

La estimación de la digestibilidad en ensayos con rumiantes

Mariela Lachmann¹ y O. Araujo Febres²

La Universidad del Zulia. ¹Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Producción e Industria Animal. ²Facultad de Agronomía. Departamento de Zootecnia. Apartado 15205. Maracaibo, ZU 4005 Venezuela. E-mail: oaraujo@cantv.net

Introducción

Un elemento clave dentro de los sistemas de producción con rumiantes es la nutrición, ya que el potencial productivo de un animal sólo puede expresarse en la medida que sus necesidades de mantenimiento estén cubiertas y quede un excedente disponible para ser transformado en producto. En condiciones tropicales la base de estos sistemas de alimentación, son las pasturas naturales o cultivadas. Además, se cuenta con una biodiversidad de plantas que normalmente son consumidas por los animales en los potreros o al incursionar en terrenos con vegetación natural. Las posibilidades de usar subproductos de cultivos tropicales y del procesamiento de cereales y oleaginosas, son parte de una larga lista de materiales con gran potencial. Sin embargo, la eficiencia de su utilización está sujeta al conocimiento de sus características nutricionales, siendo los principales parámetros de evaluación, el contenido de nutrientes, el consumo y la digestibilidad del material.

Para la correcta evaluación de materiales es necesario que los investigadores validen las técnicas que usan, contrastándolas con estimaciones por otros métodos (Titgemeyer, 1997). El uso del método tradicional de colección total de heces (CHT) es laborioso e implica algunas restricciones al manejo ordinario de animales en producción, haciéndose necesaria la evaluación y validación de técnicas que permitan estudiar diferentes materiales (Van Keulen y Joung, 1977). Aun cuando se considera a los forrajes la fuente de alimentos más económica para los rumiantes, las investigaciones conducidas para determinar su valor alimenticio son mucho menores con relación a las conducidas con otro tipo de alimentos (Reid *et al.*, 1952).

El consumo y la digestibilidad han sido áreas de gran interés para los nutricionistas, donde la técnica de los indicadores ha contribuido notablemente (Kotb y Luckey, 1972). El empleo del óxido de cromo y la fibra cromo (Cr) mordente como marcadores, han sido comúnmente reportados como eficientes sistemas de marcaje para estimar la digestibilidad *in vivo*, pero se exige un delicado manejo y su determinación analítica es costosa, por lo que el empleo de la lignina como marcador interno significa un ahorro importante de tiempo y recursos económicos.

Los marcadores internos varían en su habilidad para las determinaciones de digestibilidad en diferentes dietas, por lo que es necesario evaluar el mérito del empleo del marcador en varios forrajes antes de su aplicación en investigaciones posteriores (Sunvold y Cochran, 1991). El investigador debe estandarizar el uso de un marcador para una situación específica y determinar el grado de error probable de sus estimaciones (Lascano *et al.*, 1990) por lo que se recomienda que cada equipo de investigación, evalúe diferentes materiales bajo las condiciones particulares en que se desempeña su investigación y determine qué fiabilidad tienen los estimados de digestibilidad obtenidos (Pond *et al.*, 1987; Lascano *et al.*, 1990).

Determinación de la Digestibilidad de los Alimentos

El conocimiento del valor nutritivo de los alimentos es fundamental para la nutrición animal, no siendo suficiente con los análisis químicos, hay que considerar los efectos de los procesos de digestión, absorción y metabolismo animal (Bondi, 1989). Las pruebas de digestibilidad permiten estimar la proporción de nutrientes presentes en una ración que pueden ser absorbidos por el aparato digestivo (Church y Pond, 1994) quedando disponibles para el animal (Bondi, 1989).

La digestibilidad depende mayormente de la composición nutritiva de la ración en estudio, siendo a su vez afectada por el hecho de que las heces contienen cantidades importantes de materiales de origen no dietético (Merchen, 1993). Éstas, constituyen una importante vía de excreción de compuestos nitrogenados, grasos, minerales y glúcidos no fibrosos de origen endógeno (Church y Pond, 1994), encontrándose reportes que indican que no hay secreción de carbohidratos a nivel intestinal (Bondi, 1989). A esto se debe que los coeficientes de digestibilidad determinados por diferentes métodos se denominan “aparentes”. Es difícil cuantificar con exactitud las cantidades de origen endógeno de un determinado elemento presente en las heces, ocasionando la subestimación de su digestibilidad verdadera.

Los valores estimados de digestibilidad aparente de las fracciones correspondientes a proteínas y lípidos, sin incluir los aportes de compuestos endógenos de la misma naturaleza, son siempre menores a los coeficientes de digestibilidad verdadera. Por lo que un dato de gran utilidad al trabajar con rumiantes es que el aporte de nitrógeno endógeno se encuentra alrededor de 0,5 a 0,6 g por 100 g de materia seca consumida (aproximadamente un 4% de la proteína de la ración), por lo que los coeficientes de digestibilidad aparente en raciones con un contenido de proteína inferior al 4%, son negativos (Bondi, 1989).

En dietas basadas en el consumo de forrajes, la digestibilidad *in vivo* es afectada por aquellos elementos que tienen efecto sobre el consumo, como la capacidad de selección del animal en función de la oferta de material, la disponibilidad de agua, la tasa de pasaje del alimento, la eficiencia metabólica de los animales y hasta las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa), lo que trae como consecuencia, que difícilmente la técnica *in vitro* pueda reproducir las transformaciones ocurridas en la digestibilidad *in vivo* (Cochran *et al.*, 1986). Aún cuando la digestibilidad aparente, constituye una expresión muy simplificada del valor nutritivo, los datos que se generan de esta determinación son de gran utilidad (Merchen, 1993).

Para la determinación *in vivo*, del coeficiente de digestibilidad de raciones completas o de determinados nutrientes dentro de una ración, se han empleado diversos métodos, entre los cuales destacan, el de colección total de heces y el método de las proporciones usando marcadores.

El Método de Colección Total de Heces

La colección total de heces (CTH) es el método más confiable para medir digestibilidad, ya que involucra directamente factores tanto del alimento como del animal (Basurto y Tejada, 1992). Este método incluye la medición de la ingestión de una determinada ración de composición conocida y la colecta total de la excreción fecal correspondiente al alimento consumido. Las muestras del material ofrecido, al igual que las del rechazado, cuando se proporciona alimento *ad libitum*, muestras de orina y las heces, son analizadas en el laboratorio, para controlar el balance de nutrientes ingeridos

y excretados, como base de la determinación de la digestibilidad de los nutrientes en estudio. Esta es normalmente representada por un coeficiente de digestibilidad, expresado en forma porcentual que se calcula mediante la siguiente fórmula (Bondi, 1989):

$$\text{Coeficiente de digestibilidad (\%)} = \left[\frac{\text{NI} - \text{NH}}{\text{NI}} \right] \times 100 \quad (1)$$

Donde:

NI = Nutriente ingerido

NH = Nutriente en heces

Sin embargo, esta técnica posee algunas limitaciones con relación a la precisión de la estimación del coeficiente de digestibilidad, representadas principalmente por las pérdidas de metano por medio del eructo, producto de la fermentación ruminal de los carbohidratos, el cual se considera digerido y los coeficientes de digestión determinados por diferencia entre los nutrientes ingeridos y los excretados, no siempre reflejan su disponibilidad (Ortega, 1987; Bondi, 1989).

Alcanzar esta información a través de ensayos que involucren el CTH presenta una serie de desventajas desde el punto de vista práctico: es laborioso (Van Keulen y Young, 1977; Huhtanen *et al.*, 1994); requiere de la disponibilidad de jaulas de colección; de personal adiestrado en su manejo (Van Keulen y Young, 1977; Laredo *et al.*, 1988; Basurto y Tejada, 1992); el costo de mantenimiento de los animales (Basurto y Tejada, 1992) y la imposibilidad de utilizar hembras en los ensayos (Brandyberry *et al.*, 1991).

El trabajo operativo del método de CTH, implica la medición diaria de consumo, la colección de heces una o dos veces al día, sin contaminarlas con la orina, mantener los arneses en su sitio y la colección de la orina. En ensayos a pastoreo la situación se complica aún más (Laredo *et al.*, 1988) ya que los animales deben estar adaptados al uso de arneses y al constante manipuleo (Doley *et al.*, 1994), pudiendo causar un efecto detrimental sobre los hábitos de pastoreo del animal (Van Soest, 1994). Todo esto ha promovido el uso creciente de marcadores en los estudios de digestión.

Generalidades sobre el Uso de Marcadores para Ensayos de Digestibilidad

Los marcadores son compuestos de referencia usados para monitorear aspectos físicos, como la tasa de pasaje, y químicos, como hidrólisis y síntesis, haciendo estimaciones cuantitativas o cualitativas de la fisiología nutricional. Estos materiales también han sido denominados como indicadores, trazadores, sustancias de referencia o sustancias indicadoras, y se ha denotado de manera especial, como marcadores de las dietas, a aquellos que pueden ser colocados en ella, pueden ser constituyentes naturales de la misma o ser administrados de forma oral (Kotb y Luckey, 1972).

Para ser considerada como marcador, una sustancia debe ser inerte y no tóxica, no tener efectos fisiológicos o psicológicos, no puede ser absorbida ni metabolizada en su paso por el tracto digestivo y debe ser recuperada completamente tanto de materias primas como de alimentos procesados, debe mezclarse íntimamente con el alimento y mantenerse uniformemente distribuida en la digesta, no tener influencia sobre las secreciones alimentarias, digestión, absorción, motilidad del tracto digestivo o sobre la excreción, no tener efecto sobre la microflora del tracto digestivo de importancia para el hospedero; además, debe tener cualidades que permitan su medición precisa (Kotb y Luckey, 1972).

La metodología con marcadores ha sido ampliamente estudiada para ensayos de digestibilidad, reconociendo que los coeficientes de digestión pueden ser determinados sin la CTH, tanto para animales en confinamiento como para animales a pastoreo (Fahey y Jung; 1983; Pond *et al.*, 1987; Lascano *et al.*, 1990; Van Soest, 1994), en ocasiones cuando se dificulta medir el consumo total de alimento o cuando se hace imposible coleccionar la totalidad de las heces (Van Keulen y Young, 1977; Bondi, 1989; Merchen, 1993; Church y Pond, 1994). Bajo estas condiciones es deseable el uso de marcadores (Cochran *et al.*, 1986) siendo necesario, conocer la concentración de la sustancia de referencia en el alimento y en las heces (Van Soest, 1994) siempre que se identifique el marcador apropiado (Fahey y Jung, 1983).

El uso de marcadores ofrece una serie de ventajas en relación con el método de CHT, es menos laborioso y no requiere de la medición del consumo del alimento a evaluar y su excreción fecal, ya que las determinaciones pueden ser realizadas directamente sobre muestras del alimento y de las heces (Van Keulen y Young, 1977; Bondi, 1989; Van Soest, 1994).

Los diferentes estudios con marcadores demuestran que reunir todos estos requisitos es prácticamente imposible, por lo que en ensayos de digestibilidad se han considerado la indigestibilidad, la recuperación completa y la fácil medición del material, como las principales características que debe cumplir un marcador (Kobt y Luckey, 1972). Adicionalmente, no debe afectar al animal, no interferir la digestibilidad del alimento, ni estar presente en la dieta o en el suelo (Van Soest, 1994) y debe contar con un método específico y sensible para su determinación (Owens y Hanson, 1992).

Los marcadores han sido clasificados bajo diversos criterios (Kotb y Luckey, 1972) siendo su naturaleza la más común, regularmente divididos en internos y externos (Pond *et al.*, 1987; Lascano *et al.*, 1990; Basurto y Tejada, 1992; Merchen, 1993; Church y Pond, 1994). Adicionalmente, Van Soest (1994) incluye una tercera categoría, los generados matemáticamente (como el nitrógeno fecal). Los internos son aquellos, como la lignina, que son constituyentes naturales del alimento no digeridos ni absorbidos por el animal (Pond *et al.*, 1987; Van Soest, 1994) o que se digieren en muy poca cantidad (Church y Pond, 1994) su utilización es ventajosa gracias a que por ser componentes indigeribles de los alimentos, no es necesaria la preparación del marcador (Huhtanen *et al.*, 1994). Los externos, son sustancias químicas que se suministran al animal, bien sea directamente con la ración, en cápsulas o en soluciones (Church y Pond, 1994) y, que al igual que los internos no son digeridos ni absorbidos (Pond *et al.*, 1987; Owens y Hanson, 1992; Van Soest, 1994).

Varios métodos han sido propuestos para simplificar las determinaciones de los coeficientes de digestión, siendo el más popular el de las proporciones usando marcadores (Kane *et al.*, 1950). Éste se muestra como un procedimiento altamente válido (Swift *et al.*, 1947; Van Soest, 1994) que permite su estimación en función de la concentración del indicador en el alimento y en las heces (Kotb y Luckey, 1972). Al determinar con precisión las cantidades de marcador suministrado en el alimento y en muestras de heces, y conocer la composición porcentual de los nutrientes presentes en el alimento y las heces, se determina, a partir de la relación entre esas concentraciones, la digestibilidad de los nutrientes (Bondi, 1989).

Para el cálculo de la digestibilidad con marcadores, según la técnica de las proporciones, se han descrito algunas fórmulas, en función de la relación de las concentraciones de los nutrientes y el

marcador, tanto en la ración como en las heces. En el caso de la digestibilidad de la MS y cualquier otro nutriente se han propuesto la siguientes formulas:

$$DMS, \% = (1 \text{ CMF}/\text{CMH}) \times 100 \quad (2)$$

Donde:

CMF = Concentración del marcador en el forraje (%)

CMH = Concentración del marcador en las heces (%) (Lascano *et al.*, 1990).

Para calcular la digestibilidad de cualquier nutriente (DN), se aplica alguna de estas fórmulas según su preferencia:

$$DN, \% = [1 (\text{CMF} \times \text{NH})/(\text{CMH} \times \text{NF})] \times 100 \quad (3)$$

Donde:

CMF = Concentración del marcador en el forraje (%)

NH = Concentración del nutriente en las heces (%)

CMH = Concentración del marcador en las heces (%)

NF = Concentración del nutriente en el forraje (%) (Lascano *et al.*, 1990).

$$\text{Digestibilidad aparente, \%} = 100 [100 (\text{MA}/\text{MH})(\text{NH}/\text{NA})] \quad (4)$$

Donde:

MA =% de marcador en el alimento

MH =% de marcador en las heces

NH =% de nutriente en las heces

NA =% de nutriente en el alimento (Church y Pond, 1994).

La precisión y la efectividad de las estimaciones de digestibilidad se ven afectadas por las variaciones en las determinaciones del marcador. Dichos errores se traducen en una subestimación de los coeficientes de digestión, pudiendo ser ajustados con la introducción de un factor de corrección estimado con la digestibilidad determinada en (1) por el método de CTH. Esto sólo se justifica en el caso de los marcadores internos, pero no en el uso de sustancias metabólicas o marcadores externos, donde vendría a ser un correctivo para encubrir fallas en la técnica (Van Soest, 1994).

La validez del uso de marcadores en estudios a pastoreo depende de la habilidad de los investigadores para obtener muestras representativas de las heces producidas y del forraje consumido (Streeter, 1969). Sin embargo, el marcador nutricional ideal, que cumpla con todos los requisitos establecidos y sea aplicable en condiciones variables, no ha sido encontrado, aún cuando algunos marcadores han resultado exitosos para una aplicación específica (Kotb y Luckey, 1972).

La Lignina como Marcador Interno para Ensayos de Digestibilidad

La lignina es el único gran polímero de las plantas cuyos componentes no se encuentran claramente reconocidos (Van Soest, 1994; Reeves, 1997). La lignina afecta la digestibilidad de los tejidos

vegetales (Reeves, 1997). Las estructuras condensadas que se conocen y sus modelos han sido sintetizados a partir de estudios *in vitro*, pero no sobre el material en su condición natural (Van Soest, 1994).

Generalmente la lignina se clasifica dentro de tres grandes grupos, basándose en sus monómeros estructurales y variando según la clasificación taxonómica de las plantas, especialmente entre monocotiledóneas y dicotiledóneas (angiospermas y gimnospermas) (Cain, 1981; Van Soest, 1994). El problema de definición de la lignina está acompañado por una nomenclatura, hasta los momentos, inconsistente en la literatura donde se reporta lignina, por lo que este término ha sido empleado para distinguir el polímero principal de lignina de los fenoles extraíbles asociados a las muestras (Van Soest, 1994).

La determinación de la lignina es utilizada por muchos investigadores para monitorear estudios de digestión con rumiantes (Muntifering, 1982; Reeves, 1997), principalmente en los Estados Unidos (Wallace y Van Dyne, 1970) y típicamente medida mediante métodos gravimétricos (Porter y Singleton, 1971; Muntifering, 1982). Algunos autores han sugerido que el detergente ácido y el detergente neutro remueven alguna lignina verdadera (Fahey y Jung, 1983). Este punto de vista considera todos los fenoles de la pared celular, incluyendo los ésteres de ácido ferúlico y *p*-cumárico como lignina (Jung y Deetz, 1993, citado por Van Soest, 1994), lo que reitera la dificultad de hablar de ella como un término absoluto y universal.

Los resultados obtenidos al comparar diferentes métodos de determinación de lignina, producen valores muy diferentes, que en ocasiones no concuerdan, ya que cada método mide sustancias completamente distintas (Reeves, 1988). Algunos investigadores señalan que el método de detergente ácido incluye cutina, y algunos elementos Maillard como lignina (Muntifering, 1982), al igual que proteínas y posibles carbohidratos; pero toda la lignina originalmente contenida en la fibra detergente ácido (FDA) aparentemente es retenida, por lo que si hay pérdidas en la preparación inicial de la FDA, los valores subsecuentes de lignina obtenidos deben ser incorrectos (Reeves, 1993).

La presencia de proteína cruda (PC) en la FDA puede complicar la correcta determinación de la lignina detergente ácido (LDA), ya que entre el 1.5 y el 18% del valor de la lignina puede estar representado por proteína y no por lignina, dependiendo básicamente de las alteraciones que sufran las proteínas presentes en la muestra por acción del proceso de FDA o por el ácido sulfúrico al 72% empleado para la determinación de la lignina (Reeves, 1997). Se resalta que la composición de las preparaciones de lignina varían de acuerdo con el método de aislamiento (Merchen, 1993; Reeves, 1993; Van Soest, 1994) y cada método presenta problemas específicos (Reeves, 1993).

Las diferencias reportadas por las determinaciones del contenido de lignina mediante distintas rutinas analíticas pueden estar influenciadas por la fuente del material evaluado, observándose efecto de interacción entre la lignina y la dieta cuando ha sido empleada como marcador en ensayos de digestión. Al evaluarse su uso como marcador, empleando diferentes tipos de dietas y varios métodos de determinación, la sensibilidad analítica del método, es afectada por la complejidad estructural de los componentes de los forrajes de diferentes fuentes (Muntifering, 1982).

Las propiedades físicas de la lignina son generalmente alteradas por ácidos fuertes que promueven la posterior polimerización y condensación, pudiendo causar que el material originalmente soluble (en condiciones naturales) se transforme en productos insolubles (Van Soest, 1994). Por esta razón

se le confiere la característica de insoluble e indigerible, cuando en realidad no se conoce con precisión su composición específica, ni su grado de solubilidad en condiciones naturales, ni como es consumida por el animal. Es por ello que la lignina ha sido usualmente considerada como indigestible, esperando que funcionara como un marcador interno ideal en estudios de digestión (Wallace y Van Dyne, 1970; Muntifering, 1982), pero ésto no es del todo cierto ya que parte de su estructura es degradada o modificada en su paso por el tracto digestivo (Muntifering, 1982; Fahey y Jung, 1983; Merchen, 1993; Church y Pond, 1994) por lo que la lignina debe ser considerada con precaución en su empleo como marcador (Merchen, 1993).

Las principales limitaciones para el uso de la lignina como marcador son su grado de digestibilidad y la necesidad de realizar colección total de las heces para la obtención de muestras representativas (Weir *et al.*, 1959), aún cuando se han reportado variaciones en cuanto a la recuperación de la lignina determinada por este método (Fahey y Jung, 1983). Numerosas observaciones de desaparición de la lignina a través de su paso por el tracto digestivo han indicado coeficientes aparentes de digestión que van desde 8 hasta 53% (Merchen, 1993); otros investigadores señalan que la variabilidad en cuanto a los coeficientes de digestión va del 2 al 42% (Dearriba, 1988).

Algunos investigadores han reportado que la mayor parte de la desaparición de la lignina tiene lugar a nivel ruminal, y alguna en los intestinos (Fahey y Jung, 1983). Coincidiendo con estudios realizados en ovinos, que señalan que la degradación de la lignina ocurre principalmente antes de llegar a los intestinos, donde se da la mayor parte de la demetoxilación, y sugieren una pequeña degradación a nivel intestinal (Porter y Singleton, 1971).

La aparente digestión de la lignina puede ser consecuencia de la formación de complejos solubles carbohidrato-lignina que pasan a través del rumen, y presumiblemente el intestino, como polímeros en solución que no son recuperados en las heces. El tránsito de la lignina por el sistema digestivo del rumiante la modifica de manera tal, que mayor número de grupos fenólicos son liberados y expuestos (Fahey *et al.*, 1979). La lignina ha demostrado, no ser una sustancia inerte en el proceso digestivo de rumiantes, su digestibilidad parcial ha sido reportada como una característica inapropiada para una sustancia de referencia, a ser empleada en la determinación indirecta de la digestibilidad de otros nutrientes de la ración (Sullivan, 1955).

En este sentido Wallace y Van Dyne (1970) realizaron una recopilación de varios reportes de digestibilidad de la lignina bajo diferentes condiciones experimentales (Cuadro 1) los cuales fueron empleados por dichos investigadores para modificar la ecuación de determinación del coeficiente de digestión de un nutriente en función de la recuperación incompleta de este marcador.

Otras razones de la aparente digestibilidad de la lignina (Merchen, 1993; Van Soest, 1994) las cuales incluyen los preparados de lignina provenientes de plantas inmaduras de bajo contenido de lignina pueden presentar componentes diferentes a ésta; la presencia de compuestos digestibles puede incidir en la aparente digestibilidad de la lignina, por lo que lignina de pastos inmaduros no debe ser empleada como marcador en ensayos de digestibilidad, ya que se dificulta su recuperación en heces, aún cuando esta es virtualmente indigerible (Van Soest, 1994). La lignina allí presente, pudiera ser parcialmente digerida (Wallace y Van Dyne, 1970; Scales *et al.*, 1974; Van Soest, 1994) polimerizada a fragmentos de bajo peso molecular que son absorbidos y excretados por la orina (Van Soest, 1994); la formación de complejos lignina-carbohidrato que no son recuperados en las heces, la destrucción parcial de lignina fecal durante el análisis (Fahey y Jung, 1983) diferencias propias de los métodos de estimación (Wallace y Van Dyne, 1970; Fahey y Jung, 1983; Dearriba,

1988) y diferencias en las características de la lignina determinada en las heces (Fahey y Jung, 1983; Dearriba, 1988).

Cuadro 1. Digestibilidad aparente de la lignina en varios forrajes de clima templado, por diferentes clases de animal, y determinada por diferentes métodos analíticos.

Referencia	Dieta	Descripción	Clase de animal	Método de análisis ¹	Dig. aparente (%) ²
Archibald et al., 1961	Alfalfa	2 ^{do} Corte	Bovinos	F	14
	Timoti	1 ^{er} Cultivo	Bovinos	F	10
Bondi y Meyer, 1943	Varias gramíneas	Inmaduro	Ovinos	D	64 a 35
Davis et al., 1947	Planta de frijol con granos	Deshidratada	Ovinos	B	16 a 11
Ely et al., 1953	Pata de gallina	Inmaduro a maduro	Bovinos	C	16 a 4
Forbes y Garrigus, 1950	Diferentes forrajes	Gramíneas introd. Comunes	Bovinos y ovinos	C	11 a -27
Guibert y Goss, 1944	Especies anuales	Maduras	Ovinos	A	24 a -20
Hale et al., 1940	Alfalfa	No especificado	Bovinos	A	17
Lancaster, 1943	Varios alimentos	Variado	Ovinos	E	32 a -40
Louw, 1941	Mezcla de gramíneas	1 a 4 meses	Ovinos	E	24 a 12
McCann, 1967	Alfalfa	Nº 1 grado	Bovinos	G	12
Miller et al., 1954	Trébol ladino	Inmaduro	Conejos	C	26
	Festuca gigante	Inmaduro	Conejos	C	6
Smith et al., 1956	Muchas especies	Variado	Venado	C	42 a -7
Sullivan, 1955	Diferentes gramíneas	Inmaduras a maduras	Ovinos	C	17 a -3
Troelsen y Campbell, 1959	Diferentes especies introducidas	Postfloración /comenzando semillar	Ovinos a	C	9 a -2
Waite et al., 1964	Forraje de centeno	Inmaduro a maduro	Ovinos	C	42 a 0
Watkins, 1955	Diferentes especies	Inmaduro espigado	Ovinos a	C	24 a -17
Van Dyne, 1963	Alfalfa	Peletizada	Bovinos	C	18
	Alfalfa	Peletizada	Ovinos	C	8

Fuente: Wallace *et al.*, 1970.

¹ A = Crampton and Maynard, 1938; B = Davis and Miller, 1939; C = Ellis *et al.*, 1946; D = Kalb, 1932; E = Norman y Jenkins, 1934; F = Sullivan, 1959, y G = Van Soest, 1963.

² Rangos obtenidos con varios estados de madurez reflejando valores de digestibilidad en estados de madurez tiernos y senescentes, respectivamente.

Las recuperaciones incompletas de lignina se traducen en una subvaloración de la digestibilidad del material en estudio, cuando ésta ha sido empleada como marcador, aumentando el error en la medida que disminuye la cantidad de lignina recuperada en relación con el contenido de lignina de la dieta, especialmente en dietas bajas en este componente (Merchen, 1993). La recuperación de la lignina funciona mejor cuando su contenido supera el 5% de la materia seca (Streeter, 1969; Van Soest, 1994). Para que la lignina pueda ser empleada en ensayos de digestión ruminal, su recuperación debe ser confirmada (Kotb y Luckey, 1972), evitando la consideración de lignina artificial sintetizada en el paso por el sistema digestivo, como lignina recuperada proveniente de la dieta; Sin embargo, existe poca información sobre el comportamiento como marcador de la lignina producida por forrajes tropicales.

Los marcadores internos presentan variabilidad en cuanto a la predicción de los coeficientes de digestión, pudiendo estar relacionado con la especie forrajera evaluada (Penning y Johnson, 1983), por lo que el mayor contenido de lignina en la composición de los forrajes tropicales, en relación con los de climas templados, ofrecen un material prometedor para ser empleado como marcador interno para ensayos de digestibilidad, bajo nuestras condiciones.

Resultados de nuestro laboratorio (Lachmann *et al.*, 1999; datos no publicados) han mostrado que la LDA presentó una recuperación cercana al 100% (cuadro 2), lo que permite inferir, tomando en cuenta que el uso de la técnica de las proporciones se basa en la recuperación completa del marcador, que sus estimaciones de digestibilidad deben presentar como resultado, valores muy cercanos a los estimados por CTH.

Cuadro 2. Comparación de las medias para métodos con desviaciones estándar sin diferencia significativa entre los métodos de colección total y lignina detergente ácido (P<0.01, n=12).

	Calculado en base a la χ				Calculado en base a la m			
	χ	t cal.	t tab.	Diferencia	m	t cal.	t tab.	Diferencia
DMSCTH	38.93	0.44	3.11	ns	39.42	1.16	3.11	ns
DMSLDA	38.63				38.59			
DMOCTH	41.81	0.69	3.11	ns	41.58	0.35	3.11	ns
DMOLDA	41.27				41.30			
DPCCTH	45.23	0.47	3.11	ns	43.70	0.21	3.11	ns
DPCLDA	44.72				43.32			

Ecuaciones de Corrección para el Cálculo de la Digestibilidad con la LDA.

Ningún marcador es ideal (Streeter, 1969; Undersander *et al.*, 1987; Huhtanen *et al.*, 1994; Van Soest, 1994) y sus coeficientes de digestión estimados pueden ser ajustados introduciendo factores de corrección para la digestibilidad del marcador determinada por colección total, siempre y cuando se trate de un componente natural del alimento y no de sustancias metabólicas o sustancias metálicas añadidas, como el óxido de cromo (Van Soest, 1994).

Para que este ajuste sea válido, además de cumplir con el requisito de ser un marcador interno, debe hacerse basado en la premisa de que el análisis es preciso y las pérdidas son constantes. Estas ecuaciones no deben tomarse como algo definitivo sino como el primer paso para el uso rutinario de este método en condiciones tropicales.

Con esta finalidad se ejecutó un análisis de correlación entre los coeficientes de digestión estimados por ambos métodos para una misma fracción (Lachmann *et al.*, 1999; datos no publicados), obteniéndose una alta correlación y calculándose posteriormente las ecuaciones de predicción para estimar el valor de la digestibilidad de cada una de las fracciones en estudio de la CTH a partir del valor estimado por el método de la LDA.

Las ecuaciones de predicción generadas fueron las siguientes:

Digest. MS CHT =	1.0077 DMSLG	($r^2 = 0.99$, C (p) = 1.00, P < 0.0001)
Digest. MO CHT =	1.0133 DMOLG	($r^2 = 0.99$, C (p) = 1.00, P < 0.0001)
Digest. PC CHT =	1.0114 DPCLG	($r^2 = 0.99$, C (p) = 1.00, P < 0.0001)

Estas ecuaciones son válidas únicamente al replicar las condiciones experimentales en las cuales se basó su determinación (Lachmann *et al.*, 1999; datos no publicados). Aún ecuaciones derivadas de ensayos de digestión en serie de varios forrajes con animales con alimentación controlada no necesariamente se aplican a diferentes tipos de forrajes con animales a pastoreo (Streeter, 1969).

El Óxido de Cromo como Marcador Externo para Ensayos de Digestibilidad

El óxido de cromo en polvo es uno de los muchos compuestos con cromo con características de indicador inerte (Kotb y Luckey, 1972) destacado como el más antiguo y comúnmente empleado de los marcadores externos (Pond *et al.*, 1987; Basurto y Tejada, 1992; Merchen, 1993; Van Soest, 1994). Es prácticamente insoluble en agua y no se asocia con los componentes de la ingesta (Pond *et al.*, 1987) viaja en la digesta en forma de suspensión, a una velocidad diferente a las correspondientes tanto a la fase líquida como a la fase sólida o particulada, pudiendo formar un sedimento en el retículo-rumen y ser transferido esporádicamente al tracto gastrointestinal (Merchen, 1993) lo que afecta directamente el patrón de excreción del marcador.

El óxido de cromo, ofrece la ventaja de tener una recuperación completa en las heces y, existen varios métodos analíticos confiables para su determinación, resultando de gran utilidad para pruebas de digestibilidad (Merchen, 1993). Sin embargo, otros investigadores han reportado que su determinación es tediosa y presentan dudas sobre lo adecuado de los métodos de estimación (Kotb y Luckey, 1972). Además, el empleo del óxido de cromo en ensayos con rumiantes, ofrece resultados menos precisos debido a su excreción fecal irregular (Crampton y Harris, 1969).

La técnica depende básicamente del muestreo, de manera que la variación diaria de la excreción fecal del marcador no contribuya como una fuente de error (Van Soest, 1994). Se ha reportado efecto del forraje consumido por los animales sobre el comportamiento del marcador, aún en condiciones de liberación continua del cromo a nivel ruminal (Hollingsworth *et al.*, 1995), por lo que las variaciones diurnas en la excreción del óxido de cromo han limitado su aprovechamiento (Anzola *et al.*, 1981; Laredo *et al.*, 1988).

Para establecer un calendario adecuado de toma de muestras, la medición del patrón de excreción diurno puede proveer una valiosa información. Es importante tomar en cuenta que la toma de muestras rectales para estos fines no trabaja bien, debido a que el óxido de cromo en polvo cuando es suspendido en agua, por su densidad y tamaño de partícula, tiende a ser un líquido pesado, por lo que se asocia en su movimiento con la fracción líquida (Van Soest, 1994).

Al empleo del óxido de cromo debe añadirse un especial cuidado en su manipulación, ya que se encuentra identificado como un elemento carcinógeno (Pond *et al.*, 1987).

La Fibra Cromo Mordente como Marcador Externo para Ensayos de Digestibilidad

El mordenteo con cromo ha sido ampliamente empleado (Pond *et al.*, 1987; Van Soest, 1994). Este procedimiento fue desarrollado para atrapar el Cr en la fibra vegetal a través de la formación de enlaces coordinados, permaneciendo a lo largo del proceso digestivo en rumiantes (Udén *et al.*, 1980). Por lo que tiene un alto valor como marcador tanto para estudios de digestibilidad como para determinación del avance de la ingesta (Merchen, 1993).

Esta metodología, señala una adición de Cr entre el 12 y el 14% del peso de la fibra para su incubación. Sin embargo, se ha reportado un aumento de la densidad de la fibra marcada y en consecuencia la alteración de su tasa de pasaje en relación a la fibra original (Coleman *et al.*, 1984; Ehle *et al.*, 1984a; Ramanzin *et al.*, 1991). Uno de los principales problemas que pueden presentarse con los marcadores es que su velocidad de pasaje a través del tracto gastrointestinal, sea diferente a la de la ingesta, lo que podría producir estimaciones erradas (Church y Pond, 1994).

Se ha reportado que en la medida que aumenta la concentración de Cr en la solución empleada para el mordenteo de la fibra, aumenta el contenido de Cr fijado, al igual que la densidad de la fibra marcada, incrementando la tasa de pasaje de dichas partículas en el rumen, en relación con la tasa de pasaje de la fibra presente en la dieta (Ehle, 1984b).

Una densidad de 2,08 g/ml del marcador es suficiente para depositarse en el fondo del rumen y retardar el pasaje, debido a la baja tasa de recambio, por lo que se recomienda el uso de bajos contenidos de Cr para minimizar el efecto sobre la densidad y la tasa de pasaje de la fibra (Ehle *et al.*, 1984a). Este problema ha sido controlado con la adición de Cr para la incubación en sólo un 6 a 8% del peso de la fibra (Pond *et al.*, 1987); no obstante, estudios posteriores han recomendado el uso de concentraciones de Cr entre 2 y 4% (Ramanzin *et al.*, 1991).

Otro problema lo constituyen las variaciones diurnas en la excreción del marcador, por lo que se recomienda tomar en cuenta el patrón de recuperación del marcador como una información de apoyo para fijar los muestreos (Van Soest, 1994). La toma de muestras rectales para la determinación de la curva de excreción del marcador es una decisión acertada cuando se trata de fibra mordenteada (Van Soest, 1994).

Selección de los Animales para Ensayo

Las pruebas de digestibilidad se realizan durante periodos cortos de tiempo, con un control minucioso sobre la dieta ofrecida y sobre el animal, por lo que generalmente son suficientes de 4 a 6

animales por tratamiento para fines estadísticos (Church y Pond, 1994). Si las pruebas se realizan con animales en confinamiento, en lugar de a pastoreo, puede reducirse el número de animales a usar, manteniendo el mismo nivel de precisión (Wallace y Van Dyne, 1970), concordando con reportes que afirman que al comparar la variabilidad de los coeficientes de digestión obtenidos entre animales a pastoreo y animales en confinamiento, la variabilidad a pastoreo fue 50% mayor (Van Dyne y Lofgreen, 1964). Al utilizar varios animales se obtienen valores promedios que ayudan a reducir las variaciones individuales (Bondi, 1989).

Manejo de los Animales para Ensayo

Luego de la selección de los animales para ensayo se inicia la fase de acostumbramiento, la cual tiene como finalidad limpiar el aparato digestivo de los residuos de alimento consumido antes de comenzar el ensayo, que el animal se adapte a su nueva dieta (Church y Pond, 1994) y al manejo diario. Este periodo tiene una duración mínima de dos semanas, especialmente en rumiantes, donde son necesarios entre ocho y diez días para eliminar los residuos de la dieta previa (Bondi, 1989). Sin embargo, al emplear forrajes muy toscos o de baja calidad, se sugiere un periodo preliminar de al menos 30 días para el ajuste (Van Keulen y Young, 1977).

Los niveles de consumo de la ración en estudio deben ser ajustados durante un largo periodo de tiempo para que la excreción se haga constante y sea representativa de la dieta en estudio durante el muestreo, siendo válido únicamente para periodos de colección de varios días que permitan balancear las fluctuaciones interdiarias de consumo y excreción (Crampton y Harris, 1969). Durante el período de acostumbramiento se establecen los niveles de consumo de los animales para evitar fluctuaciones drásticas en la excreción (Merchen, 1993).

En el caso de la CTH en jaulas de colección el animal debe acostumbrarse a la jaula, al arnés y a la bolsa colectora. Si se emplean marcadores externos con suministro vía oral, los animales deben ser acostumbrados a este manejo. Para la CTH, los animales son alimentados con una ración de composición conocida, en cantidad fija durante varios días, se colectan las heces y posteriormente se procede a su análisis para cuantificar el contenido de los componentes en estudio (Church y Pond, 1994).

En ensayos con marcadores los animales son alimentados con raciones que contienen el marcador o son dosificados oralmente a intervalos regulares de tiempo (Merchen, 1993). Algunos investigadores han empleado, en ensayos de comparación de marcadores para estimar digestibilidad, un período de acostumbramiento de 10 días, seguido de siete días de colección durante los cuales se registra el peso diario total de las heces, orina y alimento consumido, y se toman muestras de los mismos para su futuro análisis (Cochran *et al.*, 1986). Sin embargo, el periodo de acostumbramiento puede prolongarse al trabajar con marcadores internos y forrajes de baja calidad, que pueden estar asociados con bajas tasas de pasaje (Penning y Johnson, 1983).

Las muestras fecales se toman bien sea luego de excretadas o directamente del recto, dependiendo del marcador empleado, a intervalos iguales determinados tomando en cuenta el momento de administración del marcador (Merchen, 1993) y la curva de excreción del mismo.

Para ensayos a pastoreo, los animales deben estar familiarizados con un constante manipuleo, ya que de lo contrario el estrés producido por el manejo puede causar alteraciones de la conducta animal como cambios en los patrones de consumo y de selección de la dieta en la pastura.

En este tipo de ensayo, los animales deben ser equipados con arnés y bolsa colectora, siete días antes del inicio del período de colección de heces, manteniendo la bolsa colectora abierta hasta dos o tres días antes de comenzar la colección. Las heces son vaciadas dos veces al día dependiendo del volumen excretado, durante siete días. Si existen varias repeticiones por tratamiento y ocurren pérdidas del material fecal, los datos del animal en cuestión son descartados para ese día (Doley *et al.*, 1994).

Dosificación de Marcadores

Un marcador nutricional puede ser tomado con el alimento después de ser mezclado con parte o con toda la ración, bebido, tomado en cápsulas o píldoras cuando su color o sabor son indeseables, e incluso colocado directamente en el rumen, todo esto en el caso de los marcadores externos. Los marcadores internos son simplemente ingeridos en cantidades conocidas como parte de la dieta (Kotb y Luckey, 1972).

El Cr_2O_3 empleado en ensayos a pastoreo ha sido normalmente administrado en cápsulas de gelatina una o dos veces por día (Doley *et al.*, 1994). La dosificación del marcador permite una estimación más consistente de la excreción fecal en relación al empleo de una dosis diaria (Langlands *et al.*, 1963b; Laredo *et al.*, 1988, Owens y Hanson, 1992). Sin embargo, rara vez la cantidad de marcador administrado coincide con la cantidad excretada (Doley *et al.*, 1994).

La administración de fibra mordenteada con Cr en cápsulas de gelatina, normalmente se realiza con ayuda de un lanza bolos (Pond *et al.*, 1987; Pond *et al.*, 1989), en caso de los animales estar fistulados a nivel de esófago, las cápsulas son colocadas directamente en él (Pond *et al.*, 1989).

Se han reportado problemas para establecer con precisión la dosis de fibra marcada administrada a los animales en un tiempo determinado, debido a que porciones de la fibra marcada (< 5 g) han sido regurgitadas y eliminadas por animales al utilizarse más de 10 cápsulas por dosis (Pond *et al.*, 1989).

Es importante tomar en cuenta el momento de dosificación del marcador en relación con la hora de suministro del alimento, considerando que la ingestión estimula los movimientos ruminales. En la medida que el material consumido sea más denso, tiende a ubicarse en el fondo del saco, por lo que la intensidad de los movimientos ruminales aumenta. Esto implica que el efecto sobre la motilidad del rumen que tiene el consumo de una dieta alta en fibra, es diferente al producido por una dieta a base de harinas, partiendo de que en la medida que aumenta la densidad de las partículas aumenta el movimiento ruminal (Ehrlein, 1979 y Deswysen y Ehrlein, 1981, citados por Pond *et al.*, 1989).

Estudios de la motilidad ruminal y movimiento de las partículas de la ingesta de harinas marcadas han reportado que las cápsulas con marcadores entran al retículo-rumen en la misma forma que son administradas. Luego son forzadas por los movimientos dorsales y caudales, constituyendo las partículas marcadas, parte de la masa formada en el saco dorsal del retículo-rumen y comienzan a mezclarse con el resto del material presente en este compartimiento. Las contracciones del retículo-

rumen aumentan durante el consumo de alimento, por lo que el bolo previamente presente en el retículo-rumen es expuesto a mayor movimiento y posiblemente es mezclado con mas efectividad. Las cápsulas suministradas al finalizar la ingestión del alimento no son forzadas por los movimientos dorsales y caudales, ni mezclados con el alimento previamente consumido, debido que al finalizar la ingestión ocurre una reducción de los movimientos ruminales y por lo tanto el mezclado es deficiente (Ehrlein, 1979, citado por Pond *et al.*, 1989).

Algunos reportes de Comparación de Métodos para Ensayos de Digestibilidad

La evaluación de diferentes técnicas usadas en estudios de digestión, surge de la necesidad de simplificar los procedimientos, reducir la labor y costos de las determinaciones. El mas popular de los métodos evaluados, es el método de las proporciones utilizando materiales inertes como marcadores, y son diversos los resultados encontrados (Kane *et al.*, 1950).

Una experiencia de comparación directa de los coeficientes de digestibilidad, en vacas en producción, con alfalfa de segunda cosecha, conservada como ensilaje, heno en pie y heno en granero, obtenidos usando lignina u óxido de cromo como marcadores, con los estimados por colección total de heces, reporta que los coeficientes de digestibilidad estimados por los diferentes métodos fueron bastantes cercanos, sin detectar diferencia estadística para las estimaciones de digestibilidad de MS, PC y EE; con recuperaciones satisfactorias de la lignina y el óxido de cromo, resaltando, la necesidad de evaluar la lignina antes de usos posteriores (Kane *et al.*, 1950). Aún cuando otros investigadores han empleado la lignina como marcador con el método de las proporciones con bastante éxito (Swift *et al.*, 1947; Forbes y Garrigus, 1948), son varios los reportes de experiencias insatisfactorias (Elam *et al.*, 1962; Wilson *et al.*, 1971).

En relación con el uso del óxido de cromo, algunos reportes demuestran que no siempre sus estimaciones han sido exitosas. Un ensayo llevado a cabo para comparar los coeficientes de digestibilidad obtenidos por CTH y óxido de cromo como marcador, en raciones de sólo concentrado en ovinos, se encontró que los valores obtenidos con el método de CTH fueron significativamente superiores a los obtenidos al emplear el óxido de cromo como marcador con la técnica de las proporciones (Lassiter *et al.*, 1966), reafirmando observaciones realizadas por otros investigadores (Clanton, 1962).

Es importante destacar reportes que evidencian que la eficiencia de los métodos alternativos a la colección total, esta sujeta a las condiciones experimentales y altamente afectada por la dieta a evaluar, su naturaleza física (Clanton, 1962) y la especie animal utilizada. En este sentido, se llevó a cabo un ensayo comparativo entre once técnicas para la determinación de la digestibilidad con seis dietas diferentes suministradas a carneros. Las técnicas evaluadas fueron: (I) *in vitro*, (II) *in situ* por 48 h, (III) *in situ* por 72 h, (IV) *in situ* por 48 h + digestión con pepsina, (V) *in vitro* por 96 h + fibra detergente neutro (FDN), (VI) *in vitro* por 144 h + FDN, (VII) *in vitro* por 96 h + fibra detergente ácido (FDA), (VIII) *in vitro* por 144 h + FDA, (IX) proporciones con lignina detergente ácido (LDA), (X) tratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino antes de LDA, (XI) tratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino antes de la extracción de FDA para LDA; y las dietas evaluadas: (a) Heno de fescue picado *ad libitum*, (b) Heno de alfalfa *ad libitum*, (c) heno de fescue restringido, (d) heno de alfalfa restringido, (e) 75% heno de fescue + 25% harina de soya y (f) 60% heno de alfalfa + 40% maíz triturado. Se obtuvo, en relación al método de las proporciones, que sólo en la evaluación con heno de fescue picado, la LDA mostró una predicción precisa de la digestibilidad *in*

vivo, pero no para las dietas restantes, por lo que se sugiere precaución con el uso de esta técnica, ya que ningún método es preciso en sus estimaciones bajo todas las condiciones (Judkins *et al.*, 1990), reafirmando resultados reportados por otros investigadores con experiencias en este estilo (Wilson *et al.*, 1971; Cochran *et al.*, 1986).

Estudios realizados para comparar la efectividad de métodos alternativos a la colección total de heces para ensayos de digestibilidad han sido realizados en reiteradas oportunidades. Sin embargo, la mayor parte de la información producida es originaria de condiciones ambientales diferentes a las nuestras.

En condiciones tropicales, una experiencia mejicana de evaluación de pulpa deshidratada de limón con ovinos mestizos de criollo (Mejicano) con Suffolk, con un peso promedio de 44 ± 6.4 kg, colocados en jaulas de colección, con arneses y bolsas colectoras, consumiendo una dieta de 11.3% de PC, no detectó diferencias estadísticas entre el método de colección total de heces y los métodos de digestión *in vitro* de Tilley y Terry y el empleo del óxido de cromo como marcador externo. El Cr_2O_3 presentó un bajo porcentaje de recuperación en las heces, con un coeficiente de variación del 20% (Basurto y Tejada, 1992) lo que evidencia que este método subestima ligeramente la digestibilidad en relación con la colección total de heces. La recuperación del Cr_2O_3 en las heces difícilmente coincide con la cantidad de marcador administrado, efecto que pudiera resultar en estimaciones imprecisas de la excreción fecal (Doley *et al.*, 1994).

Selección de un Método Analítico

Antes de que una metodología se emplee de forma rutinaria, hay que esforzarse por identificar las fuentes de error, usualmente una o más características deseables del método dependen de una serie de factores experimentales, lo que hace necesario algunos experimentos preliminares con el fin de su optimización, para conservar recursos y tiempo. Esto puede constituir un problema en extremo complejo (Miller y Miller, 1993).

Los análisis cuantitativos son herramientas básicas en todo laboratorio analítico, siendo de importancia los errores que aparezcan en ellos. Se dispone de variados instrumentos para realizar determinaciones, razón por la cual debe hacerse una cuidadosa elección del método a utilizar, bajo condiciones específicas de trabajo. Los datos obtenidos carecen de valor si no van acompañados de la estimación de su fiabilidad, por lo que la estadística proporciona formas de evaluar la fuente y magnitud del error presente en las determinaciones analíticas (Willard *et al.*, 1991; Miller y Miller, 1993).

Al comparar conjuntos de resultados obtenidos por dos métodos diferentes surgen varias preguntas, ¿Los dos valores medios son significativamente diferentes?, ¿Uno de los métodos es menos propenso a errores que el otro?, ¿Cuál de los dos valores medios está más cerca de la verdad?. Para responder estas preguntas y decidir si un método es o no adecuado, además de las pruebas de medias, el investigador puede valerse de algunos criterios cuantitativos, de los cuales se destacan como los más usados en análisis de fiabilidad, la precisión y la exactitud. Estos, se miden a través de parámetros de calidad, que permiten reducir el número de opciones para la selección (Miller y Miller, 1993; Skoog y Leary, 1996).

“La precisión de los datos analíticos, se define como el grado de concordancia mutua entre los datos que se han obtenido de una misma forma... ..mide el error aleatorio de un análisis” (Skoog y Leary, 1996:7), la influencia de los factores no controlados puede medirse a través la desviación estándar absoluta (DEA), la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV), y la varianza (S^2), empleados como parámetros de calidad (Pimentel, 1970; Skoog *et al.*, 1995; Skoog y Leary, 1996). Se asocia con la capacidad para reproducir los mismos valores en un conjunto de observaciones paralelas (Sienko y Plane, 1990; Willard *et al.*, 1991; Skoog *et al.*, 1995; Skoog y Leary, 1996).

La exactitud se define como la concordancia de una medición con el valor real aceptado (Christian, 1981; Sienko y Plane, 1990; Willard *et al.*, 1991; Whitten *et al.*, 1995; Skoog *et al.*, 1995; Skoog y Leary, 1996), describe la veracidad de un resultado experimental, pero sólo el contar objetos es una medición exacta. Se expresa en términos de error absoluto o de error relativo, ambos tienen signo, si el signo es positivo indica que el resultado de la medición es mayor que el valor real y si es negativo lo contrario (Skoog y Leary, 1996). Esta estimación es posible efectuando comparaciones con una muestra estándar de composición conocida, cuyo valor dependerá de una medición que tenga algún límite de certidumbre (Christian, 1981).

Para obtener resultados confiables a partir de un método analítico, todos los esfuerzos se dirigen a identificar las fuentes de error, para ser eliminadas, reducidas o ajustadas. Los errores pueden clasificarse básicamente en aleatorios y sistemáticos o de procedimiento. Los primeros, residen en la naturaleza intrínsecamente incierta de las técnicas de medición, estando presente en cada análisis, por lo que siempre que se repitan varias mediciones analíticas de una muestra los valores obtenidos evidenciarán dispersión, reflejada en la imprecisión de los datos. Es posible reducir el error aleatorio de un análisis a un valor cercano a cero, pero resulta impráctico en la mayoría de los casos, ya que para ello se requiere repetir el análisis 20 o más veces, lo que se traduce en una alta inversión de tiempo y recursos. Generalmente se realizan dos o tres repeticiones, por lo que se espera un error aleatorio significativo (Skoog y Leary, 1996). Los errores sistemáticos, presentan un valor definido, una causa asignable, hacen que los resultados se desvíen constantemente en la misma magnitud y sentido respecto a los valores esperados, pudiendo ser frecuentemente minimizados al incluir modificaciones al procedimiento analítico, estos errores determinan la exactitud de una técnica de medición. Por tanto el error presente en la media de un conjunto de mediciones repetidas es la suma de estos dos tipos de error (Willard *et al.*, 1991; Miller y Miller, 1993; Skoog y Leary, 1996).

Los errores sistemáticos no pueden detectarse con una simple repetición de mediciones, ya que si no se conoce de antemano el valor verdadero de un análisis, podría existir un error muy grande y pasar desapercibido (Miller y Miller, 1993). Estos, son de tres tipos: instrumentales, personales y de método. Los instrumentales se suelen detectar y corregir mediante una calibración con materiales estándares adecuados, la respuesta de los instrumentos analíticos varía con el tiempo debido al desgaste, la corrosión y el trato inadecuado. Los personales, se introducen en las mediciones debido a los juicios que el experimentador debe hacer, “la mayoría de las personas independientemente de su honestidad, tienen una tendencia natural a estimar las lecturas de una escala en una dirección que mejore la precisión del conjunto de resultados, o los haga caer cerca de un valor preconcebido de la media” (Skoog y Leary, 1996:818). Estos errores pueden minimizarse si se trabaja con cuidado y auto disciplina. Los errores de método, usualmente se originan del comportamiento físico y/o químico no ideales de los reactivos y reacciones en las cuales se basa el análisis. Los errores sistemáticos de método son los más difíciles de detectar y corregir, siendo la validación del método analítico la forma más segura de hacerlo (Skoog y Leary, 1996).

Una de las propiedades mas importantes de un método analítico es que carezca de errores sistemáticos. Sin embargo los errores aleatorios no permiten que el valor medido sea exactamente igual al valor conocido, aunque no hubiese error sistemático. Para definir si la diferencia entre la cantidad medida y la conocida es atribuible a los errores aleatorios se aplica una prueba de significación, para comprobar la veracidad de la hipótesis nula, partiendo de que el método no se encuentra sujeto a errores sistemáticos. El término nulo se emplea para indicar que no existe mas diferencia entre el valor conocido y el observado que la que se debe a los errores aleatorios, utilizando la estadística para calcular la probabilidad de este evento. El valor crítico de "t" para cada nivel de significación concreto, se encuentra tabulado. Si el valor de "t" calculado es menor que el valor crítico tabulado no hay evidencia de errores sistemáticos. Otra forma de comparación de las medias de un nuevo método en relación con un método de referencia, es la comparación de medias muestrales siempre que las desviaciones entre medias no presenten diferencias significativas, partiendo de la hipótesis nula que ambos métodos dan el mismo resultado, estimando una desviación estándar conjunta para el cálculo del valor de "t". Es común que los métodos analíticos se apliquen en un amplio intervalo de condiciones, a menudo se compara un método nuevo con uno estándar, ocurriendo con frecuencia que deben compararse dos métodos de análisis por medio del estudio de muestras substancialmente dependientes, en este caso se emplea la prueba de "t" pareada (Miller y Miller, 1993).

Las pruebas de medias se usan para detectar errores sistemáticos y las comparaciones de desviaciones estándar para detectar problemas aleatorios. Estas últimas, pueden tener dos formas: probar si un método es mas preciso que el otro o probar si ambos métodos difieren en su precisión, para ello se emplean las pruebas de una cola o de dos colas respectivamente. Para la comparación de las varianzas se emplea la prueba de F, partiendo de la hipótesis que estas son iguales, si es verdadera, entonces el valor de la razón de las varianzas se aproxima a uno (Miller y Miller, 1993).

Esto es aplicable tanto a la química analítica como a cualquier campo de estudio en el que se obtengan resultados numéricos experimentales (Miller y Miller, 1993) razón por la cual se aplicaron los criterios antes descritos en la comparación entre los métodos en estudio, para estimar la digestibilidad de una ración en ovinos, y seleccionar el método mas adecuado, en las condiciones de trabajo descritas en la sección de materiales y métodos, aún cuando tradicionalmente este tipo de ensayos en el área de la nutrición animal, han sido ejecutados con base a pruebas de medias para comparar los valores estimados por métodos opcionales propuestos en relación con los estimados por un método aceptado.

Literatura citada

- Anzola, V. H., M. A. Laredo, M. E. Alacón, F. Gómez. 1981. Consumo voluntario de tres variedades de raigrás en pastoreo por ovinos, mediante el uso de óxido de cromo. *Rev. ICA.* 16(1) :11 - 19.
- Basurto, R. e I. Tejada de Hernández. 1992. Digestibilidad aparente de la pulpa deshidratada de limón. Comparación de métodos para estimarla. *Téc. Pec. Méx.* 30(1):13 - 22.
- Brandyberry, S. D., R. C. Cochran, E. S. Vanzant and D. L. Harmon. 1991. Technical note: Effectiveness of different methods of continuous marker administration for estimating fecal output. *J. Anim. Sci.* 69:4611 - 4616.
- Bondi, A. A. 1989. *Nutrición Animal.* Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 546 p.
- Cain, R. 1981. The uptake and catabolism of lignin-related aromatic compounds and their regulation in microorganisms. In: T. Kent Kirt, Takayoshi Higuchi and Hou-min Chang (Eds). *Lignin biodegradation: Microbiology, chemistry, and potential applications.* Vol 1. 21 p.
- Christian, G. 1981. *Química analítica.* Segunda edición. Editorial Limusa, S. A. México. 684 p.
- Church, D. C. y W. G. Pond. 1994. *Fundamentos de nutrición y alimentación de animales.* Editorial Limusa, S. A. de C. V. Grupo Noriega Editores. México. pp 438.
- Clanton, D. C. 1962. Variation in chromic oxide methods of determining digestibility of hand - fed beef cattle rats. *J. Anim. Sci.* 21: 214 - 218
- Cochran, R. C., D. C. Adams, J. D. Wallace and M. L. Galyean. 1986. Predicting digestibility of different diets with internal markers: Evaluation of four potential markers. *J. Anim. Sci.* 63:1476 -1483.
- Coleman, W. S., B. C. Evans and G. W. Horn. 1984. Some factors influencing estimates of digesta turnover rate using markers. *J. Anim. Sci.* 58:979 - 986.
- Crampton, E. W. and L. E. Harris. 1969. *Applied Animal Nutrition.* 2nd edition. W. H. Freeman and Company. San Francisco. p 753.
- Dearriba, J. 1988. *Fisiología y bioquímica de la digestión en el rumiante.* Editorial Oriente. Santiago de Cuba. p 83.
- Doley, P. T., T. Casson, L. Cransberg and J. B. Rowe. 1994. Faecal output of grazing sheep measured by total collection or using chromium sesquioxide. *Small Ruminant Research.* 13:231 - 236.
- Ehle, F. R., F. Bas, B. Barno, R. Martin and F. Leone. 1984a. Particulate rumen turnover rate measurement as influenced by density of passage marker. *J. Anim. Sci.* 67:2910 - 2913.
- Ehle, F. R. 1984b. Influence of feed particle density on particulate passage from rumen of Holstein cow. *J. Dairy Sci.* 67:693.
- Elam, C. J., P. J. Reynolds, R. E. Davis and D. O. Everson. 1962. Digestibility studies by means of chromic oxide, lignin and total collection techniques with sheep. *J. Anim. Sci.* 21:189 - 192.
- Fahey, G. C., G. A. McLaren and J. E. Williams. 1979. Lignin digestibility by lambs fed both low quality and high quality roughages. *J. Anim. Sc.* 48: 941 - 946.
- Fahey, G. C. y H. G. Jung. 1983. Lignin as marker in digestion studies: A review. *J. Anim. Sci.* 57:220 - 225.
- Forbes, R. M., and W. P. Garrigus. 1948. Application of a lignin ratio technique to the determination of the nutrient intake of grazing animals. *J. Anim. Sci.* 7: 373 - 382.
- Huhtanen, P., K. Kaustell and S. Joakkola. 1994. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:211 - 227.
- Hollingsworth, K. J., D. C. Adams, J. J. Klopfenstein, J. Lamb and G. Villalobos. 1995. Supplement and forage effects on fecal output estimates from an intra-ruminal marker device. *J. Range Manage.* 48:137 - 140.
- Judkins, M. B., L. J. Krysl and R. K. Barton. 1990. Estimating diet digestibility: A comparison of 11 techniques across six different diets fed to rams. *J. Anim. Sci.* 68:1405 - 1415.
- Kane, E. A., W. C. Jacobson and L. A. Moore. 1950. A Comparison of techniques used in digestibility studies with dairy cattle. *J. Nutr.* 41: 583 - 596.
- Kotb, A. R. and T. D. Luckey. 1972. Markers in nutrition. *Nutrition abstracts and reviews.* 42: 813 - 845.
- Lachmann, M., O. Araujo Febres, y J. Vergara López. 1999.** Evaluación de la lignina detergente ácido como marcador para la determinación de la digestibilidad. *Revista Científica, FCV-LUZ.* (En arbitraje).

- Langlands, J. P., J. L. Corbett, I. McDonald and G. W. Reid. 1963 b. Estimation of the faeces output of grazing animals from the concentration of chromium sesquioxide in a sample of faeces. 1. Comparison of estimates from samples taken at fixed times of day with faeces outputs measured directly. *Brit. J. Nutr.* 17: 211 - 218.
- Laredo, M. A., H. J. Anzola V. y F. Segura. 1988. Cloruro de iterbio y óxido de cromo como indicadores de excreción fecal y consumo de heno. *Rev. ICA.* 23:303 - 313.
- Lascano, C., R. Borel, R. Quiroz, J. Zorrilla, C. Chaves y C. Wernli. 1990. Recomendaciones sobre metodología para la medición de consumo y digestibilidad *in vivo*. En: M. E. Ruiz y A. Ruiz (Eds.). *Nutrición de Rumiantes: Guía metodológica de investigación.* IICA-ALPA-RISPAL. San José, Costa Rica. 159 - 168 p.
- Lassiter, J. W., Vernon Alligood and C. H. McGauhey. 1966. Chromic oxide as an index of digestibility of all - concentrate rations for sheep. *J. Anim. Sci.* 25: 44 - 47.
- Merchen, N. R. 1993. Digestión, absorción y excreción en los rumiantes. En: D. C. Church (Ed.). *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición.* Tomo I. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 191 - 223.
- Miller, J. C. y J. N. Miller. 1993. *Estadística para química analítica.* Segunda edición. Adison-Wesley-Iberoamericana, S. A. Wilmington, Delaware. E. U. A. 211 pp.
- Muntifering, R. B. 1982. Evaluation of various lignin assays for determining ruminal digestion of roughages by lambs. *J. Anim. Sci.* 55: 432 - 438.
- Ortega C., M^a E. 1987. Factores que afectan la digestibilidad del alimento en rumiantes. Estudio recapitulativo. *Vet. Méx.* 18: 55 - 60.
- Owens, F. N. and C. F. Hanson. 1992. Symposium: External and internal markers. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *J. Dairy Sci.* 75: 2605 - 2617.
- Penning, P. D. and R. H. Johson. 1983. The use of internal markers to estimate herbage digestibility and intake. 1. Potentially indigestible cellulose and acid insoluble ash. *J. Agric. Sci., Camb.* 100: 127 -131.
- Pimentel, F. 1970. *Curso de estadística experimental.* Livraria Nobel S. A. São Paulo. Brasil. 468 p.
- Pond, K. R., J. C. Burns and D. S. Fisher. 1987. External markers - Use and methodology in grazing studies. *Proceeding, Grazing livestock nutrition conference.* North Carolina State University and USDA, ARS. 49 - 53 p.
- Pond, K. R., W. C. Ellis, J. H. Matis and A. G. Deswysen. 1989. Passage of chromium-mordanted and rare earth-labeled fiber: time of dosing kinetics. *J. Anim. Sci.* 67:1020 - 1028.
- Porter, P. and A. G. Singleton. 1971. The degradation of lignin and quantitative aspects of ruminant digestion. *Br. J. Nutr.* 25: 3 - 14.
- Ramanzin, M., G. Bittante and L. Bailoni. 1991. Evaluation of different chromium mordanted wheat straws for passage rate studies. *J. Dairy Sci.* 74: 2989 - 2996.
- Reeves, J. B., III. 1988. Chemical assays for fiber, lignin, and lignin componentes: interrelationships and near infrared reflectance spectroscopic analysis results. *J. Dairy Sci.* 71:2976 - 2985.
- Reeves, J. B., III. 1993. Chemical studies on the 1. Composition of fiber fractions and lignin determination residues. *J. Anim. Sci.* 76: 120 - 128.
- Reeves, J. B., III. 1997. Relationships between crude protein and determination of nondispersible lignin. *J. Dairy Sci.* 80: 692 - 699.
- Reid, J. T., P. G. Woolfolk, W. A. Hardison, C. M. Martin, A. L. Brundage and R. W. Kaufmann. 1952. A procedure for measuring the digestibility of pasture forage under grazing condition. *J. Nutr.* 46:255 - 269.
- Scales, G. H., C. L. Streeter, A. H. Deham and G. M. Ward. 1974. A comparison of indirect methods of predicting *in vivo* digestibility of grazed forage. *J. Anim. Sci.* 38: 192 - 199.
- Sienko, M. y R. Plane. 1990. *Química. Principios y aplicaciones.* McGraw-Hill Interamericana de México, S. A. de C. V. México. 782 p.
- Skoog, D. y J. Leary. 1996. *Análisis instrumental.* Cuarta edición. McGraw-Hill Interamericana de España, S. A. España. 935 p.
- Skoog, D., D. West y F. Holler. 1995. *Química analítica.* Sexta edición. McGraw-Hill Interamericana de México, S. A. de C. V. México. 680 p.

- Streeter, Ch. L. 1969. A review of techniques used to estimate the *in vivo* digestibility of grazed forage. J. Anim. Sci. 29:757 - 768.
- Sullivan, J. T. 1955. Cellulose and lignin in forage grasses and their digestion coefficients. J. Anim. Sci. 14:710 - 717.
- Sunvold, G. D. and Cochran. 1991. Technical note: Evaluación of acid detergent lignin, alkaline peroxide lignin, acid soluble ash, and indigestible acid detergent fiber as internal markers for prediction of Alfalfa, Bromegrass, and Prairie hay digestibility by beef steers. J. Anim. Sci. 69:4951 - 4955.
- Swift, R. W., E. J. Thacker, A. Black, J. W. Bratzler and W. H. James. 1947. Digestibility of rations for ruminants as affected by proportions of nutrientes. J. Anim. Sci. 6:432 - 444.
- Titgemeyer, E. C. 1997. Desig and interpretation of nutrient digestion studies. J. Anim. Sci. 75: 2235 -2247.
- Udén, P., P. E. Colucci and P. J. Van Soest. 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passege studies. J. Sci. Food Agric. 31:625.
- Undersander, D. J., N. A. Cole, and C. H. Naylor. 1987. Digestibility by lambs of water-stressed alfalfa as determined by total collection or internal markers. J. Dairy Sci. 70: 1719 - 1723.
- Van Dyne, G. M., and G. P. Lofgreen. 1964. Comparative digestion of dry annual range forage by cattle and sheep. J. Anim. Sci. 23: 823 - 832.
- Van Keulen, J. and B. A. Young. 1977. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. J. Anim. Sci. 44:282 - 287.
- Van Soest, P. J. 1994. Nutritional Ecology of the ruminan. Cornell University Press. II Edición. 108 - 195 p.
- Wallace, J. D. and G. M. Van Dyne. 1970. Precision of indirect methods for estimating digestibility of forage consumed by grazing cattle. J. Range Manage. 26:424 - 430.
- Weir, W. C., J. H. Meyer and G. P. Lofgreen. 1959. Symposium on forage evaluation: VI. The use of the esophageal fistula, lignin, and chromogen techniques for stuying selective grazing and digestibility of range and pasture by sheep and cattle. Agron. J. 51: 235 - 237.
- Whitten, K., K. Gailey y R. Davis. 1995. Química general. Tercera edición. McGraw-Hill Interamerican de México, S. A. de C. V. México. 930 p.
- Willard, H., L. Merritt, Jr., J. Dean y F. Settle, Jr. 1991. Métodos instrumentales de análisis. Grupo Editorial Iberoamericana S. A. de C. V. México, D. F. 884 p.
- Wilson, A. D., W. C. Weir and D. T. Torell. 1971. Comparison of methods of estimating the digestibility or range forage and browse. J. Anim. Sci. 32: 1046 - 1050.