*, CABI Publishing, Wallingford, UK. pp. 189-213.