

## **Nutrición animal con pastos Tropicales**

- ✓ 1. Calidad de pasturas y nutrición. Lascano, C.
- ✓ 2. Métodos para el análisis químico y la evaluación biológica de alimentos para animales. Harris, L.E.
3. Análisis del tejido de las plantas: Errores costosos que hay que evitar. Bowen, E.J.

CALIDAD DE PASTURAS Y NUTRICION

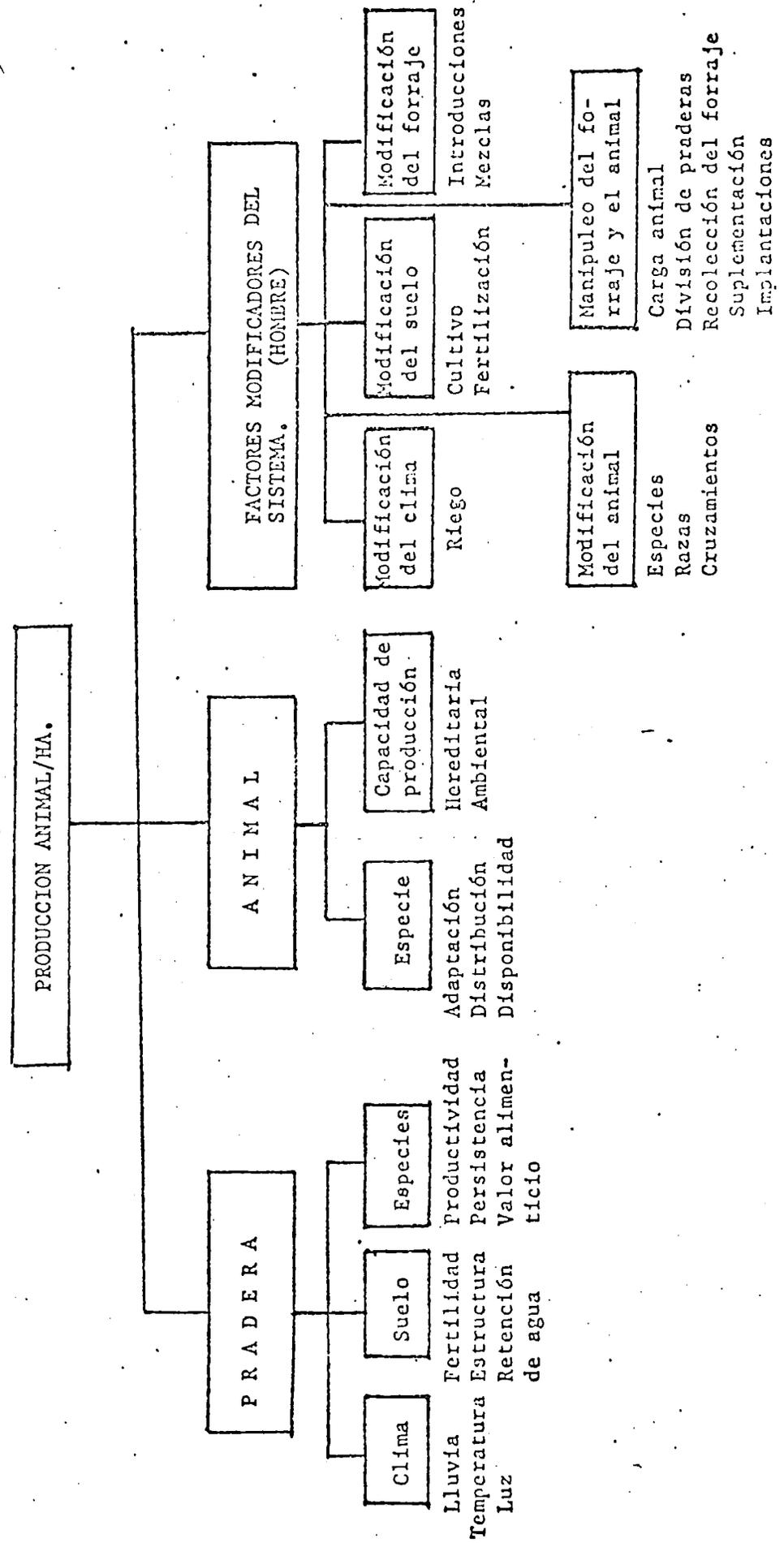
CIAT

Cuadros y Gráficos presentados en el IV Programa  
De Adiestramiento Posgrado en Producción y Utili  
zación de Pastos Tropicales

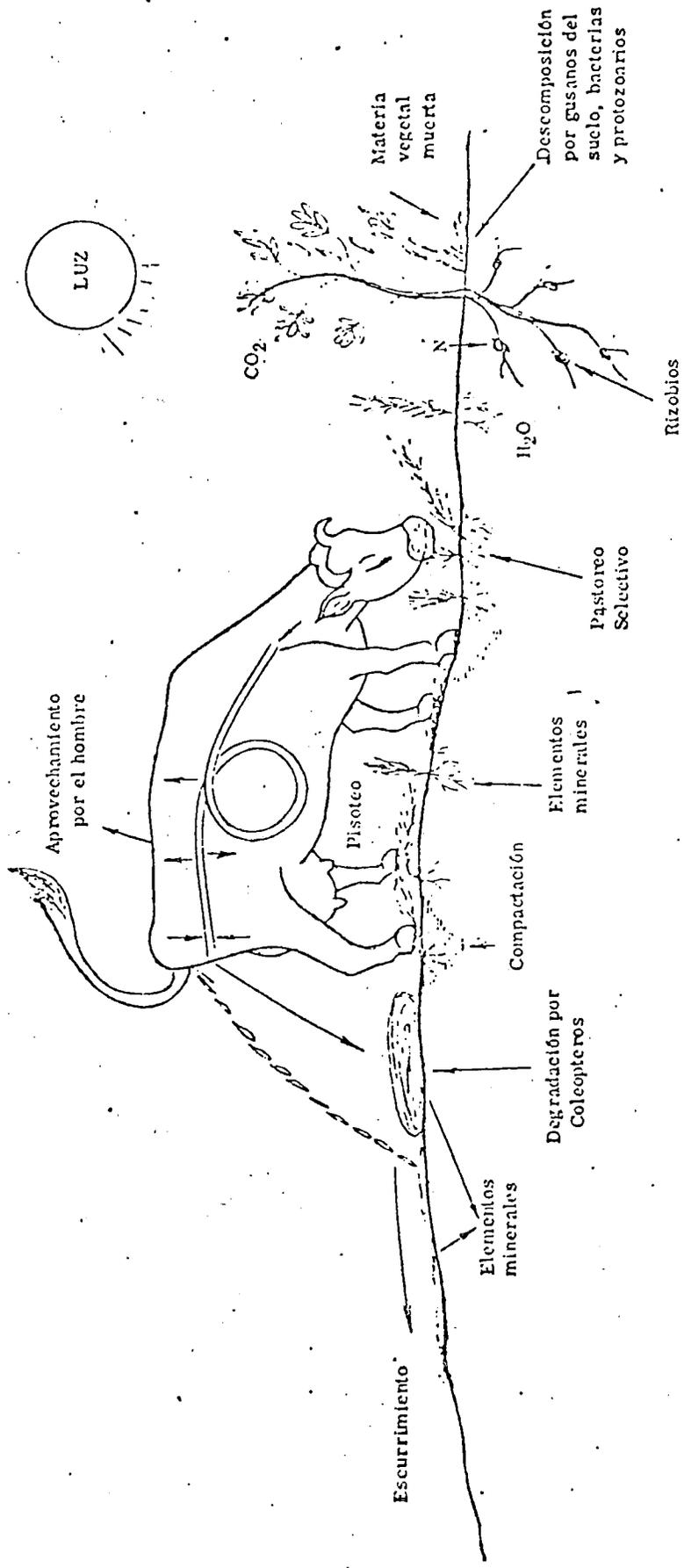
Febrero, 1981

Carlos Lascano, Ph.D.

DESCRIPCIÓN DE LOS FACTORES QUE ACTUAN SOBRE UN SISTEMA DE PRODUCCION ANIMAL EN PRADERAS



RELACIONES FUNDAMENTALES ENTRE EL AMBIENTE, EL SUELO, LAS PLANTAS Y LOS ANIMALES EN PASTOREO



Handwritten notes in Spanish, possibly a signature or date.

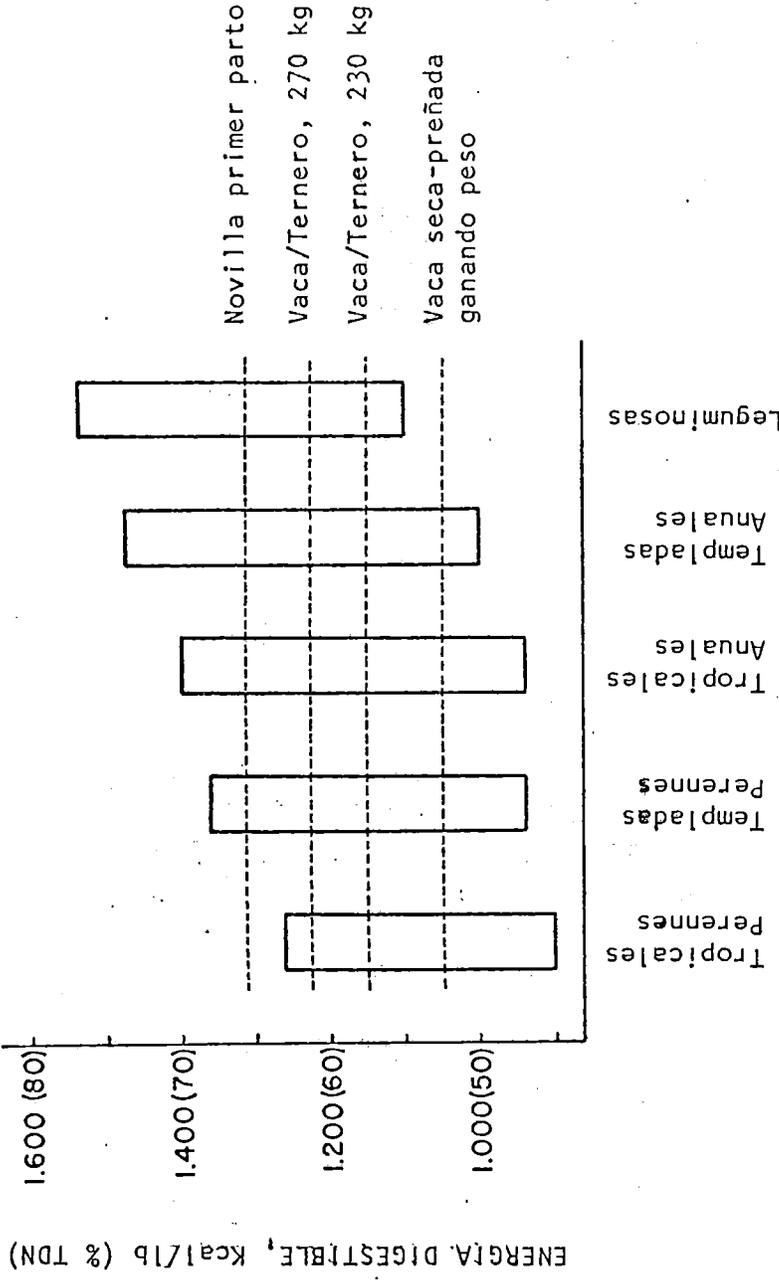


Figura: Rangos en energía digestible de varias clases de forraje para cubrir requerimiento de vacas.

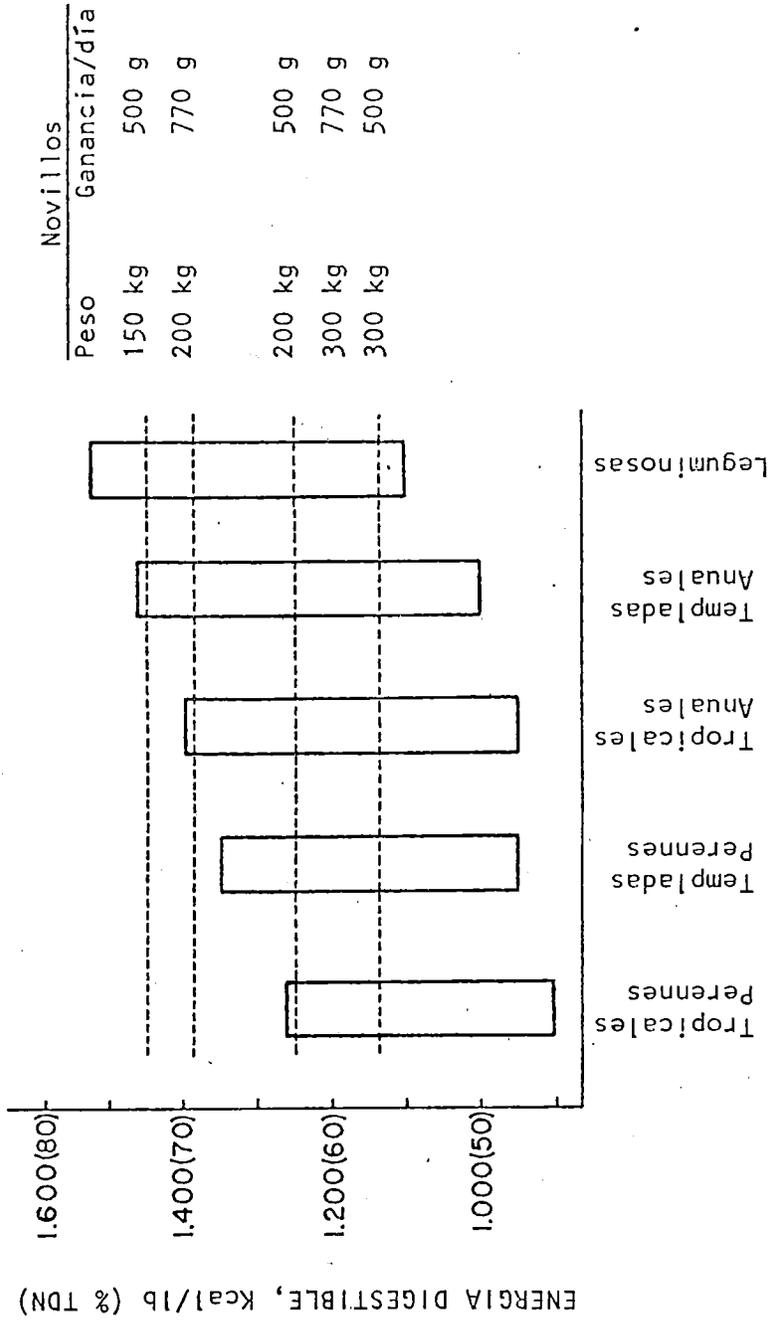
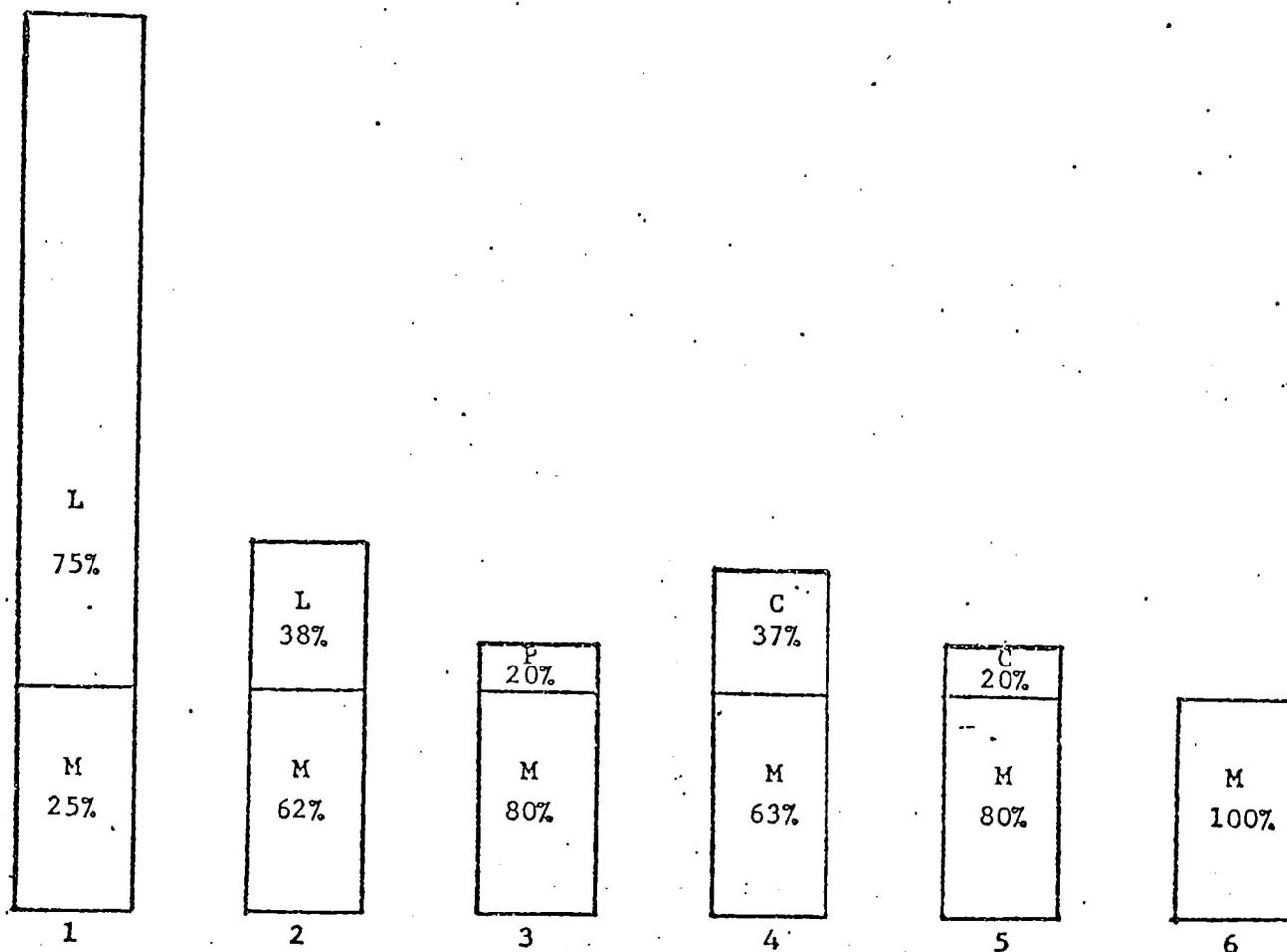


Figura: Rangos en energía digestible de varias clases de forraje para cubrir requerimiento de novillos.



Distribución del requisito de energía entre mantenimiento (M), preñez P, producción de leche (L) y crecimiento (C).

1 y 2 vacas lecheras produciendo 20 y 4 lts. de leche.

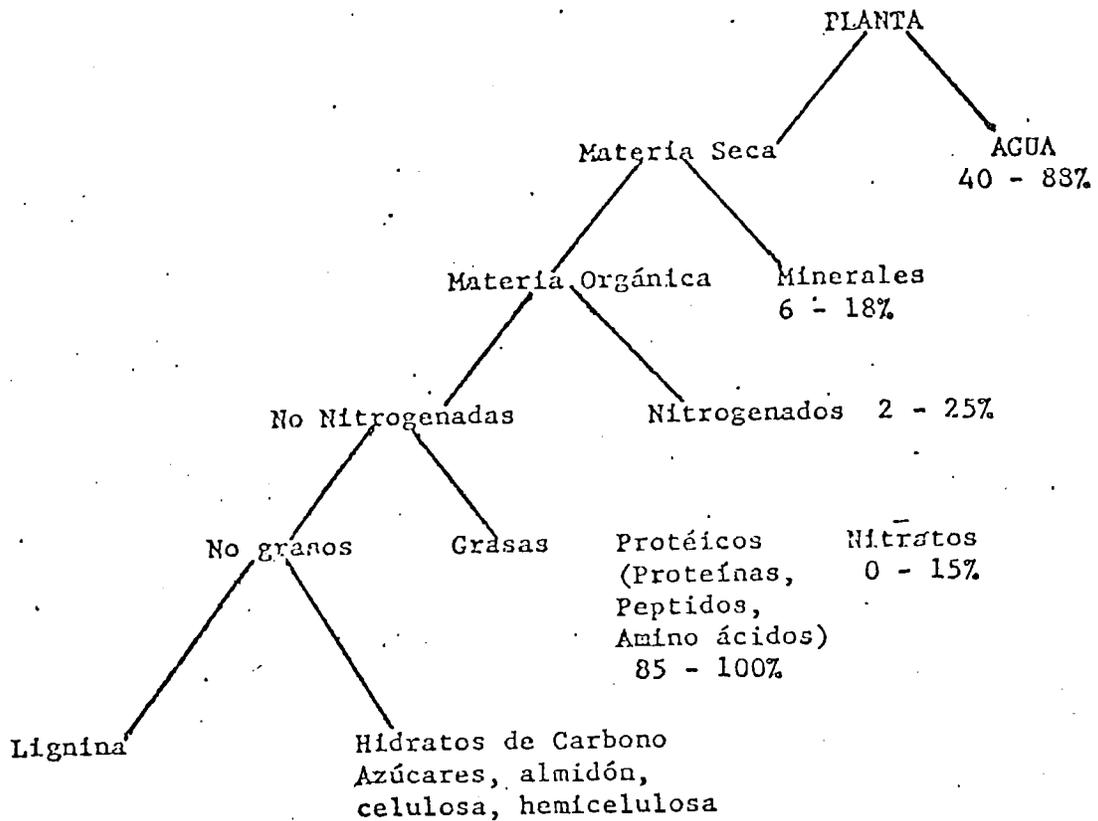
3 vaca seca en el último mes de gestación.

4 - 5 - 6 novillos ganando 700 - 300 y 0 g. de peso diarios.

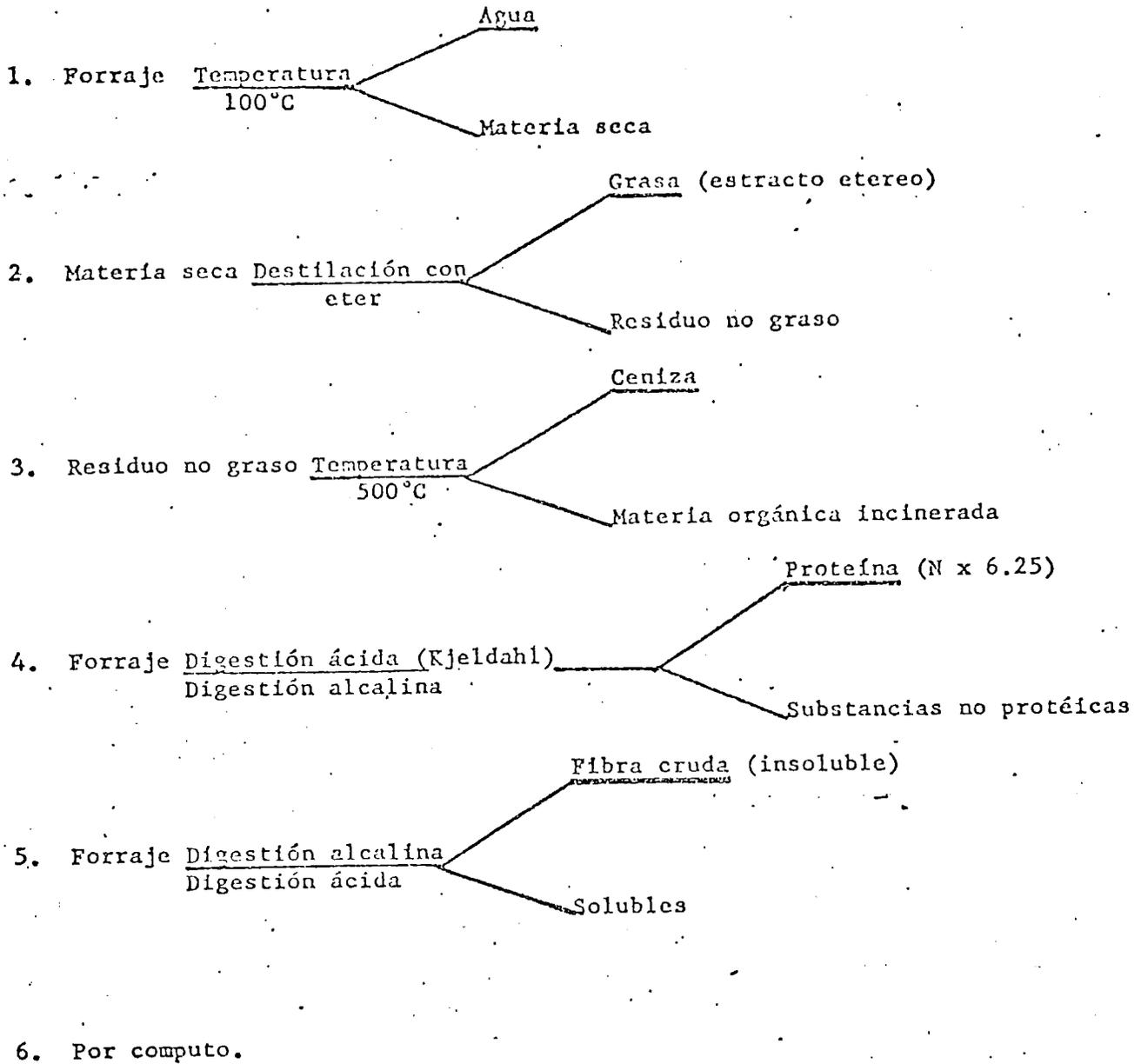
VALOR NUTRITIVO DE PASTOS

TROPICALES

COMPONENTES QUIMICOS DE LOS FORRAJES



ESQUEMA DE ANALISIS DE WENDEE



Extracto no

$$= \text{Forraje} - (\text{agua} + \text{ceniza} + \text{proteína} + \text{fibra cruda})$$

nitrogenado

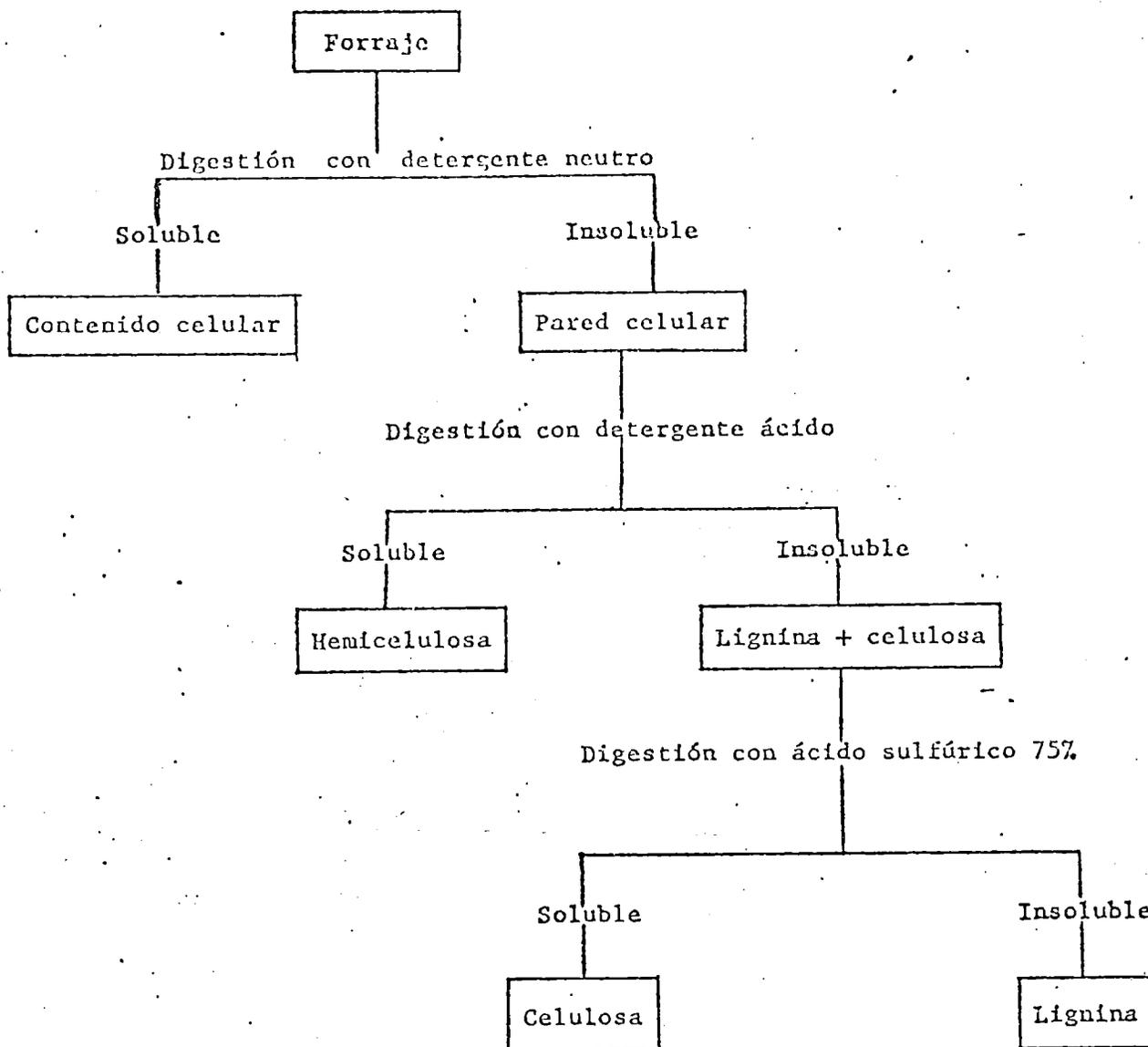
luego:

$$\text{Forraje} = \text{agua} + \text{grasa} + \text{ceniza} + \text{proteína} + \text{fibra cruda} + \text{extracto no nitrogenado.}$$

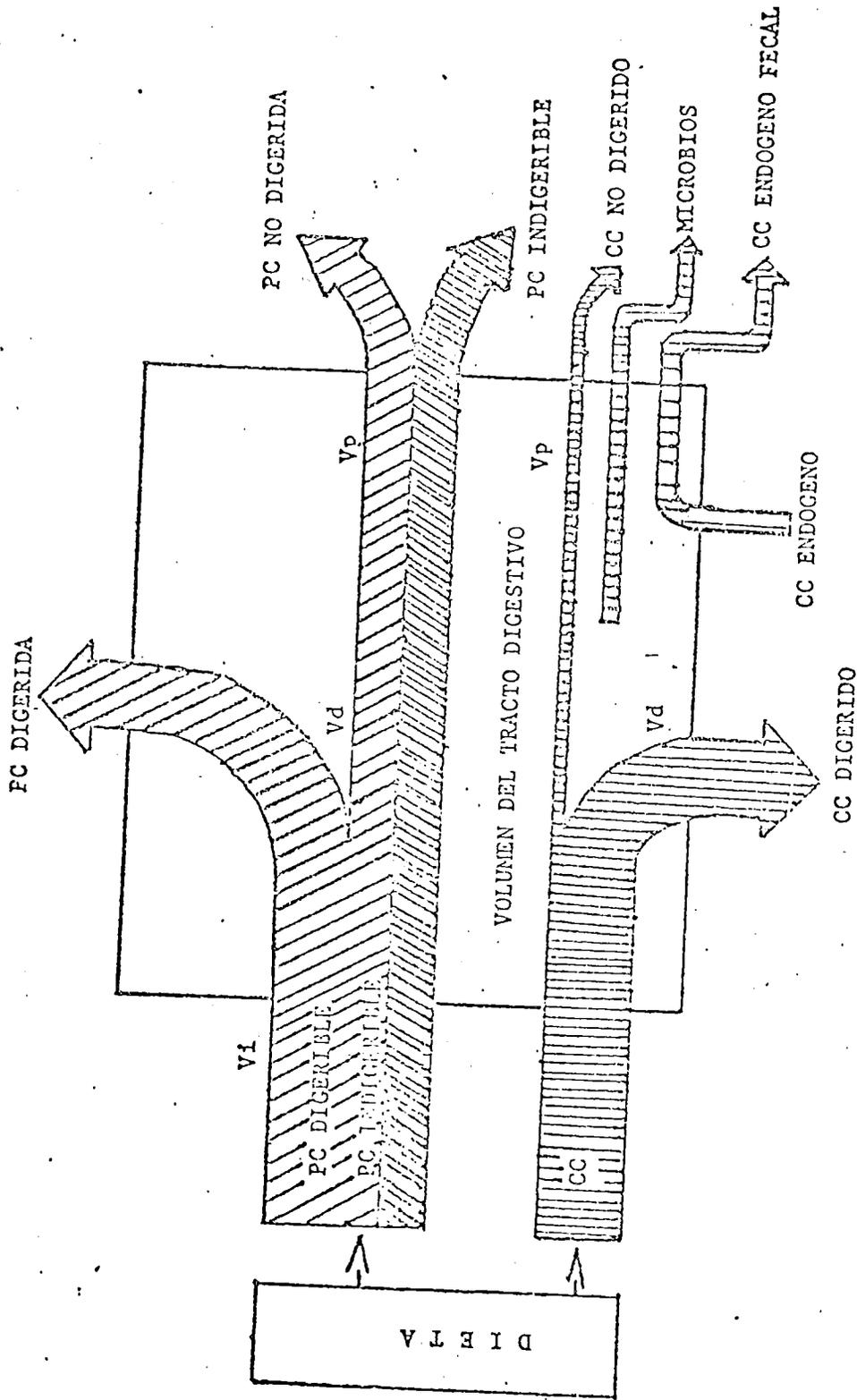
Tabla Efecto del método de fibra cruda en un alimento libre de grasa.-

Constituyente	Tratamiento con 1.25% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Tratamiento con 1.25% NaOH
Proteína	Extracción parcial	Extracción extensa
Azúcares y almidones	Extracción completa	-
Celulosa	Insignificante	Insignificante
Hemicelulosa	Extracción variable	Extracción extensa pero variable
Lignina	Insignificante	Extracción extensa pero altamente variable

ESQUEMA DE ANALISIS DE VAN SOEST



Adaptado de Crampton y Harris (1969) (Applied Animal Nutrition).



MOVIMIENTO DE LOS COMPONENTES DEL FORRAJE EN EL TRACTO DIGESTIVO

In vitro DM digestibility of plant parts of Desmodium distortum  
(%)

Digestibilidad in vitro del Desmodium distortum

Porcentaje de la MS

Altura de la planta al corte, m

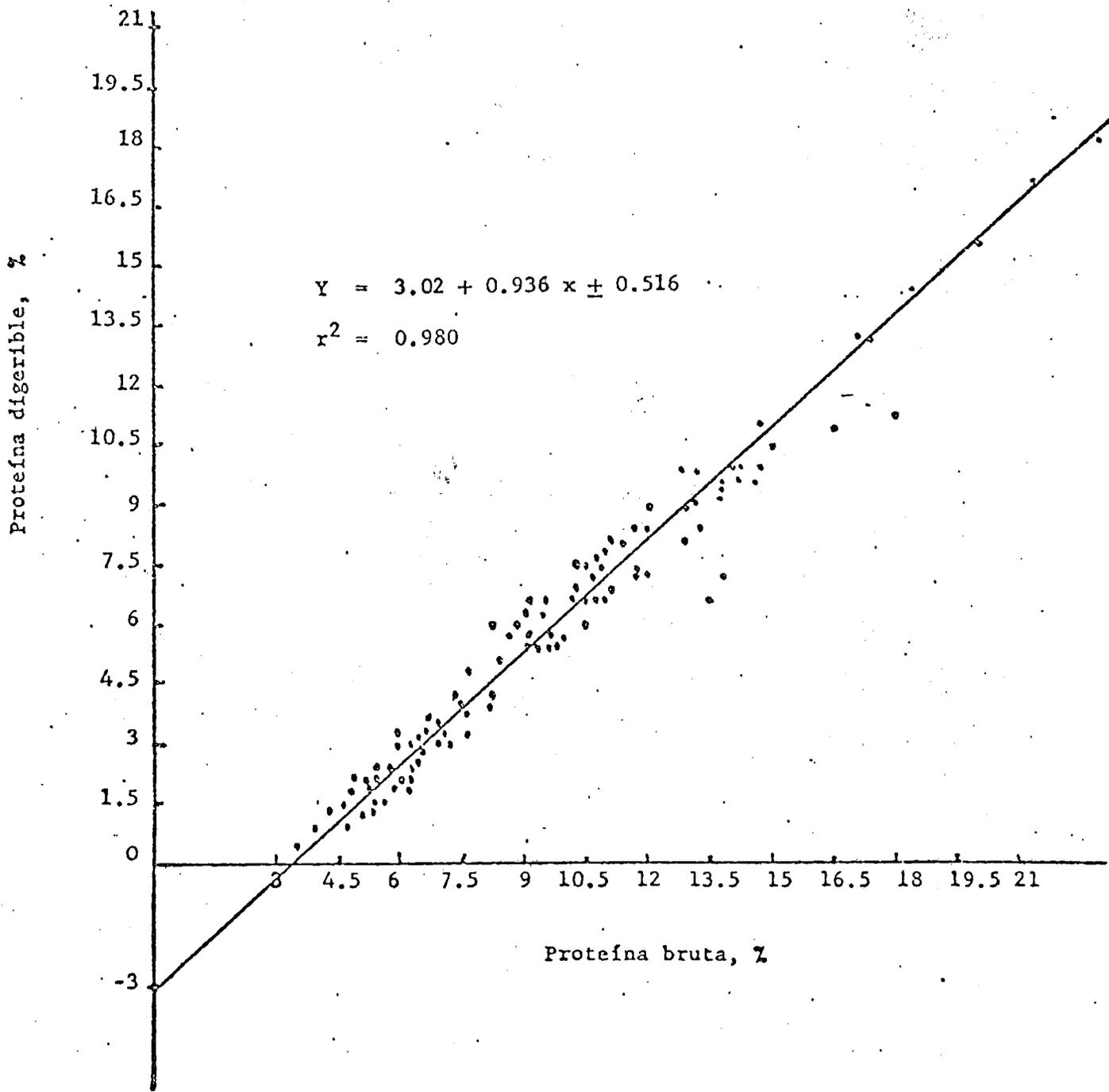
Height of the plant at cutting, m

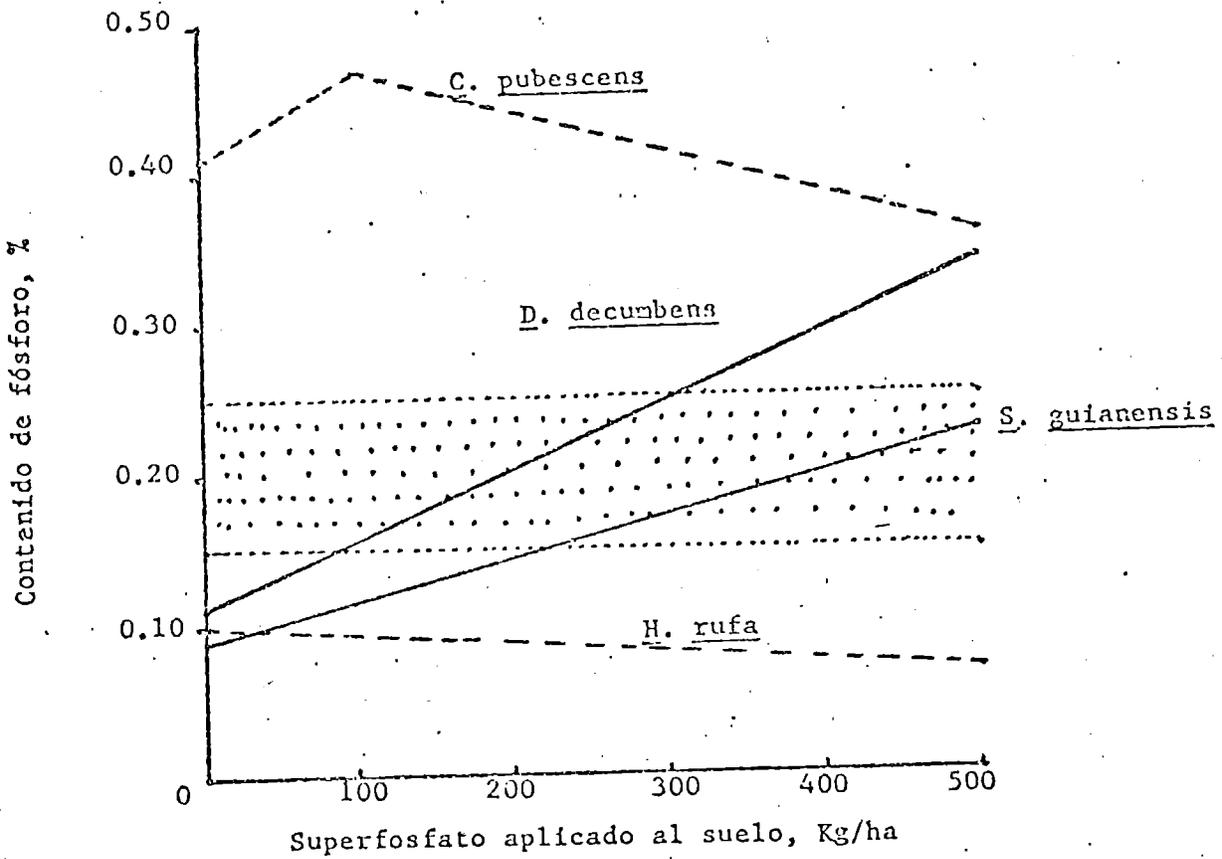
0.60      0.90      1.20      1.50 .30

Plant parts

Leaf Hoja	71.2	73.4	72.6	72.0
Petiole Pecfolo	64.6	65.1	62.8	61.5
Internodes 0-6 Entrenudos	73.6	69.8	68.9	59.4
Internodes 7-11	56.8	57.0	55.5	51.1
Basal internodes Entrenudos basales	45.8	44.4	44.5	42.6
Inflorescens Inflorescencia	-	-	69.7	60.4

Relación entre el contenido de proteína bruta y el contenido de proteína digerible en los forrajes de América Latina.





Contenido de fósforo de especies forrajeras en la selva peruana. La zona en puntos corresponde a los niveles necesarios para el crecimiento y reproducción del ganado (Adaptado de Santhirasegaram, 1976).

Efecto de la localización de la hoja sobre el contenido de N en P. maximum (adaptado de Wilson. Aust. J. Agric. Res. 27:343-354. 1976).

Días después de la expansión	Nivel de inserción (de abajo hacia arriba)				
	B	5	7	10	13
0	4.7	4.0	3.7	3.2	2.5
5	4.6	3.7	3.6	2.9	2.4
10	3.0	2.9	2.7	2.6	2.2
20	1.5	1.9	1.8	1.7	1.7

CONSUMO Y DIGESTIBILIDAD DE CINCO GRAMINEAS  
TROPICALES, SEPARADAS ENTRE HOJAS Y TALLOS.

(Adaptado de Laredo y Minson, Aust. J. Agric.  
Res. 24: 875-888. 1973).

DIAS DE CRE- CIMIENTO.	HOJA	TALLO	DIFERENCIA
	CONSUMO, g M.S./ P. <sup>75</sup>		
47	69.4	48.9	- 20.5
74	50.9	34.8	- 16.1
89	53.0	26.3	- 26.7
	DIGESTIBILIDAD M.S., %		
47	59.6	61.1	1.5
74	50.8	54.0	3.2
89	47.5	52.2	4.7

Tabla Efecto de fertilización con nitrógeno en el contenido de proteína y digestibilidad de forrajera

Nivel de fertilizante kg/ha	Panicum coloratum		Cynodon dactylon var. Coastal	
	% PC	% dig	% PC	% dig
25	5.9	56.1	6.7	53.8
100	6.6	57.1	7.6	54.8
200	9.8	55.8	10.6	53.4
300	10.8	57.4	10.8	55.1

a Estación Experimental de Texas

✓

DIGESTIBILIDAD Y CONSUMO DE TRES FORRAJES TROPICALES  
 FERTILIZADOS CON 125 y 500 Kg N/ha DESPUES DE CADA CORTE  
 (Adaptado de Minson. Aust. J. Exp. Agric. An. Hus.13:153-  
 157 . 1973)

<u>Especie</u>	<u>125 Kg N</u>	<u>500 Kg N</u>	<u>Diferencia</u>
<u>Digestibilidad de la M.S. %</u>			
C. gayana	58.8	62.1	3.3 ns
D. decumbens	60.2	62.2	2.0 ns
P. clandestinum	58.3	59.4	1.1 ns
<u>Consumo de M.S. , g / P<sup>0.75</sup></u>			
C. gayana	63.0	66.3	3.3 ns
D. decumbens	61.3	65.4	4.1 ns
P. clandestinum	60.7	60.5	- 0.2 ns

Tabla Efecto de secamiento en la composición y digestibilidad de Rye grass inmaduro.

COMPONENTE	CONGELADO	SECO
	%	%
Pared celular	50.5	59.9
Contenido celular	49.5	40.1
Dig M S	74.0	69.0

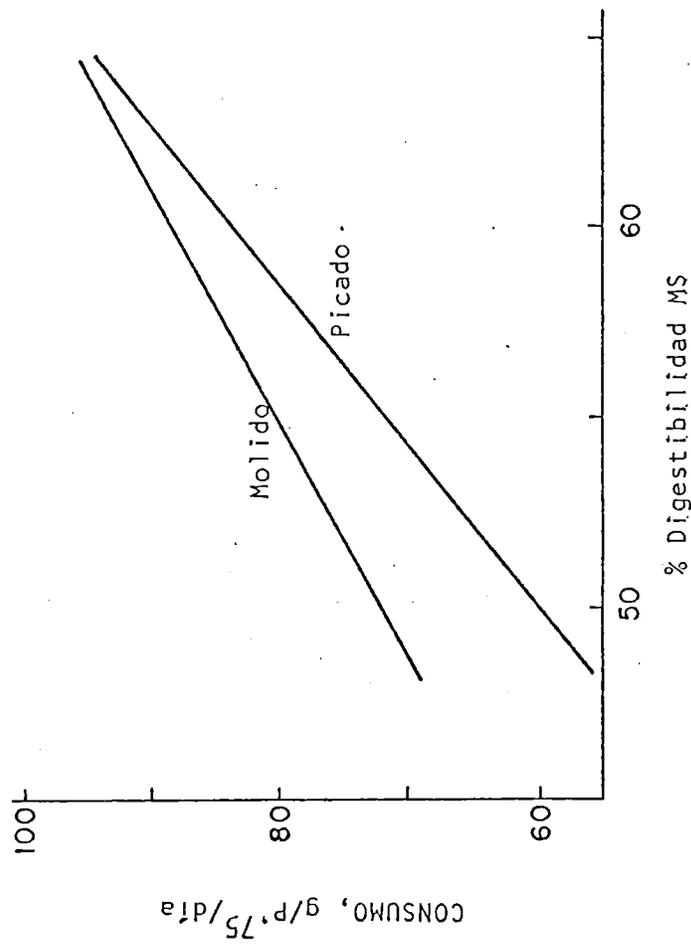
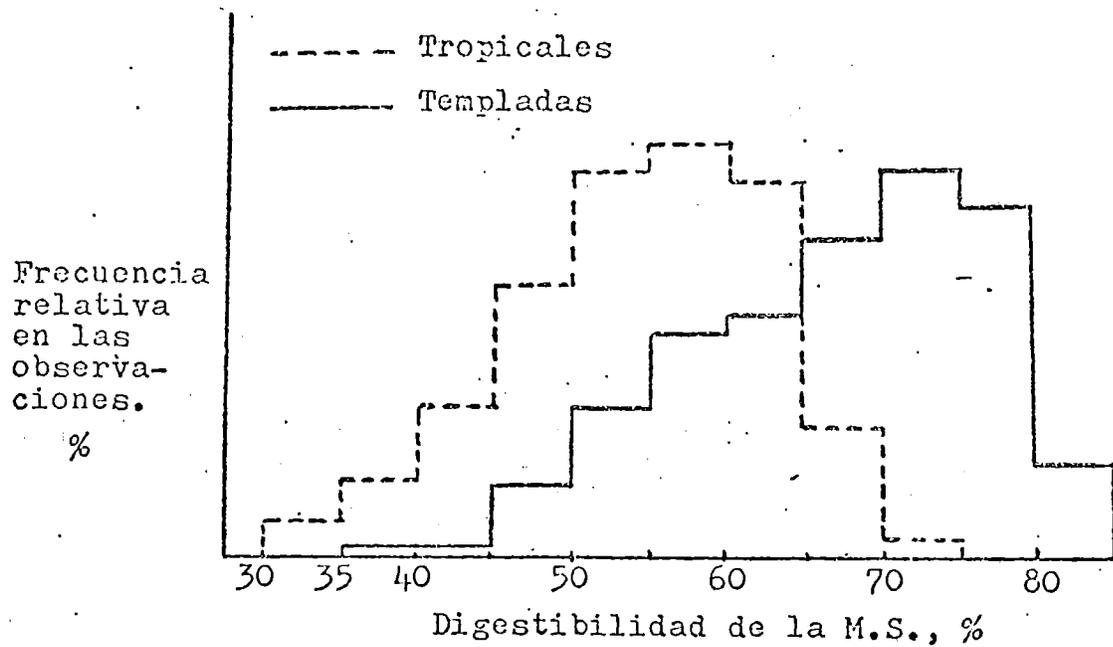


Figura: Efecto de forma física del forraje en relación consumo-digestibilidad.



Diferencias en digestibilidad entre forrajes de clima

tropical y templado

(Tomado de Minson y McLeod. Proc. Int. Grass. Congress

XI : 719-722. 1970 )

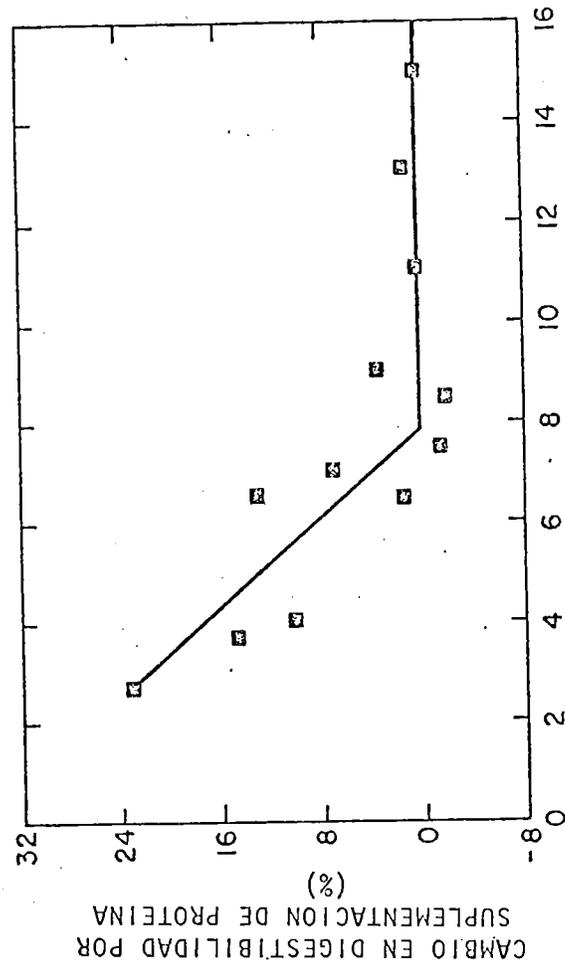
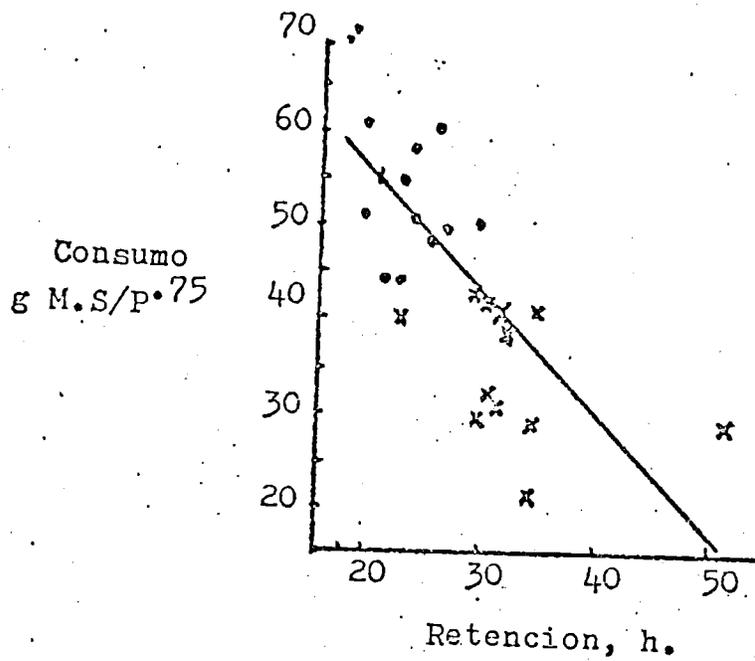
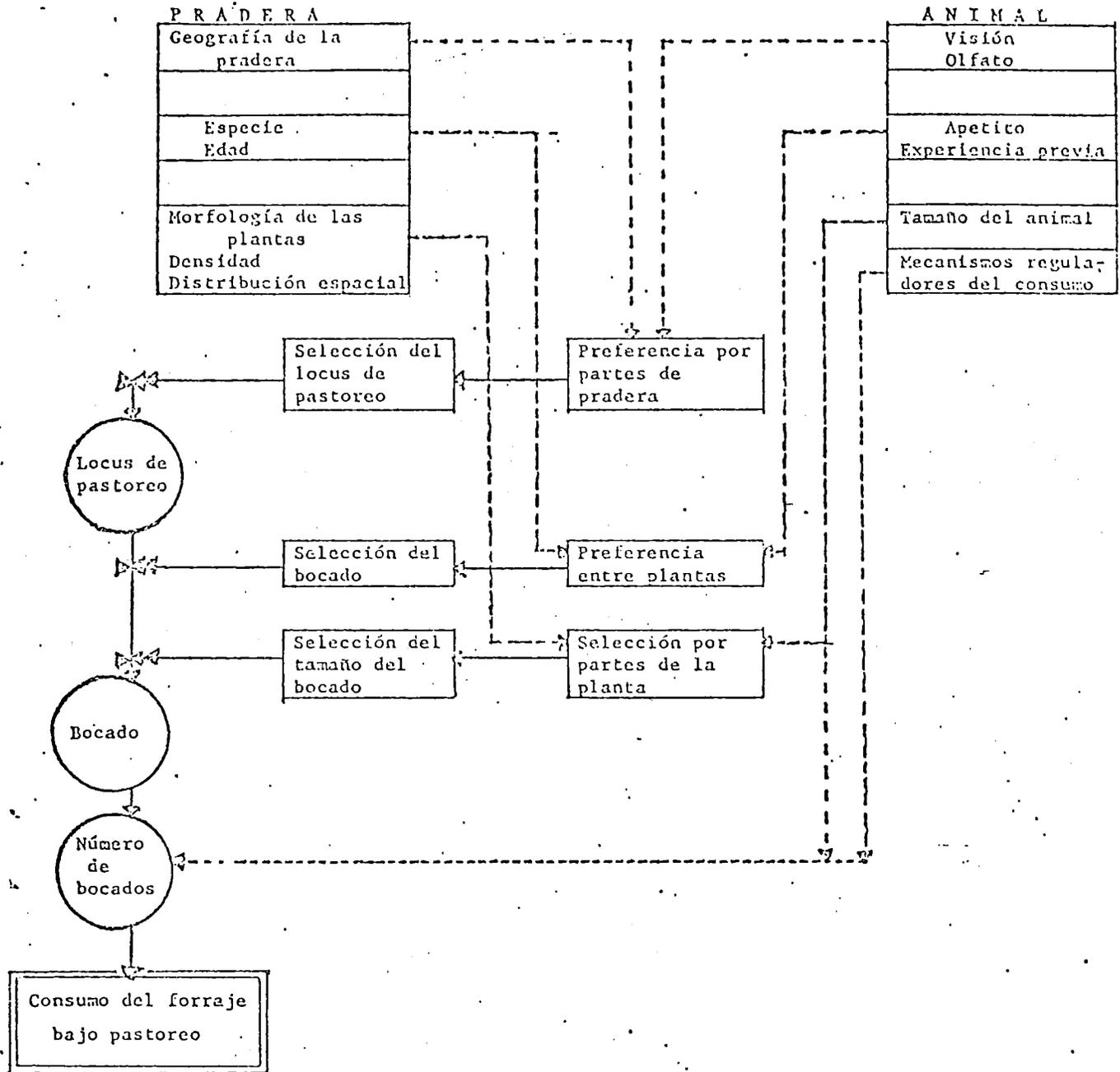


Figura: Nivel de proteína en el forraje necesario para que haya respuesta de suplementación de Nitrógeno en términos de digestibilidad.

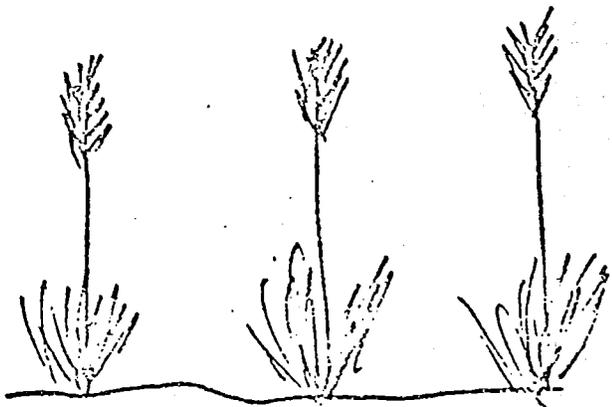
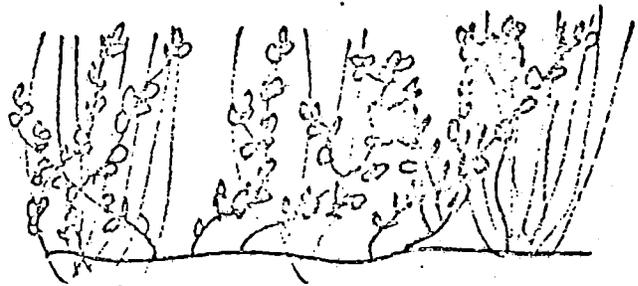
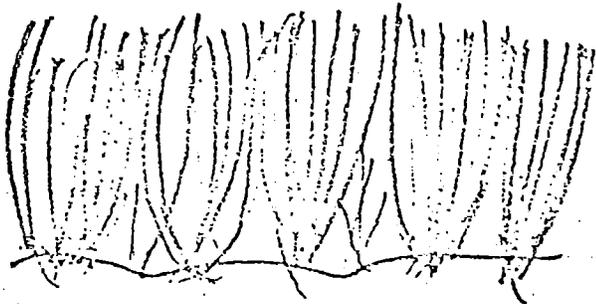
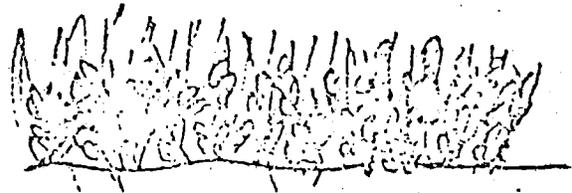


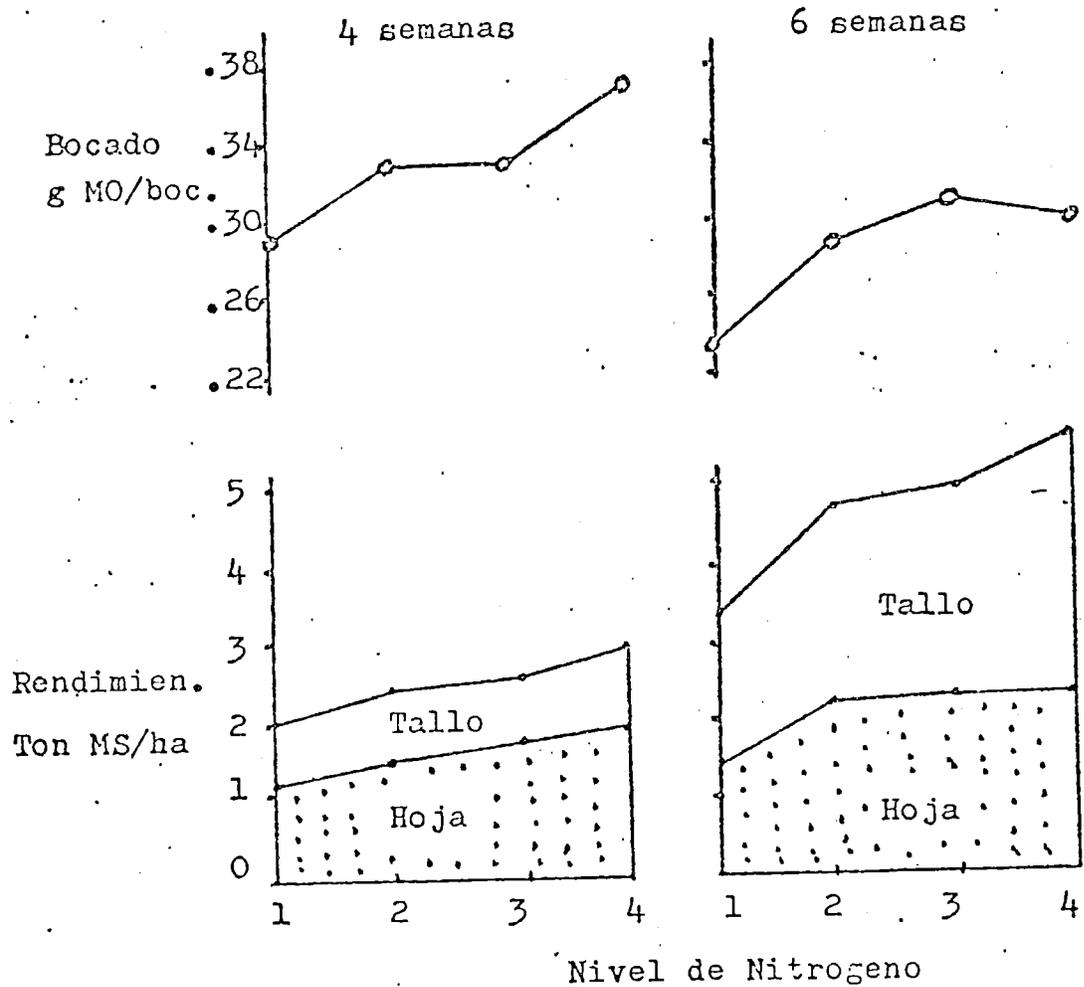
Relacion entre consumo de M.S. y tiempo de retencion de la M.S. ingerida, en el reticulo-rumen. Tomado de Laredo y Minson 1973.

RELACIONES ENTRE LA PRADERA Y EL ANIMAL QUE  
REGULAN EL CONSUMO BAJO PASTOREO



DISTRIBUCION ESPACIAL DE LA PRADERA Y CONSUMO DE  
FORRAJE POR EL GANADO





Tamaño de bocado y rendimiento de hoja y tallo del pasto *Setaria anceps*, Kazungula, fertilizado con Nitrogeno.

Adaptado de Stobbs . 1973.

Densidad de hojas (DH) en pastos tropicales y templados

	IAF	Altura cm	DH/cm (IAF/cm)
<i>Setaria anceps</i>	8.5	80	0.121
<i>Pennisetum typhoides</i>	9.5	120	0.079
<i>Desmodium intortum</i>	5.5	50	0.110
<i>S. anceps</i> / <i>D. intortum</i>	4.2	38	0.114
<i>Lolium</i> spp.	8.0	24	0.333

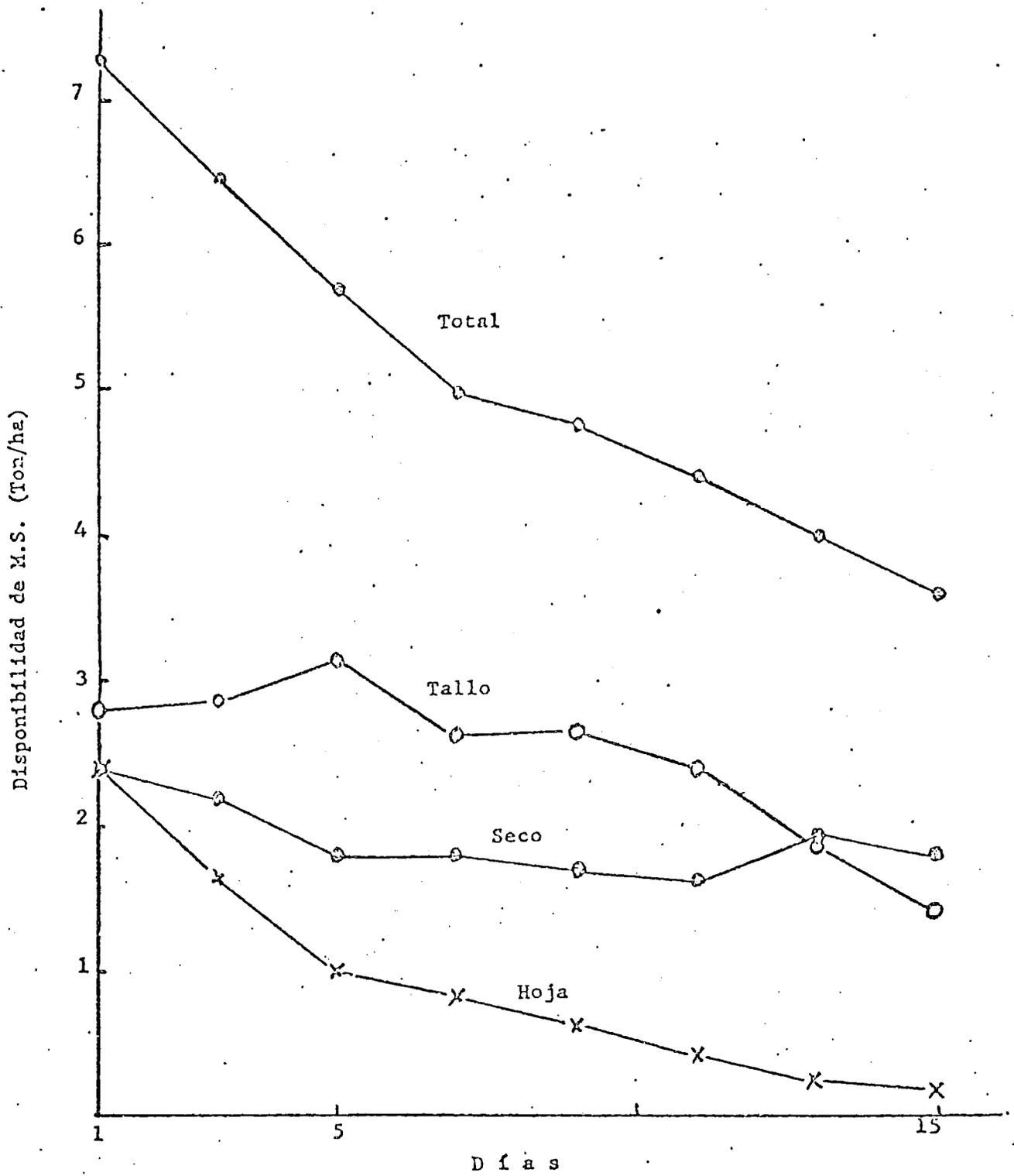
Adaptado de Stobbs 1973

✓  
Tiempo de pastoreo y consumo de forrajes en pastoreo

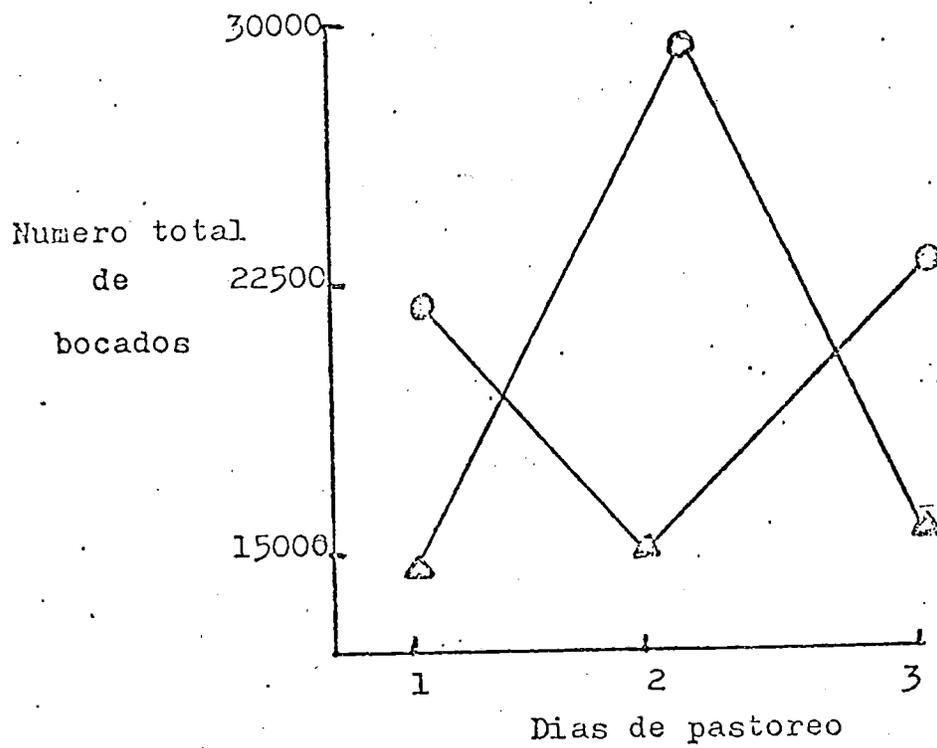
Adaptado de Stobbs 1974

Pradera	Tiempo de pas- toreo horas/día	Número de bocados* bocados/día	Tamaño de bocado g.MC/bocado
Templada, joven	7.7	28.800	0.43
Tropical, joven	9.4	44.530	0.34
Tropical, madura	11.2	61.700	0.17

\* Número total de bocados (de consumo y rumia). Entre 50 y 50% de los bocados son de consumo.



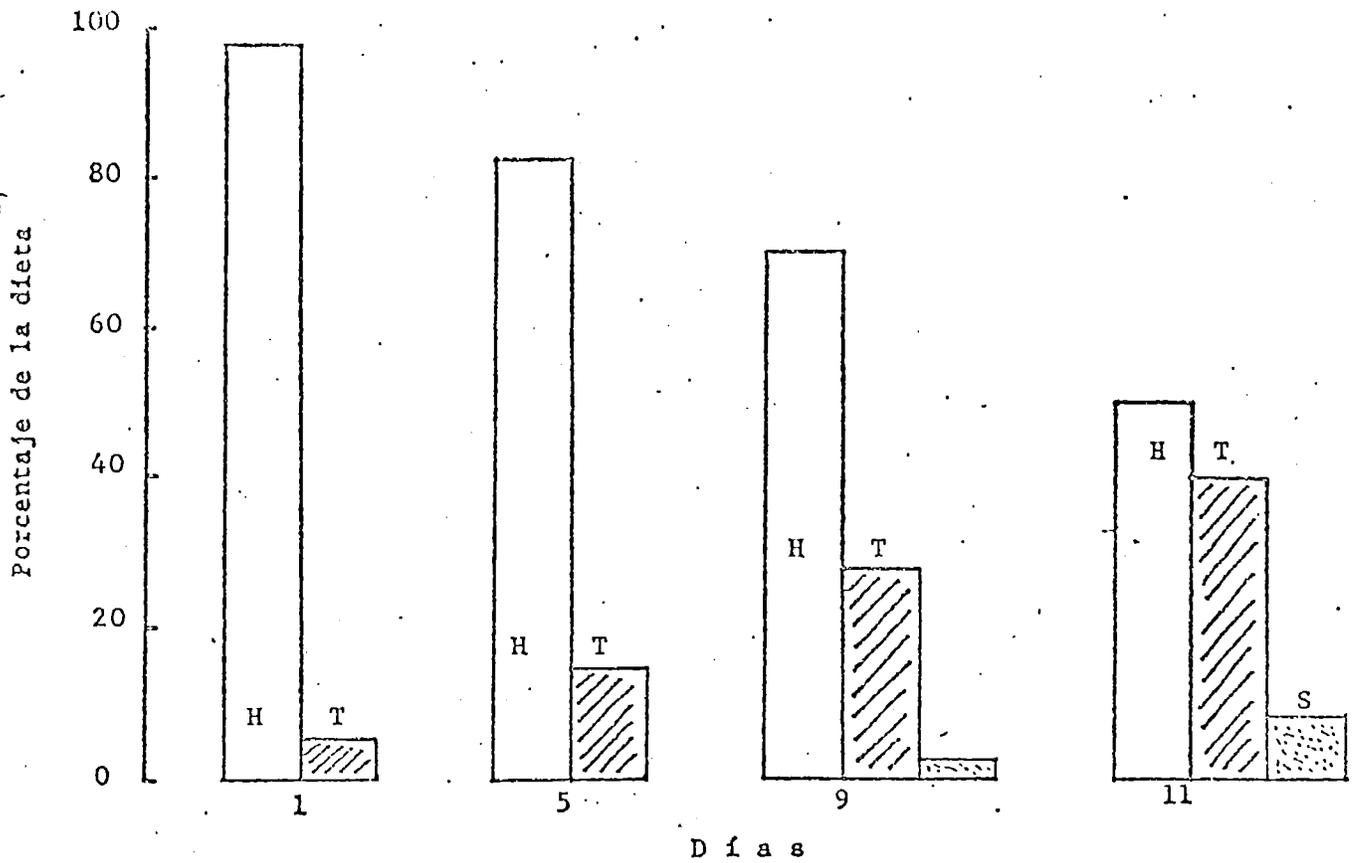
Disponibilidad de M.S. en una pradera de Setaria en varios estados de defoliación. (Adaptado de Chacón y Stobbs. 1976).



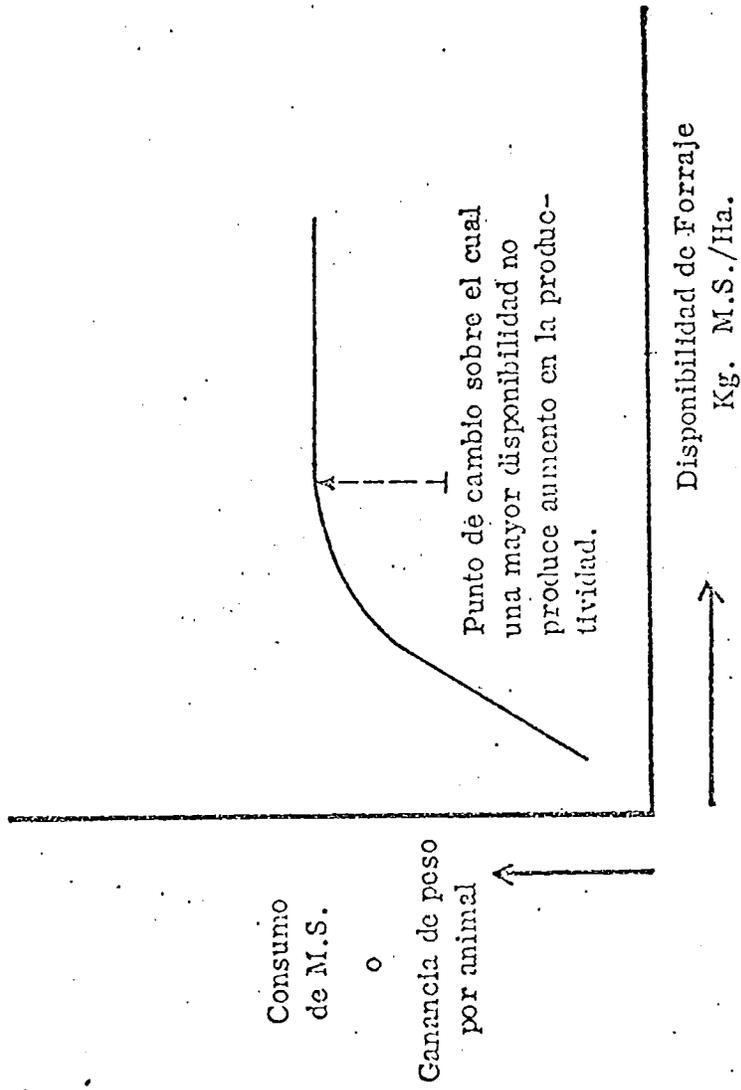
● . ● Setaria, madura

▲ . ▲ Cebada, tierna

Numero total de bocados por vacas secas en 380 minutos de pastoreo. Tomado de Stobbs 1974.



Composición porcentual de la dieta de vacas en una pradera de Setaria, defoliada continuamente. (Adaptado de Chacón y Stobbs. 1976.)



*La línea original*

Relación General entre Disponibilidad de Forraje y Producción por Animal.

Cuadro Caracterización química del suelo y tejido foliar de *Desmodium ovalifolium* 350 consumido y no consumido bajo pastoreo en Carimagua

Componente	Suelo		Tejido foliar <sup>a</sup>		
	Area de consumo	Area de no consumo	Componente	Consumido	No consumido
	$\bar{X}$	$\bar{X}$		$\bar{X}$	$\bar{X}$
pH	3.7	3.7	Taninos <sup>b</sup> (%)	20.2	31.3
Al (meq/100 g)	3.0	3.2	P (%)	.20	.11
P (ppm) Bray II	1.4	.7	K (%)	.89	.52
S (ppm)	16.0	11.7	Ca (%)	.91	.92
Ca (meq/100 g)	.28	.10	Mg (%)	.20	.26
Mg (meq/100 g)	.06	.04	S (%)	.17	.09
K (meq/100 g)	.09	.06	Proteína (%)	16.4	10.2
			DIVMS (%)	51.6	45.4

a/ Promedio de dos muestreos realizados 3 y 5 meses después de iniciado el pastoreo (Febrero, 1980)

b/ Catequinas equivalentes

Cuadro Efecto de época del año en la digestibilidad *in vitro* de gramíneas bajo pastoreo continuo en Carimagua

Gramínea	Parte planta	Epoca del año		
		Inicio <sup>a</sup> 1 lluvia	Final <sup>b</sup> 1 lluvia	Inicio <sup>a</sup> 1 sequía
-----% DIVMS-----				
<i>B. decumbens</i>	Hoja	71.0 ± 4.9	69.0 ± 3.1	60.9 ± 4.6
	Tallo	60.0 ± 6.4	54.0 ± 3.9	49.3 ± 3.3
<i>B. humidicola</i>	Hoja	76.5 ± 1.9	63.9 ± 2.1	54.6 ± 3.7
	Tallo	60.0 ± 2.0	56.9 ± 1.8	47.2 ± 1.2
<i>A. gayanus</i>	Hoja	57.3 ± 3.6	53.2 ± 3.9	44.2 ± 2.8
	Tallo	62.2 ± 3.4	48.8 ± 4.6	33.8 ± 3.8
<i>P. maximum</i>	Hoja	-	51.7 ± 4.3	40.4 ± .7
	Tallo	-	43.9 ± 3.3	25.2 ± 2.0

a Muestreo Mayo 1980

b Muestreo Octubre 1979

c Muestreo Enero 1980

Cuadro . Proporción de leguminosa y contenido de proteína del forraje disponible, caracterización de lo consumido por animales fistulados del esófago y cambios de peso de novillos en diferentes pasturas durante la época seca en Carimagua\*.

Pastura	F o r r a j e					Cambio de peso g/an/d
	Disponible		Consumido		Proteína	
	Leguminosa	Proteína	Leguminosa**	DIVIS		
-----%					-----	
<i>A. gayanus</i>	—	2,4	—	49,1	4,2	- 21
<i>A. gayanus</i> + <i>S. capitata</i> 1405	34	5,1	26	47,2	6,3	+224
<i>A. gayanus</i> + <i>S. capitata</i> 1019 + 1315	67	6,5	31	41,7	6,6	+173
<i>A. gayanus</i> + Kudzu	58	6,7	73	45,9	9,8	+209
<i>A. gayanus</i> + <i>Z. latifolia</i> 728	4	2,7	1	43,2	4,6	+ 9

\* Período 12 de Diciembre a 8 de Abril (117 días de pastoreo con 1 an/ha)

\*\* Presencia en extrusa esofágica.

Cuadro . Digestibilidad *in vitro* de partes de planta en asociaciones gramíneas y leguminosas en época seca en Carimagua<sup>a/</sup>.

Pastura	Componente	Parte de planta			IC/
		Hoja	Tallo	MM <sup>b/</sup>	
		-----% DIVMS-----			
<i>Andropogon gayanus</i>	Gramínea	51,7	43,4	35,1	—
<i>Andropogon gayanus</i> + <i>Stylosanthes capitata</i>	Gramínea Leguminosa	47,8 65,2	38,9 37,2	32,4 30,4	— 65,2
<i>Andropogon gayanus</i> + <i>Stylosanthes capitata</i> 1019 + 1315	Gramínea Leguminosa	54,9 63,3	41,8 41,0	33,2 36,0	— 64,8
<i>Andropogon gayanus</i> + Kudzu	Gramínea Leguminosa	48,0 56,7	41,7 50,0	33,4 41,2	— 59,9
<i>Andropogon gayanus</i> + <i>Zornia latifolia</i>	Gramínea Leguminosa	53,4 —	51,8 48,4	39,0 43,5	— —
Promedio	Gramínea Leguminosa	51,2 61,7	43,5 44,1	35,8 37,8	— 63,3

a/ Muestreo Febrero 1980.

b/ Materia muerta

c/ Inflorescencia.

Cuadro Disponibilidad de materia seca total en mezcla de *A. gayanus* + *D. ovalifolium* bajo dos estados de madurez (Quilichao)

Días en pastoreo	No. de obs.	Inmaduro	Maduro	Promedio
		-----kg MS/ha-----		
Inicio	36	4.558 <sup>±</sup> 388	5.659 <sup>±</sup> 98	5.109
2 días	36	3.930 <sup>±</sup> 258	4.164 <sup>±</sup> 251	4.047
Promedio		4.244	4.911	

Cuadro Presión de pastoreo ejercida en pastoreo de mezcla de *A.gayanus* + *D.ovalifolium* bajo dos estados de madurez (Quilichao)

Días en pastoreo	No.de obs.	Inmaduro <sup>a</sup>	Maduro <sup>b</sup>	$\bar{X}$
		-----kg MS/100 kg PV-----		
Inicio	12	27.4 <sup>±</sup> 3.9	16.8 <sup>±</sup> .7	22.1
2 días	12	36.8 <sup>±</sup> 4.2	19.6 <sup>±</sup> .8	28.2
-				
X		32.1	18.2	

a Area/parcela 360 m<sup>2</sup>

b Area/parcela 180 m<sup>2</sup>

Cuadro . Efecto de suplementación de nitrógeno o leguminosa en el consumo de materia seca de gramínea y nutrimentos digeribles totales.

Tratamiento	Control	Suplemento	
		MS gramínea	Nutrimentos digeribles
-----g/P <sup>0.75</sup> /día-----			
1. <u>Sabana nativa</u> <sup>a/</sup>	45,4	—	15,0
Melaza + Urea	—	60,9	27,4
+ Algodón	—	56,3	29,5
2. <u>Melinis minutiflora</u> <sup>b/</sup>	38,4	34,1	15,6
+ <i>Stylosanthes guianensis</i>	—	—	25,6

<sup>a/</sup> Sabana nativa época seca: 9,3 y 7,0 g/P<sup>0.75</sup>/an/día de torta de algodón y melaza-urea, respectivamente

<sup>b/</sup> *Melinis minutiflora* época seca: 20% de lo ofrecido fue *Stylosanthes guianensis*.

Cuadro . Digestibilidad *in vitro* de forraje disponible en sabana nativa + bancos de Kudzu a finales de invierno en Carimagua<sup>a/</sup>.

Tratamiento	Sabana nativa		Kudzu	
	Hoja	Tallo	Hoja	Tallo
	-----% DIMS-----			
<u>Sabana + banco de Kudzu</u>				
Carga baja	25,4	21,7	49,4	43,9
<u>Sabana + banco de Kudzu</u>				
Carga alta	24,0	24,2	45,1	41,0

a/ Muestreo Octubre 1979.

Cuadro Efecto de la suplementación de nitrógeno en consumo y digestibilidad de sabana nativa (adaptado de Informe Anual CIAT 1974)

Descripción	Heno Sabana Nativa + Tratamientos		
	Control	Torta de Algodón	Melaza + urea
<u>Nivel de Oferta</u> (g/kg $\cdot$ 75/día)			
Heno	88.6	89.2	89.0
Suplemento	-	9.3	7.0
Minerales	1.1	1.1	1.1
<u>Nivel de Consumo</u> (g/kg $\cdot$ 75/día)			
Heno	45.4	56.3	60.9
Total	46.5	66.7	69.0
Digestibilidad M.S. (%)	32.2	44.2	39.7

Cuadro Caracterización de *S. capitata* ofrecido y rechazado por ovinos en jaula en prueba de consumo y digestibilidad (Quilichao)<sup>a</sup>

Detalle	Parte de Planta	-----Materia seca-----	
		Ofrecida	Rechazada
Proporción	Hoja	15.0 $\pm$ 3.9	6.3 $\pm$ 3.6
	Tallo	33.8 $\pm$ 1.5	68.5 $\pm$ 1.6
	Flor	51.2 $\pm$ 1.4	25.2 $\pm$ 1.4
Proteína	Hoja	16.2 $\pm$ .4	-
	Tallo	8.3 $\pm$ .3	-
	Flor	14.9 $\pm$ .6	-

a/ Promedio de tres ecotipos de *S. capitata* (1019, 1315 y 1405)

Cuadro Valor nutritivo de tres ecotipos de *S. capitata* en estado de floración con ovinos en jaula (Quilichao).

Leguminosa	Nivel de oferta	Proteína en ofrecido	Consumo de MS	Digestibilidad MS	Múltiplo de mantenimiento <sup>b</sup>
	gMS/P <sup>.75</sup> /día	%	gMS/P <sup>.75</sup> /día	%	
<i>S. capitata</i> 1019 <sup>a</sup>	128	10.4 ± 1.2	75.7 ± 5.5	59.4 ± 3.3	1.8
<i>S. capitata</i> 1315 <sup>a</sup>	117	8.9 ± 2.8	71.6 ± 5.5	56.8 ± 3.0	1.6
<i>S. capitata</i> 1405 <sup>a</sup>	122	9.1 ± 1.8	71.9 ± 7.2	59.2 ± 1.2	1.7

a/ Composición promedio de ofrecido: 15% hoja, 34% tallo y 51% flor

b/ Mantenimiento: 25 gMS digerible/P<sup>.75</sup>/día

Cuadro Caracterización del *Andropogon gayanus* y *Stylosanthes capitata* 1019 ofrecido a ovinos en jaula en ensayo de diferentes proporciones gramínea-leguminosa (Quilichao).

Material	Componente	MS ofrecida	Parte de la planta		
			Hoja	Tallo	Flor
		----- % -----			
A. <i>gayanus</i> 621 <sup>a</sup>	Proporción	-	61.2	38.8	-
	Proteína	7.2	8.9	4.1	-
	Fósforo	-	.12	.07	-
	Calcio	-	.33	.21	-
	Dig. <u>IN VITRO</u>	60.8	62.7	56.1	-
S. <i>capitata</i> 1019 <sup>b</sup>	Proporción	-	29.4	34.6	36.0
	Proteína	13.2	17.2	9.2	16.5
	Fósforo	-	.16	.09	.18
	Calcio	-	.95	.58	.84
	Dig. <u>IN VITRO</u>	58.4	60.3	49.8	64.3

a/ Edad *Andropogon gayanus* 621: rebrote 6 semanas  
b/ Edad *Stylosanthes capitata* 1019: rebrote 12 semanas

Cuadro Efecto de diferentes proporciones de gramíneas (*Andropogon gayanus* 621) y leguminosa (*Stylosanthes capitata* 1019) en el consumo y digestibilidad de materia seca con ovinos en jaula<sup>a</sup> (Quilichao)

Proporción <sup>b</sup>	Consumo	Digestibilidad	Múltiplo de mantenimiento <sup>c</sup>
Gramínea/ leguminosa	Materia seca total	Materia seca	
	g/P <sup>.75</sup> /día	%	
100 : 0	62.5	57.7	1.4
90 : 10	60.6	59.3	1.4
80 : 20	56.1	57.6	1.3
70 : 30	62.7	55.4	1.4
Promedio	60.5	57.5	1.4

a/ Gramínea: rebrote de 7 semanas

Leguminosa: rebrote de 12 semanas

b/ Nivel de oferta promedio para cada proporción: 100 gMS/P<sup>.75</sup>/día

c/ Mantenimiento: 25 gMS digerible/P<sup>.75</sup>/día

Cuadro Proporción de hojas y tallo y contenido de proteína en *B. decumbens*, *B. humidicola* y *D. ovalifolium* 350 ofrecido a ovinos en jaula en prueba de consumo y digestibilidad (Quilichao).

Detalle	Parte de Planta	-----Forraje ofrecido-----		
		<i>B. decumbens</i>	<i>B. humidicola</i>	<i>D. ovalifolium</i> 350
		----- % -----		
Proporción	Hoja	75.5	88.3	54.6
	Tallo	24.5	11.7	45.4
Proteína	Hoja	4.7 ± .6	7.0 ± .6	12.6 ± .5
	Tallo	2.1 ± .3	2.8 ± .5	6.7 ± .5

Cuadro Consumo y digestibilidad con ovinos en jaula de *D. ovalifolium*, *B. decumbens* y mezcla de *B. decumbens* con *D. ovalifolium* (Quilichao).

Ofrecido	Nivel de oferta	Consumo de MS	Digestibilidad de MS
		gMS/P <sup>75</sup> /día	%
<i>D. ovalifolium</i> 350	114	61.3 <sup>b</sup> ± 4.7	57.0 <sup>b</sup> ± 0.7
<i>B. decumbens</i>	125	59.9 <sup>b</sup> ± 5.8	60.2 <sup>c</sup> ± 2.8
<u>Mezcla</u>			
<i>B. decumbens</i>	100 (81%)	55.5 (79%)	
<i>D. ovalifolium</i> 350	23 (19%)	15.0 (21%)	
Total	123	70.5 <sup>c</sup> ± 1.5	61.9 <sup>c</sup> ± 1.5

a/ *B. decumbens* rebrote de 12 semanas

bc/ Medias en la misma columna diferentes (P<0.05)

Cuadro Consumo y digestibilidad con ovinos en jaula de *D. ovalifolium*, *B. humidicola* y mezcla de *B. humidicola* con *D. ovalifolium* (Quilichao).

Ofrecido	Nivel de oferta	Consumo de MS	Digestibilidad de MS
	-----gMS/P. <sup>75</sup> /día-----		%
<i>D. ovalifolium</i> 350	159	71.6 <sup>b</sup> ± 5.1	56.7 <sup>b</sup> ± 3.2
<i>B. humidicola</i>	144	82.8 <sup>c</sup> ± 3.4	59.1 <sup>c</sup> ± 1.2
<u>Mezcla</u>			
<i>B. humidicola</i>	109 (78%)	70.1 (81%)	
<i>D. ovalifolium</i> 350	<u>31</u> (22%)	17.8 (20%)	
Total	140	87.9 <sup>c</sup> ± 7.2	63.9 <sup>c</sup> ± 2.1

a/ *B. humidicola* rebrote de 6 semanas

bc/ Medias en las misma columna diferentes (P<0.05)



ST  
95  
1435  
1970

METODOS PARA EL ANALISIS QUIMICO Y LA EVALUACION  
BIOLOGICA DE ALIMENTOS PARA ANIMALES



Cofe

10541

Preparado por

Lorin E. Harris, BS. MS. PhD  
Profesor Visitante  
de la  
Universidad del Estado de Utah

Editado por  
Center for Tropical Agriculture  
Feed Composition Project  
Livestock Pavilion  
University of Florida  
Gainesville, Florida 32601  
USA

95  
H35

Material reproducido por la Universidad de Florida. Marzo de 1970.

Para obtener información adicional diríjase a:

Center for Tropical Agriculture  
Feed Composition Project  
Livestock Pavillion  
University of Florida  
Gainesville, Florida 32601  
USA

#### AGRADECIMIENTO

La presente investigación es financiada por la Agencia Internacional para el Desarrollo (AID) bajo el siguiente contrato: Proyecto Número 17-130-514, designado "Estudio y análisis de la producción de alimentos para los animales y de la nutrición animal en el trópico húmedo-seco y húmedo de América Latina".

ADAPTACION Y TRADUCCION  
AL  
ESPAÑOL Y PORTUGUES

por

Hernán Fonseca, BS. MS.  
Profesor Visitante  
Universidad de Florida  
Director, Laboratorio de Nutrición Animal  
Facultad de Agronomía  
Universidad de Costa Rica

TRADUCCION

Español

Juan Salazar, DVM. MS.  
Asistente Graduado - Universidad de Florida  
Instituto Colombiano Agropecuario  
Bogotá, Colombia

Portugués

Edgard L. Caielli, Ing. Agr. MS.  
Asistente Graduado - Universidad de Florida  
Secretaría de Agricultura, Estado de Sao Pablo  
Nova Odessa, Brasil

DIRECTORES DEL PROYECTO

John C. Glenn, BS. MS. PhD.  
Profesor Asociado  
Departamento de Ciencia Animal  
Universidad de Florida

T. J. Cunha, BS. MS. PhD.  
Director  
Departamento de Ciencia Animal  
Universidad de Florida

William C. Christiansen, BS. MS. PhD.  
Profesor Asociado  
Departamento de Ciencia Animal  
Universidad de Florida

Hugh Popenoe, BS. MS. PhD.  
Director  
Centro para la Agricultura Tropical  
Universidad de Florida

## CONTENIDO

	Página
Métodos químicos y biológicos . . . . .	1401
Pesado de las muestras por diferencia para el análisis químico. . . . .	1501
Determinación de materia seca y materia seca parcial. . . . .	1601
Determinación de la materia seca . . . . .	1701
Determinación de materia seca parcial . . . . .	1801
Determinación de energía bruta. . . . .	1901
<b>Análisis proximal</b>	
Determinación de ceniza . . . . .	2101
Determinación de fibra cruda. . . . .	2201
Determinación de extracto etéreo. . . . .	2301
Determinación del extracto libre de nitrógeno . . . . .	2401
Determinación de nitrógeno y proteína cruda . . . . .	2501
<b>Materia orgánica. . . . .</b>	<b>2601</b>
Determinación del contenido celular . . . . .	2701
Determinación de paredes celulares. . . . .	2801
Determinación de fibra por el método ácido detergente . . . . .	3201
Determinación de lignina por el método ácido detergente . . . . .	3301
Determinación de lignina, celulosa y sílice por permanganato . . . . .	3501
<b>Análisis para elementos mayores</b>	
Preparación de la solución de cenizas para la determinación de calcio, magnesio y fósforo . . . . .	3651
Determinación de calcio . . . . .	3701
Determinación de magnesio . . . . .	3801
Determinación de fósforo. . . . .	3901

## CONTENIDO

	Página
Métodos químicos y biológicos . . . . .	1401
Pesado de las muestras por diferencia para el análisis químico. . . . .	1501
Determinación de materia seca y materia seca parcial. . . . .	1601
Determinación de la materia seca . . . . .	1701
Determinación de materia seca parcial . . . . .	1801
Determinación de energía bruta. . . . .	1901
 Análisis proximal	
Determinación de ceniza . . . . .	2101
Determinación de fibra cruda. . . . .	2201
Determinación de extracto etéreo. . . . .	2301
Determinación del extracto libre de nitrógeno . . . . .	2401
Determinación de nitrógeno y proteína cruda . . . . .	2501
Materia orgánica. . . . .	2601
Determinación del contenido celular . . . . .	2701
Determinación de paredes celulares. . . . .	2801
Determinación de fibra por el método ácido detergente . . . . .	3201
Determinación de lignina por el método ácido detergente . . . . .	3301
Determinación de lignina, celulosa y sílice por permanganato . . . . .	3501
 Análisis para elementos mayores	
Preparación de la solución de cenizas para la determinación de calcio, magnesio y fósforo . . . . .	3651
Determinación de calcio . . . . .	3701
Determinación de magnesio . . . . .	3801
Determinación de fósforo. . . . .	3901

	Página
Análisis para elementos menores . . . . .	4101
Determinación de cobalto. . . . .	4201
Determinación de manganeso. . . . .	4301
 Análisis para vitaminas	
Determinación del caroteno en alimentos y forrajes. .	4501
Determinación colorimétrica de caroteno y vitamina A en sangre. . . . .	4601
Determinación de vitamina A en el hígado. . . . .	4701
 Otros análisis	
Determinación de cianuro en plantas . . . . .	4801
Determinación del tamaño de partícula en las materias primas y concentrados para animales por medio del cernido. . . . .	4851
Determinación de nitratos y nitritos en forrajes. . .	4901
 Procedimientos biológicos	
Digestión de materia seca y materia orgánica <u>in vitro</u>	5001
Determinación del consumo voluntario y coeficientes de digestibilidad de los forrajes curados. . . . .	5101
Determinación de digestibilidad y balance nutricional en bovinos . . . . .	5201
Determinación de digestibilidad y balance nutricional en ovinos. . . . .	5301

## SECCION II

### MÉTODOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS

Los métodos químicos y biológicos empleados en el análisis de los alimentos y en los tejidos de animales y plantas que se describen en esta sección, han sido preparados para uso de los Laboratorios de Nutrición Animal. Son métodos probados y se consideran satisfactorios, tanto en lo que respecta al tiempo que se toma en desarrollar cada uno, como en su exactitud.

Existen diferentes maneras de conducir los análisis. Los métodos sirven únicamente como guías y en algunos casos se hace necesario modificarlos para adaptarlos a las condiciones propias de cada laboratorio y de los experimentos específicos.

El análisis proximal por el método Weende para alimentos humanos y para animales, comprende la determinación de la humedad (materia seca), extracto etéreo, proteína cruda, ceniza, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno (ELN).

En el pasado, estos análisis han proporcionado el punto de partida para efectuar otros que involucran la determinación de nutrientes más específicos, sirviendo también como base para calcular el valor de los nutrientes digestibles totales (NDT) de los alimentos, cuando también se

analizan las heces y la orina.

El avance logrado en el conocimiento de las necesidades nutricionales de los animales y en la utilización de los nutrientes contenidos en los alimentos, ha aflorado errores serios tanto en los métodos usados como en la interpretación que se le da a los valores de fracciones tales como la fibra cruda, el extracto libre de nitrógeno y el extracto etéreo.

Se recomienda por lo tanto que el sistema tradicional de valoración de los alimentos de nutrientes digestibles totales (NDT), sea sustituido por los métodos modernos de fraccionamiento de nutrientes contenidos en los alimentos.

En las normas modernas que señalan las necesidades nutricionales de los animales domésticos se está usando el sistema de las calorías (véase la página 701).

Para la evaluación de forrajes, los procedimientos de Van Soest se están usando preferentemente al método de Weende. Otros análisis de importancia actual son los relacionados a la determinación del consumo voluntario de alimentos y el que establece el coeficiente de digestibilidad de la materia seca in vitro.

Para la preparación de los cuadros de composición química de los alimentos, los valores de mayor importancia los constituyen el contenido de materia seca, proteína, amino ácidos, minerales, vitaminas y los valores de energía; estos últimos de acuerdo al sistema de las calorías.

## PESADO DE LAS MUESTRAS POR DIFERENCIA PARA EL ANALISIS QUIMICO

### Principio

La muestra se debe mantener tapada para que no pierda humedad mientras se pesa.

### Equipo

- (a) Balanza analítica que lea hasta el cuarto decimal. (x.xxxx).
- (b) Botellas para pesar, de 50 ml. de capacidad.
- (c) Cuchara pequeña de aluminio o plástico.
- (d) Botellas para pesar, de 10 a 25 ml. de capacidad.
- (e) Pipetas.

### Procedimiento

#### Muestras sólidas

Llene una botella de pesar de 50 ml. hasta la mitad con la muestra; coloque una cuchara pequeña de aluminio o plástico dentro de la misma y tápela. Obtenga el peso exacto de la muestra por diferencia.

Para mayor celeridad, disponga la pesada de las muestras para los diferentes análisis de la siguiente manera: las muestras para determinar materia seca, nitrógeno, cenizas, paredes celulares, etc., pueden pesarse en una sola botella para pesar. Ello significa que se necesitará pesar solamente una vez para cada muestra sencilla y dos veces por mues-

tra duplicada.

Después de que las muestras han sido pesadas para los diferentes análisis, proceda a vaciar completamente la botella de pesar, límpiela bien junto con la cuchara, con un trapo limpio y quedará lista para la próxima muestra. Si la contaminación de las muestras representa un problema entre pesadas, tal el caso en la determinación de elementos trazas o insecticidas, use una botella de pesar y cuchara individual para cada muestra.

No pese cantidades exactas de la muestra ya que ello toma más tiempo y se puede incurrir en errores de muestreo.

#### Muestras líquidas

Si existe sedimento mezcle bien la muestra y mientras se va mezclando, tome la muestra con una pipeta y colóquela en una botella de pesar tarada. La diferencia en peso equivale al peso de la muestra tomada con la pipeta. Se puede usar la misma pipeta para tomar de una vez otra muestra para análisis químico.

Este procedimiento es muy útil si se desea muestrear y pesar una cantidad grande de material tal como orina. Si se emplea el procedimiento anterior, los resultados se registran en por ciento y no por volumen.

#### Bibliografía

Harris, Lorin E. 1970. Nutrition research techniques for domestic and wild animals. Published by L. E. Harris (in press).

DETERMINACION DE MATERIA SECA  
Y MATERIA SECA PARCIAL

Principio

La humedad (agua) de la muestra se elimina por medio de la evaporación inducida por calor o el secamiento por congelación. La cantidad de muestra residual, convertida a porcentaje después del secado, se considera como el contenido (%) de materia seca total o materia seca parcial, según el procedimiento.

El objetivo es el de obtener información necesaria para lo siguiente:

- Determinar la materia seca de la muestra en base "tal como ofrecido" o "tal como recolectado".
- Preparar las muestras para el análisis químico.
- Reportar el resultado del análisis químico en base seca.

Las siguientes definiciones se encuentran en el glosario, pero para efectos de discusión se incluyen aquí nuevamente:

"Tal como ofrecido" se refiere al estado en que se encuentra el alimento cuando lo consume el animal. El término "tal como recolectado" se emplea para materiales que generalmente no se utilizan para la alimentación animal. i.e. orina, heces, etc. Si una muestra se encuentra parcialmente deshidratada, el análisis se reporta en esta misma base (en la que se le ofrece al animal) o sea en el estado en que fué recogida la muestra. Sinónimo: secada al aire i.e. heno; tal como recibida; fresca; verde; húmeda.

Muestra "parcialmente seco" se refiere a una muestra recibida en el laboratorio del material original en estado "tal como ofrecido" o "como recolectado" y luego que haya sido sometida al secamiento en estufa (generalmente con aire forzado) a una temperatura generalmente bajo 60° C o bajo secado por congelación y luego equilibrada con la humedad ambiente. Después de este tratamiento, la muestra por lo general va a contener más de 88% de materia seca (12% de humedad). Esto se hace con el objeto de analizarla y conservarla adecuadamente. El análisis que se le corre a esta muestra, entonces se reporta como muestra "parcialmente seco". A su vez, a esta muestra se le debe determinar la materia seca total, sometiéndola a una temperatura de 105° C, con el objeto de transformar los análisis químicos subsecuentes de la misma, a "base seca" o "libre de humedad". Este análisis corresponde al porcentaje de materia seca contenida en la muestra "parcialmente seco". Sinónimo: Secado al aire.

"Muestra seca" se refiere a una muestra del material original, secada a 105° C hasta que toda la humedad haya sido eliminada. Sinónimos: 100% de materia seca; libre de humedad. Si la materia seca se determina (a 105° C) en una muestra que se designa "tal como ofrecido", ésta se debe reportar como materia seca de la muestra "tal como ofrecido". Si por otra parte, se le determina la materia seca a una muestra "parcialmente seco", se debe reportar como materia seca de la muestra "parcialmente seco". Se recomienda que la materia seca y otros nutrientes se reporten simultáneamente en "base seca" (100% de materia seca o sea libre de humedad) y en base "tal como ofrecido".

Como se explica en las definiciones, existe básicamente dos clases de muestras: (1) Aquellas suficientemente secas que permiten la molienda y análisis inmediato (contienen más del 88% de materia seca) y (2) aquellas que necesitan secarse parcialmente o darles un tratamiento espe-

cial (contienen menos de 88% de materia seca).

El esquema que aparece en la página 1601-4 muestra la forma de manipular estas dos clases de muestras. En este esquema, se asume que todas las muestras con un contenido menor a 88% de materia seca, se deben secar parcialmente antes de analizarlas. Sin embargo, el químico debe usar su propio criterio y decidir si el secamiento parcial de la muestra puede afectar los resultados finales del análisis. Si en efecto fuera así, entonces se deben tomar las medidas necesarias para analizar la muestra en base "tal como ofrecido" o "tal como recolectado".

Recientemente se ha demostrado que la fibra cruda de muestras tomadas por medio de fístulas del esófago, sufren alteraciones cuando se secan a temperaturas elevadas (Lesperance y Bohman, 1963). Por consiguiente, se debe proceder con cautela al analizar estas muestras.

Dado que el equipo para secado por congelación existe, si se dispone de él, este método debe sustituir al del secado parcial en estufa con aire forzado a 60° C.



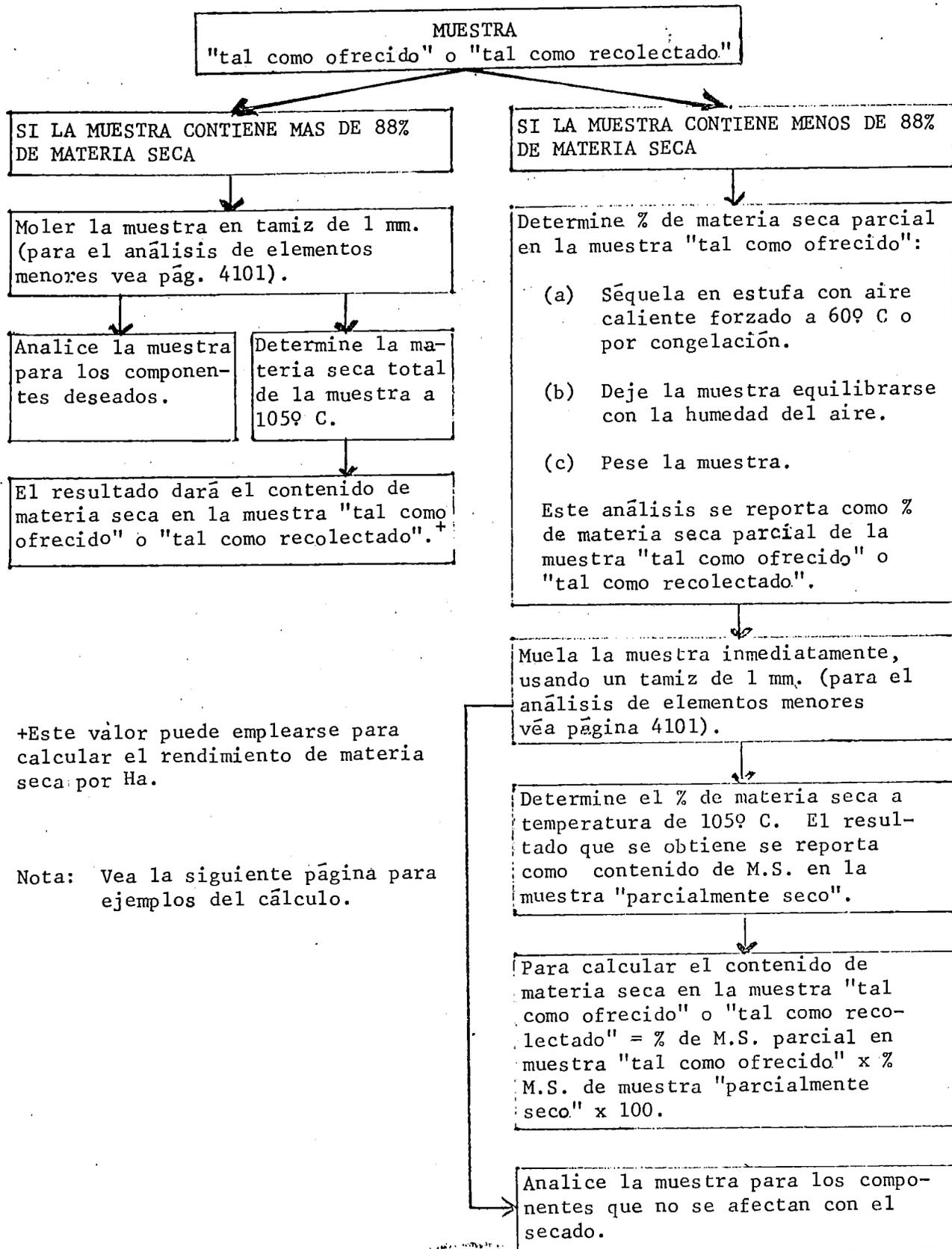


Lámina 1601-1. Esquema para la preparación de muestras para el análisis químico.

Todos los análisis en el formato de composición de alimentos se deben reportar en base seca (100% de materia seca). Sin embargo, para algunas muestras puede ser ventajoso reportar los datos en base "tal como ofrecido" o "tal como recolectado" (sangre u orina). En el formato aparece un espacio especial para ello.

Para reportar los datos en base seca, es necesario hacer las correcciones tal y como se describen en la siguiente fórmula:

(a) Conversión de la muestra "tal como ofrecido" a:

$$\text{Base seca} = \frac{\text{valor de la muestra en \% , mg./kg.; etc.} \times 100}{\% \text{ de materia seca en muestra "tal como ofrecido"}}$$

(b) Conversión de la muestra "parcialmente seco" a:

$$\text{Base seca} = \frac{\text{valor de la muestra en \% , mg./kg.; etc.} \times 100}{\% \text{ de materia seca en muestra "parcialmente seco"}}$$

Ejemplos de cálculos para obtener valores de materia seca total y parcial y de otros componentes en base "tal como ofrecido" y "parcialmente seco".

(a) Para obtener porcentaje de materia seca total en base "tal como ofrecido":

$$\frac{(\text{peso de la muestra seca (105° C) + recipiente} - \text{peso del recipiente}) \times 100}{\text{peso de la muestra en g. en base "tal como ofrecido"}}$$

Si la muestra "tal como ofrecido" pesa 1.9444 g.; el recipiente, 12.3278 g. y la muestra seca con el recipiente, 14.1011 g. (después de secada a 105° C), entonces:

$$\frac{(14.1011 - 12.3278) \times 100}{1.9444} = 91.2 \% \text{ M.S. total en base "tal como ofrecido"}$$

do".

(b) Para obtener porcentaje de materia seca parcial en base "tal como ofrecido" o "tal como recolectado":

$$\frac{\text{peso de la muestra seca (60° C)}}{\text{peso de la muestra "tal como ofrecido" o tal como recolectado", g.}} \times 100$$

Si la muestra "tal como ofrecido" o "tal como recolectado" pesa 468.2 g. y después de secada a 60° C en estufa con aire forzado y equilibrándola con la humedad del aire, pesa 155.4 g., entonces:

$$\frac{155.4 \times 100}{468.2} = 33.2\% \text{ M.S. parcial en base "tal como ofrecido" o "tal como recolectado"}$$

Nota: Esta determinación se corre cuando las muestras "tal como ofrecido" contienen menos de 88% de materia seca, como en el caso de los ensilajes y forrajes verdes y se debe tomar una muestra más grande para secarla y correrle los demás análisis.

(c) Para obtener porcentaje de materia seca total en muestra "parcialmente seco":

$$\frac{(\text{peso de la muestra seca (105° C) + recipiente} - \text{peso del recipiente})}{\text{peso de la muestra en base "parcialmente seco"}} \times 100$$

Si la muestra "parcialmente seco" pesa 2.3146 g. y después de secada en estufa a 105° C pesa 14.3957 g. con todo y recipiente y éste pesa 12.2140 g.; entonces:

$$\frac{(14.3957 - 12.2140) \times 100}{2.3146} = 94.3\% \text{ M.S. total en muestra "parcialmente seco"}$$

Nota: Cuando la muestra "parcialmente seco" se equilibra con la humedad del aire, se hace necesario conducir otra determinación de materia seca

para convertirla a base de materia seca total.

(d) Para obtener la materia seca total en muestras "tal como ofrecido" o "tal como recolectado" cuando:

(a) se conoce el contenido de materia seca parcial en una muestra como la de ensilajes o forrajes frescos.

(b) se conoce el contenido de materia seca total en la muestra "parcialmente seco":

$$\frac{\% \text{ de materia seca parcial de la muestra "tal como ofrecido" o "tal como recolectado" (a)}}{100} \times \frac{\% \text{ de materia seca total en muestra "parcialmente seco" (b)}}{100} \times 100$$

Si el contenido de materia seca parcial de una muestra "tal como ofrecido" o "tal como recolectado" es de 33.2% y el contenido de materia seca total en la muestra "parcialmente seco" es de 94.3%, entonces:

$$33.2 \times 94.3 \times 100 = 31.3\% \text{ M.S. total en muestra "tal como ofrecido" o "tal como recolectado"}$$

Los resultados de todos los análisis químicos también se deben convertir a base seca o sea libre de humedad. Seguidamente se da un ejemplo de la manera de hacerlo, utilizando un valor hipotético obtenido del análisis de una muestra de celulosa realizado primeramente en base "tal como ofrecido" y luego haciendo las conversiones necesarias hasta llegar a base seca.

(e) Para obtener el porcentaje de celulosa en base "tal como ofrecido":

$$\frac{(\text{peso del crisol con la celulosa} - \text{peso del crisol incinerado}) \times 100}{\text{peso de la muestra en base "tal como ofrecido", g.}}$$

Si el peso del crisol con la celulosa, después de secado, es de 35.4375 g. y el peso del crisol con la muestra incinerada es de 35.1131 g. y el peso de la muestra en base "tal como ofrecido" es de 1.0341 g; entonces:

$$\frac{(35.4375 - 35.1131) \times 100}{1.0341} = 31.4\% \text{ de celulosa en base "tal como ofrecido"}$$

(f) Para convertir la celulosa de base "tal como ofrecido" a base seca:

$$\frac{\% \text{ de celulosa en base "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca total muestra "tal como ofrecido"}}$$

Si el porcentaje de celulosa en base "tal como ofrecido" es de 31.4% y la materia seca total tiene un valor de 91.8% en la muestra "tal como ofrecido", entonces:

$$\frac{31.4 \times 100}{91.8} = 34.4\% \text{ de celulosa en base seca.}$$

(g) Para obtener el porcentaje de celulosa en base "parcialmente seco":

$$\frac{(\text{peso del crisol con la celulosa} + \text{peso del crisol incinerado}) \times 100}{\text{peso de la muestra en base "parcialmente seco", g.}}$$

Si el peso del crisol con la celulosa, después de secado, es de 34.8393 g. y el peso del crisol con la muestra incinerada es de 34.5114 g. y el peso de la muestra en base "parcialmente seco" es de 1.0114 g.; entonces:

$$\frac{(34.8393 - 34.5114) \times 100}{1.0114} = 32.4\% \text{ de celulosa en base "parcialmente seco"}$$

(h) Para convertir la celulosa de base "parcialmente seco" a base seca:

$$\frac{\% \text{ de celulosa en base "parcialmente seco"}}{\% \text{ de materia seca total en muestra "parcialmente seco"}} \times 100$$

Si el porcentaje de celulosa en base "parcialmente seco" es de 32.4% y la materia seca total tiene un valor de 94.3% en la muestra "parcialmente seco", entonces:

$$\frac{32.4 \times 100}{94.3} = 34.4\% \text{ de celulosa en base seca.}$$

#### Bibliografía

Harris, Lorin E. 1970. Nutrition Research Techniques for Domestic and Wild Animals. Published by L. E. Harris, 1408 Highland Drive, Logan, Utah, USA. 84321.

Ejemplo de un formato de registro para anotar los resultados de análisis químicos en el laboratorio

CELULOSA

Fecha \_\_\_\_\_

Laboratorista \_\_\_\_\_

No. de la muestra	No. del beaker y crisol	Pesos para obtener peso de la muestra g.	Crisol con celulosa g.	Crisol con ceniza g.	Celulosa g.	Celulosa en la determinación %	Celulosa $\bar{x}$ en muestra %	Materia seca en muestra <sup>a</sup> %	Celulosa en base seca %
70	3	76.3223	34.8393			32.16	32.4	94.30	34.4
380	27	75.3028		34.5114					
260A		1.0195			3279				
70	4		36.2591			32.68			
380	28	74.2923		35.9289					
260B		1.0105			3302				

<sup>a</sup> En este ejemplo, se anota la materia seca total de la muestra parcialmente seca.

## DETERMINACION DE LA MATERIA SECA

### Principio

La humedad de la muestra se pierde por volatilización a causa del calor. La cantidad de material residual después de eliminar la humedad, constituye la materia seca.

### Equipo

- (a) Estufa a 105° C.
- (b) Recipientes de aluminio con tapadera, de 50 mm. de diámetro.

### Procedimiento

(a) Limpie bien con un pincel suave los recipientes de aluminio cada vez que se va a poner una muestra. Si la muestra se va a usar posteriormente para la determinación del extracto etéreo, enjuague los recipientes con alcohol etílico de 95% y luego con éter etílico antes de ponerla. Permita que se evapore el éter en una capilla y luego ponga los recipientes a secar en estufa a 105° C por una hora mínimo. Sáquelos de la estufa, se trasladan a un desecador, se enfrían y pesan. Maneje los recipientes con pinzas de metal.

(b) Pese por diferencia entre 1.5 y 2 g. de muestra en el recipiente de metal. Coloque la tapadera en la parte inferior del recipiente y póngalo en un horno a 105° C durante la noche. A la mañana siguiente

se sacan los recipientes con la muestra, se les coloca la tapadera y se ponen en un desecador hasta enfriarlos. Luego se saca el recipiente del desecador y se pesa rápidamente.

(c) Las muestras se deben almacenar en un desecador mientras se les determina el extracto etéreo, si éste fuera el caso.

#### Cálculo

Porcentaje de materia seca:

$$\frac{(\text{peso del recipiente} + \text{peso de muestra seca}) - \text{peso del recipiente} \times 100}{\text{peso de la muestra antes del secado.}}$$

o

$$\frac{\text{peso de la muestra seca} \times 100}{\text{peso de la muestra antes del secado.}}$$

Nota: si la muestra fué analizada en base "tal como ofrecido", la materia seca se reporta como "materia seca de la muestra tal como ofrecido".

Si la muestra fué analizada en base "parcialmente seco", la materia seca se reporta como "materia seca de la muestra parcialmente seco".

Véase la página 1601 y 1601-2 para la definición de los términos "tal como ofrecido", "muestra parcialmente seco" y "muestra seca".

#### Bibliografía

Official Methods of Analyses of the Association of Official Agricultural Chemists. 1960. 9th Edition. Published by the Association of Official Agricultural Chemists, P.O. Box 540, Benjamin Franklin Station, Washington 4, D.C.

## DETERMINACION DE MATERIA SECA PARCIAL

### Principio

La muestra se seca a menos de 65º C de temperatura hasta que se haya eliminado aproximadamente un 95% del agua. También se puede secar por congelación. La muestra luego se lleva a equilibrio con la humedad ambiente.

### Equipo

(a) Recipientes. Use un recipiente que no absorba humedad y sea suficientemente grande que permita colocar la muestra bien extendida en una capa delgada. Se pueden usar bandejas de hojalata o de vidrio pyrex de 30 cm. de largo por 14 cm. de ancho y 4 cm. de alto.

(b) Secadora por calor o congelación. Secadora por calor que tenga un extractor de aire o un congelador para secado.

(c) Balanza. Que tenga una aproximación a 0.5 g.

### Procedimiento

(a) Preparación de las bandejas. Lave las bandejas y colóquelas en una secadora por cinco horas y luego póngalas a enfriar en un estante o mesa limpios, y péselas.

(b) Pesada de las muestras. Si la muestra ha sido congelada, déjela reposar fuera del congelador para que se equilibre con la tempera-

tura ambiente. Sáquela del recipiente en que ha estado guardada y mézclela hasta homogenizarla y luego se pesan de 200 a 500 g. en una de las bandejas taradas. La cantidad de muestra que se tome depende del contenido de humedad. Extienda la muestra sobre la superficie de la bandeja en una capa delgada.

(c) Secado. Ponga la bandeja con la muestra en la secadora a temperatura de 60° C y déjese por un mínimo de 48 horas o hasta que el 95% del agua aproximadamente se haya eliminado. La temperatura no debe estar más alta de lo indicado debido a que afecta algunos valores tal como la lignina. Se puede secar la muestra también por congelación.

(d) Coloque la bandeja en un cuarto o armario libre de insectos por 72 horas en donde las condiciones de humedad sean iguales a las que prevalezcan al momento de moler la muestra.

(e) Pese la muestra e inmediatamente se debe moler a través de un tamiz de un milímetro. (Véase la página 4101 para las instrucciones de como preparar las muestras para la determinación de elementos menores).

(f) Deposite la muestra molida en un recipiente que no permita la entrada del aire, tal como una botella plástica o de vidrio de 250 ml. de capacidad.

(g) Identifique la muestra con una etiqueta similar a la siguiente:

No. de la muestra \_\_\_\_\_  
No. o nombre del proyecto \_\_\_\_\_  
No. o nombre del experimento \_\_\_\_\_  
Fecha de recolección \_\_\_\_\_  
Clase de muestra \_\_\_\_\_  
Responsable del proyecto \_\_\_\_\_  
Iniciales del laboratorista \_\_\_\_\_

## Cálculo

Porcentaje de materia seca:

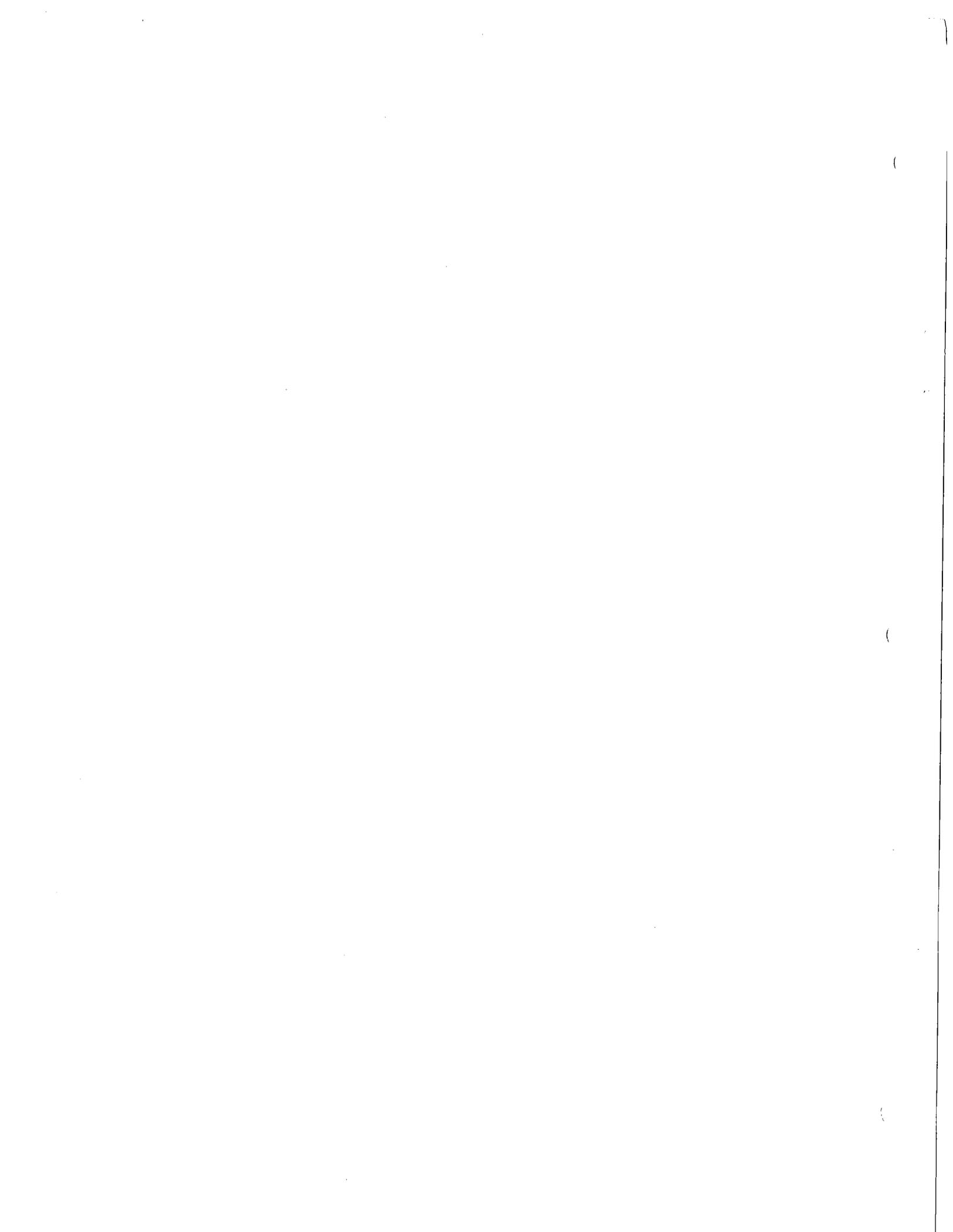
$$(a) \frac{(\text{Peso muestra parcialmente seca} + \text{bandeja}) - (\text{peso de bandeja}) \times 100}{(\text{Peso muestra "tal como ofrecido" o "como recolectado" + bandeja}) - \text{peso bandeja}}$$

o

$$(b) \frac{\text{Peso muestra parcialmente seca} \times 100}{\text{Peso "tal como ofrecido" o "como recolectado"}}$$

## Bibliografía

Harris, Lorin E. 1970. Nutrition Research Techniques for Domestic and Wild Animals. Published by L. E. Harris (in press).



## DETERMINACION DE ENERGIA BRUTA

### Principio

La cantidad de calor, medido en términos de calorías, que se produce cuando se oxida una substancia totalmente en un calorímetro de bomba, se denomina la energía bruta (EB) del material.

Una muestra del material cuyo contenido energético se va a medir, se coloca en una cápsula de combustión y a la vez se deposita en una bomba de oxígeno con un contenido de 25 a 30 atmósferas de oxígeno. La bomba se cubre con 2000 g. de agua en un calorímetro adiabático. Luego de haber ajustado la bomba y el calorímetro a la misma temperatura, la muestra se incinera con un alambre fusible. El aumento de temperatura se mide bajo condiciones adiabáticas.

El contenido calórico de la muestra se calcula multiplicando el equivalente hidrotérmico del calorímetro por el aumento en temperatura y restándole al producto algunas correcciones menores que hay que hacerle a la oxidación del alambre fusible y a la producción de ácido. Véase la página 701 para las definiciones.

### Equipo

(a) Calorímetro Parr de bomba y accesorios o su equivalente. El calorímetro puede estar equipado con un control automático de temperatura que hace menos laborioso el análisis, pero este control no es indispensable

para obtener resultados precisos<sup>+</sup>:

(b) Balanza para pesar soluciones con capacidad para 3000 g. y con precisión hasta 0.1 de g.

(c) Para una mejor ilustración de la nomenclatura del calorímetro de bomba de Parr, diríjase a la lámina en la página 1901-10.

#### Reactivos

(a) Solución estandarizada de carbonato de sodio, equivalente a 1 cal./ml. (3.658 g. de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  por litro).

(b) Indicador de metilo anaranjado.

(c) Tabletillas de combustión o cristales de grado standard primario de ácido benzóico.

#### Procedimiento

(a) Pese por diferencia aproximadamente 1.0 g. de muestra y colóquela en una cápsula limpia de combustión. Las muestras pueden comprimirse pero ello no es necesario.

(b) Ponga un trozo de 10 cm. de longitud de alambre fusible entre los electrodos del calorímetro y coloque la cápsula de combustión conteniendo la muestra, en el electrodo de lazo. Ajuste el alambre fusible de manera que entre en contacto con la muestra.

(c) Coloque aproximadamente 1 ml. de agua en el cilindro del calorímetro y rótelo a manera de humedecer las paredes internas. Este paso no se hace necesario si el calorímetro se encuentra aún húmedo de la determinación previa.

---

+ Fisher Scientific Co., Catálogo No. 4-364V2

(d) Ensamble la bomba, ajustando la tapadera de rosca, cerrando la válvula de escape de presión y llenándola con oxígeno a 25 atmósferas de presión.

Coloque el balde en el calorímetro, ponga la bomba dentro del balde y coloque el broche terminal.

(e) Pese 2000 g. de agua destilada en la balanza de pesar soluciones (use un frasco volumétrico de 2000 ml. para depositar el agua) y con mucho cuidado de no derramar nada, viértala en el balde del calorímetro.

(f) Cierre la tapadera (teniendo la precaución de que los termómetros estén levantados) y luego bájelos, y ponga a funcionar el motor de circulación del agua. Remueva la tapadera de la cámara de agua del calorímetro y llénela de agua hasta que empiece a salir por el tubo de drenaje. Esta operación únicamente se hace necesaria al iniciar el trabajo del día.

(g) Ajuste la temperatura del agua en la cámara para que sea aproximadamente igual a la del calorímetro. Esta operación se logra con la adición de agua caliente o fría según sea necesario, dejando transcurrir un minuto para que se equilibre. Luego se ajusta cuidadosamente la temperatura para que sea exactamente igual, haciendo lecturas de temperatura a intervalos de un minuto durante tres minutos.

(h) Lea y registre la temperatura inicial con una aproximación de  $0.0002^{\circ}\text{C}$  y luego incinere la muestra. Agregue agua caliente o fría, según sea necesario, para mantener la cámara de agua a una temperatura equivalente a la del calorímetro, durante el período de ascenso.

(i) Compare y ajuste con frecuencia y cuidadosamente la temperatura de la cámara exterior, con la del balde en el interior del calorímetro, para asegurar la condición adiabática o sea que las temperaturas sean iguales. Haga la lectura y registre la temperatura final cuando sea idé-

tica, después de tres lecturas consecutivas con un minuto de intervalo entre una y otra.

(j) Levante los termómetros, abra el calorímetro y saque la bomba del balde, dejando escapar la presión que permanece dentro de la bomba y después ábrala. Cuidadosamente tome las piezas que quedan del alambre fusible en los electrodos; enderécelas y mida la longitud total de ellas en centímetros. Las calorías en el alambre fundido se pueden determinar con la escala de medición que se suple con el alambre.

(k) Enjuague toda la superficie interna de la bomba con una corriente de agua destilada neutra y recójala en un beaker limpio. Para determinar la cantidad de ácido formado proveniente de la oxidación incidental de compuestos nitrogenados y azufrados, titule el agua de lavado con una solución estandarizada de carbonato de sodio, empleando el indicador anaranjado de metilo. Se realiza una corrección para tomar en cuenta el calor que ha sido liberado en la formación del ácido.

(l). Corrija las temperaturas inicial y final con el uso de la curva de calibración que viene con el termómetro.

## Cálculos

(a)

$$\text{EB (cal./g.) en base "tal como ofrecido"} = \frac{\left[ \begin{array}{l} \text{temp. final} \\ \text{temp. inicial} \end{array} \right] \text{equiv. hidrotérmico de la bomba} + \left[ \begin{array}{l} \text{cm. de alambre fundido} \\ \text{cm.} \end{array} \right] \text{cal. por cm.} - \text{ml. Na}_2\text{CO}_3}{\text{peso de la muestra}}$$

Ejemplo:

Una muestra de alimento de 1.0214 g. en base "tal como ofrecido" tuvo una temperatura inicial de 23.13° C y una temperatura final de 25.25° C. El equivalente hidrotérmico de la bomba es de 2412 cal. por grado centígrado. Se fundieron 7.0 cm. de alambre fusible con una corrección de 2.3 cal. por cm. de alambre y se emplearon 6.0 ml. de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> titulados (equivalente a 6.0 cal.).

Entonces:

$$\text{EB (cal./g.)} = \frac{(25.25 - 23.13) 2412 - (7.0 \times 2.3) - 6.0}{1.0214 \text{ g. de muestra en "base tal como ofrecido"}} = 3804 \text{ cal./g.} \text{ o } 3804 \text{ kcal/kg.}$$

Nota: Registre la información en el formato como kcal./kg.

Ajuste a base seca:

$$(a) \frac{\text{EB (kcal./kg.) en base "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en muestra "tal como ofrecido"}}$$

o

$$(b) \frac{\text{EB (kcal./kg.) en base "parcialmente seco"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en base "parcialmente seco"}}$$

Determinación del equivalente hidrotérmico  
de la bomba

(a) El equivalente hidrotérmico (calorías por grado de aumento de temperatura) de la bomba, balde y agua se obtiene siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente pero empleando una muestra de un contenido calórico conocido (pastilla de combustión de ácido benzóico). Conduzca un mínimo de cuatro determinaciones y tome el promedio de ellas como el valor representativo que podrá seguir usándose indefinidamente, a no ser que se cambien algunas piezas de la bomba.

(b) Seque el ácido benzóico a 105° C durante la noche; déjese enfriar en desecador y pese por diferencia una pastilla o aproximadamente 1 g. en una botella de pesar con tapadera.

(c) Determine el aumento de temperatura proveniente de la combustión del ácido benzóico.

Cálculo

$$\text{Equivalente hidrotérmico} = \frac{\left[ \begin{array}{l} \text{peso de muestra} \\ \text{del a. benzóico} \end{array} \times \begin{array}{l} \text{cal./g. del} \\ \text{a. benzóico} \end{array} \right] + \left[ \begin{array}{l} \text{cm. de alam-} \\ \text{bre fundido} \end{array} \times \begin{array}{l} \text{cal.} \\ \text{por} \\ \text{cm.} \end{array} \right] + \text{ml. Na}_2\text{CO}_3}{(\text{temp. final} - \text{temp. inicial})}$$

Ejemplo:

Una muestra de 1.0622 g. de ácido benzóico tiene un calor de combustión de 6319 cal. por g. La temperatura inicial corregida de la bomba es de 20.280° C y la final 23.045° C. Se fundieron 4.8 cm. de alambre fusible con un valor calórico de 2.3 cal. por cm. y se titularon 7.5 ml. de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> equivalentes a 7.5 cal.

$$\text{Equivalente hidrotérmico} = \frac{(1.0622 \times 6319) + (4.8 \times 2.3) + 7.5}{(23.045 - 20.280)} = 2434 \text{ cal.}$$

cal. por grado

Ejemplo de cuatro determinaciones realizadas y del cálculo para obtener el valor promedio del equivalente hidrotérmico de la bomba:

Peso de la muestra y recipiente	43.7622	42.7000	41.6695	40.6137
Peso del recipiente	42.7000	41.6695	40.6137	39.5656
Peso de la muestra	1.0622	1.0305	1.0558	1.0481
Temperatura final	23.045	24.17	25.12	25.76
Temperatura inicial	20.28	21.48	22.37	23.03
Aumento de temperatura	2.765	2.69	2.75	2.73
Acido (cal)	7.5	7.0	7.0	7.0
Alambre (cal)	11.0	16.5	15.0	10.0
Calor de combustión del ácido benzóico (cal)	6319	6319	6319	6319
Calorías del ácido benzóico	6712	6512	6672	6623
Total de calorías	6730	6535	6694	6640
Equivalente hidrotérmico, cal/grado	2434	2434	2429	2432

## Determinación de energía bruta en la orina

(a) La energía urinaria (EU) o (UE) puede determinarse a partir del contenido de nitrógeno urinario (NU) por medio de la fórmula de Street et al. (1964).

$$EU \text{ (kcal. por kg.)} = 117 + 26(\% \text{ de NU})$$

Esta fórmula fué desarrollada con información procedente de bovinos y ovinos y puede aplicarse siempre y cuando la cantidad de energía urinaria represente una pequeña parte de la energía total, como en el caso de la determinación de energía metabolizable de los alimentos en la elaboración de cuadros de composición química.

(b) Cuando se necesite una determinación más exacta, se debe secar una muestra de orina y la energía se determina con un calorímetro de oxígeno. Las muestras de orina deben secarse en un recipiente combustible de peso conocido. Un beaker plástico<sup>+</sup> de tamaño reducido puede servir para este fin.

(c) Se pesa una muestra de 5 ml. de orina en un beaker de 5 ml. de capacidad de polistireno previamente tarado. La pesada de la muestra de orina se realiza tal y como se describe en la página 1501.

(d) El método preferido para el secado de la orina es por congelamiento.

(e) El método alterno de secado es por medio de una estufa al vacío a 40° C con poco más de 700 mm. de vacío hasta que la muestra esté casi seca.

(f) Cuando no se dispone de ninguno de los dos medios descritos anteriormente para secado, se seca la muestra en una estufa a 45° C. La

---

+ Beaker de 5 ml. de polistireno, catálogo No. B2718, se consigue de la casa Scientific Products, Evanston, Illinois, 60201, USA. Este beaker pesa menos de 1 g.; se puede calentar a 135° C y es relativamente barato.

muestra nõ necesariamente debe estar totalmente seca para ser incinerada en la bomba de oxígeno. Un secado excesivo puede ocasionar pērdidas innecesarias de energĩa.

Despuēs de que la muestra de orina se haya secado en el recipiente plástico, se determina la energĩa bruta de la orina con todo y beaker, de acuerdo al procedimiento descrito previamente para otras muestras sōlidas.

(g) La energĩa bruta media del beaker de polistireno (cal./g.) se fija tomando el promedio de cuatro determinaciones efectuadas con diferentes beakers.

#### Cálculo del contenido de energĩa bruta en orina.

EB en orina  
(cal/g) =

$$\frac{\left[ \begin{array}{l} \text{temp.} \\ \text{final} \end{array} - \begin{array}{l} \text{temp.} \\ \text{inicial} \end{array} \right] \begin{array}{l} \text{equiv.} \\ \text{hidrot.} \\ \text{de la} \\ \text{bomba} \end{array} - \left[ \begin{array}{l} \text{cm. de} \\ \text{alambre} \\ \text{fundido} \end{array} \times \begin{array}{l} \text{cal.} \\ \text{por} \\ \text{cm.} \end{array} \right] - \text{ml.} \begin{array}{l} \text{NaCO}_3 \\ \text{beaker} \end{array} - \left[ \begin{array}{l} \text{peso del} \\ \text{beaker} \end{array} \times \begin{array}{l} \text{cal. por} \\ \text{g. del} \\ \text{beaker} \end{array} \right]$$

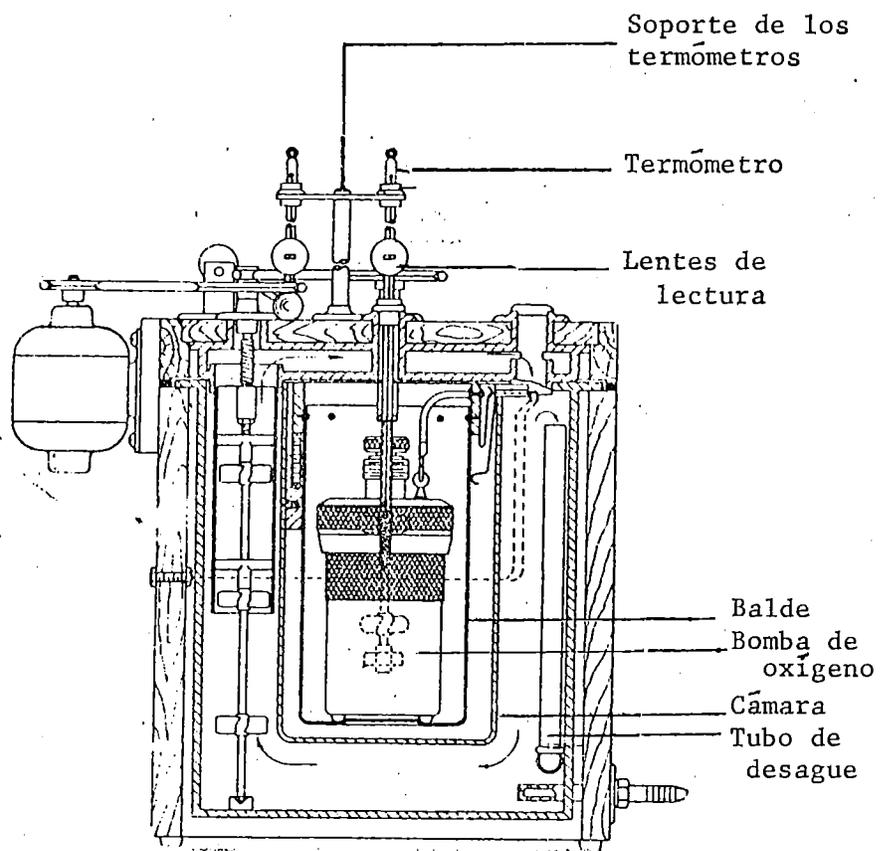
peso en g. de la muestra de orina.

Nota: cal./g. es igual a kcal./kg. Consigne la informaciōn en kcal./kg.

#### Bibliografĩa

Parr Instrument Company. 1966. Oxygen Bomb Calorimetry and Combustion Methods. Technical Manual No. 130. Parr Instrument Company, Moline, Illinois.

Street, J. C., J. E. Butcher and L. E. Harris, 1964. Estimating urine energy from urine nitrogen. J. Animal Sci. 23:1039.



Partes del calorímetro adiabático

## DETERMINACION DE CENIZA

### Principio

La muestra se incinera a 600° C para quemar todo el material orgánico. El material inorgánico, que no se destruye a esta temperatura se le llama ceniza.

### Equipo

- (a) Horno de incineración.
- (b) Crisoles de porcelana (para análisis de elementos trazas, ver la página 4101).
- (c) Desecador, con desecante de perclorato de magnesio.

### Procedimiento

(a) Coloque los crisoles nuevos o limpios en un horno de incineración a 600° C durante una hora. Luego traslade los crisoles del horno al desecador y enfríelos a la temperatura del laboratorio. Péselos tan pronto como sea posible para prevenir la absorción de humedad, usando siempre pinzas de metal para manejar los crisoles después de que se incineran o secan.

(b) Pese por diferencia 1.5 a 2.0 g. de muestra en un crisol de porcelana previamente tarado. Colóquelo en un horno incinerador y manténgalo a temperatura de 600° C durante la noche.

(c) A la mañana siguiente traslade el crisol a un desecador y enfríelo a temperatura del laboratorio. Cuando esté frío, pese el crisol tan pronto como sea posible para prevenir la absorción de humedad y registre el peso.

(d) Guarde la muestra de ceniza para el caso que se deseen realizar determinaciones de minerales posteriormente.

#### Cálculo

Porcentaje de ceniza en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$\frac{\text{peso de ceniza} \times 100}{\text{peso de la muestra}}$$

Conversión a base seca:

(a)  $\frac{\% \text{ de ceniza de la muestra "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca de la muestra "tal como ofrecido"}}$

o

(b)  $\frac{\% \text{ de ceniza de la muestra "parcialmente seco"} \times 100}{\% \text{ de materia seca de la muestra "parcialmente seco"}}$

#### Bibliografía

Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 1965. 10th Edition. Published by the Association of Official Agricultural Chemists, P.O. Box 540, Benjamin Franklin Station, Washington 4, D.C.

## DETERMINACION DE FIBRA CRUDA

### Principio

Una muestra libre de humedad y grasa se digiere primero con una solución de ácido débil y luego con una solución de base débil. Los residuos orgánicos restantes se recogen en un crisol de filtro. La pérdida de peso después de quemar la muestra, se denomina fibra cruda.

### Equipo

(a) Aparato de extracción que consiste de calentadores individualmente controlados y condensadores enfriados por agua, diseñados para mantener un volumen constante de solución durante la digestión.

(b) Recipientes para la digestión. Utilice recipientes de digestión de tamaño y forma tal, que la superficie de la solución no se encuentre a menos de 25 mm. o a más de 38 mm. de profundidad. Dependiendo del tipo de condensador que se use, se recomienda un frasco Erlenmeyer de boca ancha de 500 ml. o un beaker de forma alargada de 600 ml. de capacidad.

(c) Monte dos frascos de base redonda de 5 litros de capacidad cada uno sobre dos calentadores y les adapta un condensador y un sifón con tubo de goma a cada frasco. Esto es con el objeto de mantener en ebullición el ácido sulfúrico y el hidróxido de sodio antes de agregarlos a los recipientes de digestión.

(d) Tela de lino con aproximadamente 20 hilos por centímetro, o tela de filtrar número 40 producida por la National Filter Media Corporation

New Haven 14, Connecticut.

#### Reactivos

(a) Solución de ácido sulfúrico. 0.255 N. Agregue 1.25 gramos de  $H_2SO_4$ /100 ml. de agua. Controle la normalidad por medio de la titulación y ajústela si es necesario a 0.255 N.

(b) Solución de hidróxido de sodio. 0.313 N. Agregue 1.25 g. NaOH/100 ml. de agua libre de  $Na_2CO_3$ . Controle la normalidad por medio de la titulación y ajústela si es necesario a 0.313 N.

(c) Asbestos. Generalmente es satisfactorio el grado Gooch de fibra media, lavado en ácido e incinerado. Si se hace necesario probarlo, colóquelo en un baño de vapor por 8 horas con una solución al 5% de NaOH y luego lávelo bien con agua caliente. Después digiéralo por 8 horas con HCl (1 + 3) y de nuevo lávelo con agua caliente. Séquelo e incinérelo en calor rojo brillante.

(d) Rociador antiespumante A de Dow-Corning, o alcohol octílico.

(e) Alcohol etílico.

#### Procedimiento

(a) El residuo de muestra proveniente de la determinación del extracto etéreo se puede utilizar (use el peso original de la muestra, antes de secarla y de haberla extraído con éter). Si este residuo no se utiliza, proceda de la siguiente manera para obtener una muestra seca, libre de extracto etéreo.

(b) Pese por diferencia de 1.5 a 2.0 g. de muestra en un dedal de alundum. Séquela en una estufa a  $105^\circ C$  durante la noche y pese 6 muestras

de la manera que se indica en el paso (e) siguiente.

(c) Extraiga la muestra con éter por 16 horas (vea la determinación de extracto etéreo, página 2301).

(d) Transfiera a los recipientes de digestión el residuo extraído, junto con aproximadamente 0.5 g. de asbestos. Rocíe una pequeña cantidad del Antiespumante A de Dow-Corning en el recipiente, o agregue una o dos gotas de alcohol octílico. Por medio del sifón vacíe 200 ml. de la solución hirviente de ácido sulfúrico en el recipiente de digestión y colóquelo sobre el calentador del extractor previamente calentado y cúbralo con el condensador. La solución debe empezar a hervir en un minuto. Rote el recipiente con frecuencia hasta que la muestra se humedezca completamente. Tenga el cuidado de que todo el material siempre esté en contacto con la solución. Una ráfaga de aire dirigida dentro del frasco se utiliza para reducir la producción de espuma si ésta fuera problema. Repita este mismo procedimiento con las otras muestras a intervalos de 5 minutos.

(e) Cuando la primera muestra que se colocó haya hervido por espacio de 30 minutos exactamente, remuévala y fíltrela a través de una tela de lino colocada en un embudo acanalado y lávela con agua hirviendo hasta remover todo el ácido. Lave la muestra de nuevo del filtro de lino al recipiente, usando 200 ml. de solución hirviendo de hidróxido de sodio y coloque el beaker nuevamente en el calentador. La solución deberá empezar a hervir en un minuto. Deje transcurrir 5 minutos desde el momento en que se removi6 la muestra tratada con ácido sulfúrico del calentador, hasta que la muestra tratada con hidróxido de sodio empiece a hervir. Siguiendo esta secuencia de tiempo, el laboratorista puede correr seis determinaciones a la vez.

(f) Cuando la primera muestra con el hidróxido de sodio haya hervido

exactamente durante 30 minutos quítela del calentador y fíltrela sobre la tela de lino de igual manera como se indicó anteriormente. Lave la muestra con agua hirviendo y fíltrela por medio de succión, a través de un crisol de Gooch que contenga capas delgadas de asbestos en el fondo. Ello se prepara colocando primero asbestos en solución con agua y luego vaciando una pequeña cantidad en el crisol de Gooch. Finalmente lave la muestra que está dentro del crisol con aproximadamente 15 ml. de alcohol etílico al 95%.

(g) Seque la muestra en una estufa a  $105^{\circ}$  C durante la noche. Enfríela a temperatura del laboratorio en un desecador y pésele.

(h) Incinere el contenido del crisol en un horno a  $600^{\circ}$  C durante una hora o más. Enfríe el residuo en un desecador a temperatura del laboratorio y pésele. Reporte la pérdida de peso como equivalente a fibra cruda.

Si las muestras de fibra cruda son difíciles de filtrar a través de los crisoles de Gooch, se les puede agregar asbestos antes de vertir la solución de ácido sulfúrico para digerirlas. También, se puede facilitar la filtración lavando la muestra antes de pasarla al crisol de Gooch, con solución caliente de  $K_2SO_4$  al 10%. La solución de  $K_2SO_4$  se puede agregar durante el filtrado en cualquier momento que ésta sea difícil.

## e) Cálculo

Porcentaje de fibra cruda en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$\frac{\text{pérdida de peso por incineración} \times 100}{\text{peso de la muestra antes del secado y de extracción con éter.}}$$

Conversión a base seca:

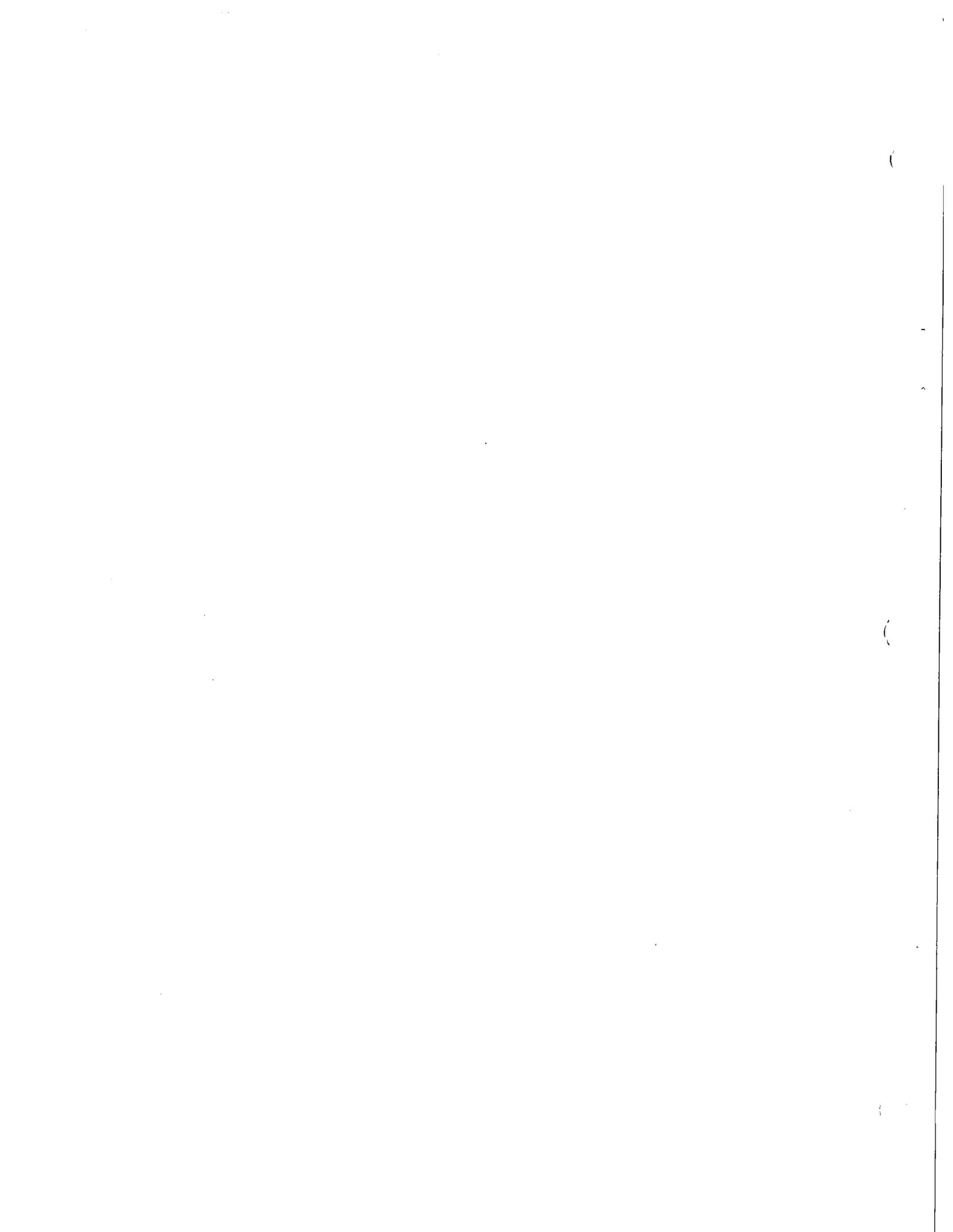
(a) 
$$\frac{\% \text{ de fibra cruda en la muestra "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en base "tal como ofrecido"}}$$

o

(b) 
$$\frac{\% \text{ de fibra cruda en la muestra "parcialmente seco"} \times 100}{\% \text{ de materia seca de la muestra "parcialmente seco"}}$$

## Bibliografía

Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 1965. 10th Edition. Published by the Association of Official Agricultural Chemists, P.O. Box 540, Benjamin Franklin Station, Washington 4, D.C.



## DETERMINACION DE EXTRACTO ETereo

### Principio

El éter se evapora y se condensa continuamente, y al pasar a través de la muestra, extrae materiales solubles. El extracto se recoge en un beaker y cuando el proceso se completa, el éter se destila y se recolecta en otro recipiente y la grasa cruda que queda en el beaker, se seca y pesa.

### Equipo

- (a) Aparato para la extracción de grasa, Goldfish.
- (b) Beakers para solventes.
- (c) Dedales de extracción, alundum.

### Reactivos

- (a) Eter dietílico, anhidro.

Si no hay éter anhidro disponible, se prepara según el procedimiento siguiente: Lave éter comercial con 2 o 3 porciones de agua y agréguele hidróxido de sodio o hidróxido de potasio; deje hasta que la mayor parte del agua se separe del éter y decántelo en una botella seca. Agréguele unos pedazos pequeños de sodio metálico que hayan sido limpiados cuidadosamente y permita que la evolución del hidrógeno cese. Almacene

el éter, así deshidratado, sobre sodio metálico en botellas con la tapadera floja. Póngale granos de zinc a los recipientes que contienen éter tanto nuevo como usado, con el objeto de prevenir la formación de peróxidos peligrosos.

#### Procedimiento

- (a) Pese por diferencia de 1.5 a 2.0 g. de muestra y colóquelos en un dedal de extracción, limpio y previamente extraído.
- (b) Seque la muestra a 105° C durante la noche, o use la muestra proveniente de la determinación de materia seca.
- (c) Limpie y seque los beakers para solventes en la estufa a 105° C por una hora. Colóquelos en el secador y enfríelos a temperatura del laboratorio; péselos y registre el peso (tara).
- (d) Coloque el dedal y la muestra en el recipiente para muestras y fíjelo bajo el condensador del aparato de extracción Goldfish. Agregue de 30 a 40 ml. de éter dietílico al beaker del solvente y colóquelo sobre el condensador, asegurándolo con el anillo de rosca el cual se debe apretar con la mano, tanto como sea posible. Abra la llave del agua que enfría el condensador; suba las placas calientes hasta que se pongan en contacto con los beakers y prenda los calentadores. Observe si hay escapes de éter después de que éste comienza a hervir y a condensarse. Cuando el nivel del éter en el beaker baje a un nivel constante, debido a que una porción siempre está volatilizándose y condensándose, el aparato puede dejarse solo y realizar observaciones periódicas. El período de extracción es de 16 horas.
- (e) Después de que la extracción se complete, baje los calentadores y permita que el dedal drene completamente. Remueva las muestras y colo-

que en su lugar los tubos de vidrio para recoger el éter. Vuelva a colocar los beakers y suba las placas calientes y destile el éter en los tubos recibidores. Poco antes de que el éter en los beakers se evapore hasta sequedad, baje las placas calientes y remueva los beakers. Vacíe el éter de los tubos recibidores en un recipiente especial para conservar el éter usado. Complete la evaporación al aire del éter que queda en los beakers, dejándolos sobre la mesa de trabajo durante un rato.

Seque los beakers en una estufa a 105° C, a prueba de explosión, por 30 minutos; después enfríelos en el desecador a temperatura del laboratorio y péselos.

#### Cálculos

Porcentaje de extracto etéreo en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$\frac{\text{peso del extracto etéreo} \times 100}{\text{peso de la muestra.}}$$

Conversión a base seca:

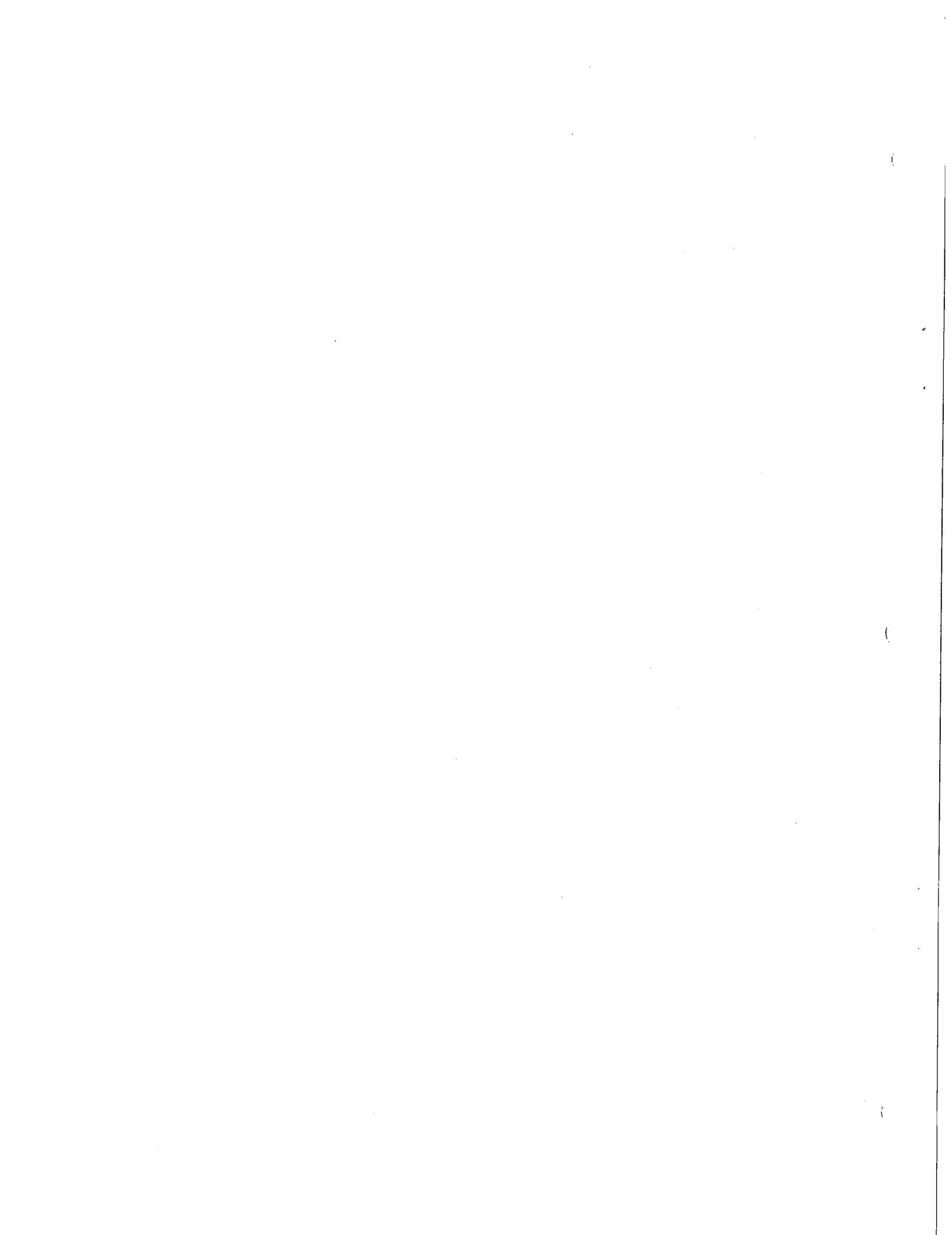
(a)  $\frac{\% \text{ de extracto etéreo en la muestra "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en base "tal como ofrecido"}}$

o

(b)  $\frac{\% \text{ de extracto etéreo en base "parcialmente seco"} \times 100}{\% \text{ de materia seca de la muestra "parcialmente seco"}}$

#### Bibliografía

Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 1960. 9th Edition. Published by the Association of Official Agricultural Chemists, P.O. Box 540, Benjamin Franklin Station, Washington 4, D.C.



## DETERMINACION DEL EXTRACTO LIBRE DE NITROGENO

### Principio

El extracto libre de nitrógeno (ELN) de un alimento se determina por diferencia después de que se han completado los análisis para ceniza, fibra cruda, extracto etéreo y proteína cruda. El extracto libre de nitrógeno es necesario para realizar el cálculo del total de nutrientes digeribles (TND).

### Cálculo

Porcentaje de ELN en base seca =

$$100 - (\% \text{ ceniza} + \% \text{ fibra cruda} + \% \text{ extracto etéreo} + \% \text{ proteína todo en base seca}).$$

Ejemplo. Teniendo los siguientes valores en base seca: cenizas 7.2%; fibra cruda 32.7%; extracto etéreo 3.3% y proteína cruda 15.3%, el cálculo se haría de la siguiente manera:

$$100 - (7.2 + 32.7 + 3.3 + 15.3) = 41.5\%$$

Método de conversión a base "tal como ofrecido" (este procedimiento sirve para cualquier componente de un alimento).

$$\frac{\% \text{ del componente en base seca}}{100} \times \frac{\% \text{ de materia seca de la muestra en base "tal como ofrecido"}}{100} \times 100$$

Ejemplo. Conversión del ELN de base seca, a base "tal como ofrecido":

(a) Contenido de materia seca del alimento = 89.3%

(b) Contenido de ELN del alimento, en base seca = 41.5%

Entonces:  $\frac{41.5}{100} \times \frac{89.3}{100} \times 100 = 37.1$  % ELN en base "tal como ofrecido".

## Bibliografía

Crampton, E.W., and L. E. Harris. 1969. Applied Animal Nutrition, The Use of Feedstuffs in the Formulation of Livestock Rations. Second Edition. W. H. Freeman and Co., San Francisco, California, USA.

## DETERMINACION DE NITROGENO Y PROTEINA CRUDA

### Principio

El nitrógeno de las proteínas y otros compuestos se transforma a sulfato de amonio por medio de la digestión con ácido sulfúrico en ebullición. El residuo se enfría, se diluye con agua y se le agrega hidróxido de sodio. El amonio presente se desprende y a la vez se destila y se recibe en una solución de ácido bórico que luego es titulada con ácido sulfúrico estandarizado.

Existe también un procedimiento alternativo que utiliza ácido sulfúrico estandarizado para recoger el amonio y una base estandarizada para titular el exceso de ácido en caso de que se pase el punto de titulación.

Ambos métodos ofrecen resultados satisfactorios pero con el segundo existe economía de reactivos. Sin embargo, por el método del ácido bórico, se economiza bastante tiempo ya que este ácido, no tiene que ser estandarizado o medido con precisión y tampoco hay complicaciones al obtener todo el amonio destilado cuando se trabaja con muestras de alto contenido de nitrógeno.

### Equipo

- (a) Aparato de digestión y destilación macro-Kjeldahl.
- (b) Frascos (balones) de Kjeldahl de 650 ml.
- (c) Frascos Erlenmeyer de 500 ml.
- (d) Dos buretas.

## Reactivos

(a) Solución indicadora (0.1% rojo de metilo y 0.2% verde de bromocresol en alcohol de 95%).

(b) Solución estandarizada de ácido sulfúrico; 0.1 N. Estandarice el ácido contra tris(hidroximetil) aminometano, conocido también como 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol que tiene un peso equivalente de 121.14 g. Una muestra de 0.3029 g. disuelta en agua es equivalente a 25 ml. de 0.10 N  $H_2SO_4$ . Use la solución indicadora (a). Corra tres determinaciones como mínimo y promedie el resultado de las tres.

(c) Acido sulfúrico concentrado, 93-98% grado de reactivo.

(d) Mezcla catalizadora. Mezcle 7% de sulfato de cobre fino, cristalino, grado de reactivo con sulfato de potasio grado de reactivo. (También se consigue la mezcla ya preparada en paquetes).

(e) Cinc en gránulos.

(f) Solución de hidróxido de sodio, libre de nitrógeno. Disuelva 450 g. de hidróxido de sodio por litro de agua. Generalmente se preparan 18 a 25 litros de una sola vez y esto se logra mezclando cantidades pequeñas de agua e hidróxido de sodio en forma alterna en un recipiente grande de metal, y la solución se va mezclando con una varilla de metal o de vidrio hasta que el hidróxido de sodio quede completamente disuelto cada vez que se agrega. Déjese la solución en reposo durante toda la noche para que enfríe y luego viértala a una botella de polietileno con la ayuda de un pichel de porcelana.

(g) Solución de ácido bórico al 4%. Disuelva 40 g. de ácido bórico por litro de agua y agregue 5 ml. de la solución indicadora.

## Reactivos para el procedimiento alterno

(a) Prepare todos los reactivos descritos anteriormente del punto (b) al (f) inclusive.

(b) Solución de hidróxido de sodio; 0.1 N. Agregue 4 g. de NaOH grado de reactivo, por litro de agua destilada (libre de CO<sub>2</sub>). Estándarice el hidróxido de sodio contra biftalato de potasio que tenga un peso equivalente a 25 ml. de 0.10 N NaOH.

(c) Indicador rojo de metilo. 0.2% rojo de metilo en alcohol etílico de 95%.

## Procedimiento

(a) Pese por diferencia una muestra que contenga aproximadamente de 25 a 50 mg. de nitrógeno. Cuando se trate de muestras de alimento, la cantidad puede oscilar entre 1.5 y 2.0 g; para heces frescas, de 4 a 6 g. y para orina fresca, 5 ml. pero además se debe pesar ya que la orina varía mucho en gravedad específica.

Para evitar la pérdida de material en muestras sólidas, coloque un papel de filtro en un embudo, ponga la muestra en el papel y arróllelo en la parte superior a manera de sellar la muestra y deposítela con todo y papel en el balón de Kjeldahl donde se va a digerir.

(b) Corra simultáneamente con las muestras, dos blancos (papel de filtro) en todos los pasos del procedimiento y réstele a la titulación de las muestras, la titulación del blanco. Generalmente el valor promedio del blanco sirve para las muestras que se corren durante el día.

(c) Agregue 10 g. del catalítico con una cuchara de medir y luego 25 ml. de ácido sulfúrico concentrado. Para muestras con bajo contenido de nitrógeno, aumente la cantidad de ácido sulfúrico en 10 ml. por cada

gramo adicional de materia orgánica sobre una muestra de 2 g.

(d) Coloque los balones en los calentadores del aparato Kjeldahl y póngalos a funcionar simultáneamente con el abanico extractor. Mantenga en observación el proceso de digestión hasta que cese la formación de espuma. Si la espuma en una muestra determinada sube por el cuello del balón, retire el frasco del calentador para que la espuma desaparezca y luego vuelva a colocarlo. Cuando se trata de muestras líquidas, la formación de espuma es común.

La digestión debe proseguir hasta que haya transcurrido 30 minutos después de que la solución se aclare y todo el carbón se haya oxidado; se deben rotar los balones ocasionalmente durante todo el procedimiento. Terminada esta fase, se apagan los calentadores y se dejan enfriar los balones manteniendo prendidos los extractores para permitir el escape de todos los gases.

(e) Antes de que se solidifique el residuo digerido, agregue con cuidado 250 ml. de agua fría del grifo mientras se terminan de enfriar los balones con agua corriente. Si el material residual se ha solidificado, disuélvase éste mediante la rotación de los balones antes de continuar el procedimiento.

(f) Agregue 50 ml. de la solución de ácido bórico a los frascos Erlenmeyer de 500 ml. y colóquelos bajo los condensadores con los extremos de los tubos de destilación ligeramente sumergidos en la solución. (Véase el procedimiento alterno más adelante).

(g) Conecte el agua en los condensadores y ponga a funcionar los calentadores del sistema de destilación para que estén calientes cuando se inicie ésta. Así se evita que el ácido bórico suba hacia los balones de destilación.

(h) Agregue con cuidado 110 ml. de NaOH a cada balón, manteniéndolo

inclinado para que la solución se deslice por un costado hasta el fondo. [Si en el proceso de digestión se empleó más cantidad de ácido sulfúrico (c) de lo necesario, agregue 35 ml. de NaOH por cada 10 ml. de  $H_2SO_4$  adicional]. Agregue unos gránulos de cinc al balón (1 - 2g.) y rápidamente conéctelo al condensador. Una vez ajustado el tapón del condensador, mezcle el contenido del balón rotándolo suavemente.

Los iones de cobre formarán un complejo amonio-cúprico de color azul oscuro que indica la presencia de suficiente NaOH para neutralizar el exceso de ácido sulfúrico y permitir la liberación del amonio.

(i) Destile unas dos terceras partes del contenido del balón o hasta que se hayan recogido unos 200 ml. del destilado en los frascos Erlenmeyer. Retire los frascos Erlenmeyer y luego apague los calentadores, permitiendo así que los condensadores terminen de destilar por unos cinco minutos mientras tanto los balones de Kjeldahl se van enfriando. Lave los tubos de los condensadores con agua neutra que haya sido previamente titulada con un indicador y ácido sulfúrico.

(j) Titule el amonio recogido con ácido sulfúrico estandarizado a 0.1 N, hasta obtener un color morado muy ténue, o que desaparezca del todo el color.

(k) Vacíe los frascos Erlenmeyer y déjelos drenar con la boca hacia abajo en una parrilla. Quedarán listos para la próxima destilación sin necesidad de volverlos a lavar.

(l) Vacíe el contenido de los balones Kjeldahl pasándolo por un cedazo para recobrar los gránulos de cinc que pueden ser usados nuevamente. Enjuague los balones en agua del grifo y póngalos a drenar en una parrilla. Quedarán listos para la próxima digestión.

### Procedimiento alterno

(a) Pese, digiera y diluya la muestra tal y como se describe en los puntos (a) hasta (e) anteriormente descritos.

(b) Agregue a los frascos Erlenmeyer de 500 ml. exactamente 50 ml. de ácido sulfúrico estandarizado a 0.1 N en lugar del ácido bórico y colóquelos en los condensadores tal y como se explica en el paso (f) anterior. Continúe el procedimiento a través de la destilación como se indica en los pasos (g) (h) e (i).

(c) Agregue 5 gotas de la solución indicadora de rojo de metilo. Con la solución estandarizada de hidróxido de sodio 0.1 N, titule el exceso de ácido sulfúrico que no ha sido neutralizado por la amonía.

Nota: si la titulación da un valor de cero, entonces significa que la muestra contiene mucha amonía para ser absorbida por 50 ml. del  $H_2SO_4$  0.1 N. En este caso, repita la determinación con una muestra más pequeña o un volumen mayor de ácido sulfúrico estandarizado.

(d) Continúe el procedimiento tal y como se describe en los pasos (k) y (l) anteriormente citados.

## Cálculos

(a) Cuando se emplea el ácido bórico, el porcentaje de nitrógeno en la muestra se calcula de la manera siguiente:

$$\text{Porcentaje de nitrógeno en la muestra} = \frac{\left[ \begin{array}{l} \text{ml. de ácido} \quad \text{ml. de ácido} \\ \text{en titulación} \quad \text{en titulación} \\ \text{de la muestra} \quad \text{del blanco} \end{array} \right] \text{N del ácido} \times 0.014 \times 100}{\text{peso de la muestra en gramos}}$$

(b) Para calcular el porcentaje de nitrógeno en la muestra cuando se usa ácido sulfúrico para recoger la amonía:

$$\text{Porcentaje de nitrógeno en la muestra} = \frac{(\text{ml. de ácido} \times \text{N del ácido}) - (\text{ml. de base en titulación} \times \text{N de base}) \times 0.014 \times 100}{\text{peso de la muestra en gramos}}$$

(c) Para convertir porcentaje de nitrógeno a porcentaje de proteína cruda:

$$\text{Proteína cruda} = \text{N\%} \times 6.25.$$

Ajuste del porcentaje de proteína cruda a base seca:

$$(a) \frac{\% \text{ de proteína en muestra "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en muestra "tal como ofrecido"}}$$

o

$$(b) \frac{\% \text{ de proteína en muestra "parcialmente seco"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en muestra "parcialmente seco"}}$$

## Bibliografía

Scales, F. M., and A. P. Harrison. 1920. Boric acid modification of the Kjeldahl method for crop and soil analysis. J. Ind. Eng. Chem. 12:350-352.

## MATERIA ORGANICA

La materia orgánica corresponde al material que se quema en la presencia de oxígeno. La ceniza o materia mineral permanece como residuo.

Si se calcula el porcentaje de ceniza en una muestra, la materia orgánica se puede obtener por diferencia.

Porcentaje de materia orgánica en base seca = % de materia seca - % de ceniza en base seca

## DETERMINACION DEL CONTENIDO CELULAR

### Principio

Los nutrientes más aprovechables se encuentran encerrados por la pared celular y pueden agruparse bajo el nombre de contenido celular. Esta fracción incluye la proteína, carbohidratos solubles, minerales solubles y los lípidos. Un valor porcentual alto del contenido celular es también indicio del alto valor nutritivo en un alimento. El contenido celular equivale al valor resultante de la diferencia entre el porcentaje de paredes celulares y 100.

### Cálculo

Contenido celular (%) en base seca:

100 - contenido de paredes celulares (%) en base seca.

Ejemplo:

% de paredes celulares en base seca = 59.3%.

Entonces:  $100 - 59.3 = 40.7\%$  Contenido celular, base seca.

Conversión a base "tal como ofrecido": (sirve para otros componentes también).

$$\frac{\text{componente en base seca, \%}}{100} \times \frac{\text{materia seca \% "tal como ofrecido"}}{100} \times 100$$

Ejemplo:

Materia seca "tal como ofrecido" = 89.3%.

Entonces:  $\frac{40.7}{100} \times \frac{89.3}{100} \times 100 = 36.3\%$  contenido celular "tal como ofrecido"

#### Bibliografía

- Van Soest, P. J., 1967. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages. J. Animal Sci. 26:119.

## DETERMINACION DE PAREDES CELULARES (FIBRA NEUTRO-DETERGENTE) Y CONTENIDO CELULAR<sup>a/</sup>

### Principio

El procedimiento neutro detergente para determinar los componentes de la pared celular es un método rápido para fibra total en alimentos fibrosos vegetales. Aparentemente divide la materia seca al punto de que separa los constituyentes nutricionales solubles y accesibles, de aquellos que no son totalmente aprovechables o que dependen de la fermentación microbiológica para su aprovechamiento. Este método no puede aplicarse a los alimentos que tienen alto contenido de proteína y bajo en fibra.

### Equipo

(a) Aparato de reflujo: utilice cualquier aparato convencional que sea adecuado para la determinación de fibra cruda. Se prefieren los beakers de Berzelius (600 ml.) y los condensadores hechos de frascos redondos de 500 ml. de capacidad.

(b) Crisoles con filtro de vidrio: use el de tipo alto, de porosidad gruesa con plato de 40 mm. de diámetro y que sea suficientemente grande para recibir de 40 a 50 ml. de líquido.

(c) Limpieza de los crisoles: después de mucho uso, los crisoles tienden a obstruirse con material residual que es resistente al filtrado corriente con ácido crómico. Una manera adecuada de limpiarlos es la de

---

a/ Vea también la página 2701.

ponerlos a incinerar a 500° C y luego forzarles agua de abajo hacia arriba, en dirección opuesta a través del filtro. Cuando los crisoles se obstruyen con partículas minerales después de mucho uso, se prepara una solución caliente de 20% de KOH, 5% de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  y 0.5% de etilenodiamina tetra-acetato y se hace pasar forzada de abajo hacia arriba a través del filtro de vidrio del crisol. Se debe evitar el uso continuo de la solución alcalina pues tiende a erosionar el vidrio.

#### Reactivos

(a) Solución neutra de detergente: agregue 30 g. de sulfato lauril sódico USP; 18.61 g. del reactivo etilenodiamino tetra acetato disódico dihidrogenado, dihidratado; 6.81 g. del reactivo borato de sodio decahidratado; 4.56 g. del reactivo fosfato disódico hidrogenado, anhidro y 10 ml. de 2-etoxietanol (etileno glicol, eter monoctílico) grado purificado, en 1 litro de agua destilada. Agítese hasta disolverlo y controle el pH para que se mantenga entre 6.9 y 7.1.

(b) Decahidro naftaleno: grado técnico.

(c) Acetona: use un grado libre de color y que no deje residuo al evaporarla.

(d) Sulfito de sodio, anhidro: grado de reactivo.

#### Procedimiento

(a) Pese por diferencia aproximadamente 1 g. de muestra que haya sido molida en un tamiz de 1 mm. y deposítela en un beaker de Berzelius para iniciar el reflujo.

(b) Agregue en el orden señalado los siguientes reactivos: 100 ml.

de detergente neutro a temperatura ambiente, 2 ml. de decahidro naftaleno y 0.5 g. de sulfito de sodio anhidro.

(c) Caliéntese para que la solución hierva en 5 a 10 minutos y reduzca la temperatura cuando comienza la ebullición para evitar la formación de espuma. Ajuste la temperatura para que la solución hierva a un nivel constante y manténgase en reflujo por 60 minutos, tomando el tiempo desde el instante en que la solución comienza a hervir.

(d) Rote el beaker para suspender el material sólido y decante la solución con la muestra suspendida, en un crisol previamente tarado y colocado en un filtro con succión al vacío. Use poco vacío al principio, aumentándolo a medida que se necesite. Decante toda la muestra en el crisol, utilizando un mínimo de agua caliente (80° C). Una vez concluido este paso, elimine el vacío y afloje la capa de muestra que se ha compactado en el fondo del crisol y llénelo con agua caliente, repitiendo el lavado varias veces. Lavé la muestra con acetona dos veces y déjese secar con el vacío puesto nuevamente.

(e) Seque los crisoles a 105° C durante toda la noche y péselos a la mañana siguiente, después de enfriarlos en un desecador.

(f) El residuo de fibra recuperado se registra en términos de paredes celulares.

(g) Calcule el contenido celular (material soluble) substrayendo este valor de 100. (Vea página 2701).

Filtración: en el caso de muestras de granos y subproductos de molinos, existe la posibilidad de que se forme un material gelatinoso derivado de los almidones y la proteína, obstruyendo el filtro. Si por esta razón, las muestras no se pudieran lavar, los resultados finales darían

un contenido alto de paredes celulares. Sin embargo, la filtración sería normal si se siguen ciertas indicaciones. (a) Con frecuencia se puede mejorar el tiempo de filtrado, haciendo pasar aire de abajo hacia arriba en el crisol. (b) Durante la parte inicial de calentamiento de la muestra hasta la ebullición, se debe tomar precaución para que la muestra no se adhiera al fondo del beaker. Esta adherencia dificulta la filtración y se puede evitar por medio de un calentamiento más rápido y rotación frecuente del beaker.

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

#### Cálculo

Paredes celulares (%) en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$\frac{\text{Peso del crisol} + \text{paredes celulares} - \text{peso del crisol}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Ajuste a base seca:

(a) 
$$\frac{\text{Paredes celulares (\%)} \text{ en muestra "tal como ofrecido"} \times 100}{\text{Materia seca (\%)} \text{ de la muestra "tal como ofrecido"}}$$

o

(b) 
$$\frac{\text{Paredes celulares (\%)} \text{ en muestra "parcialmente seco"} \times 100}{\text{Materia seca (\%)} \text{ de muestra "parcialmente seco"}}$$

Nota: Vea la página 2701 para el cálculo del contenido celular.

## Bibliografía

Van Soest, P. J. and R. H. Wine. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. The determination of plant cell-wall constituents. J. Assoc. Official Anal. Chem. 50:50.



## DETERMINACION DE FIBRA POR EL METODO ACIDO-DETERGENTE

### Principio

Este procedimiento permite una rápida determinación de la lignocelulosa en los alimentos. Sin embargo, en esta fracción también aparece el sílice. La diferencia entre el valor de las paredes celulares y la fibra ácido detergente, da una estimación del valor de la hemicelulosa, ya que esta diferencia también incluye una fracción de proteína adherida a las paredes celulares. El método de fibra por ácido detergente también se emplea como paso preliminar en la determinación de la lignina.

### Equipo

(a) El mismo que se emplea para la determinación de las paredes celulares (véase página 2801).

### Reactivos

(a) Solución ácido detergente. Acido sulfúrico, grado reactivo, estandarizado a 1 N. Ello se logra agregando 49.04 gm. de  $H_2SO_4$  por litro de agua destilada. Para preparar 18 litros de solución, se necesitan 882.72 g. de  $H_2SO_4$ . Agregue 20 g. de bromuro de amonio cetyl trimetil (CTAB), grado técnico por litro de la solución 1 N de  $H_2SO_4$

o 360 g. por 18 litros y agítese para facilitar la disolución.

- (b) Decalin, decahidronaftaleno.
- (c) Acetona, grado de reactivo.
- (d) Hexano, grado de reactivo.

#### Procedimiento

(a) Pese por diferencia aproximadamente un gramo de muestra y deposítela en un beaker u otro recipiente adecuado para reflujo.

(b) Agregue 100 ml. de solución de ácido-detergente a temperatura ambiente y 2 ml. de decahidronaftaleno. Caliente la solución para que hierva en el término de 5 a 10 minutos. Cuando se inicia la ebullición, baje el calor para evitar la formación de espuma y manténgase en reflujo por 60 minutos contados a partir del inicio de la ebullición que debe ser lenta durante todo el procedimiento.

(c) Filtre la solución, con poca succión, a través de un crisol previamente tarado que podría ponerse en serio en el tubo de unión múltiple diseñado para fibra cruda. Con una varilla de vidrio, afloje la capa de muestra que se ha compactado en el fondo del crisol y lávela dos veces con agua caliente (90 - 100° C). Lave los lados del crisol de la misma manera.

(d) Repita igualmente el lavado con acetona hasta que desaparezca totalmente el color, desintegrando cualquier grumo que se haya formado para que el solvente entre en contacto con todas las partículas de fibra.

(e) Lave la muestra con hexano mientras aún contenga acetona (el hexano se puede omitir si la formación de grumos no constituye un problema). Mantenga la muestra bajo succión hasta que se libere del hexano y séquela a 105° C por 8 horas o durante toda la noche; luego se saca de la estufa,

se enfría en un desecador y se pesa.

### Cálculos

Porcentaje de fibra ácido detergente en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$\frac{(\text{peso del crisol} + \text{fibra} - \text{peso del crisol tarado}) \times 100}{\text{peso de la muestra}}$$

Ajuste a base seca:

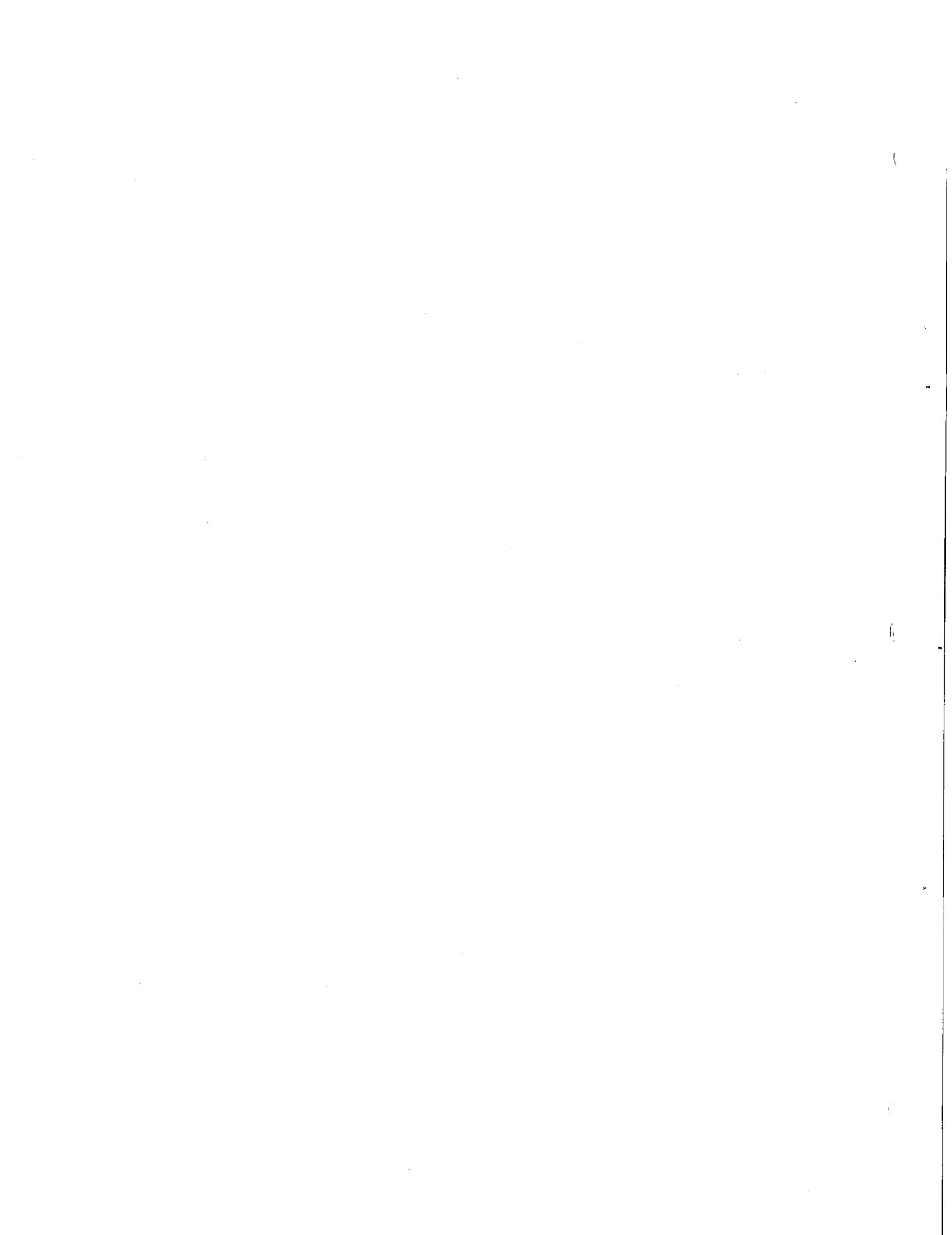
(a)  $\frac{\% \text{ de fibra ácido detergente en muestra "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en la muestra "tal como ofrecido"}}$

o

(b)  $\frac{\% \text{ de fibra ácido detergente en muestra "parcialmente seco"} \times 100}{\% \text{ de materia seca de la muestra "parcialmente seco"}}$

### Bibliografía

Van Soest, P. J. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. J. Assoc. Official Agr. Chem. 46(5):329.



## DETERMINACION DE LIGNINA POR EL METODO ACIDO-DETERGENTE

### Principio

Este procedimiento utiliza como primer paso, la técnica empleada para la determinación de fibra. El detergente extrae la proteína y otros materiales solubles en ácido que interfieren con la determinación de la lignina. El principio de este procedimiento estriba en que el residuo de la fibra ácido detergente, consiste principalmente de lignocelulosa de cuyo compuesto se disuelve y separa la celulosa por medio de la solución de  $H_2SO_4$  al 72%, quedando la lignina y la ceniza no-soluble en ácido. También la cutina, contenida en cantidades apreciables en ciertas muestras, se toma como si fuera parte de la lignina.

### Equipo

- (a) El mismo equipo necesario para la determinación de fibra ácido-detergente (véase página 3201).
- (b) Bandeja de vidrio.
- (c) Horno de incineración; con control de temperatura a 500° C.

### Reactivos

- (a) Acido sulfúrico, 72%. Cómo preparar un litro de solución:

$$\frac{100 \times 98.08 \text{ peso molecular} \times 12 \text{ mols}}{\% \text{ de } H_2SO_4 \text{ en la solución del mismo}} = \text{g. de } H_2SO_4 \text{ necesarios.}$$

(b)  $1000 \times 1.364^+ - g. H_2SO_4 = g \text{ de } H_2SO_4 \text{ necesarios.}$

Pese el agua necesaria (b) en un beaker de 2000 ml. y en un recipiente aparte, pese el ácido que se va a necesitar. Lentamente agregue el ácido al agua contenida en el beaker de 2000 ml., asentado en agua fría y agítese ocasionalmente con una varilla de vidrio. Determine la gravedad específica de una alícuota de 5 ml. de la solución (a 20° C) con una pipeta volumétrica, colocando la muestra en una botella de pesar tapada y pesándola en una balanza analítica. Ajuste la gravedad específica a 1.634 a 20° C mediante el agregado de cantidades pequeñas y medidas de agua o de ácido.

#### Procedimiento

(a) El primer paso es el de preparar la fibra ácido-detergente tal como se describe en la página 3201.

(b) Coloque los crisoles en la bandeja de vidrio y ésta en forma tal que tenga un extremo más levantado que el otro (2 cm.) para que el ácido drene libremente.

(c) Cubra el contenido de los crisoles con el  $H_2SO_4$  al 72% frío y mézclese con una varilla de vidrio hasta formar una pasta suave, deshaciendo todos los grumos. Llene los crisoles hasta la mitad con el ácido y mézclese nuevamente, dejando la varilla de vidrio dentro del crisol. Vuélvase a llenar con  $H_2SO_4$  al 72% y mézclese a intervalos de una hora mientras el ácido va drenando. No es necesario mantener los crisoles llenos todo el tiempo; con tres agregados es suficiente.

(d) Mantenga los crisoles a temperatura de 20 a 23° C.

(e) Transcurridas tres horas, extraiga tanto ácido como sea posible

---

+ gravedad específica de la solución de  $H_2SO_4$  al 72%.

con vacío. Lave el residuo otra vez con  $H_2SO_4$  al 72% y extraígalo.

(f) Lave el contenido de los crisoles con agua caliente (85 - 95° C) hasta que quede libre del ácido. Remuévalos la varilla de vidrio.

(g) Seque los crisoles durante la noche a 100° C de temperatura y luego péselos.

(h) Incinere el contenido de los crisoles en un horno a 500° C durante 3 horas; espere a que baje la temperatura a 250° C y péselos a un desecador para que terminen de enfriar y luego péselos.

#### Cálculo

Porcentaje de lignina en base "tal como ofrecido" o "parcialmente seco":

$$\frac{(\text{peso del crisol y lignina} - \text{peso del crisol y cenizas}) \times 100}{\text{peso de la muestra}}$$

Ajuste a base seca:

$$(a) \frac{\% \text{ de lignina en muestra "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en muestra "tal como ofrecido"}}$$

$$(b) \frac{\% \text{ de lignina en muestra "parcialmente seco"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en muestra "parcialmente seco"}}$$

#### Bibliografía

Van Soest, P. J. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. J. Assoc. Official Agr. Chem. 46:829.



DETERMINACION DE LIGNINA, CELULOSA Y SILICE  
(CENIZAS INSOLUBLES) POR PERMANGANATO

Principio

Un método indirecto para la determinación de la lignina por medio del permanganato, permite la determinación de la celulosa y cenizas insolubles también. La determinación de cenizas insolubles es una manera de estimar el contenido de sílice que en muchos forrajes, es factor sobresaliente en la reducción de la digestibilidad. El método de lignina por permanganato presenta una alternativa al método del ácido sulfúrico al 72%. Considerando que cada uno tiene sus propias ventajas, la escogencia del método depende de las muestras que se van a analizar y el uso que se le destine a los resultados.

Las ventajas del método por permanganato sobre el método del ácido sulfúrico al 72% pueden resumirse en los siguientes puntos:

- (1) El procedimiento es más corto;
- (2) Los reactivos son menos corrosivos y no exigen normalización;
- (3) Los resultados están menos afectados por el daño que sufre la muestra debido al calor de los aparatos empleados y por consiguiente, se aproximan más al verdadero valor de contenido en lignina.

Sin embargo, la cutina que es una fracción muy importante en muchas de las cubiertas exteriores de las semillas, no se determina con este método. Una variación que se introduce en estos casos, es la de prepa-

rar el permanganato para celulosa y tratar la muestra con ácido sulfúrico al 72% y asbestos, por espacio de 3 horas. Este procedimiento resulta en el fraccionamiento de la lignina cruda en las dos fracciones descritas seguidamente.

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

Teoría del método: los materiales que interfieren con la determinación, se separan con la preparación de la fibra ácido-detergente que está compuesta principalmente por lignina, celulosa y minerales insolubles. La lignina se oxida con una solución de ácido acético amortiguada con permanganato de potasio conteniendo hierro trivalente y plata monovalente como catalíticos. Los óxidos de manganeso y hierro que se depositan, se disuelven con una solución alcohólica de ácido oxálico é hidrociorhídrico, permanenciando la celulosa y los minerales insolubles. El contenido de lignina se determina en base a la pérdida de peso de la muestra, ocasionado por los tratamientos a que ha sido sometida; mientras que la celulosa se determina en base en la pérdida de peso de la muestra al ser incinerada. El residuo de cenizas consiste principalmente de sílice y gran parte del

material no silicato residual, puede eliminarse por medio del lavado con ácido hidrobromico concentrado.

#### Equipo

(a) El mismo que se emplea en la determinación de lignina ácido detergente (página 3301).

#### Reactivos

(a) Permanganato de potasio saturado. Disuelva 50 g. de  $\text{KMnO}_4$  grado de reactivo por litro de agua destilada o 900 g.  $\text{KMnO}_4$  para un volumen de 18 litros de agua destilada. Manténgase la solución protegida de la luz solar directa.

(b) Solución buffer de lignina. Para preparar un litro de solución, disuelva 6.0 g. de nitrato férrico nonahidratado  $[\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}]$  y 0.15 g. de nitrato de plata en 100 ml. de agua destilada. Combine esta mezcla con 500 ml. de ácido acético glacial y 5.0 g. de acetato de potasio (grado de reactivo). Agregue 400 ml. de alcohol butílico terciario (grado de reactivo) y mézclese la solución. Para preparar 12 litros se emplean las siguientes cantidades de reactivos:

Nitrato férrico nonahidratado	72.0 g.
Nitrato de plata	1.8 g.
Acido acético	6.0 litros
Acetato de potasio	60.0 g.
Alcohol butílico terciario	4.8 litros
Agua destilada	1.2 litros

(c) Solución de permanganato combinada. Antes de ser usada, combine y a la vez mezcle la solución de permanganato de potasio saturada con la solución buffer de lignina en la relación de 2:1 por volumen. La porción no utilizada de esta mezcla puede mantenerse por una semana en

refrigeración en ausencia de luz. Esta solución puede utilizarse si mantiene el color morado y está libre de precipitado.

(d) Solución desmineralizadora. Para cada litro de solución, disuelva 50 g. de ácido oxálico dihidratado en 700 ml. de alcohol etílico de 95%. Agregue 50 ml. de ácido hidrociorhídrico concentrado (aproximadamente 12 N) y 250 ml. de agua destilada y luego mézclese. Para preparar 18 litros se emplean las siguientes cantidades de los reactivos:

Acido oxálico	900.0 g.
Etanol 95%	12.6 litros
Acido hidrociorhídrico conc.	900.0 ml.
Agua destilada	4.5 litros

(e) Alcohol etílico de 80%. Para un litro mezcle 155 ml. de agua destilada y 845 ml. de alcohol etílico de 95%. Para preparar 18 litros mezcle 2.8 litros de agua destilada y 15.2 litros de alcohol etílico de 95%.

(f) Acido hidrobrómico, grado de reactivo.

#### Procedimiento

(a) El residuo de la determinación de fibra por el método ácido detergente puede utilizarse (aplicando el peso original de la muestra). Si no se usa este residuo, se deben seguir los pasos (b), (c) y (d) a continuación.

(b) Pese aproximadamente un gramo de muestra que haya sido previamente molida através de un tamiz de 1 mm. Si la muestra tuviera más de 15% de lignina, use 0.5 g.

(c) Se coloca el crisol en un horno de incineración a 500° C por espacio de una hora o más y luego se enfría en desecador y se pesa.

(d) Prepare la fibra ácido detergente de acuerdo al procedimiento descrito en la página 3201.

(e) Coloque los crisoles que contienen la fibra ácido detergente en una bandeja de vidrio de poca profundidad que tenga aproximadamente una capa de 1 cm. de espesor de agua fría. La fibra dentro de los crisoles no se debe mojar.

(f) Agréguele a los crisoles aproximadamente 25 ml. de la solución combinada de permanganato de potasio sin llenarlos demasiado. Ajuste el nivel del agua en la bandeja a manera de reducir la corriente de paso de la solución a través de los crisoles. Coloque una varilla corta de vidrio en cada crisol, con el objeto de revolver su contenido, deshacer los grumos y bañar todas las partículas que se adhieren a las paredes internas del crisol con la solución de permanganato.

(g) Permítase a los crisoles permanecer  $90 \pm 10$  minutos a temperatura de 20 a 25° C agregando si fuera necesario, una cantidad adicional de la solución combinada de permanganato. Hay que recordar que el color morado lo debe conservar constantemente.

(h) Traslade los crisoles al dispositivo de filtración y filtre toda la porción líquida remanente. No se lave la muestra. Coloque seguidamente los crisoles en bandejas limpias de vidrio o porcelana y llénelos hasta la mitad con la solución desmineralizadora. Después de transcurridos unos 5 minutos, filtre la porción líquida remanente y vuélvanse a llenar hasta la mitad con la misma solución. Se debe tomar la precaución de evitar el derrame debido a la producción de espuma. Repita la adición de la solución desmineralizadora por tercera vez si se nota que el filtrado del segundo tratamiento se encuentra de color café oscuro. Lave las paredes internas de los crisoles con una corriente fina de la solución desmineralizadora contenida en una botella de lavado por compresión, hasta que el color de la fibra sea el blanco. El tiempo total necesario en

este paso es de 20 a 30 minutos.

(i) Llene y lave el contenido de los crisoles con alcohol etílico de 80%; fíltrelo y repita este lavado por dos veces consecutivas.

Lave y filtre la muestra dos veces también con acetona, de igual manera que se hizo con el alcohol.

1. Para obtener el contenido de lignina.

Seque los crisoles durante la noche a 105° C de temperatura; luego déjense enfriar en un desecador y péselos. El contenido de lignina se calcula en base a la pérdida en peso original de la fibra obtenida por el método ácido detergente.

2. Para obtener el contenido de celulosa.

Incínere la muestra procedente de la determinación de lignina a 500° C durante 3 horas; déjese enfriar en un desecador y pésela. La pérdida de peso equivale al contenido de celulosa.

3. Para obtener el contenido de sílice.

Se puede obtener un valor supuesto del contenido de sílice mediante la percolación del residuo de ceniza en los crisoles, con ácido hidrobromico concentrado (48%) hasta que todo el color haya desaparecido. (La muestra que se usa en este caso es el residuo de cenizas obtenido anteriormente en la determinación de celulosa). Se lava la muestra con acetona y se filtra. Luego se incinera a 500° C por 3 horas, se enfría en desecador y se pesa. (Este paso no es necesario si el residuo de ceniza es menor del 2% de la muestra original).

Precauciones:

a) Los crisoles que contienen la fibra con un contenido alto a su vez en lignina, necesitarán una mayor cantidad de la solución de permanganato, pero evite el uso de cantidades innecesarias.

b) La aparición de un color amarillo o café es indicativo de que el permanganato se ha agotado.

c) Si el crisol está lleno, filtre la solución con ayuda del vacío y agréguele más solución.

d) Si persiste un color amarillo después de haber tratado la fibra con la solución desmineralizadora, ello es indicativo de una remoción incompleta de la lignina. Esto ocurre únicamente en materiales con un alto contenido de lignina.

e) La cutina presente en algunas cubiertas de semillas y otras plantas, no se oxida con el permanganato y por lo tanto no aparece como parte de la fracción de lignina, ni se blanquea con los tratamientos.

f) Las cubiertas de las semillas aparecen como manchas o vetas de colores entre las partículas de celulosa y no deben confundirse con un proceso de oxidación incompleta.

g) Un exceso en el uso y por lo consiguiente en el paso de la solución de permanganato a través de los crisoles debe evitarse cuando se trata de muestras con un contenido bajo de lignina; principalmente con los pastos tiernos o inmaduros en cuyo caso, una sola aplicación de permanganato es suficiente. La fibra en los pastos inmaduros es rápidamente deslignificada y por lo tanto, existe el peligro de una pérdida de los carbohidratos contenidos en la celulosa, si se usa un exceso de la solución.

h) Se puede obtener una disminución en el tiempo de paso de la solución a través del crisol mediante el ajuste del nivel de agua en la bandeja, regulándolo a una altura casi igual a la que tiene la solución den-

tro del crisol.

i) Las precauciones descritas anteriormente no es necesario tomarlas al usar la solución desmineralizadora.

#### D) Cálculos

Porcentaje de lignina en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$\frac{(\text{peso fibra ácido detergente} - \text{peso residuo de fibra por permanganato})}{\text{peso de la muestra antes de la determinación de fibra ácido detergente}} \times 100$$

Porcentaje de celulosa en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$\frac{(\text{peso del crisol} + \text{residuo de fibra por permang.} - \text{peso crisol y ceniza})}{\text{peso de la muestra antes de la determinación de fibra ácido detergente}} \times 100$$

Porcentaje de sílice en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$\frac{(\text{peso de la ceniza después del lavado con ácido hidrobromico})}{\text{peso de la muestra antes de la determinación de fibra ácido detergente}} \times 100$$

Ajuste a base seca (lignina, celulosa o sílice):

(a)  $\frac{\% \text{ analizado en muestra "tal como ofrecido"}}{\% \text{ de materia seca en muestra "tal como ofrecido"}} \times 100$

o

(b)  $\frac{\% \text{ analizado en muestra "parcialmente seco"}}{\% \text{ de materia seca en muestra "parcialmente seco"}} \times 100$

#### Bibliografía

Van Soest, P. J., and R. H. Wine. 1968. Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate. J. Assoc. Official Anal. Chem. 51:780.

PREPARACION DE LA SOLUCION DE CENIZAS PARA LA  
DETERMINACION DE CALCIO, MAGNESIO Y FOSFORO

Principio

La ceniza soluble se diluye en un medio ácido y la fracción insoluble se descarta por separación en el filtrado.

Equipo

- (a) Calentador de plantilla.

Reactivo

- (a) Acido clorhídrico concentrado.

Procedimiento

- (a) Una vez incinerada la muestra y enfriado el crisol, agréguele 5 ml. de HCl concentrado.
- (b) Agregue unos 20 ml. de agua destilada y ponga el crisol en un calentador de plantilla a 100° C y evapore el líquido a unos 10 ml.
- (c) Agregue 10 ml. de agua destilada y caliente a unos 90° C. Enfríe la solución y fíltrela en un papel de filtro de bajo contenido de ceniza (Sharkskin, S & S) usando un embudo de espiga larga, para que caiga el filtrado en un frasco volumétrico de 100 ml. Enjuague el crisol y pase por el papel de filtro agua destilada de manera que también caiga dentro del frasco.

- (d) Lleve la solución a volumen con agua destilada.
- (e) Conserve la solución para la determinación de calcio, magnesio y fósforo.

#### Bibliografía

- Easley, J. F., McCall, J. T., Davis, G. K. and Shirley, R. L. 1965. Analytical methods for feeds and tissues. Nutrition Laboratory, Department of Animal Science, University of Florida.
- Snell, Foster Dee and Cornelia T. Snell. 1949. Colorimetric Methods of Analysis. 3rd Edition, Vol. II. D. Van Nostrand Company, Inc., Princeton, New Jersey.

## DETERMINACION DE CALCIO

### Principio

El ácido etilendiamino tetra acético (EDTA) forma, en soluciones básicas, un complejo soluble y ligeramente ionizado con calcio y magnesio lo mismo que con muchos otros metales. Cuando el ion magnesio está presente, un buen punto final se observa con el indicador negro de eriocromo. El calcio es fijado por el EDTA antes que el magnesio, de tal manera que una solución desconocida de calcio que contenga una cantidad conocida de magnesio se puede titular con EDTA para determinar el calcio presente. La interferencia por otros iones debe eliminarse.

### Equipo

- (a) Microburetas.

### Reactivos

(a) Solución buffer. Mezcle 67.5 gramos de clorhidrato de amonio con 570 ml. de hidróxido de amonio concentrado y llévese a 1 litro de volúmen.

(b) Indicador. Disuelva 0.25 gramos de negro de eriocromo en 50 ml. de dietanolamina.

(c) Solución de sulfato de magnesio. Disuelva aproximadamente 2.0 gramos de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en un litro de agua. Un título exacto de EDTA debe determinarse por titulación de la solución de sulfato de magnesio con la solución de EDTA. (1 ml. de la solución de sulfato de magnesio deberá ser evaluada en relación a la equivalencia en mililitros de solución de EDTA.

(d) Solución de EDTA. Disuelva 6.65 gramos del etileno diamino tetra acetato disódico, grado reactivo en suficiente agua para preparar un litro de solución. (1.0 ml. de EDTA deberá ser evaluado para saber a cuántos miligramos de calcio equivale.

(e) Oxalato de amonio saturado.

(f) Acido hidrociorhídrico concentrado.

(g) Indicador rojo de metilo. 0.1% en solución alcohólica. Disuelva 0.1 gramos en alcohol etílico de 95% y llévese a 100 ml. de volumen.

(h) Calcio normal. (Un miligramo de Ca por ml.). Disuelva 2.4973 g. de carbonato de calcio puro en aproximadamente 100 ml. de HCl diluido. Dilúyase con agua exactamente a 1 litro.

(i) Hidróxido de amonio al 1%. Diluya 10 ml. de  $\text{NH}_4\text{OH}$  reactivo en 1 litro de agua.

#### Procedimiento<sup>+</sup>

(a) Con una pipeta tome una alícuota de la solución de ceniza que contenga de 0.05 mg. a 1.5 mg. de calcio y deposítela en un tubo de centrífuga cónico que contenga 3 ml. de oxalato de amonio saturado.

(b) Adicione 1 gota de indicador rojo de metilo y ajuste el pH a

---

+ Para la preparación de la solución de ceniza, ver página 3651.

5.0 - 5.5 (color rosado tenue del indicador) usando una solución diluida de ácido hidrociorhídrico o de hidróxido de amonio. Mezcle el contenido completamente, déjelo reposar por una hora y luego centrifúguese por 5 minutos a 3,000 rpm.

(c) Cuidadosamente vacíe el líquido sobrenadante, resuspenda el precipitado y lave los lados del tubo con aproximadamente 3 ml. de hidróxido de amonio al 1%. Centrifúguese nuevamente y de nuevo elimine el líquido sobrenadante.

(d) Disuelva el precipitado en 0.5 ml. de ácido hidrociorhídrico concentrado y lave la muestra con agua destilada en un beaker de 100 ml. Dilúyase aproximadamente a 30 ml. y adicione 5.0 ml. de la solución buffer y varias gotas del indicador negro de eriocromo.

(e) Con ayuda de una bureta, adicione 0.5 ml. de la solución de sulfato de magnesio. El color deberá ser vino tinto.

(f) Adicione la solución de EDTA con una bureta hasta que se obtenga un color azul definido, luego agregue de 0.1 - 0.5 ml. extra. Títule de nuevo con la solución de sulfato de magnesio hasta que se pierda el color azul y aparezca nuevamente el color vino tinto.

(g) Si no se obtiene un punto final definido, añada aproximadamente 0.25 gramos de cianuro de sodio a la muestra después de agregar el buffer.

## Cálculo

Porcentaje de calcio en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$(a) \frac{\text{Titulación de Ca del EDTA [ml. EDTA - EDTA x ml. MgSO}_4\text{]} \times 100}{\text{ml. de alicuota de la solución de cenizas x peso de muestra en g. antes de incinerar x 1000}} \quad (\text{titulación de Mg del EDTA})$$

o

$$(b) \frac{\text{Titulación de calcio del EDTA [ml EDTA - EDTA x ml. MgSO}_4\text{]} \times 10}{\text{ml. de alicuota de la solución de cenizas x peso de muestra en g. antes de incinerar.}} \quad (\text{titulación de Mg del EDTA})$$

Ajuste a base seca:

$$(a) \frac{\% \text{ de calcio en muestra "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en muestra "tal como ofrecido"}}$$

o

$$(b) \frac{\% \text{ de calcio en muestra "parcialmente seco"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en muestra "parcialmente seco"}}$$

## Bibliografía

- Easley, J. F., J. T. McCall, G. K. Davis and R. L. Shirley. 1965. Analytical methods for feeds and tissues. Nutrition Laboratory, Department of Animal Science, University of Florida.
- Welcher, Frank J. 1967. The analytical uses of ethylenediaminetetraacetic acid. D. Van Nostrand Company, Inc., Princeton, New Jersey.

## DETERMINACION DE MAGNESIO

### Principio

El ácido etilendiamino tetra acético (EDTA), forma en solución básica un complejo soluble y ligeramente ionizado con calcio y magnesio, lo mismo que con otros metales. Todos los iones de calcio forman un complejo en presencia de los iones de magnesio. Cuando se usa el indicador Eriocromo negro T, se observa un buen punto final en presencia de iones de magnesio. El calcio se determina tal como se hizo en el procedimiento para calcio y la cantidad equivalente de EDTA se resta dejando la cantidad correspondiente a los iones de magnesio. Usando el equivalente de magnesio de la solución de EDTA titulada, se pueden calcular los miligramos de magnesio que contiene la muestra.

### Equipo

- (a) Microburetas.

### Reactivos

- (a) Solución buffer. Mézclense 67.5 g. de cloruro de amonio con 570 ml. de hidróxido de amonio concentrado y dilúyase a 1 litro.
- (b) Indicador. Disuélvanse 0.25 g. de Eriocromo negro T en 50 ml. de dietanolamina.
- (c) Solución de sulfato de magnesio. Disuelva aproximadamente 2 g.

de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en un litro de agua. El equivalente de EDTA de esta solución se debe determinar por titulación con la solución de EDTA. (1 ml. de la solución de sulfato de magnesio necesita ser evaluado para saber a cuantos mililitros de la solución de EDTA corresponde.

(d) Solución estandarizada de magnesio. Un miligramo por ml. Disuélvase 8.3606 g. de cloruro de magnesio 6-hidratado, en un pequeño volumen de agua y dilúyase a 1 litro con agua.

#### Procedimiento<sup>+</sup>

(a) Tome con una pipeta, una alícuota de la solución de cenizas que contenga entre 0.02 y 1.5 mg. de magnesio, deposítela en un beaker de 100 ml. y dilúyase a 30 ml. con agua destilada.

(b) Agregue 5 ml. de la solución buffer y unas pocas gotas de la solución indicadora.

(c) Agregue de 0.2 a 0.5 ml. de la solución de sulfato de magnesio y titúlese con la solución de EDTA hasta obtener un color azul definido.

(d) Agregue de 0.2 a 0.5 ml. adicionales de la solución de EDTA, hasta que aparezca el primer tinte de color vino ténue en la solución azul.

(e) Si no se obtiene un punto final claro, adicione 0.25 g. de cianuro de sodio a la muestra después de que la solución buffer se haya agregado. Limpie el equipo con cuidado de tal manera que no haya contaminación de otro equipo o de la persona que corre los análisis. Si hay interferencia y ésta persiste, véase la cita bibliográfica.

---

<sup>+</sup> Véase la página 3651 para la preparación de la solución de ceniza.

## Cálculo

Porcentaje de magnesio en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$\frac{\text{equivalente en magnesio de la solución de EDTA} \left( \begin{array}{l} \text{ml. de EDTA} \\ \text{titulados} \end{array} \right) \left( \begin{array}{l} \text{ml. de EDTA} \\ \text{equivalentes de} \\ \text{calcio en alícuota} \end{array} \right) - \left( \begin{array}{l} \text{ml. de EDTA} \\ \text{equivalentes a} \\ \text{MgSO}_4 \text{ añadido} \end{array} \right)}{\text{ml. de solución alícuota de ceniza} \times \text{peso de muestra incinerada en g.}} \times 10$$

Conversión a base seca:

$$(a) \frac{\% \text{ de magnesio en base "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca de la muestra "tal como ofrecido"}}$$

o

$$(b) \frac{\% \text{ de magnesio en base "parcialmente seco"} \times 100}{\% \text{ de materia seca de la muestra "parcialmente seco"}}$$

## Bibliografía

Welcher, Frank J. 1957. The analytical uses of ethylenediaminetetraacetic acid. D. Van Nostrand Company, Inc., Princeton, New Jersey.



métrico de 500 ml; dilúyase a volumen con agua y almacénalo en el refrigerador.

(d) Solución de bisulfito de sodio al 15%. Disuelva 15 g. de bisulfito de sodio en agua y llévese a un volumen de 100 ml.

(e) Sulfito de sodio al 20%. Disuelva 10 g. de sulfito de sodio anhidro en agua y dilúyase a un volumen de 50 ml.

(f) Reactivo de ácido amino-naftol sulfónico (ANSA). Pese 250 mg. de ácido amino-naftol sulfónico, grado de reactivo y haga una pasta con una o dos gotas de la solución de bisulfito de sodio al 15%. Luego agregue 97.5 ml. de la solución de bisulfito de sodio al 15% y 2.5 ml. de la solución de sulfito de sodio al 20%. Si todo el ácido aminonaftol sulfónico no se disuelve inmediatamente, póngale más solución de sulfito de sodio al 20% en cantidades de 0.5 ml. cada vez, hasta que la solución sea completa. No agregue en exceso el diluyente. Deje la solución en reposo durante la noche y luego fíltrela a través de un papel de filtro Whatman No. 41 o su equivalente. Almacénela en una botella de vidrio, color pardo.

#### Procedimiento<sup>+</sup>

(a) Tome en una pipeta una alícuota de la solución de cenizas que contenga de 0.01 mg. a 0.2 mg. de fósforo y vacíela en un frasco volumétrico de 50 ml. Agregue aproximadamente 25 ml. de agua destilada y 5 ml. del reactivo de molibdato de amonio. Agite el frasco para mezclar la solución y agréguele 2 ml. de reactivo ANSA. Llévese a volumen con agua y luego se tapa y se mezcla bien.

(b) Registre la transmitancia de la solución exactamente a los 20 minutos después de haber agregado el reactivo de ANSA. Compare la transmi-

---

+ Vea la página 3651 para la preparación de la solución de cenizas.

## DETERMINACION DE FOSFORO

### Principio

El ion de ortofosfato reacciona con molibdato de amonio para formar un compuesto de molibdato de fósforo. El compuesto de molibdato de fósforo se reduce a azul de molibdeno con ácido amino naftol sulfónico. El color azul formado está en proporción directa con el ortofosfato presente.

### Equipo

- (a) Espectrofotómetro, Spectronic "20", o su equivalente.

### Reactivos

(a) Solución normal de fósforo; 0.1 mg. de fósforo por ml. Disuelva 0.4394 g. de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  puro y seco en 300 ml. de agua destilada y 200 ml. de ácido sulfúrico, 1N. Agregue unas pocas gotas de permanganato de potasio al 2%, como preservativo y dilúyase con agua a 1 litro. Para obtener soluciones normales, dilúyase tal y como sea necesario.

(b) Solución de ácido sulfúrico, 10 N. Vacíe con cuidado 280 ml. de ácido sulfúrico concentrado en 720 ml. de agua.

(c) Reactivo de molibdato de amonio. Disuelva 12.5 g. de molibdato de amonio en aproximadamente 100 ml. de agua. Agregue la solución de molibdato a 150 ml. de ácido sulfúrico, 10 N contenido en un frasco volu-

tancia con un blanco, usando agua destilada en lugar de la muestra alícuota. Lea la concentración de fósforo, comparando la transmitancia obtenida, contra una curva normal de fósforo previamente preparada, que contenga de 0.01 a 0.25 mg. de fósforo por 50 ml.

#### Cálculo

Porcentaje de fósforo en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$\frac{\text{mg. de fósforo en la alícuota} \times 10}{\text{ml. de la solución alícuota de cenizas} \times \text{peso de la muestra incinerada.}}$$

Conversión a base seca:

(a)  $\frac{\% \text{ de fósforo en la muestra "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en base "tal como ofrecido"}}$

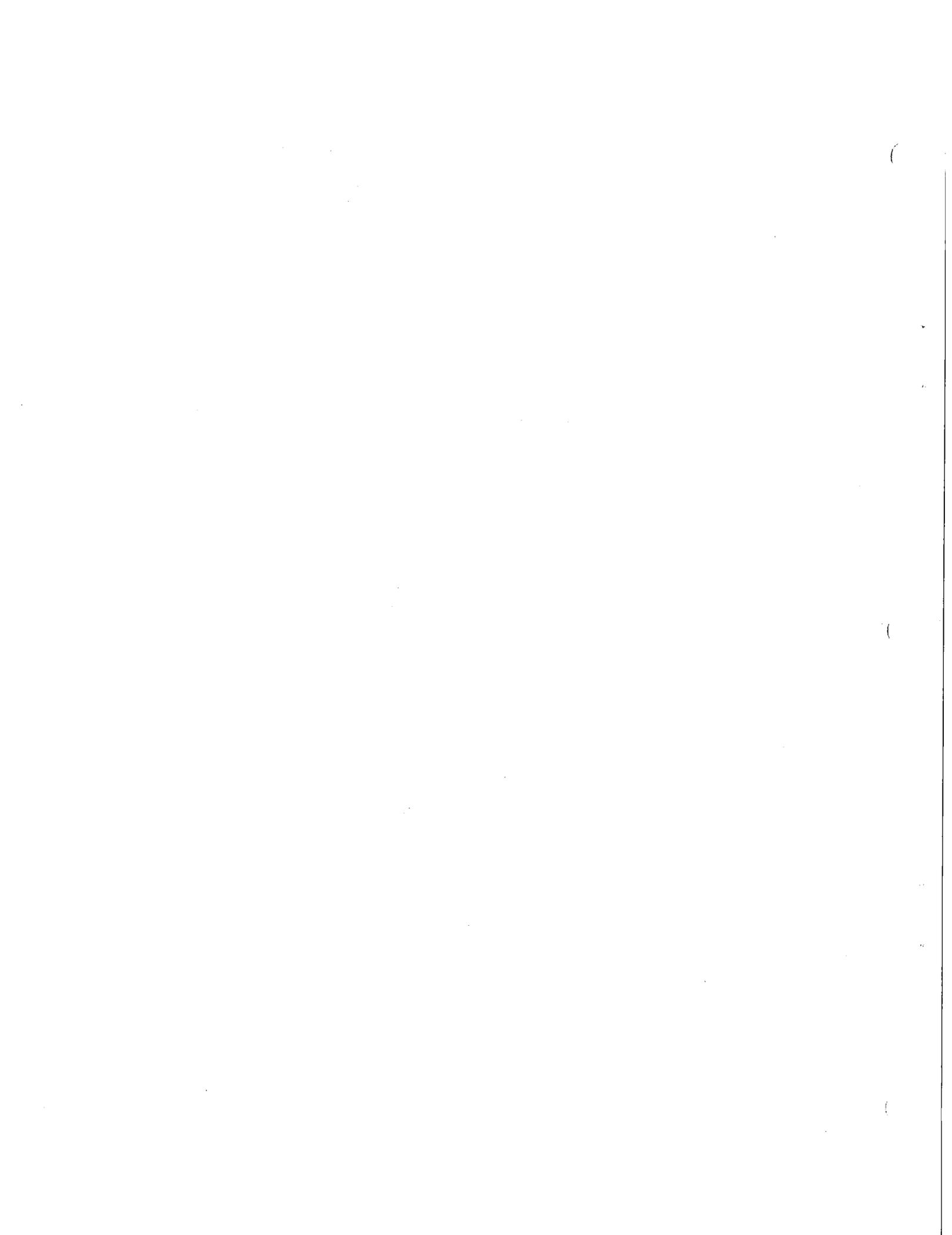
o

(b)  $\frac{\% \text{ de fósforo en la muestra "parcialmente seco"} \times 100}{\% \text{ de materia seca de la muestra "parcialmente seco"}}$

#### Bibliografía

Boltz, D. F., and M. G. Mellon. 1948. Spectrophotometric determination of phosphorus as molybdiphosphoric acid. *Anal. Chem.* 20:749.

Fiske, C. A., and I. Subbarow. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66:375.



## ANALISIS PARA ELEMENTOS MENORES

Se debe tomar ciertas precauciones en la determinación de los elementos menores que por lo general, aparecen en concentraciones menores a 0.01%.

(a) Se debe usar cristalería libre, hasta donde sea posible, de trazas del elemento que se va a analizar.

(b) Cuando se trata del uso de crisoles para incineración, se deben usar los de marca Vycor que contienen 96% de sílice y el resto del material está compuesto por óxido bórico, aluminio, sodio, hierro y arsénico. Este producto es comparable al cuarzo fundido en lo que se refiere a la resistencia a sustancias químicas y al calor. Es muy estable en presencia de ácidos y de bases débiles.

(c) El resto de la cristalería que se utilice, debe ser de marca Pyrex que es un vidrio boro silicato de un bajo contenido alcalino. Está libre de elementos del grupo magnesio-calcio-zinc, de metales pesados, de arsénico y antimonio.

(d) Para la determinación del boro, utilice vidrio resistente al álcali, que esté libre de este elemento (no Pyrex).

(e) Toda la cristalería usada debe ser lavada previamente con un detergente y enjuagada con agua del grifo, luego con una solución de ácido clorhídrico al 10% y finalmente con agua destilada triple.

(f) Se debe tener cuidado especial en la preparación de las muestras y como ejemplo de un mal procedimiento, se puede hacer referencia a

las muestras que se muelen en un molino Wiley equipado con tamiz de bronce, ya que se ha demostrado que ello puede ser fuente de importancia mayor en la contaminación de las muestras que se van a analizar. Existen tamices de acero inoxidable para los molinos Wiley y éstos se deben usar con muestras que se van a moler y posteriormente a analizar para elementos menores.

(g) Si no se consiguen los tamices de acero inoxidable, se pueden usar tijeras de acero inoxidable para cortar la muestra en lugar de molerla. En estos casos, se debe obtener submuestras más grandes de lo corriente para lograr un material representativo del que se desea analizar.

(h) En el proceso de molienda, lo que se persigue es evitar dentro de lo posible, que las muestras se vayan a contaminar con metales para los que se van a analizar, cualquiera que sea el equipo de preparación.

(i) También se debe tomar precauciones para no contaminar la muestra con la introducción accidental de metales provenientes de utensilios y equipo usados en la rutina diaria del laboratorio, tales como el níquel de las pinzas, el cobre y zinc de los quemadores, el zinc de los guantes de goma, etc.

(j) El agua que se use debe ser destilada en aparatos de vidrio y un blanco se correrá simultáneamente con todos los pasos de las determinaciones. Ello da un valor de la cantidad del elemento aportado como contaminante por los recipientes y reactivos.

(k) Un blanco que dé una lectura de cero, no necesariamente es indicativo de que está exento de contaminación. Puede suceder que se trate de análisis colorimétricos, haya una sustancia dentro del mismo reactivo que se combine con el elemento bajo estudio y prevenga que

que reaccione con el reactivo responsable de desarrollar el color.

(l) Al estar en reposo, las soluciones diluídas de iones metálicos pueden sufrir pérdida de potencia debido a la absorción o al intercambio de cationes con el vidrio del recipiente. La pérdida es mayor en un medio neutro o ligeramente básico pero también puede ocurrir en una solución ligeramente ácida. Entre más débil sea la solución, mayor será la disminución proporcional de la concentración. Por lo consiguiente, todos los patrones y las soluciones se deben almacenar en recipientes de polietileno. Las soluciones en solventes orgánicos nunca han de almacenarse en frascos de polietileno.

(m) El crecimiento de hongos puede sustraer metales de una solución.

(n) Las soluciones patrones se preparan a partir de metales puros o sus sales puras, de composición conocida. Si se dispone de una sal de buen grado, "calidad de reactivo" por lo general se puede usar para fines de colorimetría, sin necesidad de una purificación adicional. Siempre que sea posible se usa sales anhidras que deben pulverizarse y secarse a 100° C o más para eliminarles la porción mayor de la vacuola de agua.

(o) Bajo algunas circunstancias, se puede usar sales hidratadas siempre que no sean delicuescentes o altamente eflorescentes. Los cristales deben ser suficientemente grandes para que permitan escogerlos entre los que no presentan una eflorescencia definida. Tales cristales secados al aire pueden contener varias partes por mil de materiales extraños, pero ello generalmente no afecta el análisis.

(p) Prácticamente en todos los casos, la materia orgánica se debe eliminar antes de correr un análisis para elementos menores y ello se logra mediante la incineración de la muestra en un horno a temperatura de 500 - 600° C o por digestión húmeda con ácido.

## Bibliografía

Easley, J. R., J. T. McCall, G. K. Davis and R. L. Shirley. 1965.  
Analytical methods for feeds and tissues. Nutrition Laboratory,  
Department of Animal Science, University of Florida, Gainesville,  
Florida.

Sandell, E. B. 1959. Colorimetric Determination of Traces of Metals.  
3rd Edition. Interscience Publishers, Inc., New York, New York.

## DETERMINACION DE COBALTO

### Principio

El cobalto se extrae de la solución de ceniza con ditizón, formando un complejo rojo con la sal nitrosa - R (sodio 1-nitroso-2-naftol-3, 6-disulfonato) el cual es estable en ácido nítrico en ebullición. Esta última propiedad hace posible una determinación que es casi específica para cobalto. Tres moles del reactivo se combinan con uno de cobalto. Esta reacción provee un método más sensitivo para la determinación de trazas de cobalto tal como ocurre en suelos, plantas y órganos de animales.

### Equipo

- (a) Espectrofotómetro (Spectronic "20") o su equivalente.
- (b) Embudo de separación de 5 litros.

### Reactivos

(a) Sal Nitrosa-R (sodio 1-nitroso-2 hydroxynaftaleno-3, 6 disulfonato), solución acuosa al 0.2%. Esta solución no cambiará por meses si se mantiene en la oscuridad.

(b) Solución estandarizada de cobalto al 0.0100%. Disuelva 0.040 gramos de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en agua, adicione 1 ml. de HCl concentrado y dilúyase a 100 ml. De esta solución prepare otra más diluída, e.i., 10 microgramos de cobalto por mililitro.

(c) Acido cítrico, 0.20 M. Disuelva 4.2 gramos del monohidrato en agua y dilúyase a 100 ml.

(d) Solución buffer. Use 6.2 gramos de ácido bórico, 35.6 gramos de fosfato disódico dihidratado y 500 ml. de hidróxido de sodio de 1.00 N en un volumen total de 1 litro.

(e) Ditizona. Disuelva 0.5 gramos de ditizona en 600 - 700 ml. de  $\text{CCl}_4$ . Filtrelo hacia un embudo de separación de 5 litros que contenga de 2.5 - 3.0 litros de  $\text{NH}_4\text{OH}$  de 0.02 N. Agite bien y elimine la capa de  $\text{CCl}_4$ . Agítese con porciones de 50 ml. de  $\text{CCl}_4$  de alta calidad hasta que la fase  $\text{CCl}_4$ , a medida que se separa, adquiere un color verde puro. Agregue un litro de  $\text{CCl}_4$  y acidifique ligeramente la solución con  $\text{HCl}$  (1 + 1). Agite la ditizona para que se mezcle con la capa de  $\text{CCl}_4$  y descarte la capa acuosa. Almacénese en un lugar frío y oscuro que sea preferiblemente el refrigerador.

(f) Solución de citrato de amonio, al 40%. Disuélvanse 800 gramos de ácido cítrico en 600 ml. de agua y a medida que se agita agréguese lentamente 900 ml. de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Ajuste el pH a 8.5 si fuera necesario. Diluya a 2 litros y extraiga la solución con porciones de 25 ml. de solución de ditizona hasta que la fase acuosa persista con un color anaranjado y el  $\text{CCl}_4$  permanezca con un color predominantemente verde. Luego extraiga la solución con  $\text{CCl}_4$  hasta que todo el color anaranjado sea eliminado.

(g) Peróxido de hidrógeno, 30%.

(h) Acido sulfúrico concentrado.

(i) Acido nítrico concentrado.

(j) Acido hidrociorhídrico concentrado.

(k) Solución alcohólica de fenoltaleína al 1%. Disuelva 1 gramo en alcohol etílico de 95% y dilúyase a 100 ml.

(l) Hidróxido de amonio (1 + 1). Destílese  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado en igual volumen de agua.

(m) Solución de  $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$ . Combine 45 ml. de ácido nítrico concentrado y 30 ml. de ácido sulfúrico concentrado.

#### Procedimiento<sup>+</sup>

Pese 6 gramos de la muestra o una cantidad mayor y póngalos en un crisol Vycor. Incinérelos durante la noche a  $500^\circ \text{C}$ ., enfríelo y disuelva la ceniza en 3 ml. de  $\text{HCl}$  concentrado y luego agréguelo 25 ml. de agua. Evapore dos tercios de la solución y agréguele 15 ml. de agua. Evapore nuevamente dos tercios de solución y agréguele otros 15 ml. de agua. Evapore la mitad de la solución y fíltrela en un frasco volumétrico de 25 ml. y líévese a volumen. Transfiera toda o parte de esta solución a un embudo de separación de 150 ml. Agréguele 5 ml. de la solución de citrato de amonio y una gota de solución de fenoltaleína, ajustándola a pH 8.5 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  (1 + 1). Si se forma un precipitado, agréguele más citrato de amonio. Agregue 10 ml. de la ditizona en  $\text{CCl}_4$  y agítese por 5 minutos. Drene la fase  $\text{CCl}_4$  en un beaker de 100 ml. y repita este paso cuantas veces sea necesario, usando cantidades de 5 ml. de solución de ditizona cada vez y agitando por cinco minutos. La extracción se considera completa cuando la fase acuosa permanece anaranjada y la fase  $\text{CCl}_4$  se mantiene predominantemente verde. Luego adicione 10 ml. de  $\text{CCl}_4$  y agítese por 5 minutos, combinándolo con el extracto de  $\text{CCl}_4$ . Los 10 ml. finales de  $\text{CCl}_4$  deben ser de color verde puro. En caso contrario, la extracción no ha sido completa y debe repetirse.

<sup>+</sup> Ver instrucciones sobre como preparar muestras. (página 4101).

Adicione 2 ml. de solución de  $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$  y evapórese apenas hasta sequedad. Enfríese y agréguese 20 ml. de agua y porciones de 2 ml. de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%, hasta que la solución sea clara. Evapore la solución a volumen de 5 ml. y agregue 1 ml. de la solución de ácido cítrico y 1.2 ml. del bufer de ácido bórico fosfatado. El pH deberá ser 8.0 pero en el caso contrario, agregue más bufer hasta que el pH llegue a 8.0. Adicione exactamente 0.5 ml. de la solución de sal nitrosa-R, agitándola mientras tanto. Hiérvase por un minuto y agregue 1 ml. de ácido nítrico concentrado y de nuevo póngase a hervir exactamente por 1 minuto. Enfríese inmediatamente en la oscuridad y llévese a volumen después de transferirla a un frasco volumétrico de 10 ml. Observe la densidad óptica de la solución a 420 milimicrones. Compare la densidad óptica observada con una curva estandarizada de cobalto que se encuentre entre 0 y 10 microgramos de cobalto por 10 ml. del volumen final.

#### Cálculo

Miligramos de cobalto por kg. en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$\frac{\text{microgramos de cobalto en la muestra}}{\text{peso de la muestra}}$$

Conversión a base seca:

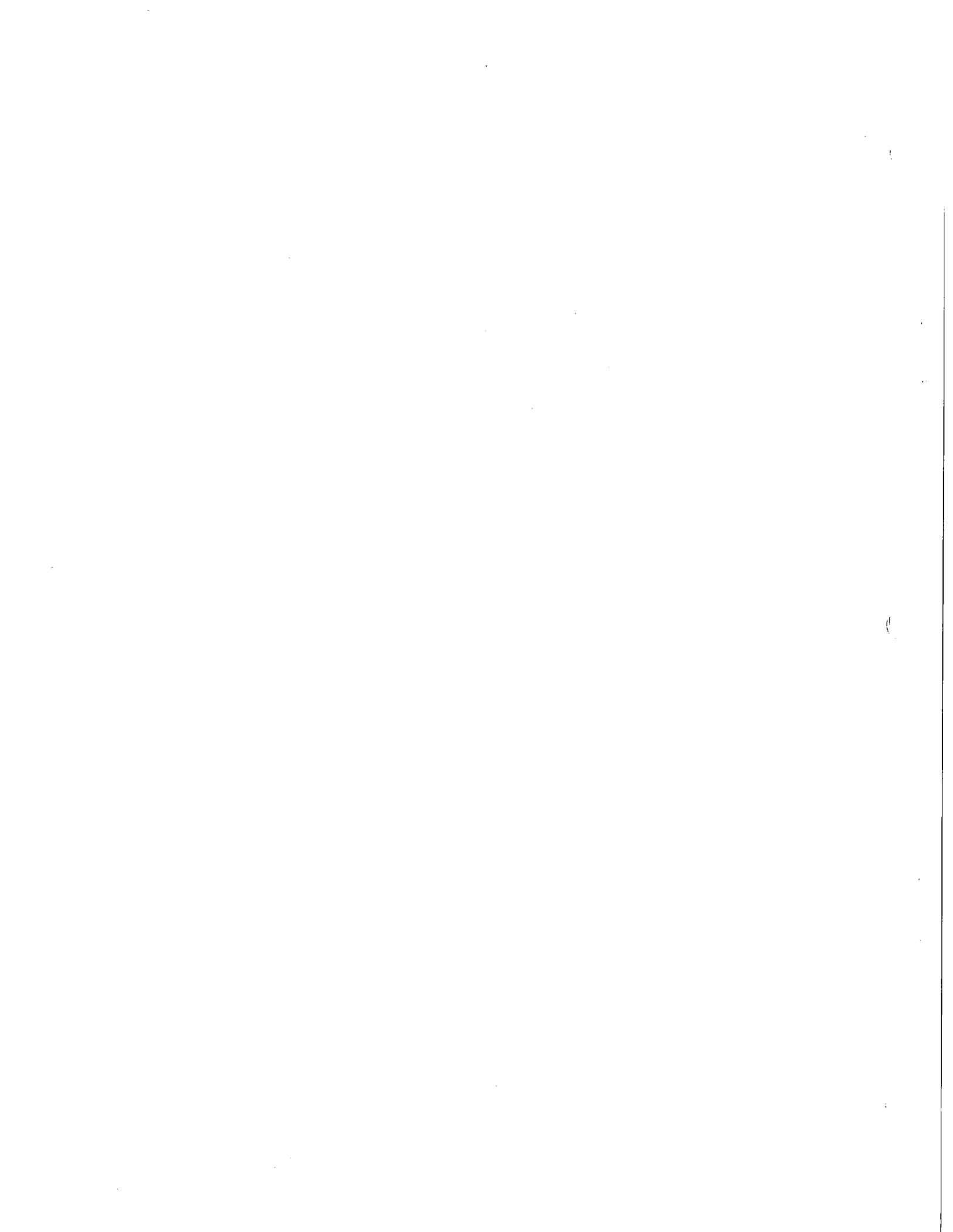
(a)  $\frac{\text{miligramos de cobalto por kg. en la muestra "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca de la muestra "tal como ofrecido"}}$ .

o

(b)  $\frac{\text{miligramos de cobalto por kg. en la muestra "parcialmente seco"} \times 100}{\% \text{ de materia seca de la muestra "parcialmente seco"}}$

## Bibliografía

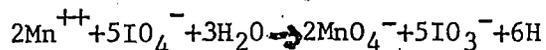
- Snell, Foster Dee and Cornelia T. Snell. 1949. Colorimetric methods of analysis. 3rd Edition, Volume II. D. Van Nostrand Company, Inc., Princeton, New Jersey.
- Sandell, E. B. 1959. Colorimetric determination of traces of metals. 3rd Edition. Interscience Publishers, Inc., New York, New York.
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 1960. 9th Edition. Published by the Association of Official Agricultural Chemists, P.O. Box 540, Benjamin Franklin Station, Washington 4, D.C.
- Marston, H. R. and D. W. Dewey. 1940. Australian J. Expt. Biology and Medical Sci. 16:343.



## DETERMINACION DE MANGANESO

### Principio

La determinación colorimétrica de manganeso por oxidación a permanganato en solución ácida es tanto sensitiva como específica. El periodato oxida suavemente las sales manganosas (o de manganeso) a permanganato. La reacción es como sigue:



### Equipo

- (a) Espectrofotómetro (Spectronic "20") u otro espectrofotómetro.
- (b) Crisoles de incineración Vycor o su equivalente.

### Reactivos

- (a)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado.
- (b)  $\text{HNO}_3$  concentrado.
- (c) Acido fosfórico (85%).
- (d) Periodato (meta) de sodio o potasio.
- (e) Acido hidrofúorhídrico (48%).
- (f) Solución estandarizada de manganeso. Se prepara disolviendo metal puro electrolítico de manganeso en ácido nítrico diluido, eliminando los óxidos de nitrógeno por ebullición y llevándose a volumen. La solución estandarizada se puede obtener pesando permanganato de potasio cristalino, grado de reactivo, acidificándola con ácido sulfúrico y lue-

go reduciéndola con un poco de sulfito.

#### Procedimiento

(a) Véanse las instrucciones del procedimiento para preparar las muestras (página 4100).

(b) Reducir a cenizas una muestra de tejido vegetal o de material biológico de tamaño adecuado en un horno a 500° C. y dejarla enfriar.

(c) Agréguese 10 ml. de ácido hidrofúorhídrico (48%). Ello previene la pérdida de manganeso como silicato insoluble. Caliéntese la solución para disolverla y déjese enfriar. Agregue 10 ml. de ácido sulfúrico concentrado y evapórese dentro de una capilla hasta que se desprendan vapores de trióxido de azufre. Transfiérala cuantitativamente a un frasco volumétrico de 100 ml. y llévase a volumen. La ceniza también puede colocarse directamente en 10 ml. de ácido nítrico concentrado y diluida a volumen.

(d) La solución lista para el análisis (0.1 a 1.0 mg. de manganeso), deberá contener 10 ml. de ácido sulfúrico concentrado o 15 a 20 ml. de ácido nítrico y además 5 a 10 ml. de ácido fosfórico de 85% en un volumen de 100 ml. Sin embargo, si la cantidad de manganeso presente es del orden de unos pocos microgramos, prepare la solución 2 N en ácido sulfúrico y agréguele 20 mg. de nitrato de plata, además del ácido fosfórico.

(e) Agregue 0.3 gramos de meta-periodato de potasio, o la cantidad equivalente de meta-periodato de sodio por cada 100 ml. de solución. Caliente la solución hasta la ebullición, agitándola y manténgala en el punto de ebullición o ligeramente por debajo durante 10 minutos (o al menos por una hora cuando hay pequeñas cantidades de manganeso). Déjese enfriar.

(f) Dilúyase a volumen y observe en el espectrofotómetro la densidad óptica a 525 milimicrones. Compare la densidad óptica observada con una curva normal de manganeso que esté entre 0.1 y 1.0 mg. de manganeso por 100 ml.

#### Cálculo

Miligramos por kg. de manganeso en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$\frac{\text{miligramos de manganeso en la muestra} \times 100}{\text{peso de la muestra}}$$

Conversión a base seca:

(a) 
$$\frac{\text{miligramos por kg. de manganeso en la muestra "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca de la muestra "tal como ofrecido"}}$$

o

(b) 
$$\frac{\text{miligramos por kg. de manganeso en la muestra "parcialmente seco"} \times 100}{\% \text{ de materia seca de la muestra "parcialmente seco"}}$$

#### Bibliografía

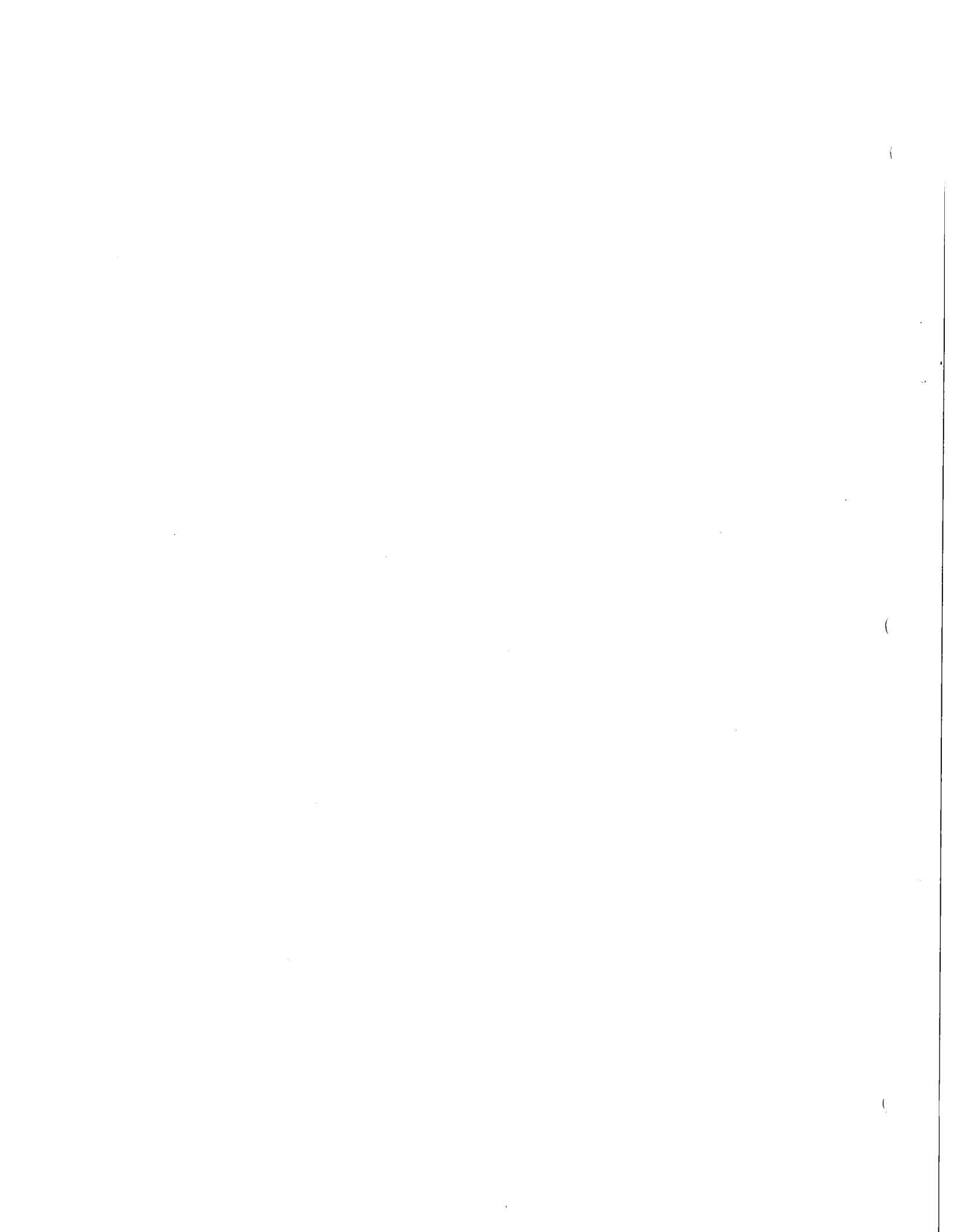
High, J. H. 1943. Amount of periodate required to oxidize manganese. Analyst 68:368.

Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 1960. 9th Edition. Published by the Association of Official Agricultural Chemists, P.O. Box 540, Benjamin Franklin Station, Washington 4, D.C.

Read, F. E. 1939. Determination of manganese in biological material. Analyst 64:586.

Sandell, E. B. 1959. Colorimetric Determination of Traces of Metals. 3rd Edition. Interscience Publishers, Inc., New York, New York.

Snell, Foster Dee and Cornelia T. Snell. 1949. Colorimetric Methods of Analysis. 3rd Edition, Volume II. D. Van Nostrand Company, Inc., Princeton, New Jersey.



## DETERMINACION DEL CAROTENO EN ALIMENTOS Y FORRAJES

### Principio

El caroteno y otros pigmentos se extraen de los materiales vegetales por medio de solventes orgánicos. El caroteno pasa a través de la columna cromatográfica que a su vez recoge otros pigmentos. La concentración del caroteno se determina por medio de la lectura de las muestras en un espectrofotómetro, comparándolas luego contra una curva normal.

### Equipo

- (a) Aparato de extracción. Goldfish o equivalente.
- (b) Espectrofotómetro, Spectronic "20" o equivalente.
- (c) Tubos cromatográficos. 20 x 400 mm con filtro de vidrio poroso.

### Reactivos

- (a) Acetona. Anhidra, libre de alcohol.
- (b) Hexano. B.P. 60-70° C.
- (c) Magnesia activada. SeaSorb 43, Fisher Scientific Company o equivalente.
- (d) Diatomita. Hyflo Super-cel, Johns-Manville or Fisher Scientific Company.

## Procedimiento

(a) Para henos y otras plantas secas, muele las muestras a través de un tamiz de 1 mm.

(b) Pese por diferencia de 1.000 a 4.000 g. de muestra, dependiendo de la cantidad de caroteno que ésta contenga en relación con las curvas normales y póngala en el frasco de extracción (Goldfish). Agréguele 30 ml. de una mezcla de acetona-hexano (3 + 7) y póngase en reflujo por una hora en calor alto. Luego déjese enfriar a temperatura ambiente.

(c) Filtre el extracto a un frasco volumétrico de 100 ml. lavando el residuo y llévelo a volumen con hexano (esta solución tendrá 9% de acetona).

(d) Para analizar material vegetal fresco y ensilajes, córtense en partículas finas con tijeras o cuchillo y si el análisis no pudiera conducirse de inmediato, decolórese en agua hirviendo por 5 a 10 minutos y almacénece bajo congelación.

Coloque la muestra previamente pesada, 2 a 5 g. en una licuadora de alta velocidad y agréguele 40 ml. de acetona; 60 ml. de hexano y 0.1 g. de  $MgCO_3$ , licuándola por espacio de cinco minutos. Permita que se asiente el residuo y luego decante la solución en un embudo separatorio, lavando el residuo con dos porciones de 25 ml. cada una de acetona, y luego con 25 ml. de hexano y combine los extractos. Lave la acetona contenida en el extracto con cinco porciones; cada una de 100 ml. de agua y transfiera la capa superior a un frasco volumétrico de 100 ml. que contenga 9 ml. de acetona y llévese a volumen con hexano.

(e) Prepare la columna cromatográfica con una mezcla (1 + 1) de magnesia activada y diatomita. Para preparar la columna, agregue el absorbente a unos 15 cm. de profundidad de manera que quede flojo; conecte el

tuño al frasco de succión y aplique toda la fuerza del vacío con el agua. Utilice un artefacto plano, tal como un tapón invertido, montado en una varilla de vidrio, para presionar suavemente el material absorbente y aplanar la superficie, para que la columna comprimida sea de unos 10 cm. de profundidad. Coloque una capa de 1 cm. de espesor de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro sobre el material absorbente. Todos los materiales deben estar totalmente secos y de no ser así, se deben secar a 105° C en estufa.

(f) Con el vacío puesto continuamente en el frasco, decante el extracto en la columna. Use unos 50 ml. o más de acetona-hexano (1 + 9) para desarrollar el cromatograma y lave a través del absorbente los carotenos visibles.

Durante todo el procedimiento mantenga la parte superior de la columna cubierta con una capa del solvente. Recupere todo lo que pasa a través de la columna; los carotenos atraviezan rápidamente ésta, mientras que los anillos de xantofila, productos de la oxidación de los carotenos y la clorofila quedan retenidos en la columna al completar este procedimiento.

(g) El material que atravieza la columna, que a su vez se ha reducido en volumen por pérdida de vapor debido al vacío por agua, se transfiere a un frasco volumétrico de 100 ml. y se lleva a volumen con acetona-hexano (1 + 9).

(h) El contenido de carotenos en esta solución se determina a 436 milimicrones en el espectrofotómetro.

(i) Se puede correr una curva normal con un ámbito de 0.0001 a 0.005 mg. de beta-caroteno por ml. de la mezcla acetona-hexano (1 + 9); o 0.01 a 0.5 mg. de beta-caroteno por 100 ml. de solución.

## Cálculos

Caroteno (miligramos por kg.) en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$\frac{\text{mg. de caroteno en muestra} \times 1000}{\text{peso de la muestra en g.}}$$

Ajuste a base seca:

(a)  $\frac{\text{caroteno (miligramos por kg.) en base "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en muestra "tal como ofrecido"}}$

o

(b)  $\frac{\text{caroteno (miligramos por kg.) en base "parcialmente seco"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en muestra "parcialmente seco"}}$

## Bibliografía

Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 1960. 9th Edition. Published by the Association of Official Agricultural Chemists, P.O. Box 540, Benjamin Franklin Station, Washington 4, D. C.

## DETERMINACION COLORIMETRICA DE CAROTENO Y VITAMINA A EN SANGRE

### Principio

El caroteno y la vitamina A se separan de la sangre con éter de petróleo. La vitamina A se determina por medios colorimétricos basados en la reacción con tricloruro de antimonio, que produce un color azul vivo. El contenido de caroteno se determina directamente también por medio de un colorímetro.

### Equipo

- (a) Espectrofotómetro "Spectronic 20" o similar.
- (b) Tubos de centrífuga de 50 ml. con tapas de vidrio.
- (c) Abastecimiento de gas de nitrógeno y regulador.

### Reactivos

(a) Tricloruro de antimonio. Triture el tricloruro de antimonio en un mortero para acelerar su disolución y disuelva 25 g. en 75 ml. de cloroformo, agréguele anhídrido acético para aclarar la solución y llévela a un volumen de 100 ml. con cloroformo. Conserve la solución dentro de un desecador en una botella color ámbar con tapón de vidrio.

(b) Eter de petróleo. Use un producto de buen grado y destílese antes de usarlo si fuera necesario.

(c) Cloroformo. Use un producto de buen grado y destílese antes de usarlo si fuera necesario.

(d) Alcohol etílico de 95%.

#### Procedimiento

Prepare una curva de caroteno de 0.1 a 1.0 microgramos de beta caroteno puro por ml. de éter de petróleo, estableciendo la densidad óptica o tramitancia a 440 milimicrones. Use el éter de petróleo como blanco.

Prepare una curva de vitamina A estableciendo la densidad óptica o tramitancia de 1 a 25 microgramos de vitamina A alcohólica pura por ml. de la solución de 5 ml. (1 ml. de cloroformo + 4 ml. de tricloruro de antimonio al 25%). Ajuste el espectrofotómetro a 620 milimicrones con un blanco compuesto por 1 ml. de cloroformo y 4 ml. de tricloruro de antimonio.

(a) Recoja 25 ml. de sangre en un tubo de ensayo que contenga 1 ml. de citrato de litio al 20% y mézclela bien invirtiendo el tubo unas 20 veces.

(b) Centrifúguela por 30 minutos a unas 2800 rpm.

(c) Tome 10 ml. del plasma con una pipeta y deposítelo en un tubo de 50 ml. para centrífuga con tapadera de vidrio; agregue 10 ml. de alcohol etílico de 95% y 15 ml. de éter de petróleo y agite el contenido vigorosamente durante 10 minutos. La mezcla se separa en dos capas; la superior consiste del éter de petróleo conteniendo la fracción de vitamina A y el caroteno.

(d) Tome dos muestras del éter de petróleo de 5 ml. cada una con una pipeta y deposítelas en dos cubetas del Spectronic "20".

(e) Lea la densidad óptica a 440 milimicrones usando el éter de petróleo como blanco.

(f) Evapore el éter de petróleo conteniendo la vitamina A y el caroteno (d), colocando las cubetas en agua caliente y haciendo circular una corriente de nitrógeno dentro de ellas.

(g) Prepare un blanco que contenga 1 ml. de cloroformo y 4 ml. de tricloruro de antimonio al 25% y ajuste el espectrofotómetro con el blanco a cero densidad óptica (100% tramitancia) a 620 milimicrones.

(h) Agregue 1 ml. de cloroformo a la cubeta conteniendo la vitamina A (f) y colóquela en el espectrofotómetro. Agréguele 4 ml. de la solución de tricloruro de antimonio al 25% rápidamente, invirtiendo la pipeta en la que se midieron éstos.

(i) Lea la densidad óptica (o tramitancia) tan pronto como sea posible después de agregar el reactivo (2-3 segundos) ya que el color azul tiende a desaparecer muy rápido. Los pasos (h, i) se corren en la muestra duplicada (d).

(j) Para obtener el valor de vitamina A, es preciso calcular la intensidad de color correspondiente al caroteno contenido en la misma muestra.

Evapore las soluciones correspondientes a la curva de caroteno y léanse igual que para la curva de vitamina A. Calcule entonces el color correspondiente a vitamina A, partiendo de la cantidad de beta caroteno usado, o sea los microgramos por ml. de la curva de vitamina A.

### Cálculo

(a) El contenido de carotenos y vitamina A en 10 ml. de plasma, se extraen en 15 ml. de éter de petróleo. La concentración de carotenos se determina en esta solución de éter de petróleo.

$$\text{Beta-caroteno, microgramos por ml. de plasma} = \frac{15 \text{ ml. de la solución de éter} \times \text{Conc. de carotenos en la solución de éter de petróleo}}{10 \text{ ml. de plasma en la muestra}}$$

o

$$\text{Beta-caroteno, microgramos por ml. de plasma} = 1.5 \times \text{concentración de carotenos en la solución de éter de petróleo.}$$

(b) Solamente se utilizan 5 ml. de los 15 ml. de la solución de plasma, éter de petróleo en la determinación de vitamina A. Ello representa el contenido de vitamina A en 10 ml. de plasma. Por consiguiente, la concentración de vitamina A por ml. de plasma, se calcula de la manera siguiente:

$$\text{Vitamina A alcohol microgramos por ml. de plasma} = \frac{\left[ \begin{array}{l} 15 \text{ sol. petróleo} \\ 5 \text{ sol. éter} \end{array} \right] \times \text{microgramos de vitamina A por ml. de la curva}}{10 \text{ ml. de la muestra de plasma}} \quad \text{Color de vitamina A debido al caroteno en microgramos por ml.}$$

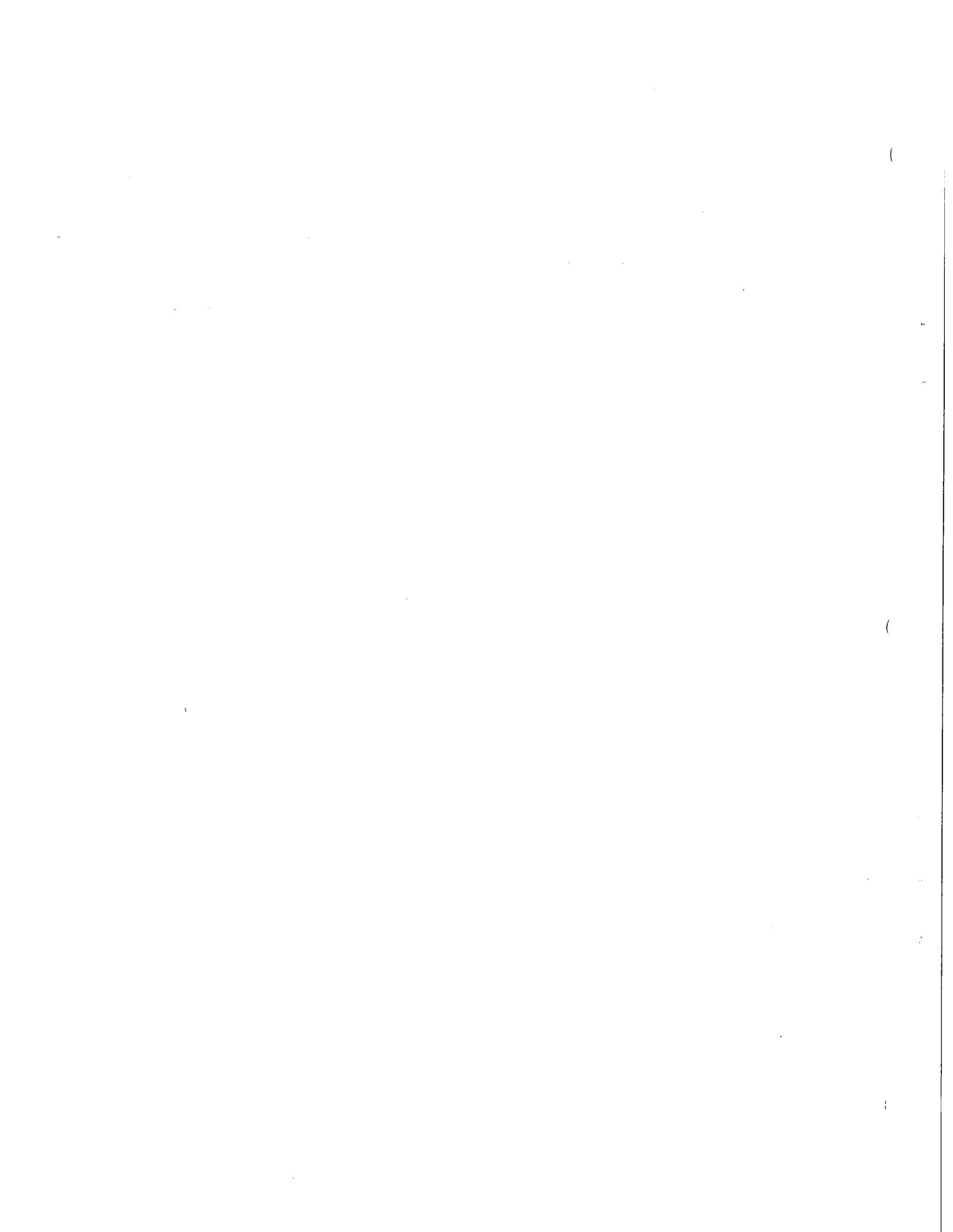
o

$$\text{Vitamina A alcohol, microgramos por ml. de plasma} = 0.3 \times \text{microgramos de vitamina A por ml. de la curva} \quad \text{color de vitamina A debido al caroteno, microg. por ml.}$$

(c) Reporte los resultados en base "tal como ofrecido" en microgramos por 100 ml. Estos datos se deben consignar bajo otros análisis en el formato.

## Bibliografía

- Carr, F. H. and E. A. Price. 1926. Color reaction attributed to vitamin A. *Biochemistry J.* 20:479.
- Kimble, M. S. 1939. The photoelectric determination of vitamin A and carotene in human blood plasma. *J. Laboratory and Clinical Medicine* 24:1005.
- Moore, Thomas. 1957. *Vitamin A*. Elsevier Publishing Company, London, England. D. Van Nostrand Company, Inc., New York, New York, distributors.



## DETERMINACION DE VITAMINA A EN EL HIGADO

La vitamina A forma un color azul intenso cuando se combina con tricloruro de antimonio en presencia de cloroformo. La intensidad de este color se mide fácilmente en un espectrofotómetro. Cualquier interferencia por el caroteno, el cual también forma un color azul con tricloruro de antimonio, se corrige determinando el contenido de caroteno de la muestra. La cantidad de color de vitamina A que aparece debido al caroteno, se subtrae de la lectura de la muestra.

### Equipo

- (a) Espectrofotómetro.
- (b) Tubos de ensayo de 50 ml. con tapadera de cristal.
- (c) Tubos de vidrio homogenizadores.
- (d) Abastecedor de hidrógeno y regulador.

### Reactivos

(a) Tricloruro de antimonio al 25%. Disuélvase 25 gramos de tricloruro de antimonio en 75 ml. de cloroformo seco, agréguese anhídrido acético para aclarar la solución y llévase a 100 ml. con cloroformo. Pulverice el tricloruro de antimonio con mortero y mazo para activar la solución y se almacena en un desecador, en botella color marrón y con tapadera de cristal.

- (b) Eter de petróleo, grado de reactivo A.C.S. B.P. 30-60° C.
- (c) Cloroformo, grado de reactivo, A.C.S.
- (d) Solución de KOH al 15%. Disuélvanse 15 gramos de KOH en agua y llévense a un volumen de 100 ml. con agua.
- (e) Solución de HCL 1:1. 50 ml. de HCl concentrado más 50 ml. de agua.
- (f) Alcohol etílico al 95%.

#### Procedimiento

Pese 3 gramos de tejido (o cualquier otra cantidad apropiada) y colóquelo en un tubo homogenizador. Protéjase las muestras y las soluciones que contengan vitamina A de la luz durante el procedimiento. Agregue 1 ml. de agua y 2 ml. de KOH al 15% y coloque el tubo de ensayo en un beaker con agua hirviendo por 15 minutos, con agitaciones frecuentes de tal manera que el hígado se disuelva completamente. Enfríese el tubo con agua corriente y agréguele una cantidad adecuada de HCl 1:1 para neutralizar el álcali. (La cantidad se determina previamente). Inserte el mazo de cristal y homogenice completamente la muestra. Luego remueva el mazo de cristal y dilúyase con agua a 15 ml. Con una pipeta coloque 5 ml. de la mezcla en cada uno de los dos tubos de ensayo de 50 ml. que tengan tapadera de cristal y agrégueles 5 ml. de alcohol de 95% a cada uno, 15 ml. de éter de petróleo, y agítese la mezcla suavemente durante 10 minutos. Permita que se separe la capa de éter y con una pipeta se toman 3 ml. (dependiendo más o menos de la cantidad de vitamina A en la muestra) de éter de petróleo y se colocan en el tubo colorimétrico. Léase la densidad óptica a 440 milimicrones usando éter de petróleo como blanco y determine la cantidad de caroteno en la muestra, comparándola con la curva de cali-

Bración del caroteno. Evapórese el éter de petróleo colocando el tubo en agua caliente y permitiendo que una corriente de nitrógeno pase por los tubos. Prepare un blanco que contenga 1 ml. de cloroformo y 4 ml. de tricloruro de antimonio y ajústese el espectrofotómetro a cero densidad óptica y 620 milimicrones. Agréguese 1 ml. de cloroformo al tubo que contiene la vitamina A y colóquelo en el espectrofotómetro. Agréguese 4 ml. de tricloruro de antimonio al 25% rápidamente, invirtiendo la pipeta volumétrica. Léase la densidad óptica tan pronto como sea posible después de añadir el reactivo (2-3 segundos), ya que el color desaparece rápidamente.

Establézcase la curva de caroteno determinando la densidad óptica de 0.1 - 1.0 microgramos de beta-caroteno puro por mililitro de éter de petróleo a 440 milimicrones. Use éter de petróleo como blanco.

Establézcase la curva de vitamina A determinando la densidad óptica de 1 - 25 microgramos de vitamina A alcohol pura, por 5 ml. de solución (1 ml. cloroformo + 4 ml. de tricloruro de antimonio al 25%). La cantidad adecuada de vitamina A se disuelve primero en éter de petróleo y luego la alícuota se evapora como se indicó anteriormente. Léase la densidad óptica a 620 milimicrones en el espectrofotómetro usando 1 ml. de cloroformo + 4 ml. de tricloruro de antimonio al 25% como blanco al igual que se hizo previamente.

Para obtener el factor de corrección del color de vitamina A debido al caroteno en la muestra, evapórense las soluciones de la curva del caroteno y léase como se hizo para la curva de vitamina A. Calcule la cantidad de color correspondiente a la vitamina A, substrayendo las cantidades del beta-caroteno usado.

## Cálculo

Microgramos de vitamina A alcohol, por g. de tejido fresco de hígado:

$$\frac{\text{Microgramos de vitamina A en la muestra} - \text{de carotenó.}}{\text{Peso de la muestra en gramos.}} \quad \text{Corrección para contenido}$$

Conversión a base seca:

$$\frac{\text{Microgramos por g. de vitamina A en la muestra "tal como ofrecido" x 100}}{\% \text{ de materia seca de la muestra "tal como ofrecido"}}$$

Nota: Determínese el contenido de materia seca en una estufa a 105° C para convertir los resultados a base seca.

## Bibliografía

- Carr, F. H. and E. A. Price. 1926. Color reaction attributed to vitamin A. *Biochemistry Journal* 20:497.
- Gallup, Willis D. and J. A. Hoefler. 1946. Determination of vitamin A in liver. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition*, 18:288.
- Moore, Thomas. 1957. *Vitamin A*. Elsevier Publishing Company, London, England. D. Van Nostrand Company, Inc., New York, New York, distributors.
- Rosenburg, H. R. 1942. *Chemistry and Physiology of the Vitamins*. Interscience Publishers, Inc., New York, New York.

## DETERMINACION DE CIANURO EN PLANTAS

### Principio

El cianuro se destila de una solución de agua y cloroformo, a una solución de KOH, formado KCN. El KCN se titula con nitrato de plata, efectuándose la siguiente reacción:  $2\text{KCN} + \text{AgNO}_3 = \text{KCN}\cdot\text{AgCN} + \text{KNO}_3$ . Un exceso de  $\text{AgNO}_3$  produce  $\text{AgCN}$  insoluble, el cual es el punto final de la titulación:  $\text{Ag}(\text{CN})_2\text{K} + \text{AgNO}_3 = 2\text{AgCN} + \text{KNO}_3$ .

### Equipo

- (a) Aparato de destilación Kjeldahl, macro.
- (b) Bureta de 5 ml, micro.

### Reactivos

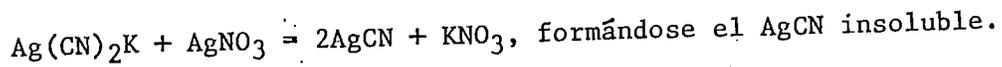
- (a) Solución de KOH al 2%. Disuelva 2 gramos de KOH en 100 ml. de  $\text{H}_2\text{O}$ .
- (b) Cloroformo. Espectroanalizado, certificado Fisher, A.C.S. o equivalente.
- (c) Yoduro de potasio.
- (d) Cloruro de potasio. Recristalizado 3 veces con agua, secarlo a  $105^\circ \text{C}$ ., y luego calentarlo aproximadamente a  $500^\circ \text{C}$ . hasta peso constante.
- (e) Solución de cromato de potasio. Solución al 5% de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  en agua.

(f) Solución de nitrato de plata 0.1 N. Disuelva un poco más de la cantidad teórica de  $\text{AgNO}_3$  (peso equivalente - 169.89) en  $\text{H}_2\text{O}$  libre de halógenos y llévase a volumen. Limpie completamente la cristalería y evite el contacto con el polvo. Guarde la solución preparada en botellas de color ámbar con tapas de cristal para evitar la exposición a la luz. Normalise la solución como sigue: pese exactamente suficiente cantidad de  $\text{KCl}$  para obtener una titulación de aproximadamente 40 ml. (alrededor de 0.3 gramos para la solución 0.1 N) y transfíerala a un Erlenmeyer de 250 ml. con tapa de cristal que contenga 40 ml. de  $\text{H}_2\text{O}$ . Adicione 1 ml. de solución de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  al 5% y titule con la solución de  $\text{AgNO}_3$  hasta que aparezca el primer signo de un color rojo-castaño pálido. Réstele a la titulación los mililitros de la solución de  $\text{AgNO}_3$  necesario para producir el punto final de color en 75 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  conteniendo 1 ml. de la solución de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ . Calcule la normalidad de la solución de  $\text{AgNO}_3$ .

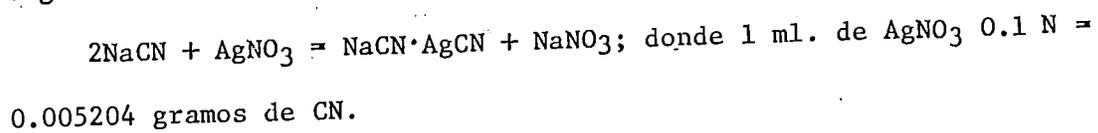
#### Procedimiento

Corte la muestra del forraje en trozos de un cuarto de pulgada de longitud y mézclense bien. Coloque una muestra de 8 gramos en un frasco Kjeldahl de 800 ml. Agregue alrededor de 200 ml. de agua destilada y 5 ml. de cloroformo y destílese con vapor a un tubo de ensayos de 100 ml. que contenga 5 ml. de  $\text{KOH}$  al 2%, teniendo el cuidado de que el terminal del adaptador del condensador, se encuentre debajo de la superficie de la solución de  $\text{KOH}$ . Destile entre 60-70 ml. y transfíerese a un beaker de 600 ml. Adicione suficiente agua para hacer un volumen de 300 ml. y agregue unos cuantos cristales de  $\text{KI}$  y titúlese

a opalescencia desvanecida con la solución de  $\text{AgNO}_3$ . Una gota que se agregue en exceso de la sal de plata, producirá una turbidez permanente, debido la siguiente reacción:



(Al hacer esta titulación es recomendable colocar el beaker sobre una superficie oscura.) De los mililitros de la solución de  $\text{AgNO}_3$  0.1 N usados, calcule el porcentaje de CN. La reacción se representa por la siguiente ecuación:



#### Cálculo

Miligramos de cianuro por kg. en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido" =

$$\frac{52 \text{ ml. } \text{AgNO}_3 \times \text{N } \text{AgNO}_3 \times 1000}{\text{peso de la muestra en g.}}$$

Conversión a base seca:

(a)  $\frac{\text{cianuro (mg. por kg.) en la muestra "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca de la muestra "tal como ofrecido"}}$

o

(b)  $\frac{\text{cianuro (mg. por kg.) en la muestra "parcialmente seco"} \times 100}{\% \text{ de materia seca de la muestra "parcialmente seco"}}$

## Bibliografía

Boyd, F. T. and E. Truog. 1955. Determination of cyanide in grass and plants. Jersey J. August, 1960.

Boyd, F. T., O. S. Aamodt, G. Bohstedt and E. Truog. 1938. Sudan grass management for control of cyanide poisoning. J. Am. Soc. Agronomy 30:569.

Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 1960. 9th Edition. Published by the Association of Official Agricultural Chemists, P.O. Box 540, Benjamin Franklin Station, Washington 4, D. C.

Scott, W. W. 1939. Standard methods of chemical analysis. Volume I, 5th Edition. D. Van Nostrand Company, Inc., New York, New York.

DETERMINACION DEL TAMAÑO DE PARTICULA EN LAS  
MATERIAS PRIMAS Y CONCENTRADOS PARA  
ANIMALES, POR MEDIO DEL CERNIDO

Propósito

La finalidad de este procedimiento es establecer diferentes grados de acuerdo al tamaño de las partículas del alimento. El tamaño de partícula, entonces puede servir para calcular la superficie y el número de partículas por unidad de peso. Estos grados serán usados para determinar la textura de los ingredientes en aquellos casos en que la molienda produce partículas que son de forma esférica o cúbica. No se adapta a la determinación del tamaño de partícula de materiales tales como los granos tratados con vapor o rodillos y que luego se preparan en hojuelas, o el heno picado en que gran parte consiste de partículas elongadas.

Equipo para las pruebas

(a) Se debe usar un juego de tamices de metal con un diámetro de 233 milímetros. Con el equipo corriente de agitación, los tamices que poseen una altura de 25 mm. (1 pulgada) o la mitad de ella, son los más

---

+ Propuesto por un subcomité de la Asociación Americana de Manufactureros de Alimentos de los Estados Unidos de Norteamérica y aprobado por el Comité Técnico de la División de Energía Eléctrica y Procesamiento de la Asociación Americana de Ingenieros Agrícolas (ASAE) y adoptado por la ASAE en diciembre de 1968. Aprobado por las siguientes organizaciones: Sociedad Americana de Agronomía; Sociedad Americana de Ciencia Animal; Sociedad Americana de Ciencias Lecheras y Sociedad Americana de Ciencias Avícolas.

adecuados para evitar tener que cernir nuevamente la fracción más fina. Un juego de tamices tal y como lo especifica la Sociedad Americana para Pruebas de Materiales en su publicación "Standard Specifications for Sieves for Testing Purposes", conocido también como "United States of America Standard Z23.1, deberá consistir de los siguientes tamaños:

Tamiz standard USA N°	Abertura normal del tamiz, mm.
3.5	5.66
5	4.00
7	2.83
10	2.00
14	1.41
18	1.00
25	.707
35	.500
45	.354
60	.250
80	.177
120	.125
170	.088
230	.063

Los tamaños anteriores para los tamices, han sido propuestos como tamaños convencionales Internacionales. Las aberturas de los tamices se han descrito como una guía únicamente, de tal manera que se podrán utilizar otros tamices similares. Los cálculos empleados, se basan en el diámetro del tamiz y por lo tanto los resultados que se obtienen serán correctos, indiscriminadamente de los tamices que se usen.

(b) Un agitador de tamices que sea adecuado, tal como el Ro-tap<sup>+</sup>.

(c) Una balanza que lea a  $\pm 0.1$  de gramo.

(d) Se necesitan anillos plásticos o de cuero, o bolas de goma para romper los grumos en los tamices finos, generalmente de menor tamaño que los U.S. N° 50.

<sup>+</sup> Nombre comercial de W. S. Tyler Co., Mentor, Ohio.

(e) Agente dispersante<sup>+</sup> debe tenerse al alcance para facilitar el tamizado de materiales con alto contenido de grasa o similares.

(f) Las aberturas del tamiz deben mantenerse libres de partículas de alimento, de tal manera que se pueda llevar a cabo un cernido normal. La limpieza de los tamices se puede hacer con un cepillo de cerdas duro o con presión de aire. Los tamices deben limpiarse periódicamente para quitarles la grasa que se va acumulando procedente de los alimentos; ésta se puede eliminar con el lavado con agua y detergente. Los tamices deben estar bien secos antes de usarse.

#### Procedimiento

(a) Se debe usar una muestra de 100 g. aunque puede ser menor siempre y cuando se tome la precaución de recoger todo el material que caiga en los tamices.

(b) Ponga la muestra en el tamiz superior del juego de tamices y agítense hasta tanto el peso del tamiz más pequeño sea constante. Esta constante se observa mediante la inspección y pesado del tamiz a intervalos de 5 minutos, después de que hayan transcurrido 10 minutos inicialmente. Si el peso del tamiz más pequeño que contiene material, varía en la proporción de 0.2% o menos en base al peso total de la muestra en uno de los intervalos de 5 minutos, el cernido se puede considerar completo.

(c) El material que permanece en cada tamiz deberá ser pesado y este peso registrado.

---

<sup>+</sup> Los agentes dispersantes comprenden el Cab-O-Sil MS que se obtiene de Cabot Corp., Boston; Zoilex 23A y Zeofree 80 que se obtienen de J. M. Huber Corp., New York; Flo-Gard de la casa Pittsburg Plate Glass Co., St. Louis, Mo.

(d) Si se necesita usar un agente dispersante, debe de agregarse al nivel del 0.5% y su efecto sobre el tamaño de las partículas no debe registrarse.

(e) Si el tamiz más pequeño lo atraviesa una cantidad, superior al 20% del peso total del material que se evalúa, este material fino deberá someterse a un análisis de tamaño de partícula distinto al cernido, tal como por medición microscópica o la prueba por sedimentación, cuyos resultados se deben de reportar por separado.

#### Análisis de los datos

(a) El análisis de los datos obtenidos de la distribución por peso en base al tamaño del material original cernido, se origina en la presunción de que la distribución es logarítmica.

(b) Cálculo del tamaño de partícula. El tamaño de las partículas debe consignarse en términos del diámetro geométrico medio y desviación geométrica standard en base al peso obtenido.

(c) Los valores calculados se obtienen de la siguiente manera:

$$d_{gw} = \log^{-1} \left[ \frac{(W_i \log \bar{d}_i)}{\Sigma W_i} \right]$$

$$S_{gw} = \log^{-1} \left[ \frac{\Sigma W_i (\log \bar{d}_i - \log d_{gw})^2}{\Sigma W_i} \right] \quad 1/2$$

donde:

$d_i$  = diámetro de las aberturas del tamiz, i.

$d_{i+1}$  = diámetro de las aberturas del tamiz que sigue al i en mayor tamaño (el tamiz que le sigue hacia arriba en el juego de tamices).

$d_{gw}$  = diámetro geométrico medio.

$\bar{d}_i$  = diámetro geométrico medio de las partículas en el tamiz  $i$   $(d_i \times d_{i+1})^{1/2}$

$S_{gw}$  = desviación geométrica estandard

$W_i$  = peso de fracciones en el tamiz  $i$ .

(d) El material que atraviesa un tamiz U.S. N° 230 se considera que posee un diámetro medio de 44 micras.

(e) Se pueden obtener gráficos para el diámetro geométrico medio y para la desviación geométrica standard, traspolando los resultados en papel logarítmico. La lámina 1 muestra un ejemplo del siguiente cálculo:

$d_{gw} = d_{50}$  = diámetro de partícula al 50% de probabilidades

$$S_{gw} = \frac{d_{84}}{d_{16}} = \frac{d_{50}}{d_{16}} =$$

tamaño de partícula al 84% de probabilidades /  $d_{gw} = d_{gw} /$

diámetro de partícula al 16% de probabilidades,

o  $d_{gw} = 350$  micras

y  $S_{gw} = \frac{640}{350} = \frac{350}{191} = 1.83$

#### Bibliografía

- Agricultural Engineers Yearbook. 1969. Method of determining and expressing fineness of free materials by sieving.
- Testing sieves and their uses. Handbook 53, 1967. W. S. Tyler Co. Mentor, Ohio, 44060.

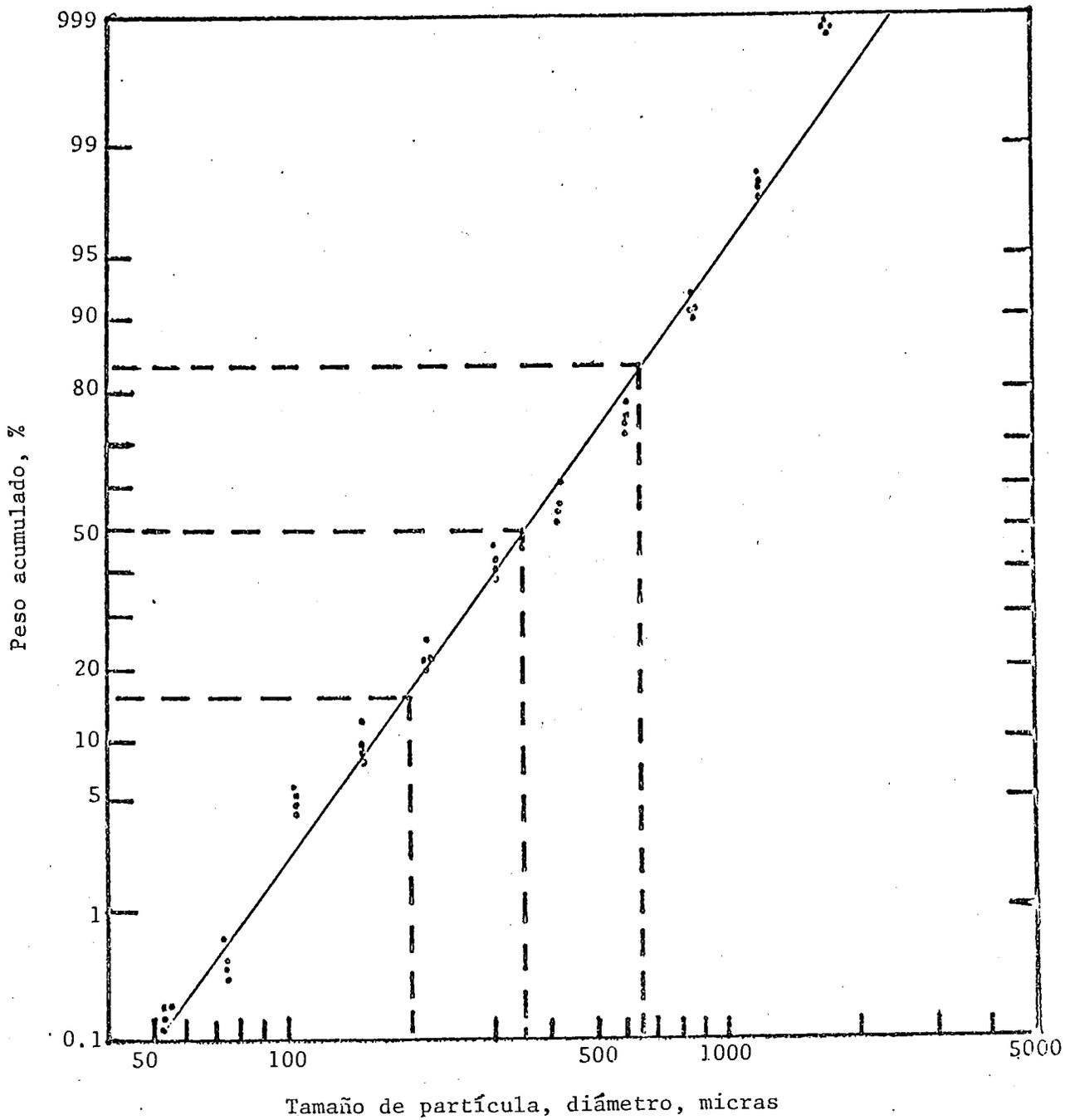


Lámina 1. Distribución logarítmico normal para el grano de sorgo molido a través de un tamiz de 32 mm.

## DETERMINACION DE NITRATOS Y NITRITOS EN FORRAJES

Cuando los animales ingieren cantidades excesivas de nitratos o de nitritos, les pueden causar daños serios. Los nitritos son mucho más tóxicos y existe el agravante de que los nitratos se reducen a nitritos por la acción de bacterias en el tracto digestivo.

Los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) se encuentran con poca frecuencia en altas concentraciones en las plantas, excepto bajo ciertas condiciones especiales como en los casos de infecciones que ocasionen enfermedad en la planta. Por lo tanto, los resultados analíticos generalmente se consiguen en términos del contenido de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ); valor que también incluye los nitritos. Sin embargo con el método que seguidamente se describe, se pueden determinar únicamente los nitritos si así se desea, en casos de existir sospechas específicas de un excesivo contenido en el material vegetal.

### Principio

El nitrato es reducido a nitrito por la acción del sulfato de zinc y de manganeso (II). La reacción consiste de la diazotización del ácido sulfanílico por el ion nitrito y subsecuente acoplamiento con la 1-naftilamina para formar un colorante rojo. La reacción se lleva a cabo en forma óptima en un ámbito de pH de 1.7 a 3.0. Los iones que interfieren se fijan con citrato. El uso de 0.2 a 1.0 ppm de cobre favorecen la reacción, pero las cantidades mayores interfieren con ella.

## Equipo

- (a) Espectrofotómetro (Spectronic "20") ó aparato equivalente.
- (b) Centrífuga

## Reactivos

(a) Solución normal de nitratos. Disuelva 1.37 gramos de nitrato de sodio en 1 litro de agua para preparar una solución madre de 0.1% de nitratos (1000 microgramos por ml.).

(b) Solución de ácido acético al 20%. A 200 ml. de ácido acético agréguele 5.0 ml. de una solución de  $\text{CuSO}_4$  (0.1572 g. de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  por litro) y dilúyase a 1000 ml.

(c) Mezcla de polvo (indicador de Bray). Se prepara empleando los compuestos y cantidades siguientes: sulfato de bario, 100 g. (secado a 105° C); sulfato monohidratado de manganeso (II), 10 g; polvo de zinc finamente pulverizado, 2 g.; ácido cítrico pulverizado, 75 g.; ácido sulfanílico, 4 g. y naftilamina-1, 2 g. Se debe pulverizar cualquier material grueso hasta obtener un polvo fino y luego se procede a mezclar por separado el sulfato de manganeso (II), el polvo de zinc, el ácido sulfanílico y la 1-naftilamina con porciones pequeñas de sulfato de bario. Luego combine todas las premezclas y agregue el resto del sulfato de bario y el ácido cítrico, haciendo una mezcla homogénea. Almacene el polvo en una botella ennegrecida pues la luz afecta la 1-naftilamina. El reactivo es estable por muchos meses si se almacena en una botella pintada en su exterior con pintura negra. Si se desea conducir la determinación de nitritos habiendo presencia de nitratos, se omite la incorporación del polvo de zinc y de sulfato de manganeso (II) en la mezcla anterior.

Se debe tener cuidado extremo de que tanto el cuarto de trabajo como la mesa y el equipo empleado, estén libres de contaminación con nitratos y nitritos.

(d) Acido hidrociorhídrico al 0.1 N. Agregue 8.18 ml. de HCl del 37 - 38% por 1.0 litro de agua. No es necesario efectuar una normalización exacta.

(e) Carbón activado. Polvo de carbón activado N.F. Merck #18351.

#### Muestreo del material

El contenido de nitratos presentes en las plantas o los alimentos que se encuentran en diferentes partes de un plantío, estiba o silo, con frecuencia tiene variaciones extremas. Por ejemplo, la concentración de nitratos de las plantas en pie, varía según la especie, estado de crecimiento, parte de la planta, localización en el campo, la hora del día, y aún el día según sea afectado por variaciones en las condiciones climáticas. El contenido de nitratos en forrajes estibados o ensilados, varía debido a los factores citados y también por diferencias en la forma de manipular en el campo el heno o el material para ensilar. Esto incluye las pérdidas de nitratos ocasionadas por el lavado de las lluvias y por el movimiento de nitratos durante la fermentación en el silo.

Por lo tanto, cuando se tomen muestras, es aconsejable obtener varias de un mismo plantío, estiba o silo y analizar cada una separadamente. Cuando se trate de plantas en crecimiento, es aconsejable tomar muestras y analizarlas cada cierto tiempo.

Los nitratos pueden desaparecer del material vegetal fresco en el transcurso de tiempo entre la recolección de la muestra y su análisis, cuando ésta no se manipula adecuadamente. Estas pérdidas pueden ser oca-

sionadas por la reducción microbiológica o enzimática de los nitratos en la muestra húmeda, o por la volatilización de los gases de nitrógeno durante el secamiento. Por lo tanto, las plantas frescas o las muestras de alimentos se deben congelar tan pronto sean recolectadas y se deben mantener bajo esas condiciones hasta que se vayan a analizar; o de otra manera, las plantas frescas, (no ensilajes) deben secarse inmediatamente a 60° C en una estufa que posea ventilación adecuada.

#### Procedimiento

(a) Pese por diferencia aproximadamente 1 gramo del material vegetal seco, o 3.0 a 5.0 gramos si se trata de una muestra húmeda. La muestra debe contener de 1 a 8 miligramos de nitratos para que caiga dentro del ámbito de la curva normal. Coloque la muestra en un frasco Erlenmeyer de 125 ml. de capacidad y póngale un tapón.

(b) Agregue 100 ml. de HCl 0.1 N; vuelva a tapar el frasco y agite el contenido hasta que la muestra esté completamente humedecida. Deje el frasco en reposo por una hora, agitándolo ocasionalmente para que se efectúe la extracción de los nitratos. Si el extracto adquiere un color intenso, hay que decolorarlo con el agregado de 1 g. aproximadamente de carbón activado, y agitándolo bien. Filtre el extracto en papel de filtro.

(c) Con pipeta, transfiera 1 ml. del extracto y 9 ml. de la solución de ácido acético al 20%, a un tubo de centrífuga provisto de tapón. Agregue 0.5 g. aproximadamente del polvo indicador de Bray con la ayuda de una cucharita de medir. Tápese y agítese cada tubo por espacio de 1 minuto. Mantenga esta solución alejada de la luz intensa.

(d) Coloque los tubos en el portatubos de la centrífuga y opérese por 5 minutos a 3,000 rpm o hasta que el líquido sobrenadante se aclare.

Elimine cualquier nata que se forme y luego vierta la solución roja, limpia, en una cubeta del espectrofotómetro.

(e) Lea la densidad óptica a 520 milimicrones, ajustando previamente el aparato a 100% de transmitancia con un blanco que haya sido sometido al mismo tratamiento que las muestras.

(f) Compare las lecturas con la curva normal para nitratos que oscila de 0 a 10 microgramos de nitrato por ml. de solución.

Nota: Prepare la curva normal diluyendo alícuotas de 0, 1, 2, 5 y 10 ml. de la solución normal de nitratos, en un frasco volumétrico de 100 ml. llevado a volúmen con agua. Coloque 1 ml. de la solución diluida en los tubos de centrífuga y continúe el procedimiento del paso (c) en adelante. Las soluciones en las cubetas tendrán un contenido de 0, 1, 2, 5 y 10 microgramos de nitratos por ml. respectivamente. La solución remanente de los 100 ml. originales en el frasco volumétrico, puede trasladarse a botellas de polietileno, almacenarse por algunos meses y vuelta a analizar si fuere necesario.

(g) Cuando se van a determinar nitritos habiendo también presencia de nitratos, se sigue el mismo procedimiento excepto que se debe usar la mezcla del polvo que no contenga el sulfato de zinc o el de manganeso (II).

## Cálculos

(a) Para determinar el contenido de nitratos y nitritos se usa la mezcla del polvo conteniendo sulfato de zinc y de manganeso, y de esta manera todos los nitratos son reducidos a nitritos. Cuando se usa la curva normal tal y como se describe en el punto (f), el resultado que se obtiene comprende el contenido total de nitratos y nitritos, pero expresado en término de nitratos.

Porcentaje de nitratos en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$\frac{\text{concentración de nitratos en la solución final, mcg./ml.} \times 1000 \times 100}{\text{peso de la muestra en g.} \times 1.000.000} = \frac{\text{NO}_3 \text{ mcg./ml. calculados de la curva normal}}{\text{g. de la muestra} \times 10}$$

(b) Para determinar únicamente los nitritos en presencia de nitratos, se omite el sulfato de zinc y de manganeso de la mezcla del polvo Bray.

Porcentaje de nitritos en base "parcialmente seco" o "tal como ofrecido":

$$\frac{\text{concentración de nitrógeno en la solución final en microgramos/ml.} \times 1000 \times 100}{\text{peso de la muestra en g.} \times 1.000.000} = \frac{\text{NO}_2 \text{ en mcg./ml. de la curva}}{\text{g. de muestra} \times 10}$$

La determinación de nitritos se realiza únicamente para obtener una información más completa cuando se sospecha intoxicación por ellos. Para efectos de consignación en el formato de análisis, los nitritos van incluidos en la determinación de nitratos y por lo tanto no es necesario reportarlos por aparte.

(c) Ajuste del contenido de nitratos a base seca (nitratos y nitritos):

$$\frac{\% \text{ de nitratos en muestra "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en muestra "tal como ofrecido"}}$$

o

$$\frac{\% \text{ de nitratos en muestra "parcialmente seco"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en muestra "parcialmente seco"}}$$

Nota: consigne el porcentaje de nitratos (nitratos y nitritos) en el formato en la sección correspondiente a "otros análisis".

#### Bibliografía

- Easley, J. F., J. T. McCall, G. K. Davis and R. L. Shirley. 1965. Analytical methods for feeds and tissues. Nutrition Laboratory, Department of Animal Science, University of Florida.
- Hanway, J. J., J. B. Herrick., T. L. Willrich., P. C. Bennett and J. T. McCall. 1963. The nitrate problem. Special Report No. 34. Iowa State University, Ames.
- Nelson, J. L., L. T. Kurtz and R. H. Bray. 1954. Rapid determination of nitrates and nitrites. Analytical Chemistry 26:1081
- Rider, B. F. and M. G. Mellon. 1946. Colorimetric determination of nitrites. J. of Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition 18:96.
- Woolley, J. T., G. P. Hicks and R. H. Hageman. 1960. Rapid determination of nitrate and nitrite in plant material. J. of Agricultural and Food Chemistry 8:481.



## DIGESTION DE MATERIA SECA Y MATERIA ORGANICA IN VITRO

### Principio

Este procedimiento es tomado de la técnica de dos etapas de "Tilley y Terry" e involucra primeramente un período de incubación de 48 horas con microorganismos del rumen en un medio buffer y en segundo término, la digestión con una mezcla de ácido clorhídrico - pepsina. Las cantidades de materia seca o materia orgánica que desaparecen después de ambas etapas, se consideran como "digeridas".

### Materiales y equipo

(a) Tubos de centrífuga de 100 ml., plásticos (Nalgene) o de vidrio sin boquilla. Si se realiza la centrifugación [véanse los procedimientos alternos (p) y (q) siguientes], los tubos deben ajustar en los portatubos de la centrífuga.

(b) Tapones de caucho para los tubos de centrífuga (a), que tengan válvulas Bunsen para la liberación del gas (policía de goma con hendidura longitudinal de aproximadamente 6 mm. de largo).

(c) Soportes para los tubos de ensayo.

(d) Crisoles con filtro de vidrio poroso de 50 ml. de capacidad, de porosidad gruesa y forma baja (Corning #32940-50C, 40-60 micras).

(e) Dispositivo de filtración al vacío para los crisoles (d). Soportes para los crisoles (Fisher 8-238B o equivalente), adaptador de goma (Fisher 8-239B o equivalente), y fuente de vacío (bomba o aspirador).

(f) Frasco de fondo redondo de 5 litros de capacidad con cuello corto, grueso, de pyrex (Corning 4260).

(g) Bureta de 500 ml. de capacidad.

(h) Baño María con cabida para el frasco de 5 litros (f).

(i) Incubadora o baño María que de cabida a los tubos de centrífuga con sus respectivos tapones provistos de las válvulas Bunsen (a) y (b).

(j) Medidor de pH con un electrodo de combinación que pueda usarse en los tubos de centrífuga.

(k) Equipo permanente adicional: balanza analítica, estufa para secado, horno incinerador, tanque con CO<sub>2</sub> y válvulas de reducción (también una centrífuga si se van a emplear las alternativas anotadas en los pasos (p) y (q) siguientes.

(l) Materiales de uso constante: beakers, termómetros, desecadores, cilindros graduados, gasa, lana de vidrio, pinzas, crisoles de porcelana, guantes de asbestos, pipetas, etc.

#### Preparación del Forraje

Los forrajes deben estar en base "secado al aire" (88 - 92% contenido de materia seca) y luego molidos con tamiz de 1 mm. (molino Wiley). Una muestra representativa de cada forraje se debe guardar en recipientes que no dejen entrar el aire y que permitan tomar las muestras con facilidad (frascos de vidrio o plásticos).

#### Reactivos

(a) Saliva artificial de McDougal (se necesitan 40 ml. por tubo). Debido a que el fosfato de calcio insoluble se precipita en presencia del pH tan alto que proporciona la solución buffer, la saliva se debe preparar en

en dos porciones separadas si se pretende almacenar por más de dos horas.

1. Solución Buffer. (Cantidades por litro, p/v):

9.80 g.  $\text{NaHCO}_3$ .

7.00 g.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (3.71 g. anhidro)

0.57 g.  $\text{KCl}$ .

0.47 g.  $\text{NaCl}$

0.12 g.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2. Solución de cloruro de calcio al 4% (p/v):

4.0 g.  $\text{CaCl}_2$  (5.3 g.  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) en 100 ml. de agua destilada.

Poco antes de usar la saliva artificial, agregue 1 ml. de la solución de cloruro de calcio al 4%, por cada litro de la solución buffer con el objeto de tener 0.04 g. de  $\text{CaCl}_2$  por litro de saliva artificial.

(b) Solución de  $\text{HCl}$  al 20% (v/v). Diluya 200 ml. de  $\text{HCl}$  concentrado en un litro de agua destilada. La solución será aproximadamente 2.4 N  $\text{HCl}$  y se ocuparán 6 ml. por tubo.

(c) Solución de pepsina al 5% (p/v). Agréguese 5 g. de pepsina a 100 ml. de agua destilada (se ocuparán 2 ml. por tubo).

(d) Líquido del rúmen filtrado (se ocupan 10 ml. por tubo). Existirá una gran variación entre laboratorios en cuanto a la fuente del líquido ruminal y la manera de obtenerlo. Se pueden usar bovinos, ovejas y cabras, siendo por lo general más conveniente el empleo de un animal con una fístula permanente en el rúmen. El tipo de la dieta también afectará los resultados y por lo tanto es importante que los animales donantes reciban una dieta que esté compuesta principalmente de forraje, heno preferiblemente, y que sea parecido a los forrajes que han de ser sometidos a la digestión in vitro. Cuando la dieta se compone de heno, es conveniente suministrar una fuente suplementaria de proteína, minerales y

vitaminas. Por ejemplo, para un novillo se suplirá lo siguiente: 900 g. de harina de soya, 75 g. de sal con minerales trazas, 50 g. de fosfato dicálcico, 20,000 UI de vitamina A por 500 kg. de peso vivo. Bajo ninguna circunstancia se deben suministrar alimentos concentrados cuando el material que se va a someter a prueba es un forraje. Sólomente se permite la fuente de proteína y cualquiera que sea la dieta que se escoja, se debe mantener lo más uniforme posible.

Existen muchas variaciones en los métodos empleados para la obtención y preparación del líquido del rumen. Para mayor uniformidad, se recomienda seguir el siguiente procedimiento:

1. El animal donante no debe tener acceso al alimento o al agua por espacio de una hora antes de la recolección del líquido del rumen y se debe tratar de recolectarlo a la misma hora cada día.
2. El líquido en el rumen no se debe recoger del fondo pues hay muchas partículas pequeñas de alimento que se vienen con la muestra e interfieren con los resultados.
3. Filtre el líquido del rumen a través de lana de vidrio (pónganse cuatro capas de gasa en un embudo y cúbranse éstas con una capa doble de lana de vidrio).
4. Si el líquido del rumen ha de transportarse de cierta distancia al laboratorio, se debe tener el cuidado de mantener una condición anaeróbica. Ello se obtiene llenando una botella completamente del líquido y tapándola bien para que no penetre el aire. El uso de un frasco cubierto con un material aislante para mantener el líquido caliente, puede ser necesario en algunos casos.

## Procedimiento

(a) Determine el contenido de materia seca y materia orgánica de la muestra de la siguiente manera: ponga una muestra de aproximadamente 0.5 g. en un crisol de porcelana (en duplicado) y anote el peso hasta el tercer decimal como mínimo. Séquela por una noche a temperatura de 105° C y luego se enfría y se pesa. La muestra se incinera en un horno a 500° C, se deja enfriar y se pesa nuevamente. Seguidamente calcule el porcentaje de materia seca y el porcentaje de materia orgánica en la muestra (en base a materia seca total o libre de humedad).

(b) Pese las muestras para la digestión in vitro. Coloque aproximadamente 0.5 g. de la muestra en un tubo de centrífuga numerado (en duplicado) y anote el peso hasta el tercer decimal. (Nota: las pesadas deben terminarse por lo menos el día anterior al inicio de la digestión).

(c) Separe cuatro tubos vacíos que servirán para los blancos.

(d) Haga funcionar el baño María o la incubadora (39° C).

(e) Ponga una cantidad adecuada de solución buffer en un frasco de 5 litros de capacidad con fondo redondo (calculando unos 40 ml. por tubo, más unos 200 ml. adicionales pero que la cantidad total no exceda a los 4 litros). Agregue 1 ml. de la solución de  $\text{CaCl}_2$  al 4% por cada litro y ponga el frasco en el baño María a 39° C, haciendo burbujear el  $\text{CO}_2$  en forma lenta a través de la solución.

(f) Agregue 2 ml. de agua destilada a todos los tubos de centrífuga, mojando con ella la muestra del forraje.

(g) Mida el pH de la saliva artificial que debe oscilar entre 6.9 y 7.0 ya que el  $\text{CO}_2$  burbujear a través de la solución reduce el pH. Cuando la solución se satura con  $\text{CO}_2$  y el sistema buffer del bicarbonato

se establece, el pH debe encontrarse entre 6.9 y 7.0. Se toman unos 30 minutos para ajustar 4 litros de saliva artificial a un pH de 6.9 a 7.0 a temperatura de 39° C. (Nota: 4 litros de la solución buffer son suficientes para correr 96 tubos o sea 46 muestras en duplicado más 4 blancos y aún sobra algo). Si en una corrida de muestras se va a usar más de esta cantidad, utilice un frasco más grande o prepare dos en lugar de uno. Si se preparan dos frascos, corra cuatro muestras en blanco para cada uno y mantenga los tubos separados.

(h) Prepare el líquido del rumen filtrado agregando una (1) parte del líquido por cuatro (4) partes de la saliva artificial en el frasco con fondo redondo.

(i) Permita que el medio (líquido del rumen más la saliva) se mezcle durante 10 minutos por la acción del CO<sub>2</sub> burbujeante.

(j) Deje pasar un flujo de CO<sub>2</sub> a través de una bureta y luego llénela con el medio. (El CO<sub>2</sub> que sale del frasco de fondo redondo puede dirigirse hacia la bureta y el medio se transfiere en condiciones anaeróbicas hacia la bureta con tubo de tygon. Se puede establecer la corriente hacia la bureta, cerrando momentáneamente el tubo del CO<sub>2</sub> que sale del frasco, aumentando de esta manera la presión interna).

(k) Agréguese 50 ml. del medio a cada tubo de centrífuga, incluyendo los blancos. (Agregue el medio a los tubos al azar y distribuya los blancos también al azar entre todos los tubos).

(l) Inmediatamente después de agregado el medio, elimine el aire remanente en los tubos haciendo pasar CO<sub>2</sub> por cada tubo por espacio de 15 segundos (no haga burbujear el CO<sub>2</sub> en los tubos conteniendo el medio). Rápidamente tape los tubos con la válvula bunsen.

(m) Coloque los tubos en la incubadora o baño María a 39° C.

(n) Mézclese el contenido de los tubos con un movimiento suave de rotación para asegurarse de que todas las partículas del forraje estén remojadas con el medio, repitiendo ésto dos veces el primer día y tres el segundo día.

(o) Después de 48 horas de incubación, rôtense los tubos a manera de agitar su contenido y elimínense los tapones; lave las partículas de forraje que se hayan adherido a los tapones, para que caigan hacia el interior de los tubos, usando una mínima cantidad de agua destilada. (Determine el pH de unos pocos tubos tomados al azar; éste debe estar bajo 7.0).

(p) Agregue 1 ml. de la solución de HCl al 20% y pasados unos pocos minutos rote el tubo. Agregue otro ml. de la misma solución, rôtense otra vez y finalmente agregue 4 ml. de HCl 20% y rôtense. (Total de HCl 20% = 6 ml/tubo).

(q) Agregue 2 ml. de la solución de pepsina al 5% por tubo, rôtense adecuadamente y póngalos en el baño María o incubadora a 39° C. Repita la rotación dos veces el primer día y tres veces el segundo día. [Nota: alternativa para los pasos (p) y (q): centrifugue los tubos por 15 minutos a una fuerza centrífuga relativa de 1000, equivalente a 2000 rpm en una centrífuga eléctrica Internacional, tamaño 2. Decante la porción superior y agregue 50 ml. de una solución de pepsina al 0.2% en 0.1 N HCl].

(r) Lávense, séquense (2 horas) y pésense los crisoles con filtro de vidrio poroso. (Esta preparación se debe hacer el día anterior al señalado para la digestión).

(s) Después de 46 horas de digestión con pepsina, transfiera el contenido de los tubos de centrífuga a los crisoles con filtro de vidrio,

secos y tarados.. Vierta el residuo que les queda a los tubos lavándolos con agua destilada (si se tiene a mano un dispositivo para vertir agua caliente, se puede usar).

(t) Ponga los crisoles en una estufa de secado a 105° C y séquelos a peso constante (durante la noche); enfríense en un desecador y péselos.

(u) Ponga los crisoles en un horno incinerador a 500° C por 3 horas déjelos enfriar en un desecador y péselos.

(v) Anote los siguientes valores:

peso de la muestra secada al aire puesta en el tubo (A)

porcentaje de materia seca en la muestra (B)

porcentaje de materia orgánica en la muestra (base M.S) (C)

peso tarado del crisol vacío (D)

peso seco del crisol con el residuo (E)

peso incinerado del crisol con el residuo (F)

#### Cálculos

Materia seca inicial,  $g = \frac{A \cdot B}{100}$  (G)

Materia seca residual en muestra,  $g = E - D$  (H)

Materia seca residual en blanco,  $g = E - D$  (promedio de 4 tubos) (I)

Digestión de materia seca in vitro,  $\% = \frac{G - (H-I)}{G} \times 100$

Materia orgánica inicial,  $g = \frac{G \cdot C}{100}$  (J)

Materia orgánica residual en muestra,  $g = E - F$  (K)

Materia orgánica residual en blanco,  $g = E - F$  (promedio de 4 tubos) (L)

Digestión de materia orgánica in vitro,  $\% = \frac{J - (K-L)}{J} \times 100$

SECUENCIA SUGERIDA PARA CONducIR UNA PRUEBA DE DIGESTIBILIDAD  
IN VITRO

- miércoles: p.m. empieze a pesar las muestras y colocarlas en los tubos.
- jueves: - - complete la pesada de las muestras iniciada el día anterior.
- lunes: a.m. inocule el medio.
- miércoles: a.m. acidifique y agregue la pepsina.
- miércoles: p.m. lave los crisoles y póngalos en la estufa a secar.
- jueves: - - transfiera los crisoles al desecador, déjelos enfriar y péselos.
- viernes: a.m. transfiera los residuos a crisoles tarados y póngalos en una estufa de secado.
- lunes: a.m. transfiera los crisoles de la estufa al desecador.
- lunes: p.m. pese los crisoles secos.
- martes: a.m. ponga los crisoles en el horno de incineración por 3 horas y luego transfíeralos del horno al desecador.
- martes: p.m. pese los crisoles incinerados y calcule los datos.

(El secado, incinerado y pesado para la determinación de la materia seca y materia orgánica inicial, pueden realizarse en el momento oportuno).

Bibliografía

- Tilley, J. M. A. and Terry, R.A: 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. J. British Grassl. Soc. 18: 104-111.
- Barnes, R. F. 1969. Collaborative research with the two-stage in vitro technique. Proc. National Conference on Forage Evaluation and Utilization, Lincoln, Nebraska.
- Alexander, R. H. 1969. The establishment of a laboratory procedure for the in vitro determination of digestibility. Research Bulletin No. 42, The West of Scotland Agricultural College, Auchincruive, Ayr.
- McLeod, M. N. Minson, D. J. 1969. Sources of variation in the in vitro digestibility of tropical grasses. J. Br. Grassld. Soc. 24: 244-249.

Moore, J. E. 1970. Procedure for the two-stage in vitro digestion of forages. University of Florida, Department of Animal Science. Unpublished.

## DETERMINACION DEL CONSUMO VOLUNTARIO Y COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDAD DE LOS FORRAJES CURADOS

### Principio

El forraje que se va a estudiar se le suministra a los animales por un tiempo suficientemente prolongado para acostumbrarlos a él. Cuando llegan al punto en que el consumo de forraje es casi igual todos los días, se empieza a anotar el consumo. Durante los últimos siete días de la prueba, las heces se recogen para determinar los coeficientes de digestibilidad. Entre mayor sea el consumo de forraje y mayor sea su contenido de materia seca digestible, mejor será la calidad del forraje.

### Generalidades

(a) Se debe picar como mínimo una reserva de 12 a 16 días del forraje seco al sol o por medios artificiales, (heno) en una cosechadora de forrajes y almacenarla en una tolva. El forraje no se debe picar durante el período de recolección, de manera que si no es posible acumular una cantidad adecuada para ambos períodos (preliminar y de recolección), entonces se debe conservar el forraje picado para el período de recolección.

(b) Las ovejas se alimentan en corrales o establos individuales que midan aproximadamente 0.6 m. x 1.2 m. con piso enrejillado preferiblemente. El agua se suministra continuamente por medio de un sistema automático o se ofrece dos veces por día en baldes. Se le ha de suministrar a

cada animal un suplemento mineral tal como el fosfato dicálcico o hueso molido y sal de minerales trazas, en cajones aparte accesibles a cada uno.

(c) Las heces se recogen en bolsas de lona y se sujetan al animal por medio de un arnés. La orina no se recoge.

(d) Se usa un diseño experimental de bloques al azar y las ovejas se asignan a cada bloque de acuerdo al peso y se distribuyen al azar a los tratamientos dentro de cada bloque. Las ovejas se distribuyen al azar en los corrales y por lo menos seis ovejas se someten a cada tratamiento. Sin embargo, como alternativa, se pueden utilizar sólo cuatro ovejas las que deben recibir cada forraje en dos períodos consecutivos, posteriormente reasignándolas al azar a los tratamientos al inicio del segundo período.

(e) Una semana antes de iniciar el experimento, las ovejas se encierran en un establo, o preferiblemente en un corral con piso enrejillado, y a todas se les ofrece el mismo heno más sal y fosfato dicálcico. Las ovejas se desparasitan el primer día de este período de encierro.

#### Medición del consumo y recolección de heces

(a) El primer día del experimento se pesan las ovejas y se colocan en establos individuales de metabolismo. Se les adaptan las bolsas recolectoras de heces y simultáneamente se les ofrece la ración que se va a estudiar, de acuerdo al diseño previo del experimento y distribución de los animales.

(b) La medida del consumo voluntario se obtiene ofreciendo al animal un 15% adicional de lo que normalmente consume diariamente, (cada día se efectúan los ajustes). Los rechazos nunca se deben ofrecer nuevamente. Este

procedimiento se debe seguir a través del experimento.

(c) Los 14 primeros días del experimento se consideran como el período preliminar, durante el cual se efectúa el ajuste del consumo voluntario del forraje, tal y como se describe en el punto anterior.

(d) El período de medición de consumo de alimento se considera del día 15 hasta el día 21 de iniciada la prueba (7 días), y diariamente dentro de este período se toma una muestra de forraje que represente un porcentaje constante del total ofrecido a las ovejas. Este porcentaje se fija en forma tal, que al final de los 7 días (período de medición de consumo), la cantidad total de muestra compuesta del forraje curado sea de 4 a 5 kg. Se recoge y almacena la muestra ya sea en un recipiente grande de metal con tapadera que excluya el aire, en una botella de plástico o en una bolsa de plástico gruesa.

(e) La cantidad total de forraje rechazado por cada oveja se recolecta, y se guarda diariamente durante el período de medición de consumo. Los pesebres se deben limpiar cuidadosamente antes de colocar el alimento el día 15 o sea, al inicio del período de medición. Los rechazos recogidos durante los días 16 al 22 se deben guardar ya que corresponden a la porción de forraje ofrecido del día 15 al 21 (7 días). Cada día, después de pesar los rechazos, se deben depositar en una bolsa de papel que se mantendrá individualmente para cada oveja con el objeto de obtener una muestra compuesta al final de los siete días. El rechazo diario asimismo sirve para establecer la cantidad de forraje que se va a suministrar seguidamente.

(f) Las bolsas colectoras de heces se descargan diariamente durante el experimento. Ello se debe hacer inmediatamente después de pesar el rechazo de alimento y antes de ofrecer alimento fresco.



Tan pronto como sea posible, esta muestra se debe moler nuevamente en un molino Wiley provisto con una zaranda de 4 mm. Se colocan unos 800 g. de la muestra molida en un frasco de 1 galón de capacidad, se sella y se almacena en un congelador por largo tiempo si fuera necesario. Otra parte de la muestra, (aproximadamente 200 g.) se muele en una zaranda de 1 mm. y se almacena en un recipiente sellado. Un frasco de vidrio o de plástico de 250 ml. de capacidad será adecuado.

(b) El rechazo total de cada oveja que ha sido colectado durante los siete días, se pesa e inmediatamente se muele en un molino de martillos pequeño y se toman unos 300 g. que se colocan en una bolsa plástica sellada para evitar que se humedezca. Esta muestra se muele en un molino Wiley igual que en el caso anterior, a través de zarandas de 4 y 1 mm. respectivamente y se almacena en un recipiente sellado.

(c) Las muestras de heces tomadas individualmente de cada oveja durante los siete días de recolección que deben representar un 20% del total evacuado, se deben secar bajo aire caliente circulante a 60° C. Después de secarlas, se deben dejar al aire para que se equilibren con la humedad del ambiente por lo menos durante 48 horas. Luego se pesa la muestra completa y se muele a través de una zaranda de 4 mm. en el molino Wiley. Una sub-muestra (300 g. aproximadamente) se toma inmediatamente y se muele a través de una zaranda de 1 mm. en el molino Wiley y se almacena en un recipiente sellado. Si la digestibilidad del nitrógeno se ha de determinar, las heces frescas deben de analizarse tal y como se describe en la metodología correspondiente a la "Prueba de digestibilidad y balance nutricional en ovinos" (página 5301).

(d) Las determinaciones de materia seca en el forraje se deben realizar cuanto antes. Las muestras de rechazos de comida y de heces se deben moler en una zaranda de 1 mm. Se deben realizar análisis separados

para los rechazos y las heces.

### Cálculo

(a) El consumo voluntario de materia seca y el coeficiente de digestión aparente de la materia seca se calculan para cada oveja de la siguiente manera:

Consumo diario promedio de materia seca (g) = A - B

Digestibilidad aparente de la materia seca =  $\frac{A - B - C}{A - B} \times 100$

donde:

A = cantidad promedio de materia seca ofrecida diariamente.

B = cantidad promedio de materia seca rechazada diariamente.

C = cantidad promedio de materia seca evacuada en las heces diariamente.

A, B y C se calculan de la siguiente manera:

A =  $\frac{(\% \text{ de materia seca en el forraje}) \times (\text{cantidad promedio de forraje ofrecido diariamente})^{1/}}{100}$

B =  $\frac{(\% \text{ de materia seca en rechazos}) \times (\text{cantidad promedio de rechazos diariamente})^{2/}}{100}$

C =  $\frac{(\% \text{ de materia seca en heces parcialmente secas}) \times (\text{peso de la alícuota de las heces})^{3/} \times 5}{100}$

1/ Peso promedio del heno ofrecido durante los días 15 a 21 (dato tomado del registro diario).

2/ Peso promedio de los rechazos antes de pasarlos por el molino de martillos (se toman los días de recolección únicamente).

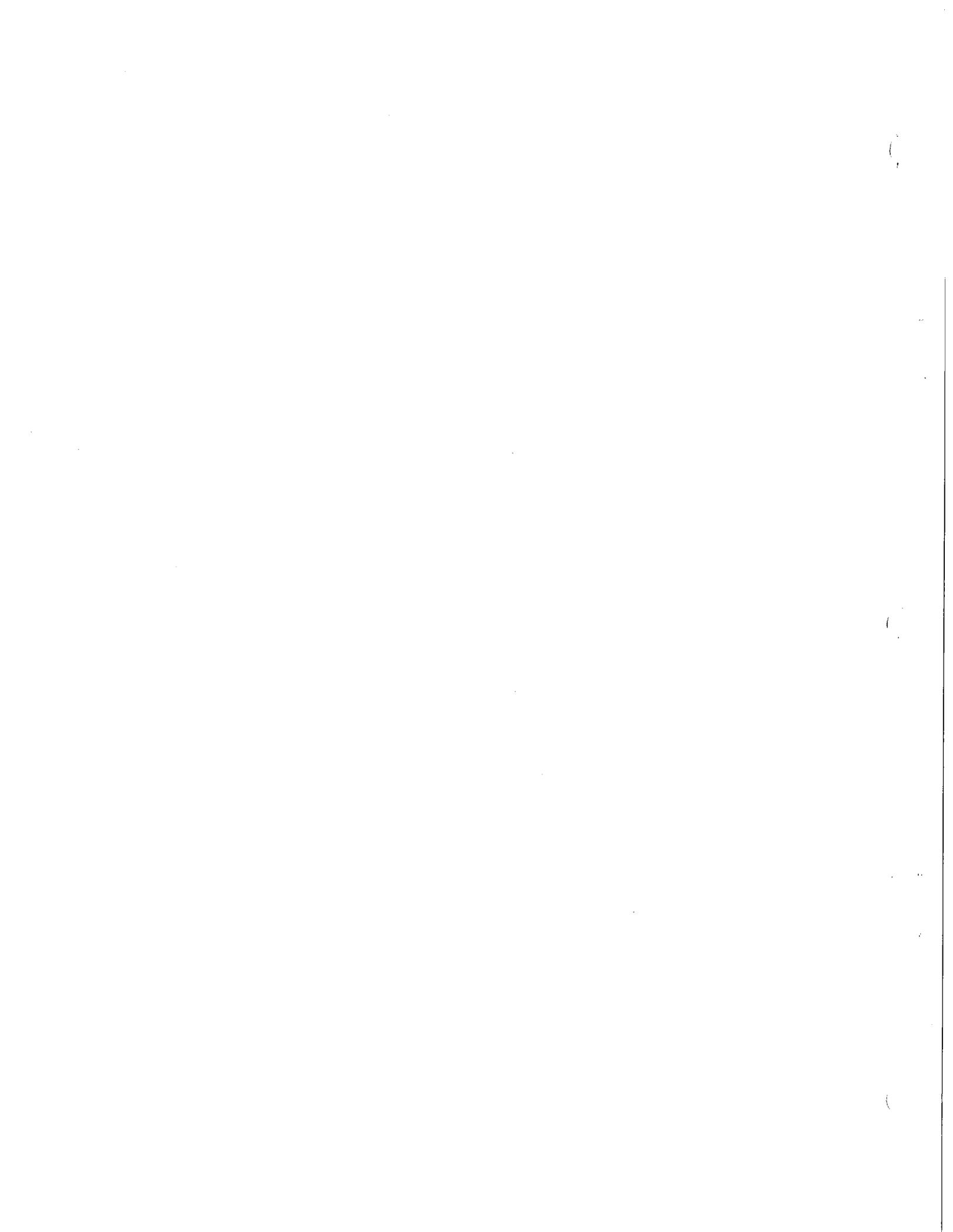
3/ Peso promedio de las heces antes de molerlas a través de la zaranda de 4 mm. en el molino Wiley (la cantidad pesada equivale al 20% del to-

tal de heces evacuadas y se toman las correspondientes a los días de recolección únicamente).

(b) Los coeficientes de digestibilidad de los demás nutrientes se calculan utilizando los valores A, B y C de materia seca descritos anteriormente y el porcentaje de nutrientes contenidos en el heno, rechazos y heces, todo expresado en base a materia seca.

#### Bibliografía

Moore, J. E. 1969. Procedure for determining voluntary intake and nutrient digestibility of hay with sheep. University of Florida Animal Science Department. Unpublished.



## DETERMINACION DE DIGESTIBILIDAD Y BALANCE NUTRICIONAL EN BOVINOS

### Principio

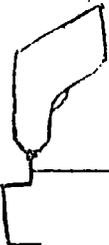
Al animal se le suministra una cantidad conocida de alimento por un período determinado simultáneamente se recogen y pesan las excreciones para efectuarles el análisis químico. Las excreciones se conservan bajo refrigeración o congelación para evitar su descomposición hasta que sean analizadas. Por medio del análisis del alimento y heces, se pueden calcular los coeficientes de digestibilidad y los nutrientes digestibles de un alimento. Analizando además la orina y otros productos tales como la leche, se pueden calcular por diferencia algunos nutrientes que han sido absorbidos, retenidos o depositados en el organismo.

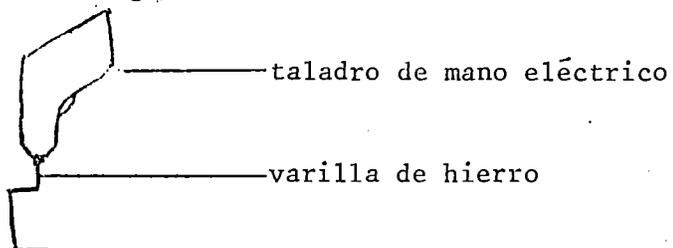
### Equipo

(a) Establos de metabolismo. Escoja los establos de metabolismo de manera que permitan ofrecer tanto una cantidad determinada de alimento y agua, como recolectar con exactitud las heces y orina evacuadas por el animal.

(b) Recipientes para la orina. Utilice recipientes plásticos o de vidrio para recoger la orina debajo de los establos de metabolismo. Para conservar las alícuotas de orina que se obtienen durante el período de recolección, se utiliza un recipiente de boca ancha y de unos 4 litros de capacidad.

(c) Recipientes para heces. Se pueden usar tinas o cubetas de plástico u hojalata para recoger las heces, colocándolas en la parte posterior del establo de metabolismo. Utilice recipientes plásticos de 4 litros de capacidad, con boca ancha para almacenar las heces durante el período de recolección.

(d) Mezclador de heces. Se puede fabricar un mezclador para heces con una varilla de hierro doblada en forma de , adaptándolo a un taladro de mano eléctrico, según el siguiente diseño:



(e) Balanzas. Para pesar los animales, alimentos, heces y orina.

(f) Recipientes. Utilice botellas de vidrio o plástico, con tapaderas bien ajustadas o bolsas plásticas gruesas para recoger las muestras de granos y para almacenar las muestras parcialmente secas de heces antes de molerlas en un molino Wiley. Use botellas de vidrio o plásticas de 250 ml. de capacidad, provistas con tapaderas bien ajustadas, para guardar muestras de heces después que hayan sido molidas. Para conservar la orina, se emplean botellas de 100 ml. de vidrio o plásticas.

(g) Para conservar las muestras de forrajes, se pueden usar bolsas plásticas grandes selladas, envases plásticos, o latas de 20 litros de capacidad.

(h) Unidad de congelación. Tipo caja o cuarto de congelación.

#### Suministro de alimento y agua

(a) La tarde anterior al inicio de la prueba, se debe pesar el ali-

mento que se va a suministrar (forraje, grano o alimento mezclado) y dejarse listo para suministrarle a cada animal individualmente la ración que se le va a ofrecer a la mañana siguiente. Siguiendo este mismo sistema diariamente, se puede realizar el suministro de alimento todas las mañanas en forma rápida durante la prueba.

(b) Disponga para alimentar los animales a la misma hora todos los días (entre las 7 y 8 a.m.; 4 y 5 p.m., etc.).

(c) Si el balance nutricional contempla además el estudio de materiales contenidos en el agua de bebida, será necesario pesar y analizar también la que el animal ingiere (éste es el caso especial de los elementos menores). Llene los recipientes de suministro con agua y péselos para obtener el peso bruto; luego ofrézcasela al animal y péselo nuevamente con el sobrante; anote el peso y por diferencia obtenga la cantidad de agua consumida. El agua se debe ofrecer dos veces por día y a la misma hora cada día. Si el animal dispone de un recipiente para agua permanente, el consumo diario se puede calcular todas las mañanas.

#### Período Preliminar

(a) El propósito del período preliminar es para acostumbrar y familiarizar al animal con el establo de metabolismo; hacer los ajustes necesarios de manera que las heces y orina se recojan convenientemente y para ajustar el consumo de alimento en relación a la excreción de heces y orina. Es muy difícil predecir el tiempo necesario para llevar a cabo este ajuste ya que depende de lo que va a tomar el animal para acostumbrarse a consumir una cantidad adecuada de alimento y para adaptarse al ambiente. Si los animales no están entrenados ésto puede tomarles de 3 a 6 semanas. Si estuvieran entrenados, deben de permanecer en el período

preliminar un mínimo de 10 días antes de iniciar la recolección o sea hasta que alcancen el consumo deseado de alimento.

(b) Se deben tratar los animales contra parásitos externos si fuera necesario y los parásitos internos se deben tratar invariablemente por lo menos 10 días antes de iniciar el período preliminar.

(c) Durante la primer etapa de este período, es preferible mantener los animales en un encierro con piso enrejillado.

(d) Se deben limpiar bien los animales antes de iniciar el período de recolección para evitar la posibilidad de la contaminación de heces y orina por materiales extraños.

#### Período de recolección

##### Recomendaciones generales:

(a) Traslade el animal al establo de metabolismo 7 días antes de iniciar el período de recolección.

(b) Pese el animal 3 días antes de iniciar el período de recolección y luego en la mañana del día último de este período, después de haber recolectado las muestras de heces y orina. La pesada debe realizarse siempre a la misma hora, preferiblemente antes de alimentar el animal por la mañana.

(c) El período de recolección generalmente dura 7 días consecutivos pero puede variar dependiendo del comportamiento del animal (consumo) y de la información que se desee obtener. Mantenga un registro exacto del tiempo cuando se inicia y concluye el período de recolección.

(d) La parte posterior del establo de metabolismo, especialmente donde se van a recoger las heces se debe limpiar muy bien la tarde anterior al inicio de la recolección.

(e) El período de recolección deberá iniciarse en la mañana del día después de que el animal haya estado consumiendo una cantidad constante de alimento, por un mínimo de 10 días.

(f) Durante el período de recolección tome diariamente un porcentaje constante de la muestra de alimento (al momento de pesarlo). Sin embargo, se debe iniciar la toma de la muestra dos días previo al inicio de la recolección de heces, continuando el muestreo diariamente hasta terminar, dos días antes de finalizar la recolección de heces.

Recolección y muestreo de heces y orina:

(a) La recolección de heces, orina y leche (si el animal está lactando) debe iniciarse 48 horas después de haber iniciado oficialmente el período. Bajo el procedimiento que aquí se describe, se asume que se deben de recoger todas las heces. Un buen programa a seguir sería el de remover los colectores de heces y orina todas las mañanas a las 8 a.m. y sustituirlos por otros limpios durante los 7 días consecutivos que debè durar la recolección, siempre y cuando todo marche normalmente.

(b) Pese las heces por diferencia. Coloque en la balanza el recipiente vacío que va a recibir las muestras diarias y obtenga su peso. Agregue la muestra alícuota de heces correspondiente a cada día (2.5 a 5% de las heces evacuadas) y pese nuevamente el recipiente, anotando el peso tarado y peso bruto en un libro de registro. Mantenga las muestras congeladas.

(c) Pese por diferencia el total de orina evacuada y anote el peso tarado y peso total. Mezcle la orina por medio de agitación con una varilla de vidrio y tome una alícuota (2.5 a 5% del total evacuado) y pésela en un recipiente plástico de boca ancha, tal como se describió para las heces. Mantenga las muestras de orina congeladas, repitiendo

este mismo procedimiento cada día durante el período de recolección.

(d) Si el animal está en lactación, pese la cantidad total de leche cada día y conserve una muestra alícuota en una botella de vidrio o plástico (siguiendo el mismo procedimiento que para las heces). Mantenga la muestra en refrigeración a 19 C.

#### Muestreo de heces para el análisis químico

(a) Descongele la muestra representativa de heces pero no permita que permanezca a temperatura ambiente por mucho tiempo. Viértala sobre una lámina de acero inoxidable u hojalata y mézclela con una paleta (si se van a realizar análisis para elementos menores, use material plástico).

(b) Deposite dos muestras rápidamente en botellas de pesa de 50 ml. para evitar la pérdida de humedad. Llévelas inmediatamente al laboratorio y determine la materia seca, nitrógeno y energía bruta en las heces frescas, sin secarlas parcialmente. (Véase el "pesado de muestras por diferencia" página 1501).

Analice cada muestra una vez y si ambos análisis concuerdan, el muestreo de las heces ha sido correcto. Si hay mucha diferencia en los resultados, tome otra muestra de heces del congelador (véase sección c) y corra los análisis nuevamente.

(c) Conserve una botella de 500 ml. de capacidad con heces, debidamente identificada en un congelador hasta que todos los análisis químicos se hayan completado.

(d) Pese una muestra de heces de aproximadamente 700 g. y determine el contenido de materia seca en la muestra secada a 609 C (parcialmente seca). Esta muestra además servirá para determinar aquellos componentes que no son afectados por el secado.

## Muestreo de la orina para el análisis químico

(a) Descongele la muestra de orina pero no permita que permanezca a temperatura ambiente por mucho tiempo. Mézclela completamente y ponga una muestra en una botella plástica de 250 ml. Analícela inmediatamente (véase el "pesado de las muestras por diferencia", página 1501).

(b) Conserve una muestra bien identificada en una botella de 250 ml. en un congelador hasta que todos los análisis químicos se hayan completado.

## Muestreo del alimento y los rechazos

(a) Siempre se debe conservar el alimento no consumido por el animal, o aquél que se derrama y cae al piso durante el período de recolección.

(b) Si el rechazo está suficientemente seco para molerlo, se le debe tomar el peso antes de hacerlo pero si estuviera mojado por derrame de agua o con saliva del animal, deberá secarse en un horno con corriente de aire caliente a 60° C de temperatura y luego colocarlo por 48 horas al aire para que se equilibre con la humedad ambiente. Luego se pesa y se muele.

(c) La molienda de la muestra tanto del alimento ofrecido, como del rechazo y de las heces parcialmente secas, se hace en un molino con tamiz o zaranda de 1 mm. Si se han de efectuar análisis para elementos menores, véase la sección correspondiente al "Análisis de elementos menores", página 4101.

Almacene muestras de cada material en botellas de vidrio o plásticas de 250 ml., llenas hasta las 3/4 partes de su capacidad.

## Cálculo

(a) Digestión aparente.

Coefficiente de digestibilidad =

$$\frac{\text{nutriente en el alimento} - \text{nutriente en las heces} \times 100}{\text{nutriente en el alimento}}$$

Ejemplo:

$$\text{EB}^+ \text{ Coeficiente aparente de digestibilidad} = \frac{\text{EB del alimento por unidad, en peso seco} \times \text{peso seco del alimento} - \text{EB de las heces por unidad, en peso seco} \times \text{peso seco de heces}}{\text{EB del alimento por unidad, en peso seco} \times \text{peso seco del alimento}} \times 100$$

(b) Un balance significa la diferencia que existe entre el contenido del componente presente en el alimento y el que aparece en las excreciones. Para los estudios nutricionales, se consideran el alimento, las heces y la orina.

Balance = componente en el alimento - componente en heces y orina.

Ejemplo:

Balance de nitrógeno (BN) =

$$\begin{aligned} & (\text{N del alimento por unidad, en peso seco} \times \text{peso seco del alimento}) - (\text{N en heces por unidad, en peso seco} \times \text{peso seco de las heces}) - \text{N en orina} \end{aligned}$$

o

$$\text{Balance de nitrógeno} = \text{N en alimento} - \text{N en heces} - \text{N en orina}$$

Para trabajos de mucha precisión, se debe tomar en consideración el material perdido a través del sudor y piel (nitrógeno cutáneo). En el caso de algunas investigaciones, también se considera el nitrógeno contenido en algunos productos elaborados por el animal: leche, huevos, lana, etc. En el balance de carbono y energía, también se toman en cuenta los gases.

---

\* Energía bruta

## Bibliografía

Harris, Lorin E. 1970. Nutrition research techniques for domestic and wild animals. Published by L. E. Harris (in press).



## DETERMINACION DE DIGESTIBILIDAD Y BALANCE NUTRICIONAL PARA OVINOS

### Principio

Al animal se le suministra una cantidad conocida de alimento por un período definido y simultáneamente se recogen y se pesan las heces y orina evacuadas, para efectuar en ambos el análisis químico. Las heces se conservan hasta analizarlas, bajo refrigeración o congelación para evitar su descomposición. El análisis tanto del alimento como de las heces, permite calcular los coeficientes de digestibilidad y nutrientes digestibles en el alimento. Analizando además la orina y otros productos tales como la leche, lana, etc. se puede calcular por diferencia la cantidad de algunos nutrientes absorbidos, retenidos o depositados en el organismo.

### Equipo

(a) Establos o cajas de metabolismo. Escójalos o diseñelos de manera que permitan ofrecer tanto una cantidad determinada de alimento y agua, como recolectar con exactitud las heces y orina evacuadas por el animal.

(b) Recipientes para la orina. Utilice recipientes plásticos o de vidrio para recoger la orina debajo de los establos o cajas de metabolismo. Para conservar las alícuotas de orina que se obtienen durante el período de recolección, se utiliza un recipiente de unos 20 litros de capacidad con boca ancha.

(c) Recipientes para heces. Se pueden usar tinas o cubetas de plástico u hojalata para recoger las heces. Disponga de recipientes de unos 20 litros de capacidad con boca ancha para almacenar las heces durante el período de recolección.

(d) Mezclador para heces. Utilice un mezclador vertical (tipo Hobart) o similar. La acción de este mezclador desintegra las heces de la oveja al punto de que no se hace necesario molerlas. Si no se dispone de este mezclador, use un molino para carne eléctrico o un molidor de mano para alimentos.

(e) Balanzas. Para pesar los animales, alimentos, heces y orina.

(f) Recipientes. Utilice botellas de vidrio o plástico, con tapaderas bien ajustadas o bolsas plásticas gruesas para recoger las muestras de granos y para almacenar las muestras parcialmente secas de heces antes de molerlas en un molino Wiley. Use botellas de vidrio o plásticas de 250 ml. de capacidad, provistas con tapaderas bien ajustadas, para guardar muestras de heces después que hayan sido molidas. Para conservar la orina, se emplean botellas de 100 ml. de vidrio o plásticas.

(g) Para conservar las muestras de forrajes, se pueden usar bolsas plásticas grandes selladas, envases plásticos o latas de 20 litros de capacidad.

(h) Unidad de congelación. Tipo caja o cuarto de congelación.

#### Suministro de alimento y agua

(a) La tarde anterior al inicio de la prueba, se debe pesar el alimento que se va a suministrar (forraje, grano o alimento mezclado) y dejarse listo para suministrarle a cada animal individualmente la ración del día

que se le va a ofrecer a la mañana siguiente. Siguiendo este mismo sistema diariamente, se puede realizar el suministro de alimento todas las mañanas en forma rápida durante la prueba.

(b) Disponga para alimentar los animales a la misma hora todos los días (entre las 7 y 8 a.m.; 4 y 5 p.m., etc.).

(c) Si el balance nutricional contempla además el estudio de materiales contenidos en el agua de bebida, será necesario pesar y analizar también la que el animal ingiere (este es el caso especial de los elementos menores). Llene los recipientes de suministro con agua y péselos para obtener el peso bruto; luego ofrézcasela al animal y péselos nuevamente con el sobrante; anote el peso y por diferencia obtenga la cantidad de agua consumida. El agua se debe ofrecer dos veces por día y a la misma hora cada día. Si el animal dispone de un recipiente para agua permanente, el consumo diario se puede calcular todas las mañanas.

#### Período Preliminar

(a) El propósito del período preliminar es para acostumbrar y familiarizar al animal con el establo de metabolismo; hacer los ajustes necesarios de manera que las heces y orina se recojan convenientemente y para ajustar el consumo de alimento en relación a la excreción de heces y orina. Es muy difícil predecir el tiempo necesario para llevar a cabo este ajuste ya que depende de lo que va a tomar el animal para acostumbrarse a consumir una cantidad adecuada de alimento y para adaptarse al ambiente. Si los animales no están entrenados esto puede tomarles de 3 a 6 semanas. Si estuvieran entrenados, deben de permanecer en el período preliminar un mínimo de 10 días antes de iniciar la recolección o sea hasta que alcancen el consumo deseado de alimento.

(b) Se deben tratar los animales contra parásitos externos si fuera necesario y los parásitos internos se deben tratar invariablemente por lo menos 10 días antes de iniciar el período preliminar.

(c) Durante la primer etapa de este período, es preferible mantener los animales en un encierro con piso enrejillado.

(d) Se deban limpiar bien los animales antes de iniciar el período de recolección para evitar la posibilidad de la contaminación de heces y orina por materiales extraños.

#### Período de recolección

##### Recomendaciones generales:

(a) Traslade el animal al establo de metabolismo 7 días antes de iniciar el período de recolección.

(b) Pese el animal 3 días antes de iniciar el período de recolección y luego en la mañana del día último de este período, después de haber recolectado las muestras de heces y orina. La pesada debe realizarse siempre a la misma hora, preferiblemente antes de alimentar el animal por la mañana.

(c) Disponga la finalización del experimento de manera tal que se completen días de 24 horas completas.

(d) Igual a "Período de Recoleccion" para Bovinos, paso (c), pág. 5201-4.

(e) La parte posterior del establo de metabolismo, especialmente donde se van a recoger las heces se debe limpiar muy bien la tarde anterior al inicio de la recolección.

(f) El período de recolección deberá iniciarse en la mañana del día después de que el animal haya estado consumiendo una cantidad constante de alimento, por un mínimo de 10 días.

(g) Durante el período de recolección tome diariamente un porcentaje constante de la muestra de alimento (al momento de pesarlo). Sin embargo se debe iniciar la toma de la muestra dos días previo al inicio de la recolección de heces, continuando el muestreo diariamente hasta terminar, dos días antes de finalizar la recolección de heces.

Recolección y muestreo de heces y orina:

(a) La recolección de heces, orina y leche (si el animal está lactando) debe iniciarse 48 horas después de haber iniciado oficialmente el período. Bajo el procedimiento que aquí se describe, se asume que se deben de recoger todas las heces. Un buen programa a seguir sería el de remover los colectores de heces y orina todas las mañanas a las 8 a.m. y sustituirlos por otros limpios durante los 7 días consecutivos que debe durar la recolección, siempre y cuando todo marche normalmente.

(b) Conserve el total de heces evacuadas durante el período completo de recolección y manténgalas en refrigeración a 19 C. Si existiera problema con el espacio, pese la muestra completa y conserve el 20% del total.

(c) Agregue 150 ml. de una solución 1:4 de HCl a cada muestra de orina recogida diariamente y conserve toda la orina que el animal evacúe durante todo el período de recolección en las botellas adecuadas. Manténgase en refrigeración a 19 C. Si existiera problema con el espacio, pese la muestra completa y conserve el 20% del total.

(d) Si el animal está en lactación, pese la cantidad total de leche cada día y conserve una muestra alícuota en una botella de vidrio o plástico (siguiendo el mismo procedimiento que para las heces). Mantenga la muestra en refrigeración a 19 C.

## Muestreo de heces para el análisis químico

(a) Tome el total de la muestra recogida durante los 7 días de recolección y transfíerala al recipiente de la mezcladora vertical (Hobart). Mezcle las heces por tres minutos o hasta que se obtenga una masa homogénea. Pese el total y divídalo por el número de días de recolección para obtener el peso diario promedio.

Si no se dispone de una mezcladora Hobart, entonces pese las heces, y viértalas en un cajón (batea) de 1.5 x 1 m. con las tablas de los extremos inclinadas y que esté forrado en hojalata. Mezcle las heces con una azada (azadón) o las manos enguantadas y tome una muestra de dos litros al azar; pásela por el molino eléctrico para carne o el de mano, y una vez molida, mézclela con las manos. Este paso debe realizarse rápidamente para evitar la pérdida de humedad.

(b) Deposite dos muestras rápidamente en botellas de pesar de 50 ml. para evitar la pérdida de humedad. Llévelas inmediatamente al laboratorio y determine la materia seca, nitrógeno y energía bruta en las heces frescas, sin secarlas parcialmente. (véase el "pesado de muestras por diferencia" página 1501).

Analice cada muestra una vez y si ambos análisis concuerdan, el muestreo de las heces ha sido correcto. Si hay mucha diferencia en los resultados, tome otra muestra de heces del congelador (véase sección c) y corra los análisis nuevamente.

(c) Conserve una botella de 500 ml. de capacidad con heces, debidamente identificada en un congelador hasta que todos los análisis químicos se hayan completado.

(d) Pese una muestra de heces de aproximadamente 700 g. y determine el contenido de materia seca en la muestra secada a 60° C (parcialmente se-

ca). Esta muestra además servirá para determinar aquellos componentes que no son afectados por el secado.

#### Muestreo de la orina para el análisis químico

(a) Pese el total de orina recolectada por diferencia, (véase página 1501) descongélese, mézclese bien y obtenga una muestra de 250 ml. en una botella plástica. Analice la muestra inmediatamente.

Nota: si se usan botellas de vidrio, no se deben llenar completamente para permitir la expansión durante el congelamiento.

(b) Conserve una muestra bien identificada en una botella de 250 ml. en un congelador hasta que todos los análisis químicos se hayan completado.

#### Muestreo del alimento y los rechazos

(a) Siempre se debe conservar el alimento no consumido por el animal, o aquél que se derrama y cae al piso durante el período de recolección.

(b) Si el rechazo está suficientemente seco para molerlo, se le debe tomar el peso antes de hacerlo pero si estuviera mojado por derrame de agua o con saliva del animal, deberá secarse en un horno con corriente de aire caliente a 60° C de temperatura y luego colocarlo por 48 horas al aire para que se equilibre con la humedad ambiental. Luego se pesa y se muele.

(c) La molienda de la muestra tanto del alimento ofrecido, como del rechazo y de las heces parcialmente secas, se hace en un molino con tamiz o zaranda de 1 mm. Si se han de efectuar análisis para elementos

menores, véase la sección correspondiente "Análisis de elementos menores", página 4101.

Almacene muestras de cada material en botellas de vidrio o plásticas de 250 ml., llenas hasta las 3/4 partes de su capacidad.

### Cálculo

#### (a) Digestión aparente

Coefficiente de digestibilidad =

$$\frac{\text{nutriente en el alimento} - \text{nutriente en las heces} \times 100}{\text{nutriente en el alimento}}$$

Ejemplo:

EB <sup>+</sup> Coeficiente aparente de digestibilidad	EB del alimento por unidad, en peso seco x peso seco del alimento	EB de las heces por unidad, - peso seco x peso seco de heces	x 100
	EB del alimento por unidad, peso seco x peso seco del alimento		

(b) Un balance significa la relación que existe entre el componente presente en el alimento y el que aparece en las excreciones. Para los estudios nutricionales, se consideran el alimento, las heces y la orina.

Balance = componente en el alimento - componente en heces y orina.

Ejemplo:

Balance de nitrógeno (BN) =

$$\begin{aligned} & (\text{N del alimento por unidad,} & (\text{N en heces por unidad,} \\ & \text{peso seco x peso seco del} & \text{peso seco x peso seco} - \text{N en orina} \\ & \text{alimento}) & \text{de las heces}) \end{aligned}$$

o

Balance de nitrógeno = N en alimento - N en heces - N en orina

---

<sup>+</sup> Energía bruta

Para trabajos de mucha precisión, se debe tomar en consideración el material perdido a través del sudor y piel (nitrógeno cutáneo). En el caso de algunas investigaciones, también se considera el nitrógeno contenido en algunos productos elaborados por el animal: leche, huevos, lana, etc. En el balance de carbono y energía, se toman en cuenta los gases también.

#### Bibliografía

Harris, Lorin E. 1970. Nutrition research techniques for domestic and wild animals. Published by L. E. Harris (in press).

13

14

15

16

17

ANALISIS DEL TEJIDO DE LAS PLANTAS:  
ERRORES COSTOSOS QUE HAY QUE EVITAR

John E. Bowen\*

Los rendimientos máximos de un cultivo dependen del suministro equilibrado de los 16 nutrimentos básicos durante el ciclo del cultivo. Frecuentemente se puede facilitar el logro de este equilibrio mediante el diagnóstico foliar o, más apropiadamente, el "análisis de tejidos de la planta", debido a que los tejidos foliares no siempre constituyen el mejor tejido indicador. Muchos de nosotros hemos basado las tasas de aplicación de fertilizante, durante muchos años, en los resultados del análisis de tejidos y consecuentemente hemos visto subir los rendimientos en forma significativa. Sin embargo, pensemos por un momento en algunos aspectos relacionados con nuestras prácticas actuales. ¿Estamos realmente obteniendo el máximo beneficio de esta técnica? ¿Quizás estos datos nos hacen desviar a veces? ¿Cuánto error humano estamos introduciendo, sin saberlo, en nuestros resultados? Si se usa correctamente, el análisis de tejidos puede aumentar los rendimientos sustancialmente, pero existen ciertos factores negativos que pueden minar la eficacia de nuestros esfuerzos.

Podemos pensar en el análisis de tejidos como en dos operaciones separadas: a.) muestreo de los campos de cultivo y preparación del material vegetal para el laboratorio, seguido por b.) análisis químico del material vegetal. Examinemos nuestros métodos para estar seguros de no dejar penetrar en nuestros resultados el error susceptible de evitar, el cual nos cuesta dinero en términos de menores rendimientos o fertilización excesiva. En el proceso, revisaremos algunas de las reglas básicas que hay que aplicar para que cualquier programa de análisis de tejido vegetal tenga éxito con cualquier cultivo. No debemos olvidar que estamos midiendo el éxito en términos del aumento en los rendimientos, tanto en cantidad como en calidad.

---

\* John E. Bowen es profesor de Fisiología Vegetal en la Universidad de Hawaii, Hilo.

El paso más crítico en el éxito del control de cultivos mediante el análisis de tejidos es la selección de un tejido indicador para cada nutriente. La concentración de nutrientes en el tejido indicador se debe correlacionar significativamente con la cantidad de ese mismo nutriente que está disponible para la planta, así como con el rendimiento final del cultivo. La variabilidad aleatoria en los niveles de nutrientes de tejidos indicadores provenientes de distintas plantas de un campo debería ser mínima. Idealmente, la concentración de nutrientes en el tejido debería ser independiente de la edad de la planta de forma que cualquier discrepancia entre las concentraciones reales y críticas de nutrientes pueda ser atribuida principalmente a la falta de disponibilidad de nutrientes en el suelo. Desafortunadamente, este último criterio no siempre se puede lograr, especialmente en el caso del nitrógeno y del potasio.

Una concentración crítica de nutrientes, o nivel, es la cantidad de ese mismo nutriente que el tejido indicador debe contener a una edad y contenido de humedad específicos, si se quieren obtener los máximos rendimientos. La expresión "disponibilidad de nutrientes" debe discutirse porque una cantidad inadecuada de alguno de los elementos esenciales en el tejido indicador, con la reducción consecuente del crecimiento y del rendimiento, no significa necesariamente que la deficiencia del nutriente se encuentra en el suelo. Mejor, significa sencillamente que la planta no está absorbiendo ese nutriente en cantidad suficiente. Una razón obvia para esto puede ciertamente ser una cantidad inadecuada del elemento en el suelo, pero ésta no es la única explicación posible. Es posible que el elemento se encuentre en el suelo en una combinación química que la planta no puede utilizar, como sucede frecuentemente con el fósforo y el hierro. El desarrollo radical deficiente causado por las enfermedades, nemátodos, insectos o toxicidades químicas también se puede manifestar por medio de una absorción de nutrientes disminuída. Por lo tanto, cuando el contenido de nutrientes de los tejidos indicadores desciende bajo el nivel crítico, es necesario conocer las causas reales antes de aplicar acciones correctivas. Las aplicaciones de fertilizantes en respuesta a los bajos niveles de nutrientes resolverán frecuentemente el problema pero no siempre.

### Recolección de la Muestra:

En el campo, el eslabón más débil en la cadena de procedimientos para el análisis de tejidos es la selección de las plantas para la muestra, tanto en lo concerniente a los sitios de las estaciones de muestreo como a las plantas individuales escogidas. El uso de una técnica impropia en esta etapa significará que los análisis químicos subsiguientes y las recomendaciones en cuanto a fertilizantes serán inexactos. El muestreo por lo tanto debe realizarse con gran cuidado y atención.

Determinemos algunas pautas respecto a la selección de sitios. Primero, la topografía, o terreno, constituye una de las principales determinantes. Un campo uniforme requerirá menos sitios para la muestra que un campo escarpado con zonas pobremente drenadas y áreas rocosas. Segundo, la combinación de variedades dentro un mismo campo necesita sitios múltiples de muestreo debido a las diferencias varietales en cuanto a la nutrición, y por lo tanto en los niveles críticos que se han observado en algunos cultivos, especialmente en la caña de azúcar. Tercero, si la fecha de siembra difiere significativamente en distintas partes del campo, debe tomarse una muestra representativa de cada edad de las plantas. Por último, aquellas áreas del campo que históricamente presentan un crecimiento pobre y bajos rendimientos, cualquiera sea la razón, deben muestrearse en forma separada. Podríamos enunciar muchas otras variables que harían necesario un sitio separado de muestreo de menor área por sitio. En vez de eso, diremos solamente que la selección de los sitios de muestreo debe ser realizada por un agrónomo experto que posea un conocimiento detallado del campo en cuestión.

No resulta práctico ofrecer pautas respecto a la extensión que un sitio de muestreo puede representar, ya que las variables comprometidas son demasiadas. Sin embargo, tal vez sea de valor mencionar que se considera común un sitio de muestreo por cada 25 acres (10 ha.) de caña de azúcar si el campo es uniforme. Generalmente, los bordes del campo y las zanjas de riego se deben evitar al tomar muestras de tejido vegetal con el objeto de minimizar los inconvenientes originados por los efectos "laterales" que son tan familiares a los estadígrafos.

Aunque existe cierto desacuerdo acerca de esto, se deben recoger las muestras vegetales dentro de las tres horas posteriores a la salida del sol

a fin de evitar las posibles fluctuaciones diurnas en cuanto a la humedad y la composición de nutrimentos. Con frecuencia los niveles de nitrógeno, fósforo y potasio de los tejidos se correlacionan con el contenido de humedad de los mismos. Debido a que el contenido de humedad muestra la tendencia a disminuir durante el día, los niveles de nitrógeno, fósforo y potasio disminuirían en forma similar.

La importancia práctica de la recolección de muestras temprano en la mañana no ha sido evaluada suficientemente a nivel experimental para comprobar su necesidad. Pero para estar seguros, el muestreo debe continuar haciéndose temprano en el día, hasta que se compruebe que esta práctica es innecesaria. Si se prevé una demora prolongada entre el momento de la toma de muestras y el regreso de los tejidos al laboratorio para las determinaciones del peso fresco, el material cortado debe ser sellado en bolsas de plástico a fin de retardar la pérdida de humedad.

#### Preparación de la Muestra:

Una vez que el material vegetal ha sido cortado, éste debe limpiarse, secarse y prepararse para el análisis químico. Estos pasos también involucran numerosos inconvenientes. Primeramente se eliminan los contaminantes superficiales, tales como tierra y polvo, sacudiendo la muestra.

Enseguida, es necesario limpiarla. Uno de los métodos consiste en lavar rápidamente la muestra en agua corriente frotando suavemente a fin de desprender todas las películas adheridas a la superficie y luego pasar la muestra a través de una solución jabonosa no fosfatada. La importancia del uso de un jabón no fosfatado es obvia si se desea analizar el contenido de fósforo en una forma precisa. Finalmente el tejido se enjuaga en agua destilada y se seca con papel secante.

Actualmente, el mejor método para la limpieza superficial de tejidos es objeto de un amplio debate entre los analistas de tejidos. Las recomendaciones varían desde el proceso de lavado ya descrito al cepillado de las muestras individualmente con un cepillo de pelo de camello, hasta la limpieza con un trapo húmedo. Probablemente las muestras de diferentes cultivos se comportan de distinta forma respecto a esto. Sin embargo, en el caso de la piña, la caña de azúcar y los cítricos, el lavado elimina de un 20 a un

60% más de hierro y cobre de las muestras previamente limpiadas con un trapo. Esto indica claramente que la limpieza con trapo por sí sola es bastante ineficaz para eliminar el polvo y otros contaminantes de la superficie.

La no eliminación del polvo de la tierra y de los residuos de pesticidas probablemente tenga poco efecto en las concentraciones aparentes de macronutrientes en el material vegetal, pero los micronutrientes pueden presentar niveles anormalmente altos.

Por otra parte, el lavado excesivo puede constituir también un factor de error en el caso del potasio y de otros nutrimentos altamente solubles que pueden filtrarse del tejido. Para cada cultivo y cada tejido indicador se debe determinar experimentalmente el régimen de lavado más apropiado, el cual debe adoptarse luego como un procedimiento de rutina. Las pérdidas causadas por la filtración de elementos de las vainas foliares de la caña de azúcar y de las hojas de la piña son generalmente menores al 2% bajo el régimen de lavado descrito previamente.

Los materiales vegetales deben secarse rápidamente después de recogidas las muestras a fin de minimizar los cambios físicos y bioquímicos que podrían afectar la exactitud de nuestros resultados. Por ejemplo, la respiración continúa en las muestras de tejidos después de haber sido cortadas de la planta hasta que se secan. Debido a que las enzimas respiratorias convierten los azúcares a dióxido de carbono y agua, el no secamiento rápido de las muestras puede ocasionar una pérdida en el peso y en el contenido de azúcar de las mismas. También se altera el metabolismo proteínico en las muestras recolectadas. Esto puede ocasionar lecturas falsas del contenido de nitrógeno.

Las temperaturas de secamiento deben ser lo suficientemente altas para destruir las enzimas pero no tan altas que puedan causar la pérdida de tejido quemándolo o chamuscándolo. Generalmente se satisfacen estos dos criterios si se seca durante la noche en horno alto a 65-70°C. Es poco probable que se elimine toda la humedad aún en estas condiciones, por lo tanto el "peso seco" de nuestras muestras no es realmente lo que se quiere expresar. Algo de agua queda ya que es muy difícil — si no es imposible — eliminarla toda sin destruir parte del tejido con el elevado calor. Por lo tanto, aunque no estemos secando las muestras en una forma completa, es de esperar

que las estemos secando a un contenido constante de humedad. Sin embargo, continuaremos llamando "seco" al tejido a fin de evitar una innecesaria confusión.

#### Comienzo de las Evaluaciones:

Esto no es el final de nuestros problemas porque el tejido seco debe molerse finalmente y luego pasar a través de un tamíz de malla 20. En parte ésto se hace para facilitar la manipulación pero, más importante, para proporcionar una mayor uniformidad al eliminar la variabilidad entre las plantas de la muestra. Este paso usualmente no ofrece problemas importantes si el agrónomo solamente está interesado en los macronutrientes, por ejemplo, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio. Sin embargo, si se va a realizar una evaluación de los micronutrientes, el técnico debe permanecer alerta a la posibilidad de contaminación proveniente del molino en sí. Piensen que podría ocasionar a nuestro análisis de hierro una minúscula partícula de óxido de hierro. La forma más fácil, y se admite, la más costosa es usar un molino de acero inoxidable. Debido a que éste puede resultar prohibido por su alto costo, algunos sencillamente muelen el tejido disecado con las manos. Esta última técnica es adecuada pero no ideal porque una sub-muestra al azar para el análisis químico es más difícil de obtener cuando el tejido no ha sido finamente molido.

El material finamente molido se puede almacenar durante varias semanas, aunque difícil de comprender por qué motivos se justificaría hacer ésto ya que generalmente los resultados se necesitan inmediatamente. Sin embargo, si se va a almacenar el material, ésto debe hacerse en condiciones estériles, refrigerado, o congelado para evitar los cambios microbianos en el material vegetal. Después de un almacenamiento prolongado es necesario volver a secar el tejido puesto que ha absorbido humedad atmosférica durante el almacenamiento. Finalmente, se pesa y analiza una sub-muestra — generalmente un gramo. Los cultivadores pueden demostrar tendencia a descartar o minimizar la importancia de una o más de estas fuentes de error, ya que asumen que cualquier intento de resolver el problema puede ser aún más oneroso que el mismo error que se pretende corregir. Pongamos ésto en la perspectiva adecuada, sin embargo. Los errores en la recolección de muestras y en la preparación para el análisis son acumulativos y pueden

causar un error total de 10 a varios cientos en el porcentaje del resultado final. Errores de este calibre resultan costosos al reducir los rendimientos o causar una innecesaria fertilización. La economía inflacionaria de hoy hace esencial que las prácticas de cultivo se orienten a la máxima producción al mínimo costo. El análisis de tejidos, si se utiliza apropiadamente, constituye un medio hacia este fin.

## PARTES DE LA PLANTA PARA LAS MUESTRAS

H O R T A L I Z A S		
ETAPA DEL CRECIMIENTO	PORTE DE LA PLANTA QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA	No. DE PLANTAS QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA
<u>Papa</u> Antes o durante floración temprana.	3a. a 6a. hoja desde el ápice vegetativo.	20-30
<u>Coles (repollo, etc.)</u> Antes del encabezamiento	Primeras hojas maduras desde el centro del verticilo.	10-20
<u>Tomate (campo)</u> Antes o durante floración temprana.	3a. a 4a. hoja desde el ápice vegetativo.	20-25
<u>Tomate (invernadero)</u> Antes o durante establecimiento de los frutos.	1. Plantas jóvenes, hojas adyacentes al 2o. y 3er. racimos. 2. Plantas viejas, hojas del 4o. al 6o. racimos.	20-25 20-25
<u>Fríjol</u> 1. Retoños (menos de 12 pulgadas). 2. Antes o durante floración inicial.	Toda la parte aérea. 2 ó 3 hojas completamente desarrolladas de la parte superior de la planta.	20-30 20-30
<u>Raíces (zanahorias, cebolla, remolacha).</u> Antes del ensanchamiento de raíces o bulbos.	Hojas maduras centrales	20-30
<u>Apio</u> Crecimiento medio (12-15 pulgadas de altura)	Pecíolos de la hoja madura más joven.	15-30
<u>Hojas (lechuga, espinaca, etc)</u> Crecimiento medio	Hoja madura más joven	35-55

2.  
PARTES DE LA PLANTA PARA LAS MUESTRAS (Cont.)

H O R T A L I Z A S		
ETAPA DEL CRECIMIENTO	PORTE DE LA PLANTA QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA	No. DE PLANTAS QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA
<u>Alverjas</u> Antes o durante floración inicial.	Hojas del 3er.nudo desde la parte superior de la planta.	30-60
<u>Maíz dulce</u> 1. Antes del desarrollo de la espiga. 2. Durante el desarrollo de la espiga.	Toda la hoja madura situada por debajo del verticilo. Toda la hoja del nudo de la mazorca.	20-30
<u>Melones</u> (melón de agua, cohombro, etc.) Etapas tempranas del crecimiento antes del establecimiento del fruto.	Hojas maduras cerca de la porción basal de la planta en el tallo principal.	20-30
FRUTOS Y NUECES		
ETAPA DEL CRECIMIENTO	PORTE DE LA PLANTA QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA	No. DE PLANTAS QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA
<u>Manzana, albaricogue, almendra, durazno, pera, cereza.</u> Media estación	Hojas cercanas a la base del crecimiento del año o de espolones.	50-100
<u>Fresa</u> Media Estación	Las hojas maduras más jóvenes completamente expandidas.	50-75
<u>Pacana</u> Seis a ocho semanas después de la floración.	Hojas de los brotes terminales, pares de la mitad de la hoja.	30-45
<u>Nogal</u> Seis a ocho semanas de la floración	Pares de hojuelas intermedias de brotes maduros.	30-35

3.  
PARTES DE LA PLANTA PARA LAS MUESTRAS (Cont.)

FRUTOS Y NUECES		
ETAPA DE CRECIMIENTO	PORTE DE LA PLANTA QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA	No. DE PLANTAS QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA
<u>Limón, lima</u> Media estación	Hojas maduras del último crecimiento de los terminales no fructíferos.	20-30
<u>Naranja</u> Media estación	Hojas del ciclo de primavera, de cuatro a siete meses, de los terminales fructíferos.	20-30
<u>Uva</u> Fin del período de floración	Pecíolos de las hojas adyacentes a los racimos.	60-100
<u>Frambuesa</u> Media estación	Hojas maduras más jóvenes en laterales o cañas "primos"	20-40
CULTIVOS DE CAMPO		
ETAPA DE CRECIMIENTO	PORTE DE LA PLANTA QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA	No. DE PLANTAS QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA
<u>Maíz</u> 1. Retoños (menos de 12") 2. Antes del desarrollo de espigas. 3. De la aparición de la espiga y floración hasta la aparición de hebras.  No se recomienda recoger muestras después de la aparición de hebras.	Toda la parte aérea  Toda la hoja completamente desarrollada bajo el verticilo.  Toda la hoja en el nudo de la mazorca, sobre ésta o debajo de ella.	20-30  15-25  15-25
<u>Soya</u> 1. Retoños (menos de 12 pulg.) 2. Antes o durante la floración.	Toda la parte aérea  Dos o tres hojas complet. desarrolladas de la parte superior de la planta.	20-30  20-30

4.  
PARTES DE LA PLANTA PARA LAS MUESTRAS (Cont.)

CULTIVOS DE CAMPO		
ETAPA DE CRECIMIENTO	PORTE DE LA PLANTA QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA	No. DE PLANTAS QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA
No se recomienda recoger muestras después de la aparición de vainas.		
<u>Granos pequeños (arroz incluido)</u>		
1. Retoños (menos de 12")	Toda la parte aérea	50-100
2. Antes del espigamiento	Las cuatro hojas superiores	50-100
No se recomienda recoger muestras después del espigamiento.		
<u>Heno y especies forrajeras (gramíneas).</u>		
Antes del espigamiento o en la etapa óptima de mejor calidad de forraje.	Las cuatro hojas superiores	40-50
<u>Alfalfa</u>		
Antes de la décima parte de la etapa de floración	Láminas foliares maduras a aproximadamente 1/3 hacia abajo desde la parte superior de la planta.	40-50
<u>Trébol y otras leguminosas</u>		
Antes de la floración	Laminillas foliares maduras aproximadamente 1/3 hacia abajo desde la parte superior de la planta.	40-50
<u>Remolacha</u>		
Media estación	Hojas completamente expandidas y maduras situadas en el punto equidistante entre las hojas centrales más jóvenes y el verticilo foliar exterior más viejo.	30-40
<u>Tabaco</u>		
Antes de la floración	Hoja superior completamente desarrollada	8-12

5.  
PARTES DE LA PLANTA PARA LAS MUESTRAS (Cont.)

CULTIVOS DE CAMPO		
ETAPA DE CRECIMIENTO	PORTE DE LA PLANTA QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA	No. DE PLANTAS QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA
<u>Sorgo - millo</u> Antes de o durante la capitación.	Segunda hoja desde la parte superior de la planta.	15-25
<u>Caña de Azúcar</u> Hasta cuatro meses de edad	3a. ó 4a. hoja completamente desarrollada desde la parte superior de la planta	15-25
<u>Maní</u> Antes o durante la floración	Hojas maduras tanto del tallo principal como de una rama lateral cotiledonal.	40-50
<u>Algodón</u> Antes o durante la primera floración o a la aparición de los primeros cuadros.	Hojas maduras más jóvenes del tallo principal.	30-40
ORNAMENTALES Y FLORES		
ETAPA DE CRECIMIENTO	PORTE DE LA PLANTA QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA	No. DE PLANTAS QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA
<u>Arboles ornamentales</u> Crecimiento del año.	Hojas completamente desarrolladas.	30-100
<u>Arbustos ornamentales</u> Crecimiento del año.	Hojas completamente desarrolladas.	30-100
<u>Césped</u> Durante la estación normal de crecimiento.	Laminillas foliares. Corte manual para evitar contaminación con tierra y otros materiales.	de material
<u>Rosas</u> Durante la producción de flores	Hojas superiores en el tallo florecido.	20-30

6.  
PARTES DE LA PLANTA PARA LAS MUESTRAS (Cont.)

ORNAMENTALES Y FLORES		
ETAPA DE CRECIMIENTO	PORTE DE LA PLANTA QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA	No. DE PLANTAS QUE SE DEBE TOMAR PARA LA MUESTRA
<u>Crisantemos</u> Antes o durante la floración	Hojas superiores en el tallo florecido.	20-30
<u>Claveles</u> 1. Plantas no presionadas	4o. ó 5o. par de hojas desde la base de la planta	20-30
2. Plantas presionadas	5o. y 6o. par de hojas desde la parte superior de los laterales primarios	20-30
<u>Euphorbia pulcherrima</u> (poinsettia) Antes o durante la floración	Hojas completamente expandidas de maduración más reciente.	15-20.