

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA (UN)  
INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA)  
PROGRAMA DE ESTUDIOS PARA GRADUADOS EN CIENCIAS AGRARIAS

COMPENDIO DE METODOS DE LABORATORIO EN NUTRICION ANIMAL

Por:

Jaime Rubio Uribe  
Estudiante Graduado

Bogotá, Colombia

1973

TRABAJO ESPECIAL

Presentado como requisito Parcial  
al Programa de Graduados de  
la Universidad Nacional y  
El Instituto Colombiano Agropecuario

## A G R A D E C I M I E N T O S :

El autor desea expresar sus sinceros agradecimientos al personal del Laboratorio Nacional de Nutrición del Instituto Colombiano Agropecuario, a cuyo apoyo y valiosa cooperación se debe en gran parte el contenido del presente trabajo. Así mismo, desea hacer público el reconocimiento de su admiración hacia el doctor José R. Maguiña V., compañero de promoción, por su cooperación desinteresada en la culminación y asesoría del mismo.

Al doctor Jaime Pineda Morales, por la magnífica oportunidad que me brindó al insinuarme este tema para cumplir con el Problema Especial, ya que ha sido una gran experiencia y la forma más eficiente de forjar la disciplina investigativa en el campo de la Nutrición Animal.

Finalmente el reconocimiento sincero para los doctores Ottomario Marin y L. Arturo Gil, Directores del Laboratorio, quienes permitieron el franco acceso para la utilización de equipo y reactivos.

## C O N T E N I D O

Página

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 1. Introducción                     | 1  |
| 2. Métodos Químicos                 | 3  |
| 3. Determinación del peso           | 5  |
| 3.1. Principio                      | 5  |
| 3.2. Equipo                         | 5  |
| 3.3. Procedimiento                  | 5  |
| 4. Determinación de Materia Seca ✓  | 7  |
| 4.1. Principio                      | 7  |
| 4.2. Equipo                         | 7  |
| 4.3. Procedimiento                  | 7  |
| 4.4. Cálculo                        | 7  |
| 5. Determinación de Ceniza ✓        | 9  |
| 5.1. Principio                      | 9  |
| 5.2. Equipo                         | 9  |
| 5.3. Procedimiento                  | 9  |
| 5.4. Cálculos                       | 10 |
| 6. Determinación de Extracto Etéreo | 11 |
| 6.1. Principio                      | 11 |
| 6.2. Equipo                         | 11 |
| 6.3. Reactivos                      | 11 |
| 6.4. Preparación                    | 12 |
| 6.5. Procedimiento                  | 12 |
| 6.6. Cálculos                       | 13 |
| 7. Determinación de Fibra cruda     | 14 |
| 7.1. Principio                      | 14 |

C O N T E N I D O

Página

|  |    |
|--|----|
| 7.2. Equipo  | 14 |
| 7.3. Reactivos   | 14 |
| 7.4. Procedimiento   | 15 |
| 7.5. Cálculos  | 16 |
| 8. Determinación de Proteína Cruda a partir de la<br>Determinación del Nitrógeno por el método Kjeldahl. | 17 |
| 8.1. Principio   | 17 |
| 8.2. Equipo  | 17 |
| 8.3. Reactivos   | 18 |
| 8.4. Procedimiento   | 18 |
| 8.4.1. Digestión   | 18 |
| 8.4.2. Destilación   | 19 |
| 8.4.3. Titulación  | 19 |
| 7.5. Cálculos  | 19 |
| 8.5.1. Proteína Cruda  | 20 |
| 9. Determinación del extracto libre de Nitrógeno<br>(E.L.N.)   | 21 |
| 9.1. Principio   | 21 |
| 9.2. Cálculo   | 21 |
| 10. Determinación de Energía Bruta   | 22 |
| 10.1. Principio  | 22 |
| 10.2. Equipo   | 22 |
| 10.3. Reactivos  | 23 |
| 10.4. Procedimiento  | 23 |
| 10.5. Cálculos   | 25 |

C O N T E N I D O

Página

|   |    |
|---|----|
| 11. Método de Van Soest para la Determinación<br>de Fibra Detergente Neutro Detergente Acido. | 26 |
| 11.1. Principio   | 26 |
| 11.2. Equipo  | 26 |
| 11.3. Reactivos   | 27 |
| 11.4. Procedimiento Analítico   | 29 |
| 11.5. Detergente Neutro (Paredes celulares)   | 29 |
| 11.6. Fibra Detergente Acido  | 30 |
| 11.6.1. Procedimiento   | 31 |
| 11.6.2. Cálculo de F.A.D.   | 32 |
| 11.7. Lignina Acido detergente  | 32 |
| 11.7.1. Principio   | 32 |
| 11.7.2. Equipo  | 32 |
| 11.7.3. Reactivos   | 32 |
| 11.7.4. Procedimiento   | 33 |
| 11.7.5. Cálculos  | 34 |
| 12. Determinación de la Digestibilidad <u>in vitro</u><br>de Van Soest                        | 35 |
| 12.1. Principio   | 35 |
| 12.2. Aparatos  | 35 |
| 12.2.1. Materiales  | 35 |
| 12.3. Descripción   | 36 |
| 12.4. Reactivos   | 36 |
| 12.5. Procedimiento   | 37 |
| 12.6. Cálculos  | 39 |

C O N T E N I D O

Página

|   |    |
|---|----|
| 13. Determinación de Minerales por Espectrofotometría de Absorción Atómica. | 40 |
| 13.1. Calcio  | 41 |
| 13.2. Reactivos   | 41 |
| 13.3. Procedimiento   | 42 |
| 13.4. Cálculos  | 42 |
| 14. Bibliografía  | 44 |

## 1. INTRODUCCION

La unificación de los métodos que se utilizan para realizar los análisis químicos de los insumos o materias primas empleados en Nutrición Animal, hace necesaria la divulgación de un Manual de Técnicas Aprobadas de Laboratorio.

Hasta el presente, el método empleado para el análisis aproximado de los alimentos concentrados y de los forrajes, ha sido el de Weende, el cual fue desarrollado en Alemania por Henneberg y Stohmann en 1960. Este es el método aceptado hoy por la A.O.A.C. Dicho método ha sido impugnado, debido sobre todo, al empirismo con el que se expresa el porcentaje de Fibra y el Extracto Libre de Nitrógeno. Debido a ello, existen casos en los cuales se encuentra una digestibilidad de la fibra muy alta, lo que hace pensar que aparte de la fibra, en ésta fracción se deben encontrar otros nutrientes los cuales no son expresados con dicho análisis.

Desde los primeros años de la década del 60, muchos autores, entre los que se cuenta Van Soest, (7, 8, 9, 10)\* se han preocupado por identificar los componentes que el análisis de Weende señala como fibra y extracto libre de Nitrógeno.

Es por ello por lo que en el presente informe se explica el método de Van Soest conocido como el método Fibra Detergente Neutro (FDN) y Fibra Detergente Acido (FDA) (3, 4, 7, 8, 9, 10).

---

\* Los números entre paréntesis corresponden a los números de la bibliografía.

También se comenta y explica en forma breve, el método de la Digestibilidad "in vitro" de Van Soest, que modifica al método de Tilley y Terry en su segunda fase (3).

Se explica el uso de la Bomba colorimétrica para la obtención de la Energía Bruta de los alimentos (5).

El análisis de los principales minerales, como son: P, Ca, K, Mg, y Fe por fotometría, por medio del Spectronic 20 el primero y el empleo del Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin-Elmer para los restantes.

## 2. METODOS QUIMICOS

Los métodos químicos que se explican en el presente compendio, son métodos probados, para el análisis de los tejidos animales y plantas y se consideran satisfactorios en su exactitud y en el tiempo que se toma para desarrollarlos.

Los métodos son sólo guías susceptibles de introducirles modificaciones de acuerdo con las condiciones del Laboratorio donde se esté trabajando, así como también de acuerdo con la especificidad de los experimentos que se conduzcan.

En el análisis de Weende o método proximal, se tiene en cuenta la determinación de la humedad (Materia seca), extracto etéreo o grasa, proteína cruda, ceniza, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno o carbohidratos solubles, tanto en los alimentos con destino a uso humano como los que tienen destinación para el consumo de los animales.

Dichos análisis representan la base para efectuar otras determinaciones más específicas y para calcular el valor de los nutrientes digestibles totales (N.D.T.) de los alimentos, cuando se analizan también las heces y la orina en los ensayos de digestibilidad.

El sistema de nutrientes digestibles totales (N.D.T.) ha sido tradicionalmente usado para medir el contenido energético de los alimentos. Sin embargo ha sido recomendado últimamente que éste sistema sea sustituido por los métodos modernos de fraccionamiento de la energía de los nutrimentos conte-

nidos en los alimentos.

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

Para la valorización de los forrajes, el método de Van Soest está siendo preferido al método de Weende; otro análisis de gran importancia, es el de la digestibilidad de la materia seca in vitro.

### 3. LA DETERMINACION DEL PESO

#### 3.1. PRINCIPIO.

Para que la muestra no pierda humedad se debe mantener bien tapada, mientras se procede a pesarla.

La balanza ha sido indispensable en el estudio de la nutrición, desde el siglo XVIII, cuando fue introducida por Lavoisier. La pesada correcta de la muestra, es el procedimiento mas importante ya que si la muestra que se analiza, no se pesa correctamente no se obtienen resultados exactos y se corre el riesgo de introducir elementos de error que no se pueden eliminar ni en años. La balanza es la pieza mas importante de un Laboratorio.

#### 3.2. EQUIPO.

- a) Balanza analítica que lea hasta el cuarto decimal (0.0000)
- b) pesasustancias
- c) Desecador
- d) Cuchara de aluminio o de plástico
- e) Pinceles.

#### 3.3. PROCEDIMIENTOS.

Antes de empezar a pesar, cerciórese de que: la balanza esté a nivel; que todas las piezas estén en buenas condiciones, que la aguja oscile a distancias iguales a cada lado del punto central, al soltarse el brazo y los platillos, que la aguja esté en cero al descansar el brazo

y al descansar los platillos sobre las trabas. Pese el pesasustancias (papel de filtro, crisol de aluminio o botella para pesar), anote el peso, agregue la muestra hasta obtener por diferencia la cantidad aproximada que se requiere para los diferentes análisis.

Para cada análisis debe pesarse dos veces para realizar la determinación por duplicado.

Al terminar de pesar una muestra, debe limpiarse bien la cuchara con pincel y verificar de nuevo el peso del pesasustancias previa limpieza del mismo.

No se deben pesar cantidades exactas de la muestra por ser más dispendioso y tener la posibilidad de incurrir en errores de muestreo.

#### 4. DETERMINACION DE MATERIA SECA

##### 4.1. 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.

##### 4.2. EQUIPO

- a) Estufa de vacío a 105°C
- b) Recipiente de aluminio con tapadera, de 50 m.m de diámetro.
- c) Desecador

##### 4.3. PROCEDIMIENTO.

- a) Cada vez que se va a colocar una muestra, se deben limpiar previamente los recipientes de aluminio con pincel suave. Tare después de limpiarles y lleve al desecador.
- b) Pese por diferencia 2.5 gms. de muestra en el recipiente de metal. Recuerde hacer por duplicado el peso de cada muestra, Coloque los recipientes en una bandeja, llévelos a la estufa a 105°C durante 4 horas. Los mejores resultados se obtienen con estufas, que permitan hacer vacío, equipadas con manómetro para graduarlo a 30 m.m de Hg. de presión.
- c) Después del tiempo convenido, desconecte el vacío, saque las muestras y colóquelas en un desecador hasta que se enfríen y luego proceda a pesarlas.

##### 4.4. CALCULO.

Porcentaje de Materia Seca:

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

o también

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

## 5. DETERMINACION DE GENIZA

### 5.1. PRINCIPIO.

Cuando se incinera una muestra, el residuo es la parte inorgánica que se denomina ceniza, el cual no se destruye por la temperatura del horno que es de 550°C.

### 5.2. EQUIPO.

- a) Horno de incineración (Mufla)
- b) Crisoles de porcelana
- c) Desecador

### 5.3. PROCEDIMIENTO.

Previamente se deben tarar los crisoles, para lo cual se limpian y se colocan en el horno durante media hora a 550°C. Se sacan del horno, se colocan en un desecador, se dejan enfriar y se pesan.

Pesar 2.5 gms de la muestra, colocarlos en el crisol respectivo, hacer el análisis por duplicado. Se recomienda quemar en un reverbero y luego introducir los crisoles al horno a 550°C durante 6 horas, o durante la noche.

Se deben usar pinzas de metal para manejar los crisoles, guantes de asbesto y anteojos protectores o careta protectora de la cara contra el calor del horno. Dejar que la temperatura baje a 250°C después de cumplido el tiempo de calcinación. Sacar los crisoles, pasarlos a desecador, dejar enfriar y pesar.

## 5.4. CALCULOS.

Porcentaje de la muestra en base "parcialmente seco"

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

Conversión a base seca:

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

ó

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

## 6. DETERMINACION DE EXTRACTO ETereo

### 6.1. PRINCIPIO.

En el análisis próximo de los materiales vegetales, siempre se debe hacer referencia al "extracto etéreo" y no al de "grasa" para designar la porción extraída.

Una sustancia soluble en éter puede ser extraída cuantitativamente por medios sucesivos. El éter se evapora y se condensa continuamente y al pasar a través de la muestra, extrae los materiales solubles. El éter debe ser anhidro y la muestra estar completamente seca para evitar pérdida de carbohidratos solubles.

### 6.2. EQUIPO.

A) Aparato para la extracción de grasa de Goldfish, el cual incluye lo siguiente:

- a) Vasos especiales con el borde esmerilado
- b) Dedales de asbesto, o de alundum
- c) Recipientes de vidrio o de metal para los dedales
- d) Tubos de vidrio para recuperar el solvente

B) Balanza analítica

C) Papel de filtro

### 6.3. REACTIVOS.

- a) Eter dietílico anhidro -  $C_2H_5OC_2H_5$  - p.m. 74.12
- b) Acido clorhídrico - HCL - .m. 36.47
- c) Acido Nítrico -  $HNO_3$  - p.m. 63.02

#### 6.4. PREPARACION.

- a) De la muestra: Secar la muestra al horno de vacío hasta que esté completamente seca (ver atrás) 2.5 gms. Se puede usar la muestra que se utilizó para determinar la materia seca.
- b) De la vidriería y los dedales. Se deben enjuagar los objetos de vidrio con éter. Se lavan con agua jabonosa y se repite el lavado con un polvo limpiador (ajax). Cada vez que se utilicen los dedales alundum se deben sumergir en agua regia ( $1 \text{ HNO}_3 + 3\text{HCL}$ ) por unas 4 horas. Después se enjuagan bien con agua destilada todos los utensilios y se llevan al horno para secar.

Los vasos se deben enfriar en desecador y pesar.

#### 6.5. PROCEDIMIENTO.

Secar y pesar los vasos para grasa.

Colocar la muestra pesada en un dedal.

Cubrir la muestra con papel de filtro.

Colocar los dedales en los anillos metálicos.

Colocar 30-40 ml. de éter en el vaso.

Colocar el vaso en el aparato del condensador asegurándolo con el anillo de rosca, apretar con la mano tanto como sea posible.

Abrir la válvula de seguridad 2 ó 3 veces.

Abrir la llave del agua para enfriar el condensador.

Subir las placas calientes hasta que se pongan en contacto con los beakers y prender los calentadores.

La extracción se hace durante 5 horas.

Después de la extracción se bajan en orden los calentadores y se permite que el dedal drene completamente. Colocar el platillo de seguridad.

Zafar el anillo de rosca y sacar el vaso

Retirar el dedal. Colocar en su lugar los tubos de vidrio para recuperar el éter.

Colocar nuevamente el vaso de grasa. Subir las placas calientes y destilar el éter.

Las placas se deben retirar poco antes de que el éter se evapore completamente. El éter de los tubos recibidores se debe vaciar en un recipiente de éter usado.

La evaporación del éter que queda en los beakers se completa al aire. Se llevan estos a estufa de vacío a 105°C durante 15 minutos. Se dejan enfriar en desecador y se pesan.

La muestra de los dedales, se guarda para la determinación de fibra.

#### 6.6. CALCULOS.

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:

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

## 7. DETERMINACION DE FIBRA CRUDA

### 7.1. PRINCIPIO.

La fibra cruda es la pérdida de peso después de quemar la muestra libre de humedad y de grasa, que ha sido sometida a digestión primero con una solución de ácido débil y después con una solución de base débil.

### 7.2. EQUIPO.

- a) Aparatos de extracción. Calentadores individuales con control y condensadores enfriados por agua, diseñados para calentar 200 ml de agua a 25°C hasta la ebullición en 15  $\pm$  2 minutos.
- b) Recipientes para la digestión. Erlenmeyer de boca ancha de 500 ml de capacidad.
- c) Dos frascos de base redonda de 5 litros de capacidad cada uno, 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 o tela de filtrar
- e) Crisoles de alundum
- f) Espátula
- g) Frasco lavador

### 7.3. REACTIVOS.

- a) Solución de ácido sulfúrico 0.255 N.
- b) Solución de hidróxido de Sodio 0.313 N.
- c) Antiespumante o alcohol etílico
- d) Alcohol etílico. Solución al 50%

#### 7.4. PROCEDIMIENTO.

- a) El residuo de muestra proveniente de la determinación del extracto etéreo se puede utilizar, transfiriéndolo del dedal a un vaso de digestión para fibra.
- b) Agregar 200 ml. de solución de  $H_2SO_4$  caliente al 1.25%
- c) Adaptar el vaso de digestión con el condensador de fibra
- d) La digestión debe durar 30 minutos. Es esencial que el contenido del vaso hierva en el primer minuto y que la ebullición se mantenga durante los 30 minutos vigorosamente.
- e) Retirar el vaso. Filtrar a través de una tela de lino colocada en un embudo acanalado. Lavar con agua hirviendo hasta remover todo el ácido.
- f) Se raspa la tela con espátula y se lleva el contenido de nuevo al vaso; se agregan 200 ml de hidróxido de sodio. Nuevamente se acopla el beaker al calentador para que hierva durante 30 minutos, al cabo de los cuales se pasa a través de la tela de lino, lavando sucesivamente con agua hirviendo. Aplicar vacío para producir un mejor filtrado.
- g) Se raspa la tela con espátula para pasar el contenido a un crisol haciendo succión.
- h) Lavar con alcohol etílico la muestra dentro del crisol
- i) Pasar los crisoles a estufa a  $105^{\circ}C$  durante toda la noche. Sacar a un desecador a la mañana siguiente, dejar enfriar y pesar.
- j) Incinerar el contenido de los crisoles en una mufla a  $550 - 660^{\circ}C$ , durante una hora.
- k) Sacar a desecador, dejar enfriar y pesar
- l) La pérdida de peso, representa la fibra cruda.

## 7.5. CALCULOS.

Porcentaje de fibra cruda en base "parcialmente seco":

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

Conversión a "Base seca"

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

8. DETERMINACION DE PROTEINA CRUDA A PARTIR  
DE LA DETERMINACION DEL NITROGENO POR EL  
METODO Kjeldahl

8.1. PRINCIPIO.

El método Kjeldahl se usa para determinar el nitrógeno total. El nitrógeno de las sustancias nitrogenadas y de las proteínas se convierte en sulfato de amonio mediante la digestión de la muestra con ácido sulfúrico en ebullición. El material orgánico se oxida a dióxido de carbono y agua. La cantidad de sulfato de amonio se determina agregando un exceso de hidróxido de sodio, destilando amonio liberado para convertirlo en una sal con un ácido estandar ácido bórico, para luego titularlo con ácido estandarizado. Los autores recomiendan el ácido sulfúrico estandarizado, en el Laboratorio de Nutrición del I.C.A. se utiliza ácido Clorhídrico 0.1 Normal.

8.2. EQUIPO.

- a) Aparato macro Kjeldahl de digestión y destilación
- b) Balones de Kjeldahl de 800 ml. de capacidad
- c) Frascos Erlenmeyer de 500 ml de capacidad
- d) Buretas graduadas en número de 4
- e) Granallas de Zinc
- f) Soportes de madera para colocar y manejar los balones Kjeldahl
- g) Papel de filtro para pesar la muestra.

### 8.3. REATIVOS.

- a) Mezcla Catalizadora. Mezclar sulfato disódico anhidro en polvo, con óxido de Mercurio, químicamente puros, en la proporción de 14.3 : 1 respectivamente. Esta mezcla acelera el proceso de digestión.
- b) Acido Sulfúrico Concentrado, libre de N. Actúa como agente oxidante de la materia orgánica.
- c) Solución de Hidróxido de sodio. Disolver 500 mgs de hidróxido de sodio en escamas en un litro de agua destilada. A ésta solución se le agrega sulfuro de sodio al 1% (disolver 31 gms de sulfuro de sodio  $9 \text{ H}_2\text{O}$  ó 10 gms de sulfuro de sodio anhidro en 200 ml de agua. Se mezclan y se completa a 1 litro con agua destilada.
- d) Zinc en gránulos. Sirven para regular la ebullición.
- e) Solución Indicadora. Disolver 0.25 gms de verde Bromocresol y 0.05 gms de Rojo de Metilo en 100 ml de alcohol Etílico concentrado. Esta mezcla muestra color rosado en presencia de un ácido y una coloración azul en presencia de una base.
- f) Acido Bórico al 4%. Disolver 40 gms de ácido bórico por litro de agua, agregar 5 ml de la solución indicadora.
- g) Acido Standar - Puede ser HCL ó  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 N.

### 8.4. PROCEDIMIENTO.

#### 8.4.1. Digestión.

- a) Pese por diferencia 1 gm de la muestra, en un papel de filtro. Doblar el papel cuidadosamente y colocarlo en un matraz Kjeldahl de 800 ml de capacidad.

- b) Se debe correr con las muestras, dos blancos (papel de filtro solo) en todos los pasos del procedimiento y restar a la titulación de las muestras, la titulación del blanco.
- c) Agregar 16 gms de catalizador y 25 ml de  $H_2SO_4$  concentrado.
- d) Colocar los balones en el aparato digestor de Kjeldahl para calentar. Los calentadores y el aparato extractor se prenden simultáneamente. La digestión dura aproximadamente 30 minutos después de que la solución se aclare. Apagar los calentadores al cabo de este tiempo, sin apagar el extractor de gases. Permitir que se enfríen los balones, para agregar 400 ml de agua destilada.

#### 8.4.2. Destilación.

- a) Agregar a cada Erlermeyer 50 ml de la solución de ácido bórico colocarlos con el extremo de los tubos de destilación, debajo de los condensadores, sumergidos en la solución de ácido bórico.  
Poner a funcionar el sistema refrigerador y colocar los calentadores en alto.
- b) Agregar a cada balón Kjeldahl, una granalla de Zinc y 75 ml de Na CH.  
Debe agregarse con cuidado por las paredes del balón. Se lleva éste para conectarlo al aparato de destilación sobre los calentadores. Agitar bien el contenido.
- c) Destilar aproximadamente 200 ml. de solución.
- d) Mover el Erlermeyer al puesto bajo el condensador dejando el tubo de derrame fuera de la solución de ácido bórico. Apagar el calentador. Retirar el Erlermeyer.

#### 8.4.3. Titulación.

La titulación por cambio de color, se realiza en el sitio de titulación introducir un imán en el Erlemeyer, se hace girar por medio del agitador magnético y se titula con HCL, hasta que el color cambie de color azul a un morado tenue.

#### 8.5. CALCULOS.

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

$$\% \text{ de N. en muestra} = \frac{\text{ml. de ácido en la titulación de la muestra} - \text{ml. de ácido en titulación del Blanco} \times \text{N. del ácido}}{\text{Peso de muestra en gramos}} \times 0.014 \times 100$$

$$8.5.1. \text{ Proteína Cruda} = \text{N \%} \times 6.25$$

Ajuste del porcentaje de proteína cruda a "Base seca"

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

9. DETERMINACION DEL EXTRACTO LIBRE DE  
NITROGENO (E.L.N.)

9.1. PRINCIPIO.

Cuando se han terminado los análisis para cenizas, fibra cruda, extracto etéreo y proteína cruda, el extracto libre de nitrógeno se determina por diferencia entre 100 y la suma de todos los porcentajes de los elementos enumerados.

9.2. CALCULO.

Porcentaje de E.L.N. en base seca =

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

## 10. DETERMINACION DE ENERGIA BRUTA

### 10.1. PRINCIPIO.

La energía bruta de un material (E.B.) es la cantidad de calor, medida en términos de calorías, que se produce cuando se oxida dicho material totalmente en un calorímetro, de Bomba. También se denomina calor de combustión. La muestra del material, se coloca en una cápsula de combustión que a la vez se deposita en una bomba de oxígeno con un contenido de 25 a 30 atmósferas de dicho gas. La bomba se encuentra sumergida entre 2 litros de agua en un calorímetro adiabático. Después de ajustar la bomba y el calorímetro a idéntica temperatura, se incinera la muestra con un alambre fusible. El aumento de temperatura se mide bajo condiciones adiabáticas. El cálculo para el contenido calórico de la muestra se realiza multiplicando el equivalente hidrotérmico de la bomba por el aumento de temperatura corregida, restando el consumo de alambre corregido y la producción de ácido medido por titulación.

### 10.2. EQUIPO.

- a) Calorímetro de Bomba con todos sus accesorios.
- b) Balanza para pesar soluciones con capacidad de 3.000 gms.
- c) Vasos de precipitados # 2.
- d) Frasco lavador con agua destilada.
- e) Alambre fusible.
- f) Regla graduada en centímetros.
- g) Pipetas, una de 1 ml. otra de 10 ml.
- h) Botella metálica con oxígeno, equipada con manómetro

- i) Agua caliente y agua fría que debe estar conectada con la bomba.
- j) Bureta graduada.

### 10.3. REACTIVOS.

- a) Solución de carbonato de sodio estandarizada; equivalente a 1 Cal/ml.  
(3.658 gms de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  por litro).
- b) Indicador de Rojo de Metilo

### 10.4. PROCEDIMIENTO.

Antes de explicar el procedimiento, debe quedar bien claro, que para el presente trabajo se tiene en cuenta que ya se ha realizado la estandarización de la bomba, para obtener el equivalente calórico de ella, que representa un dato de gran importancia para la realización de los cálculos.

La bomba calorimétrica del laboratorio de Nutrición del I.C.A., posee un equivalente calórico de 1.364,9 calorías por grado Fahrenheit. El procedimiento seguido en la obtención de la energía bruta de las muestras fué el siguiente, que es el convencional insinuado por la Parr Instrument Company.

- a) Pesar por diferencia 1 gm, de la muestra aproximadamente y colocarlo en una cápsula de combustión completamente limpia.
- b) Cortar 10 cm. de alambre fusible y colocarlo entre los electrodos del calorímetro. Colocar la cápsula en el electrodo de sostenimiento, se debe ajustar el alambre para que entre en contacto con la muestra.

- c) Con la pipeta de 1 ml. colocar esta cantidad de agua destilada en el fondo del cilindro del calorímetro.
- d) Ensamblar la bomba, colocando el soporte de los electrodos dentro del cilindro, cuidando de tapar con la tapadera de rosca en forma ajustada. Cerrar la válvula de escape de presión. Llenar con oxígeno a 25 atmósferas de presión.
- e) Pesar el balde, introducirlo en el calorímetro y colocar dentro de él 2.000 gramos de agua destilada. Introducir la bomba y ajustar el broche terminal.
- f) Cerrar la tapa del calorímetro, teniendo cuidado de que los termómetros estén levantados. Bajar los termómetros. Poner en funcionamiento el motor de circulación de agua.
- g) Ajustar 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. Ajustar entonces la temperatura para que sea exactamente igual, realizando lecturas de temperatura a intervalos de un minuto, durante tres minutos.
- h) Anotar la temperatura inicial con aproximación de tres cifras decimales. Apretar el botón de ignición para incinerar la muestra. Agregar agua caliente o fría, según sea necesario, para mantener, durante el período de ascenso de la temperatura de la bomba, idéntica temperatura dentro del agua de la cámara.
- i) Para asegurar la condición adiabática, o sea que las temperaturas de la bomba y de la cámara sean iguales, se debe ajustar con frecuencia y cuidadosamente la temperatura de la cámara exterior, con la del balde o en el interior del calorímetro.

- j) Cuando la temperatura sea idéntica, después de tres lecturas consecutivas con un minuto de intervalo entre una y otra, registre dicha temperatura como temperatura final.
- k) Apagar el motor. Levantar los termómetros. Abrir el calorímetro, desconectar el alambre del broche terminal, retirar la bomba del balde. Dejar escapar la presión que permanece dentro de la bomba. Abrir la bomba y retirar la tapa de los electrodos. Cuidadosamente separar los restos de alambre que han quedado y medirlos.
- l) Enjuagar toda la superficie interna de la bomba con agua destilada con el frasco lavador para ser recogida en un beaker limpio. Titular el agua de lavado con una solución estandarizada de carbonato de sodio, previa la adición de 2 gotas de indicador rojo de metilo.
- m) Corregir las temperaturas inicial y final utilizando la curva de calibración que viene con cada termómetro.

#### 10.5. CALCULOS.

| E.B. Cal/gm<br>en Base<br>"tal como ofrecido" | Temp.<br>final<br>corregida | Temp.<br>inicial<br>corregida | Equivalente<br>hidrotérmico - ml de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -alamb.<br>de la bomba | c.m.<br>alamb.<br>fundi. | cal.<br>X por<br>c.m. |
|---|-----------------------------|-------------------------------|--|--------------------------|-----------------------|
|   |                             |                               | Peso de la muestra   |                          |                       |

Ajuste a "Base Seca"

- a)  $\frac{\text{E.B. (Kcal/Kg) en base "tal como ofrecido"} \times 100}{\% \text{ de materia seca en muestra "tal como ofrecido"}}$
- b)  $\frac{\text{E.B. (Kcal/Kg) en base "parcialmente seco"} \times 100}{\% \text{ materia seca en base "parcialmente seco"}}$

11. METODO DE VAN SOEST PARA LA DETERMINACION DE FIBRA  
DETERGENTE NEUTRO (PAREDES CELULARES) DETERGENTE  
ACIDO (F.D.A.).

11.1 PRINCIPIO.

Un nuevo método para la determinación de fibra y la preparación de la muestra para la determinación de lignina, tiene como base la capacidad que tienen el Lauril sulfato de sodio en solución alcalina débil o en solución neutra y el Bromuro de cetil Trimetil Amonio en solución fuertemente ácida para disolver las proteínas y determinar en forma rápida y completa la fibra y la lignina con un contenido bajo de nitrógeno. Se determinan paredes celulares y contenido celular con el detergente neutro. Con el detergente ácido, se determinan Hemicelulosa, lignina y sílice.

11.2. EQUIPO.

- a) El equipo de reflujo descrito para la determinación de fibra cruda, puede ser usado si se encuentra instalado en el Laboratorio, sin ninguna modificación. Otros tipos de aparatos de reflujo probablemente sean de utilidad si ellos presentan las cuatro condiciones siguientes: 1) Un mínimo de 6 puestos de reflujo; 2) Cada puesto o calentador sea regulable individualmente y tenga poder suficiente para hervir soluciones y mantener la fibra en suspensión continua; 3) Los vasos de reflujo deben ser cilíndricos y no cónicos y 4) el sistema condensador debe tener una capacidad suficiente para mantener el volumen constante de las soluciones en ebullición.
- b) Múltiple adaptable para permitir la filtración de 6 crisoles simultáneamente.

c) Beakers; crisoles tipo Gooch, altos, de vidrio, de 50 ml de capacidad.

Vasos grandes para agua destilada.

d) Mufla para altas temperaturas y estufa graduable.

e) Frascos grandes de vidrio de capacidad de 6-8 galones para almacenar suficientes detergente neutro y detergente.

f) Bandeja de vidrio.

### 11.3. REACTIVOS.

| (para preparar                       | 1<br>Litro | 18<br>Litros | 40<br>Litros |
|--------------------------------------|------------|--------------|--------------|
| A) Detergente neutro                 |            |              |              |
| Agua destilada (litro)               | 1          | 18           | 40           |
| Lauril sulfato de sodio (gms)        | 30         | 540          | 1.200        |
| (E.D.T.A.) Etileno-Diamino)          |            |              |              |
| Tetraacetato cristal                 |            |              |              |
| Dihidrato, grado reactivo (g)        | 18.61      | 335.0        | 744.4        |
| Borato de sodio decahidratado        |            |              |              |
| grado reactivo (gms)                 | 6.81       | 122.6        | 272.4        |
| Fosfato disódico hidrogenado         |            |              |              |
| anhidro grado reactivo (gms)         | 4.56       | 82.1         | 182.4        |
| 2-Etoscietanol (Etilenglicol         |            |              |              |
| Monoetil eter) grado purificado (ml) | 10.        | 180          | 400          |

Procedimiento para preparar el detergente neutro (solución).

Colocar el E.D.T.A. y el Borato de sodio decahidratado juntos en un beaker

grande, añadir una cantidad del agua destilada y calentar hasta disolver. Luego agregar a la solución, el sodio Lauril Sulfato y el 2-Etos-cietanol. En el beaker colocar el Fosfato disódico hidrogenado añadir agua destilada y calentar hasta disolver. Añadir luego a la solución los ingredientes que faltan; se debe tomar el pH, el cual debe estar comprendido entre 6.9 a 7.1, si la solución está hecha correctamente. Muy rara vez se hace necesario el ajuste de pH.

B) Decahidronaftaleno - grado reactivo.

C) Acetona. Se debe usar un grado que esté libre de color y que al evaporarla no deje residuo.

D) Sulfito de sodio anhidro, grado reactivo

E) Solución detergente Acido

a) Acido sulfúrico, grado reactivo

estandarizado a 1 N. Ello se logra agregando 49.04 gm de  $H_2SO_4$  por litro de agua destilado.

Para preparar 18 litros de solución se requieren 882.72 gm de  $H_2SO_4$

b) Bromuro de cetil trimetil amonio (C.T.A.B.) grado técnico para 1 litro 20 gms para preparar 18 litros se necesitan 3 gms.

Procedimiento para preparar el detergente Acido (solución)

Pesar el ácido sulfúrico y llevarlo a volumen con agua destilada a 20°C. Observar la normalidad por titulación antes de la adición del detergente. Luego añadir el C.T.A.B. y agitar fuertemente,

F) Acido Sulfúrico para determinación de lignina.

Acido sulfúrico al 72% por peso. El cálculo para las cantidades de ácido y de agua necesarios para preparar 1 litro de solución se realiza por la aplicación de la fórmula siguiente:

$$a) \text{ Gms de H}_2\text{SO}_4 \text{ necesarios} = \frac{100 \times 98.08 \times 12 \text{ moles}}{\% \text{ de H}_2\text{SO}_4 \text{ en la soluc. del mismo}}$$

$$b) \text{ Gms de H}_2\text{O necesarios} = (1000 \times 1.634)^{+-} \text{ gms de H}_2\text{SO}_4$$

Pesar la cantidad de agua necesaria en un frasco volumétrico de 1 litro (con bulbo de seguridad en el cuello) y añadir el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> muy lentamente agitado ocasionalmente. Extremar los cuidados, tomar buenas precauciones. Se puede asentar el frasco en agua fría para permitir enfriamiento ya que el calor desprendido es muy fuerte.

11.4. PROCEDIMIENTO ANALITICO.

11.5. DETERGENTE NEUTRO ( Paredes celulares).

El procedimiento de detergente neutro para el contenido de paredes celulares es un método rápido para analizar la fibra total en los alimentos vegetales.

Los reactivos requeridos son los vistos atrás desde A hasta D, inclusive.

a) Pesar un gramo de muestra molida y colocarla en un beaker del aparato de reflujo.

+ Gravedad específica de 1 litro de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72%

- b) Añadir en orden: 100 ml de la solución de detergente neutro a la temperatura de laboratorio; 2 ml de decahidronaftaleno y 0.5 gms de sulfito de sodio.
- c) Calentar hasta el comienzo de la ebullición en 5-10 minutos. Reducir la temperatura para evitar la formación de espuma. Dejar hervir por reflujo durante 60 minutos.
- d) Colocar en el multiple para filtrado los crisoles previamente tarados. Agitar el beaker para suspender los sólidos y llenar los crisoles. Usar poco vacío al principio, este se debe incrementar solo si se hace necesario una fuerza mayor.  
  
Lavar la muestra dentro del crisol con agua caliente (90-100°C). Eliminar el vacío, aflojar la capa de muestra que se ha compactado en el fondo del crisol; llenar con agua caliente. Repetir el lavado varias veces.
- e) Lavar con acetona dos veces de la misma manera, dejar secar con el vacío.
- f) Secar los crisoles a 100°C por 8 horas, o durante toda la noche. Pasarlos a un desecador, dejar enfriar y pesar.
- g) El residuo de fibra recuperado, se registra como porcentaje de paredes celulares. La estimación del contenido celular se obtiene restando de 100, la cantidad de paredes celulares.

#### 11.6. FIBRA DETERGENTE ACIDO.

Este procedimiento proporciona un método rápido para la determinación de lignocelulosa en los alimentos. En el residuo también se incluye la fracción sílica.

La diferencia entre el contenido de paredes celulares y la fibra ácido detergente,

es un estimado de la hemicelulosa. La fibra ácido detergente se utiliza como paso previo para la determinación de lignina.

Reactivos requeridos : B-C y E.

#### 11.6.1. PROCEDIMIENTO.

- a) Pesar por diferencia un gramo de muestra aproximadamente. Depositarla en un beaker o en un recipiente adecuado para reflujo.
- b) Añadir 100 ml. de solución ácido detergente, a la temperatura de laboratorio (E), agregar 2 ml de decahidromaftaleno (B). Calentar hasta la ebullición de 5 a 10 minutos: reducir el calor de los calentadores cuando comience la ebullición, para impedir la formación de espuma. Hervir durante 60 minutos después del comienzo de la ebullición.
- c) Filtrar en crisoles de Gooch previamente pesados, que se encuentran colocados en el multiple de filtrado; usar poca succión. Aflojar la capa de muestra que se ha compactado en el fondo del crisol, con una varilla de vidrio. Lavar la muestra dos veces con agua caliente (90-100°C). Lavar de la misma manera los lados del crisol.
- d) Repetir el lavado con acetona hasta que desaparezca el color. En el caso de la pulpa de café por ejemplo, este color es bastante difícil de remover. Con 3 lavados que se efectúan con acetona aplicando el vacío, es suficiente para observar que la acetona no remueve más color.
- e) Retirar los crisoles, para colocarlos en estufa a 105°C durante toda la noche, o durante 8 horas. Se sacan a la mañana siguiente, se colocan en un desecador se dejan enfriar y se procede a pesar los crisoles. Estos sirven

para el método de la lignina que se explica posteriormente.

#### 11.6.2. CALCULO DE F.A.D.

Calcular la fibra ácido detergente de la siguiente manera:

$$\frac{(\text{Peso del crisol más fibra} - \text{peso del crisol solo})}{\text{Peso seco de la muestra}} \times 100$$

#### 11.7. LIGNINA ACIDO DETERGENTE.

##### 11.7.1. PRINCIPIO.

El primer paso para la determinación de lignina es el método empleado para la obtención de la fibra detergente ácido. El detergente, extrae la proteína y otros materiales solubles en ácido que podrían interferir con la determinación de lignina. El residuo de fibra detergente ácido está compuesto de celulosa, lignina, cutina y cenizas insolubles en ácido (principalmente sílica). Por medio de la solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 72% se separa y disuelve la celulosa, quedando la lignina y el sílice.

##### 11.7.2. EQUIPO.

- a) El mismo equipo empleado para la determinación de fibra detergente ácido.
- b) Bandeja de vidrio.
- c) Mufla. Horno de incineración con control de temperatura.

##### 11.7.3. REACTIVOS.

B - C - E - F

## 11.7.4. PROCEDIMIENTO.

- a) Preparar la fibra detergente ácido.
- b) Cubrir el contenido del crisol con ácido sulfúrico al 72% frío, agitar con una varilla de vidrio para formar una pasta suave. Los crisoles se deben colocar previamente en la bandeja de vidrio, la cual debe tener uno de sus extremos levantados dos centímetros, para formar un plano inclinado. Llevar los crisoles hasta la mitad con ácido sulfúrico agitar nuevamente con la varilla de vidrio y dejar esta introducida en el crisol. Volver a llenar el crisol con ácido sulfúrico y mezclar con intervalos de 1 hora, durante 3 horas, mientras el ácido va drenando. No es necesario mantener los crisoles llenos todo el tiempo, con tres agregados es suficiente.
- c) Mantener los crisoles a temperatura de 20-23°C.
- d) Después de 3 horas, extraer tanto ácido como sea posible, acoplando los crisoles al múltiple para hacer el vacío. Lavar el residuo otra vez con  $H_2SO_4$  al 72% y extraer de nuevo con succión.
- e) Lavar el contenido de los crisoles con agua caliente (85-95°C), hasta que quede libre del ácido. Remover las varillas de vidrio.
- f) Secar los crisoles a 100°C de temperatura durante la noche; pasarlos a desecador para pesar.
- g) El contenido de los crisoles se incinera en la mufla a 500°C durante 3 horas; esperar que la temperatura baje a 250°C para sacarlos y pasarlos al desecador, dejar enfriar y pesar.

## 11.7.5. CALCULOS.

$$\text{Porcentaje de lignina en base "tal como ofrecido" o "parcialmente seco"} = \frac{\text{Peso crisol más lignina} - \text{Peso crisol más cenizas}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Ajuste a base seca

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

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

## 12. DETERMINACION DE LA DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE VAN SOEST.

### 12.1. PRINCIPIO.

El procedimiento del Rumen in vitro está diseñado, para que se pueda obtener un valor de digestibilidad verdadera o aparente. La predicción del valor de la digestibilidad verdadera se basa en los constituyentes indigestibles de la pared celular. La predicción del valor de la digestibilidad aparente o valor que es igual en magnitud a un valor aparente in vivo, se basa en la técnica de la digestión in vitro de Tilley y Terry que puede contener residuos bacteriales y otros materiales insolubles en pepsina.

### 12.2. APARATOS.

#### 12.2.1. Materiales:

- a) Fuente de contenido Ruminal de un animal cuyo alimento sea alto en paredes celulares. Preferible un animal fistulado.
- b) Frascos erlenmeyer de 125 ml de capacidad, Pyrex con tapón #6.
- c) El agua del baño debe permanecer a 40°C y tener cabida para 18 frascos.
- d) Múltiple metálico con capacidad para 18 frascos colocado sobre el baño.
- e) Baño María con controles automáticos de temperatura y con agitador.

- f) Gasa, lana de vidrio y embudo de plástico o de vidrio.
- g) Aparato de reflujo como el utilizado para las preparaciones detergentes y vasos de vidrio para las digestiones.
- h) Fuente CO<sub>2</sub>.

### 12.3. DESCRIPCION.

Las fermentaciones se producen en frascos Erlenmeyer Pyrex de 125 ml de capacidad; se utilizan 0.5 gms de sustrato, 40 ml de medio y 10 ml de inóculo.

Los frascos de fermentación se colocan en el baño, adaptados al múltiple tapando con tapón de caucho No6. Los tapones poseen 3 salidas, una es para el tubo principal por donde entra el CO<sub>2</sub>, otra es para el tubo de escape que a su vez posee una válvula de Bunsen en el tubo de caucho.

### 12.4. REACTIVOS.

- Tripticase.
- Sulfuro de sodio monohidratado. R.P.
- Hidróxido de sodio 1 N. Disolver 4 mgs en agua y diluir hasta 1 litro.
- Cisteína.
- Resazurín.
- Acido clorhídrico 6 N. Diluir ácido clorhídrico concentrado con una cantidad igual de agua.
- Pepsina.

- Tolueno. Grado comercial.
- Solución Buffer para rumen in vitro:
 

|                            |  |     |
|----------------------------|--|-----|
| Agua destilada litros      |  | 18  |
| Bicarbonato de amonio gms. |  | 72  |
| Bicarbonato de sodio gms   |  | 630 |
- Solución Macro mineral para rumen in vitro:
 

|  |     |  |       |
|--|-----|--|-------|
| Agua destilada litros                        | 1   |  | 18    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro gms | 5.7 |  | 102.6 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhidro gms  | 6.2 |  | 111.6 |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O gms      | 0.6 |  | 10.5  |
- Solución micromineral in vitro

|  |  |      |
|--|--|------|
| Ca Cl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O gms |  | 13.2 |
| Mn Cl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O gms |  | 10.0 |
| Co Cl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O gms |  | 1.0  |
| Fe Cl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O gms |  | 8.0  |

Completar hasta 100 ml con agua destilada.

#### 12.5. PROCEDIMIENTO.

- a) Pesar 0.5 gms de muestra y colocarlos en uno de los frascos Erlenmeyer de 125 ml de capacidad.
- b) Preparar el medio. Se añaden en orden 2 gms de tripticase, 400 ml de agua y 0.1 ml de solución micromineral, agitar para disolver. Luego añadir 200 ml de la solución Buffer, 200 ml de la solución micromine-

ral y 1 ml de resazurin. Mezclar y añadir 40 ml a cada uno de los Erlenmeyer de 125 ml de capacidad.

- c) Ensamblar y colocar los tapones y los frascos en el baño, dejar pasar el  $\text{CO}_2$  para comprobar si funciona bien el equipo y las válvulas de bunsen. La presión se mide en 30-40 cms de agua. Abrir los tubos principales y agitar el frasco mientras se abre y luego cerrar. En seguida preparar la solución reductora así: añadir 625 mgms de cistina hidrociorhídrica, 95 ml de agua, 4 ml de hidróxido 1 N y disolver; añadir luego 625 mgms de sulfito de sodio monohidratado y disolver. Reducir la presión de  $\text{CO}_2$  a 3 ó 4 cms e inyectar 2 ml de la solución reductora a través del tubo principal. Agitar todos los frascos. Mirar el cambio de color de la solución reductora de rojo (oxidada) a incoloro (reducida).
- d) Preparar el inóculo. Colectar el contenido ruminal de un animal fistulado en un frasco o en un beaker. Colocar el contenido envuelto por una tela de gasa doblada en cuatro. Exprimir y llenar el frasco, hasta llenarlo completamente. Taparlo y colocarlo en el baño maría durante 2 minutos aplicándole corriente de  $\text{CO}_2$ : pasar a través de lana de vidrio a un frasco previamente calentado a la temperatura del baño. Inocular 10 ml de éste filtrado a cada frasco de fermentación.
- e) Fermentación. Sellar los tubos e incubar durante 48 horas, con agitación en forma tal que no se produzcan salpicaduras. Ajustar la presión del  $\text{CO}_2$  a una presión de 2 cms de agua.

Al final de la fermentación se puede seguir uno de los dos métodos siguientes: La filtración de Tilley y Terry o el tratamiento con detergente neutro.

Para almacenar los frascos, se puede añadir 1 ml de tolueno como preservativo y dejarlos en refrigeración, taparlos con un corcho, en el caso de que no se pueda seguir el procedimiento inmediatamente.

f) Procedimiento con detergente neutro para la estimación de la digestibilidad verdadera. Este método, es el que se recomienda, para completar el procedimiento de Van Soest que es el método que se ha querido discutir en el presente trabajo. Se retiran los frascos de baño después de la digestión o del refrigerador si es que se han almacenado. Lavar con 100 ml de solución de detergente neutro en un beaker de 600 ml de capacidad para llegar a un volumen total de 150 ml. Añadir 2 ml de decahidronaftaleno. Colocar en el aparato de reflujo por una hora y filtrar en los crisoles previamente tarados. Lavar dos veces con agua caliente y dos veces con acetona y aspirar en seco. Secar en estufa a 100°C y pesar. No es necesario correr Blancos.

## 12.6. CALCULOS.

Cálculo de la digestibilidad verdadera de la materia seca:

Digestibilidad verdadera  
de la materia seca = 100 - % de detergente neutro residual.

### 13. DETERMINACION DE MINERALES POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.

Con éste método se determina la concentración de elementos metabólicos en solución o en suspensión fina (6).

El método se basa en el hecho de que el elemento al ser disociado y quedar en forma de vapor atómico puede absorber luz a longitudes de onda características para cada elemento.

Los elementos que se determinan van desde el Arsénico que absorbe 1937 (Å) angstroms hasta el cesio 8.521 Å., o sea que se cubre la amplitud ultravioleta y visible, quedando incluidos los metales, se excluyen los no metales como el fósforo, azufre, halógenos, que no se pueden determinar directamente, debido a que absorben por debajo de 1.800 Å y hay interferencia con el oxígeno, porque este absorbe a 1.800 Å, el 40% de la energía disponible, quedando solo 60% para la muestra.

En absorción atómica existen tres tipos de interferencias, las cuales se pueden clasificar en Químicas, de bulto o Matriz y Ionización.

Los métodos que se utilizan en absorción atómica son:

- El método analítico de rutina.
- Método de adición estandar.
- Método de alta precisión.

Como ejemplo se presenta a continuación y en forma más o menos detallada, la determinación del Calcio por espectrofotometría de Absorción Atómica. En el procedimiento para el análisis de los de los otros ele-

mentos, se siguen los mismos pasos que para el Calcio, con ligeras modificaciones. Los análisis se encuentran en el manual que acompaña al aparato.

### 13.1. CALCIO.

Método de rutina cuando hay interferentes:

Por ejemplo cuando se determina el Calcio, en presencia de altas concentraciones de fósforo, hay formación de fosfatos debido a la ionización del calcio. Esto se evita al agregar otro metal más fácilmente ionizable como el lantano.

### 13.2. REACTIVOS.

a) Solución stock de calcio de 1.000 p.p.m.

Disolver en un balón volumétrico de 1.000 ml 2.5 mgs de carbonato de calcio puro y seco, en la misma cantidad posible de ácido clorhídrico concentrado, agregar agua desmineralizada y completar a volumen.

b) Solución stock de lantano de 5%

Pesar 58.65 gms de óxido de lantano en un balón volumétrico de 1.000 c.c., agregar 250 c.c. de ácido clorhídrico concentrado lentamente hasta disolución total, dejar enfriar y completar a 1.000 c.c. con agua destilada.

c) Soluciones estandar de calcio.

Colocar los volúmenes que se dan en el cuadro siguiente en balones volumétricos de 50 ml, agregar a cada balón 10 ml de solución stock de lantano y completar a volumen con agua desmineralizada.

| VOLUMEN DE SOLUCION<br>STOCK DE CALCIO | p.p.m. EN LA SOLUCION<br>ESTANDAR |
|--|-----------------------------------|
| 0.00 ml                                | 0 p.p.m.                          |
| 0.25 ml                                | 5 "                               |
| 0.50 ml                                | 10 "                              |
| 0.75 ml                                | 15 "                              |
| 1.00 ml                                | 20 "                              |

### 13.3. PROCEDIMIENTO.

- En balones volumétricos adicionar 2 ml de solución stock de lantano y 8 ml de la solución problema.
- Teniendo en cuenta las instrucciones, leer tanto los problemas como los estandares colocando las condiciones de trabajo para cada elemento.
- Las lecturas de absorción se convierten en absorvancia.
- Se traza una curva de calibración (en las ordenadas se colocan las absorvancias y en las abscisas las concentraciones en p.p.m. de calcio, o calcular el factor de ellas

$$\text{Factor (F)} = \frac{A}{B}$$

A = Promedio de las concentraciones de los estandares.

B = Promedio de las absorvancias (densidad óptima) de los estandares.

### 13.4. CALCULOS.

$$\% \text{ Calcio} = \frac{L \times V_f \times V_d}{M \times A \times 10^4}$$

L = Lectura en p.p.m. en la curva o L = absorvancia de la muestra  
problema  $\times F$ .

Vf = Volúmen final (50 ml)

Vd = Volúmen de dilución

M = Peso de la muestra en gramos.

A = Alicuota tomada para la dilusión.

#### 14. BIBLIOGRAFIA

1. BATEMAN, J.M. 1970. Nutrición Animal. Manual de métodos analíticos. Edit. Herrero Hnos. Sucesores. S.A. México.
2. BECKER, M. 1961. Análisis y valorización de piensos y forrajes. Trad. del Aleman por Eduardo Zorita Tomillo. Edit. Acribia. Zaragoza (España).
3. GOERING, H.K. and P.J. VAN SOEST. 1970. Foraje Fiber Analyses Agricultural Handbook No. 379. Agricultural Research Service. United State Department of Agriculture.
4. HARRIS, L.E. 1970. Métodos para el análisis químico y la evaluación biológica de alimentos para animales. Center for tropical agriculture feed composition project University of Florida. Gainesville U.S.A.
5. PARR INSTRUMENT COMPANY. 1960. Oxygen Bomb calorimetry and combustion methods technical manual No. 130. Parr Instrument Company. Moline, Illinois.
6. PERKIN ELMER. 1971. Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry Perkin Elmer Corp.
7. VAN SOEST, P.J. 1963. Use of detergent in the analysis of fibrous feeds. I preparation of fiber residues of low nitrogen content. J. of the A.O.A.C. 40(5) 825:829.
8. \_\_\_\_\_ 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) 829-835.

9. \_\_\_\_\_ 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. 50:50-55.
  
10. \_\_\_\_\_ 1967. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages. J. Anim. Sci. 26:119-128.