



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE PAJAS MEDIANTE
DOS MÉTODOS: INCUBACIÓN CON LÍQUIDO RUMINAL Y DIGESTIBILIDAD
ENZIMÁTICA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

JESÚS ISRAEL VEGA GARCÍA

ASESORES:

DR. CARLOS MANUEL ARRIAGA JORDÁN

DR. FELIPE LÓPEZ GONZÁLEZ

DR. IGNACIO ARTURO DOMÍNGUEZ VARA

Revisores:

Dra. Alejandra Donají Solís Méndez

Dr. Manuel González Ronquillo

Toluca México, Junio de 2016.



AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México por el espacio y tiempo invertido en mí.

Al Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales de la Universidad Autónoma del Estado de México por permitirme formar parte de su equipo de investigación.

A mis asesores: Dr. Carlos Manuel Arriaga Jordán, Dr. Felipe López González y Dr. Ignacio Arturo Domínguez Vara; por apoyarme durante la realización de este trabajo.

Al proyecto de investigación “Adaptación al cambio climático de las estrategias de alimentación del ganado en sistemas de producción de leche en pequeña escala en el noroeste del Estado de México” financiado por la Universidad Autónoma del Estado de México, con clave: 3676/2014/CIA.

A mis revisores: Dra. Alejandra Donají Solís Méndez y Dr. Manuel González Ronquillo; por sus consejos para que este trabajo se lograra de la mejor forma posible.

DEDICATORIAS

A mis padres: Ma. Félix García Mondragón y Pablo Vega García por brindarme la oportunidad de recibir una educación a lo largo de mi vida, por sus consejos, por su apoyo incondicional y por formar parte de mi vida.

A mis hermanos: Ma. Del Carmen y Rigoberto, por cada uno de sus sacrificios para que yo pudiera estudiar una licenciatura.

A mis cuñados: Nancy García Reyes y Arturo Reyes Flores, por su apoyo brindado hacia mí, y por su paciencia para con mis hermanos durante este tiempo.

A mis amigos, por su compañía incondicional durante este proceso.

A mi Equipo de Sistemas de Producción de Leche en Pequeña Escala, por el tiempo, experiencias y conocimientos compartidos.

A todos los profesores que a lo largo de mi vida aportaron para mi formación hasta el día de hoy.

RESUMEN

La producción de leche en México se realiza mediante tres sistemas: gran escala, tropical y en pequeña escala. En este último sistema se encuentran los “sistemas campesinos de producción láctea”; la investigación en los Sistemas de Producción de Leche en Pequeña Escala (SPLPE) es muy importante ya que por medio de esta se pueden diseñar y evaluar estrategias de alimentación que lleven a la sustentabilidad de los mismos. Junto con las praderas, los concentrados comerciales y los ensilados; el uso de pajas y rastrojos es común en estos sistemas de producción.

Con el objetivo de establecer el mejor método para la determinación de la digestibilidad y la determinación de la composición química de cinco pajas de mayor uso en los sistemas de producción de leche en pequeña escala del noroeste del Estado de México que permitirá hacer más eficientes los procesos de laboratorio, a la vez de proporcionar información sobre el valor nutritivo y la variación inherente en estos forrajes toscos, para su mejor aprovechamiento en la alimentación de rumiantes; en este ensayo se compararon dos técnicas *in vitro* (con líquido ruminal y enzimática), para evaluar los valores de digestibilidad de 59 muestras de pajas utilizadas en sistemas de producción de leche en pequeña escala en el noroeste del Estado de México; de estas 12 son paja de Avena, 14 de Cebada, 14 de Maíz (rastrojo o zacate), 11 de Trigo y 8 de Sorgo. Además se realizaron pruebas para determinar Proteína, Fibras (FDA y FDN) y Cenizas de las mismas para tener un parámetro mayor a la hora de compararlas.

Los resultados muestran una correlación positiva entre la técnica de Incubación con Líquido Ruminal y la técnica de Digestibilidad Enzimática ($P>0.05$), por lo que se concluye que no existen diferencias significativas en cuanto a la comparación de ambas técnicas: el promedio obtenido de digestión en la técnica de incubación con líquido ruminal fue de 515 g/kg MS en contraste de la técnica de digestibilidad

enzimática en donde el resultado fue de 520 g/kg MS. Evaluándolas independientemente se observó que la técnica de digestibilidad con líquido ruminal, la paja o rastrojo de maíz es la más digestible (536 g/kg MS) y en su contra parte se encuentra la paja de trigo con sólo 411 g/kg MS; las pajas de avena, cebada y sorgo obtuvieron valores de 531, 535 y 516 g/kg MS respectivamente. En la técnica de digestibilidad enzimática de igual forma la paja de maíz fue superior con 560 g/kg MS de digestibilidad; la paja de trigo obtuvo la menor con 478 g/kg MS y al mismo tiempo las pajas de avena, cebada y sorgo obtuvieron valores de 528, 510 y 524 g/kg MS respectivamente. Estos datos indican que en cuanto a digestibilidad, salvo la paja de trigo, en todas se han superado los 500 g/kg MS por lo que el forraje no se consideraría de baja calidad.

Con estos resultados se pudo calcular la energía metabolizable de los forrajes evaluados obteniendo valores que van de 6.3 a 8.1 MJ/kg MS en la digestibilidad con líquido ruminal y valores de 8.0 a 8.4 MJ/kg MS en la digestibilidad enzimática.

En cuanto a la composición química los mayores valores de proteína cruda fueron para la paja de avena con 44.7 g/kg MS y los más bajos para la paja de trigo con 36.5 g/kg MS; en cuanto al contenido de FDN, ninguna paja rebasó los 650 g/kg MS, que se considera el límite para que el forraje sea de mala calidad en este componente. El contenido de FDA varió entre 359 g/kg MS a 454 g/kg MS.

A partir del análisis de las ventajas y desventajas de cada una de las técnicas (y ya que no presentaron diferencias significativas en su comparación con pajas y rastrojos) *in vitro* empleadas para medir la digestibilidad de los alimentos utilizados para la alimentación de rumiantes se concluye que en estos forrajes se puede establecer la técnica de digestibilidad enzimática de la materia orgánica como método de rutina en el Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales de la Universidad Autónoma del Estado de México.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIAS	iii
RESUMEN	iv
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Forrajes	4
2.2. Calidad de los forrajes	4
2.3. Utilización de la paja como alimento del ganado	5
2.4. Digestión en rumiantes	6
2.5. Métodos para estimar la digestibilidad	8
Método directo: <i>in vivo</i>	9
Métodos indirectos	10
2.6. Métodos de digestibilidad <i>in vitro</i>	13
Métodos de incubación con líquido ruminal	13
Método de digestibilidad enzimática	14
III. JUSTIFICACIÓN	16
IV. HIPÓTESIS	17
V. OBJETIVOS	18
5.1. Objetivo general	18
5.2. Objetivos específicos	18
VI. MATERIAL	19
6.1. Material biológico	19
6.2. Material no biológico	19
VII. MÉTODO	20
7.1. Digestibilidad con líquido ruminal	20
7.1.1. Procedimiento	20
7.1.2. Cálculo	22

7.2. Digestibilidad Enzimática de Materia Orgánica	22
7.2.1. Reactivos	22
7.2.2. Proceso.....	23
7.2.3. Cálculo.....	24
7.3. Determinación de Fibra	24
7.3.1. Análisis de FDA.....	25
7.3.2. Análisis de FDN	26
7.4. Determinación de cenizas.....	29
7.5. Determinación de nitrógeno.....	30
7.6. Análisis estadístico	32
VIII. LÍMITE DE ESPACIO	33
IX. LÍMITE DE TIEMPO	34
X. RESULTADOS	35
XI. DISCUSIÓN.....	39
XII. CONCLUSIONES	41
XIII. LITERATURA CITADA	42

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica del municipio de Aculco, Estado de México.....	33
Cuadro 1. Contenido de Materia Seca (MS), Ceniza, Proteína Cruda (PC), Fibra Detergente Ácido (FDA), Fibra Detergente Neutro (FDN) y Energía Metabolizable (EM) en diversas pajas	6
Cuadro 2. Media de digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca mediante incubación con líquido ruminal de cinco pajas evaluadas.....	35
Cuadro 3. Media de digestibilidad de los cinco tipos de pajas evaluados mediante la técnica de digestibilidad enzimática <i>in vitro</i> de la materia seca de cinco pajas evaluadas.....	36
Cuadro 4. Comparación entre los métodos de digestibilidad: Incubación con Líquido Ruminal y Digestibilidad Enzimática de la Materia Orgánica en MS y MO.....	37
Cuadro 5. Composición química (g/kg MS) promedio de cinco pajas.....	37

I. INTRODUCCIÓN

La producción de leche en México se realiza en tres sistemas principales que son la gran escala, la lechería tropical y la lechería en pequeña escala; en este último se encuentran los “sistemas campesinos de producción de leche” los cuales se definen como unidades de producción con pequeñas superficies de tierra donde la venta de leche proporciona ingresos fundamentales para la familia, y que pueden complementarse o no con ingresos generados por otras actividades dentro o fuera de la unidad de producción; estos cuentan con un máximo de 20 vacas y un mínimo de 3, más sus reemplazos; utilizan mano de obra familiar y están integrados al mercado como proveedores (Espinoza *et al.*, 2005).

Un componente importante de la investigación en Sistemas de Producción de Leche en Pequeña Escala (SPLPE) es el diseño y evaluación de estrategias de alimentación que lleven a la sustentabilidad de estos sistemas; lo que requiere estudiar cada una de las limitantes que impidan el desarrollo de los SPLPE. Aunque no es la única, la limitante más trascendental de estos sistemas es la escala económica de la sustentabilidad (Fadul *et al.*, 2013); por los altos costos de producción y la baja eficiencia, la alimentación, con un 60% del total es el aspecto que se busca optimizar.

En el Estado de México, el modelo familiar o de traspatio se compone de ganaderías formadas hace aproximadamente hace 100 años y que se complementan con la actividad agrícola para la producción de forrajes; en este modelo de producción el alimento para los animales se basa en esquilmos agrícolas, maíz molido, concentrado y pastoreo natural. Se trata de explotaciones que combinan los recursos provenientes de superficies de riego y de temporal, aprovechan cultivos de secano y de cosechas que son complementados con concentrados locales (Guzmán *et al.*, 1996). Ya que los productores tienen el

hábito de quemar los subproductos de las cosechas contaminando así el aire, existe el creciente interés por el aprovechamiento total de la biomasa generada, así como la búsqueda de alternativas a la contaminación creada lo que conlleva hacer un uso efectivo de las mismas.

Por otra parte toda actividad que los animales realizan, sin importar si es trivial o no, necesita una transacción de energía. Esta se transfiere de una parte del sistema a otra aunque estas partes del sistema sean tan pequeñas como moléculas que reaccionan. Los animales obtienen combustibles al captar las moléculas orgánicas del alimento; que son degradadas por la digestión y el metabolismo, gracias a los cuales la energía química de sus estructuras moleculares se puede utilizar para las necesidades energéticas del organismo (Eckert *et al.*, 1994).

El animal rumiante mantiene una posición estratégica con relación al hombre ya que obtiene su fuente de energía a partir de alimentos fibrosos y fuentes de nitrógeno no proteicas no compitiendo parcialmente con la especie humana en este aspecto. Este animal tiene necesidades muy particulares de energía, proteína y minerales, aunque existe un segundo grupo de necesidades: los microbios del rumen; estos son responsables de la descomposición de los componentes estructurales de la materia vegetal y producen la mayoría de la proteína microbiana absorbida en el intestino delgado. Cuando el rumen dispone de los microorganismos en forma ideal, por consiguiente, puede funcionar de manera óptima y así realizar el mejor uso de los alimentos ofrecidos, especialmente de la fracción contenida en la membrana celular de los forrajes (Chamberlain y Wilkinson, 2002).

Un alimento puede ser definido como cualquier componente de la ración que provee nutrientes; la mayoría proporcionan uno o varios (Parsi *et al.*, 2001). El conocimiento de la composición química y la digestibilidad de los alimentos son

fundamentales para establecer su valor nutritivo y poder incluirlos en las raciones de mejor manera para cumplir los requerimientos de los animales.

Los métodos *in vivo* para determinar la digestibilidad son los más exactos, pero también son costosos y laboriosos, por lo que se han propuesto distintos métodos *in vitro*. En la búsqueda para hacer más eficiente, rápido y económico el proceso para estimar la digestibilidad se han desarrollado métodos *in vitro* que son considerados como adecuados para la determinación de la digestibilidad de forrajes y alimentos para rumiantes (Giraldo *et al.*, 2007). Ante la legislatura del Estado de México, en el decreto número 15, capítulo V, que prohíbe el uso de animales para la realización de experimentos, y por los costos implicados en la manutención de estos animales, se hace necesario buscar alternativas para determinar la digestibilidad *in vitro*. Este trabajo propone comparar un método de digestibilidad enzimática *in vitro* contra el método tradicional para determinar la digestibilidad mediante fermentación anaeróbica con líquido ruminal, en pajas y rastrojos de cereales.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Forrajes

Se le llama forraje a todo aquel producto de origen vegetal que tiene bajo peso por unidad de volumen (voluminoso). De acuerdo con Flores *et al.* (2003), los forrajes constituyen las formas más baratas para la alimentación de los rumiantes y el conocimiento de la composición es una condición necesaria para la utilización eficiente en la alimentación animal, preparando así dietas mejor equilibradas y poder obtener altos niveles de producción animal, sin olvidar los requerimientos del mercado y consumidores en general, orientados a la calidad del producto y preferencia hacia sistemas de producción no agresivos con el medio ambiente.

La mayoría de los forrajes tienen altos valores de fibra cruda (FC), más de 18% del total; el contenido proteico, mineral y vitamínico es variable entre las especies, y de forma general, la calidad puede abarcar un rango amplio; una calidad alta se puede obtener de gramíneas y leguminosas jóvenes, y ensilados; en su contraparte se encuentran las pajas con un escaso valor nutricional (Parsi *et al.*, 2001).

2.2. Calidad de los forrajes

Aunque hoy en día no exista aun una terminología definida para hablar sobre el tema (se pueden usar calidad de forrajes, calidad forrajera, calidad nutritiva o composición nutritiva, entre otras), se ha llegado al acuerdo en que el principal parámetro que define la calidad de los forrajes es la digestibilidad de la materia (Di Marco, 2011).

Independientemente del método usado, se puede definir a un forraje de alta calidad cuando sus valores rondan en 700g/kg de Digestibilidad in Vitro de Materia

Seca (DIVMS), menos de 500 g/kg de Fibra Detergente Neutro (FDN), y más de 150 g/kg de Proteína Cruda); en cambio se considera que el forraje es de baja calidad nutricional cuando este contiene valores de menos de 500 g/kg de DIVMS, más de 650 g/kg de FDN y de PC menos de 80 g/kg; todo lo anterior en base seca (Di Marco, 2011).

Giraldo *et al.* (2007), mencionan que la calidad nutritiva de los forrajes se puede determinar por el nivel de consumo, la digestibilidad, el contenido de nutrientes y la eficiencia en que pueden ser metabolizados y utilizados por los animales durante el proceso digestivo.

2.3. Utilización de la paja como alimento del ganado

Existe una amplia variedad de residuos agrícolas y subproductos agroindustriales que pueden ser utilizados para la alimentación del ganado, dando así una alternativa para que pequeños y medianos productores agropecuarios puedan aprovechar los esquilmos para alimentar a su ganado (González, 2000). Mantener alimentado al ganado de una forma correcta durante todo el año requiere que los ganaderos conozcan cómo aprovechar al máximo los esquilmos agrícolas, ya que en época de sequía estacional y errática distribución de las lluvias, estos integran la poca fuente de forraje disponible (Pérez, 2015).

Junto con la paja o rastrojo de maíz, las pajas de cereales representan el residuo de cosecha más abundante en el mundo; las cuales se han usado desde la antigüedad como el principal alimento voluminoso para los rumiantes, sobre todo en los países en vías de desarrollo (Guzmán *et al.*, 1996).

El uso de la paja de cereales en la alimentación animal presenta ventajas como aumentar la disponibilidad de recursos de las fincas ganaderas mixtas de cultivos y producción de ganado, permite su uso como recurso alternativo en épocas de

sequía o cuando falla la planificación forrajera; aunque su baja digestibilidad, bajo contenido de energía y proteína y además alto contenido de fibra lo hacen un alimento de bajo valor nutritivo (Martínez *et al.*, 2007).

La paja es aquel residuo que queda después de haber cosechado el grano. En general son alimentos muy pobres nutricionalmente, como se puede observar en el Cuadro 1 (Maynard *et al.*, 1987; Wolfgang, 2000; Yescas *et al.*, 2004; Vancov *et al.*, 2012; Velásquez *et al.*, 2012; Velásquez *et al.*, 2015), y sólo tienen importancia como alimento de emergencia (Mercado, 2012).

Cuadro 1. Contenido de Materia Seca (MS), Ceniza, Proteína Cruda (PC), Fibra Detergente Ácido (FDA), Fibra Detergente Neutro (FDN) y Energía Metabolizable (EM) en diversas pajas.

PAJA	MS (g/kg MS)	Ceniza (g/kg MS)	PC (g/kg MS)	FDA (g/kg MS)	FDN (g/kg MS)	EM (MJ/kg MS)
Avena	919	-	38	523	785	7.112
Cebada	968	75	44	556	847	6.066
Maíz	898	62	61	480	692	6.610
Sorgo	932	-	49	360	630	6.485
Trigo	960	81	40	546	862	7.698

2.4. Digestión en rumiantes

Dentro de los sistemas de producción de rumiantes, la nutrición representa el principal elemento para su viabilidad, ya que el potencial productivo de cada animal se manifiesta cuando todos sus requerimientos son cubiertos y además queda un excedente para ser transformado en el producto deseado (Lachmann *et al.*, 1999).

Los rumiantes se caracterizan por haber evolucionado para alimentarse a base de forraje, ya que pueden degradar los hidratos de carbono estructurales (celulosa y hemicelulosa). Esta degradación ocurre mayoritariamente por fermentación microbiana en el rumen y no por acción de enzimas digestivas (Relling *et al.*, 2003). Cuando se habla de la nutrición de los rumiantes se trata de un sistema dentro de otro sistema, ambos de naturaleza biológica; los rumiantes por sí no son capaces de descomponer la celulosa y demás compuestos estructurales de la planta, pero su aparato digestivo se encuentra adaptado para proporcionar un ambiente de crecimiento ideal a una amplia gama de microorganismos que descomponen la celulosa y producen ácidos grasos volátiles, principal fuente de energía para los rumiantes, y sintetizan la proteína microbiana (Chamberlain y Wilkinson, 2002).

El concepto de digestibilidad hace referencia a la cantidad de alimento que desaparece en el tracto digestivo, en el caso de los rumiantes, principalmente por la actividad de los microorganismos ruminales (aunque una parte de la digestión se lleva a cabo en el tracto posterior). La digestibilidad ruminal permite conocer la proporción de nutrientes que componen el alimento y que tienen potencial para ser absorbidos por el tracto digestivo (Giraldo *et al.*, 2007).

Por lo tanto, la digestibilidad de alimentos y forrajes utilizados en los sistemas de producción de rumiantes es un indicador de su calidad nutritiva, por lo que su determinación es elemento fundamental en la evaluación de alimentos y forrajes, así como para su inclusión en las raciones.

Algunos factores afectan o pueden afectar la digestibilidad:

- Composición química del alimento.
- Estado de madurez al momento de la cosecha.

- Cuando el animal reduce su ingestión (por causas propias o ajenas) por debajo del nivel de mantenimiento, tiende a ser más eficiente en la digestión y en el aprovechamiento de nutrientes.
- Cuando el alimento es sólo de forrajes el nivel de ingesta tiene poca influencia sobre la digestibilidad. En cambio la influencia es mayor con la presencia de alimentos concentrados en la ración total.

2.5. Métodos para estimar la digestibilidad

Como se mencionó con anterioridad, la nutrición es esencial para que un ser vivo se encuentre libre de enfermedades y debilidades, que son el impedimento de mayor importancia para que este ser vivo no manifieste su máximo potencial reproductivo y productivo. De acuerdo con Maynard *et al.* (1979) esta implica diversas reacciones químicas y procesos fisiológicos, y comprende la ingestión, digestión y absorción de diferentes nutrientes, su transporte hacia todas las células del cuerpo, así como la eliminación de células no utilizables y productos de desecho del metabolismo. Una correcta nutrición requiere de una ración debidamente balanceada en cuanto a cantidad, calidad y proporción de los requerimientos; razón por la cual se realizan numerosos análisis químicos de los alimentos. Pero debemos tener en cuenta que con el análisis químico del alimento sólo se llega al valor potencial del mismo; el valor real del alimento únicamente puede ser determinado teniendo en cuenta las pérdidas inevitables que tienen lugar durante la digestión, absorción y metabolismo. Estudiar la digestibilidad nos permite conocer la cantidad de una sustancia alimenticia o nutriente que no se degrada ni se absorbe mientras pasa a través del animal (Tobal, 1997). Puede sonar confuso el término de degradación y digestión por lo que los diferenciaremos tal y como lo hizo Rozales *et al.* (2013): la degradabilidad hace referencia a la cantidad de alimento que se descompone en sus elementos primordiales mediante procesos químicos y/o biológicos; en cambio la

digestibilidad nos indica la cantidad de alimento que desaparece en el tracto digestivo o en un proceso de laboratorio debido a su solubilización o ataque por los microorganismos anaerobios ruminales.

La digestibilidad de los forrajes nos permite estimar la proporción de los nutrientes presentes en el alimento, evalúa la utilización por el animal de un determinado nutriente, establece cuantitativamente el aporte de sustancias nutritivas digeribles y permite su utilización en estudios experimentales.

Método directo: *in vivo*

Este método se realiza mediante ensayos de balance nutritivo, utilizando animales vivos.

El método de “Colección total de heces” descrito por Crampton y Lloyd (1959) es el que da la mejor estimación de la digestibilidad de un alimento. Básicamente consiste en la administración a cada animal de alimento uniforme y cuidadosamente pesado; de la misma manera se pesan y toman muestras de la parte rechazada por el animal, y se recogen las heces. Convencionalmente la digestibilidad se determinaba restando de la cantidad consumida de un determinado nutriente, la cantidad excretada con las heces. Esto suponía un error ya que durante la excreción a las heces se les adicionaban fluidos digestivos y células descamadas de la mucosa intestinal por lo que no reflejaba la naturaleza de los productos finales de la digestión que son absorbidos ni la cantidad de energía perdida en los procesos digestivos, estancándose en una digestibilidad aparente. Además de este sesgo dado respecto a la digestibilidad real debido al material endógeno que se elimina a través de las heces, normalmente se tiene que habituar al animal a una ración que se quiere estudiar durante un periodo de tiempo para permitir la adaptación de los microorganismos del rumen y para

ajustar la toma de alimentos hasta un nivel estable que reduzca la selectividad. Otro inconveniente es el periodo que tarda el proceso ya que, por ejemplo, los alimentos fibrosos retrasan la excreción hasta diez días (Tobal, 1997).

Para Maynard *et al.* (1983), una prueba de digestión debe cuantificar los nutrientes consumidos y las cantidades eliminadas a través de las heces. Es importante que las heces recolectadas representen en forma cuantitativa el residuo que no fue digerido del alimento consumido y previamente medido. La método se debe dividir en: periodo preliminar o de adaptación y periodo de recolección; este último por lo menos debe tardar en herbívoros ocho días.

Métodos indirectos

Las evaluaciones *in vivo* son la “piedra de toque” frente a la cual se deben comparar los métodos indirectos para la estimación de la digestibilidad. Los métodos indirectos se dividen en: a) relaciones empíricas entre composición química del forraje y digestibilidad, b) por diferencia, c) por indicadores, d) digestión *in situ* de forrajes, e) digestión *in vitro* de forrajes, y f) técnica NIRS (Espectroscopía de reflectancia en la región de infrarrojo).

- a) **Relaciones empíricas entre composición química del forraje y digestibilidad.** Este método es muy común para estimar la digestibilidad de un forraje ya que la determinación de la composición química se hace en un periodo relativamente corto de tiempo y es menos costosa en comparación con la determinación de la digestibilidad por otros métodos. Sin embargo la falta de estandarización de las determinaciones en las predicciones conllevan a la inaplicabilidad de los modelos obtenidos fuera del ámbito de influencia del laboratorio donde se obtuvieron (Flores *et al.*, 2003).

- b) **Por diferencia.** En muchos casos se desea evaluar la digestibilidad de un alimento cuando se asocia o mezcla con una o más sustancias y como sabemos, en las heces es imposible hacer la separación de los diferentes alimentos. Este método consiste en determinar previamente la digestibilidad del alimento que va a acompañar el “alimento problema” (del cual se desea saber el valor); el cálculo se hace por la diferencia entre la digestibilidad total de la ración y la digestibilidad del alimento conocido. Este método requiere una gran cantidad de animales, equiparable con el método directo *in vivo*, además de que tiene el mismo costo, y no considera los efectos asociativos por lo que se descarta como técnica de rutina (Tobal, 1997).
- c) **Por indicadores.** Cuando se alimenta a los animales en grupo donde no se puede calcular la cantidad ingerida por cada uno, es difícil controlar la ingestión y/o la excreción de heces. En estos casos es posible calcular la digestibilidad si el alimento contiene un marcador (sustancia inerte, que carece de efectos tóxicos, que no es absorbida ni metabolizada, que no influya sobre las secreciones gastrointestinales, digestión, absorción o motilidad normal, que no influya sobre la microflora del tracto gastrointestinal y lógicamente no debe ser digestible), midiendo su concentración en el alimento y en las muestras de heces de cada animal; la relación que exista entre estas concentraciones nos da la digestibilidad. Los marcadores se usan no solamente para calcular los coeficientes de digestibilidad, sino también para valorar la digestión fraccional de diversos segmentos del tracto alimentario y también para medir el tiempo de retención de la digesta. El inconveniente de esta técnica es que la excreción no es uniforme, produciendo una recuperación mayor o menor del indicador que repercute sobre el valor de la digestibilidad en el sentido de elevarla o disminuirla respectivamente. Los marcadores que se usan en este procedimiento pueden ser internos (material no digestible que presenta el alimento): lignina, sílice y ceniza insoluble en ácidos; y externos (material

que se añade a la dieta): colorantes, óxido de cromo, fibra tratada o polietilenglicol (Tobal, 1997).

- d) **Digestión *in situ* de forrajes.** El método *in situ* se realiza incubando la muestra colocada en bolsas de tejido sintético que permanecen suspendidas en el rumen de un animal canulado durante dos a tres días obteniendo así el valor de la digestibilidad. Los resultados de esta técnica se afectan por el método de preparación de la muestra, el procedimiento de lavado y secado de las muestras, las pérdidas de partículas no degradadas de la bolsa, la contaminación microbiana de la muestra, el lugar de la secuencia de la incubación, la especie animal utilizada y la dieta ofrecida; así como la relación entre el tamaño de la muestra incubada y la superficie de la bolsa... lo que dificulta la estandarización de resultados (Flores *et al.*, 2003).
- e) **Digestión *in vitro* de forrajes.** Ya que es el tema principal de la tesis, se hablará de los métodos *in vitro* en otro apartado.
- f) **Técnica NIRS.** La técnica de espectroscopía de reflectancia en la región de infrarrojo es un método analítico físico basado en la absorbancia de la luz en determinadas regiones de longitud de onda que se relacionan con la presencia de determinados enlaces químicos, característicos de los constituyentes de los alimentos. Es única a causa de su naturaleza no destructiva, no requiere reactivos, caracteriza la totalidad de la composición del forraje y es adecuada para el procesado de grandes números de muestras; sin embargo está ligada a requerimientos de: calibración con muestras de composición química y valor nutricional conocidos (determinados por métodos de referencia) y también requiere de un conjunto de datos suficientemente amplios y una actualización frecuente que debe representar, en cuanto a la naturaleza de las muestras y su variabilidad, a la población de las muestras objeto de la predicción. El coste de obtención de muestras de calibración/validación y su mantenimiento, es

por tanto el factor principal que limita la adaptación generalizada de la técnica (Flores *et al.* 2003).

2.6. Métodos de digestibilidad *in vitro*

Aunque las determinaciones de la digestibilidad *in vivo* total son consideradas las más exactas, requieren cantidades de alimento a ofrecer diariamente, mano de obra e instalaciones, y además son costosas y laboriosas por lo que se han propuesto métodos *in vitro* para la estimación de la digestibilidad, mismos que requieren de pequeñas cantidades de muestra.

Se ha desarrollado un cuantioso conocimiento sobre la actividad ruminal y su papel en la nutrición, en particular mediante el uso permanente de la fístula ruminal descrita en 1886 por el fisiólogo francés Colín. Por otra parte dos años antes, en 1884 Tappeiner en Alemania mostró las grandes cantidades de ácidos grasos volátiles que se producían por la fermentación *in vitro* de la celulosa por bacterias obtenidas del rumen de un buey (Maynard *et al.*, 1983).

Métodos de incubación con líquido ruminal

Los métodos *in vitro* que más se utilizan (ya que son considerados los más exactos para la predicción de digestibilidad en rumiantes) son el de Tilley y Terry (1963), y el de Van Soest *et al.* (1966).

El método de digestibilidad con líquido ruminal inicialmente pretendió igualar las condiciones del rumen, al fermentarse una muestra de alimento (de composición conocida) en un recipiente con una cantidad determinada de fluido ruminal y, posteriormente a un periodo de incubación, se decantaba la muestra y se determinaba por diferencia la degradabilidad de la materia seca, corrigiendo por el residuo del inóculo del rumen; pero los resultados obtenidos indicaban que las

correlaciones con la digestibilidad *in vivo* no eran altas ya que en esta última la digestión ruminal es seguida por una digestión enzimática. Debido a esto se agregó una segunda etapa de digestión *in vitro* que consistía en una digestión enzimática (Tobal, 1997).

El método Tilley y Terry (1963) fue el precursor del método de fermentación *in vitro* en dos etapas (la primera en incubación con líquido ruminal y la segunda con pepsina); generalmente los métodos desarrollados posteriormente son en su mayoría modificaciones de este, Van Soest *et al.* (1966), sustituyó la pepsina de la segunda etapa por solución detergente neutro (solubiliza la pared celular bacterial y los productos endógenos, además de la proteína) (Tobal, 1997).

El método de Tilley y Terry (1963), es el que estima la digestibilidad más precisa, sin embargo depende y requiere de la incubación de las muestras con líquido ruminal, lo que significa la necesidad de tener animales canulados en rumen como donadores, incurriendo en costos elevados de alojamiento, alimentación, y manejo. Además, hay corrientes en contra de animales modificados quirúrgicamente desde el campo del bienestar animal, por lo que se han implementado técnicas enzimáticas para la determinación de la digestibilidad *in vitro* de alimentos y forrajes para rumiantes.

Método de digestibilidad enzimática

Últimamente se han desarrollado técnicas de predicción de la digestibilidad *in vitro* de alimentos de ganado, utilizando enzimas con el fin de reproducir la actividad celulolítica que presentan los microorganismos ruminales. Estos métodos de digestibilidad enzimática han despertado un gran interés en el campo de la nutrición ya que, además de ofrecer grandes ventajas sobre las técnicas de cultivos microbiales, son técnicas promisorias para determinar el valor nutritivo de los alimentos, principalmente de forrajes; y la técnica potencializa la estimación de

la digestión de la proteína mediante la estimulación de la solubilidad o insolubilidad (Riveros y Argamentería, 1987).

El principio se basa en remplazar el líquido ruminal por celulasas comerciales y por lo menos en la digestibilidad de forrajes se ha demostrado su utilidad.

Con el objetivo de reemplazar el líquido ruminal Jones y Hayward (1975) emplearon en la preparación con enzimas. Muchos trabajos indicaron que es importante que el material sea preparado de una manera determinada para que la enzima sea capaz de penetrar y reaccionar con el sustrato. Dowman *et al.* (1982) realizaron seis técnicas con enzimas para predecir la digestibilidad de los alimentos; los reactivos utilizados fueron derivados de las celulasas de *Trichoderma viridae* y *Aspergillus niger*, los cuales se disolvieron en acetato y el pH fue ajustado a 4.8 por la adición de hidróxido de sodio. La técnica seleccionada fue una versión modificada de la ya existente de Jones y Hayward (1975), en la que la muestra fue molida y pasada a través de una criba de 0.75mm; 0.2 g de muestra fueron incubadas a 40 °C con 20 ml al 0.2% de pepsina diluida en ácido clorhídrico por 24 horas. El líquido sobrenadante es recogido, se le agregaron 20 ml de celulasa y la muestra es llevada al incubador por 24 horas a una temperatura de 40°C. El residuo se colectó, secó, pesó y posteriormente llevó a una mufla de 520°C por cuatro horas; es enfriado y pesado, consecutivamente se determina el porcentaje de materia orgánica digestible (MOD). A lo largo del tiempo se llegó a la conclusión de que la celulasa de *Trichoderma viridae* ofrece mejores correlaciones en forrajes que las celulasas de *Aspergillus niger*.

III. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día los productores a pequeña y gran escala requieren reducir costos en sus sistemas de producción; ya que el mayor costo en el funcionamiento de sus sistemas es el que representa la alimentación de los animales, requiriendo de la administración de alimentos baratos como la opción más viable.

En este caso las pajas juegan un papel importante, ya que son utilizadas como forraje en los sistemas de producción de leche en pequeña escala, no obstante su baja calidad, para soportar los altos requerimientos nutritivos de las vacas lecheras.

Establecer el mejor método para la determinación de la digestibilidad y la determinación de la composición química de las cinco pajas de mayor uso en los sistemas de producción de leche en pequeña escala del noroeste del Estado de México, permitirá hacer más eficientes los procesos de laboratorio, a la vez de proporcionar información sobre el valor nutritivo y la variación inherente en estos forrajes toscos, para su mejor aprovechamiento en la alimentación de rumiantes.

Como lo menciona Tobal (1997), en los centros experimentales que se dedican a la producción animal es de gran importancia contar con resultados simples, rápidos y exactos para estimar la digestibilidad de los alimentos o para medir su tasa de degradación.

IV. HIPÓTESIS

Hipótesis nula: No existen diferencias en la digestibilidad de la MS y MO de pajas de avena, cebada, maíz, sorgo y trigo determinada *in vitro* por el método de incubación con líquido ruminal y mediante la técnica de digestibilidad enzimática de la materia orgánica.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Evaluar la digestibilidad *in vitro* mediante los métodos de incubación con líquido ruminal o mediante el método de incubación enzimática en pajas de avena, cebada, maíz, sorgo y trigo utilizadas en sistemas de producción de leche en pequeña escala del noroeste del Estado de México.

5.2. Objetivos específicos

- Determinar la digestibilidad *in vitro* de la materia seca y materia orgánica, de pajas de avena, cebada, maíz, sorgo y trigo mediante el método de incubación con líquido ruminal e incubación enzimática.

- Realizar el análisis estadístico de los resultados de determinación de digestibilidad entre cada uno de los métodos evaluados.

- Determinar la composición química de las pajas evaluadas en términos de contenidos de proteína cruda (PC), Fibra Detergente Neutro (FDN), Fibra Detergente Ácido (FDA), contenido de cenizas y materia orgánica.

- Discutir las ventajas y desventajas de cada una de las dos técnicas de digestibilidad *in vitro* usadas.

VI. MATERIAL

6.1. Material biológico

Se evaluaron 59 muestras de pajas, 12 de Avena (*Avena sativa*), 14 de Cebada (*Hordeum vulgare*), 14 de Maíz (*Zea mays*), 8 de Sorgo (*Sorghum bicolor*) y 11 de Trigo (*Triticum aestivum*).

Las muestras fueron recolectadas de catorce unidades de producción de leche en pequeña escala de comunidades del municipio de Aculco, ubicado al noroeste del Estado de México, como parte de proyectos de investigación en el mejoramiento participativo de sistemas de producción de leche en pequeña escala del Instituto de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (ICAR) de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM).

Las muestras que se colectaron, corresponden a un periodo de tres años: de febrero de 2011 a febrero de 2014.

Se usó líquido ruminal de una vaca canulada, con un peso vivo aproximado de 500 kg, y una condición corporal de 3 en una escala de 1 a 5; ubicada en la Unidad de Bovinos Productores de Leche de la Posta Zootécnica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAEM.

6.2. Material no biológico

- Material de gabinete: Libros, revistas en línea, artículos científicos, computadora con Microsoft Office, bolígrafos, hojas y lápiz.
- Material de laboratorio: Bata, guantes, cubre bocas, mascarilla, lentes de protección, frascos de plástico para almacenar las muestras, balanza analítica, crisoles, mufla, bolsas Ankom, analizador de fibras Ankom 2000, estufa de aire forzado, digestor Büchi, unidad de destilación Büchi 323, termómetro, reactivos, incubadora Ankom Daisy II.

VII. MÉTODO

7.1. Digestibilidad con líquido ruminal

Para la determinación de la digestibilidad *in vitro* por este método, se siguió un protocolo recomendado por el fabricante para el incubador Daisy II, cuyo principio es establecer condiciones de incubación semejantes a las que se encuentran *in vivo*.

7.1.1. Procedimiento

Previamente a la técnica se pesaron 0.5 g MS de cada muestra (ya identificada con un marcador resistente a acetona) en bolsas Ankom de 5 X 5 cm de tamaño total, y de 5 µm de tamaño de poro. Posteriormente se sellaron las bolsas y se registraron los pesos para luego distribuirlas homogéneamente en el frasco de fermentación (máximo 25 muestras por frasco).

Para la preparación del inóculo ruminal se precalentaron dos termos con agua a 39°C antes de coleccionar el líquido ruminal (deberá filtrarse); se requieren 400 ml por cada frasco de fermentación.

En los cuatro frascos se prepara una mezcla líquida de 2 litros incluyendo soluciones compuestas por minerales, fuentes de nitrógeno y agentes reductores que ayudan a la anaerobiosis necesaria en el proceso, siendo conformada por dos soluciones durante la incubación (A y B) en unas proporciones de 1.330 L de solución A y 266 ml de solución B esto para ajustar un pH de 6.8, más 400 ml de líquido ruminal y una tercera solución después de la incubación (C); siendo constituidas las soluciones de los siguientes reactivos (Ankom Technology, Operator's Manual Daisy II Incubator) :

A. Solución A:	g/l
KH ₂ PO ₄	10.0
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5
NaCl	0.5
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.1
Urea	0.5
B. Solución B:	
Na ₂ CO ₃	15.0
Na ₂ S•9H ₂ O	1.0

C. Solución neutro detergente

El líquido ruminal se colectó de un bovino, hembra adulta, de raza Holstein, fistulada del rumen, con un peso promedio de 500 kg.

Una vez colectado el líquido ruminal se mezcló en cada frasco con las soluciones A y B en las proporciones ya dichas, más un máximo de 23 muestras y un blanco (bolsa vacía y sellada sin muestra) previamente identificadas y registradas para ser saturadas con CO₂ durante 5 minutos y después ser colocados en el equipo Daisy (Ankom Tehcnology) previamente calentado a 39°C, iniciando la incubación de 48 horas.

Transcurridas las 48 horas se vació el líquido y se realizó un pre enjuague de las muestras con agua fría para después ser procesadas en el analizador de fibras (Ankom 2000), usando la solución neutro detergente a una temperatura de 100°C durante una hora, completamente cerrado, para después realizar tres lavados a una temperatura de entre 70 y 90°C con agua, añadiendo 4 ml de alfa amilasa a los dos primeros enjuagues y terminar exprimiendo el exceso de agua

cuidadosamente. Después de terminar el proceso y los enjuagues en el equipo Ankom 2000, las muestras fueron remojadas durante 5 minutos en acetona para después colocarlas en una superficie y dejarlas secar al aire; una vez secas se metieron a una estufa a $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas.

Por último fueron introducidas en bolsas herméticas aplastándolas para remover el aire y se enfriaron a temperatura ambiente para proceder al pesado.

7.1.2. Cálculo

$$DEGRADACION = [W_3 - (W_1 + \text{peso de la muestra degradada} - W_4) / (W_3)]$$

En donde:

W_1 = Peso de la bolsa

W_2 = peso de la muestra + peso de la bolsa

W_3 (peso de la muestra seca) = $(W_2 - W_1) \times \text{contenido de materia seca (g.g}^{-1}\text{)}$

W_4 = Peso de la bolsa corregida (peso del blanco final/peso del blanco inicial)

7.2. Digestibilidad Enzimática de Materia Orgánica

(Previo al proceso se hace determinación de FDN)

7.2.1. Reactivos

Acetato sódico trihidratado

Ácido acético

Cloranfenicol

Celulasa "Onozuka" R-10

Agua destilada

7.2.2. Proceso

Una vez realizada la solución, se colocaran las bolsas F57 con los residuos de Fibra Detergente Neutro en un frasco de Ankom Daisy.

El equipo deberá estar previamente calentado a 40°C para iniciar la rotación y cuando el termostato marque los 40 °C comenzará la incubación que es de 24 horas.

Pasadas las 24 horas se sacarán los frascos y se destaparán con cuidado enjuagando las muestras con agua destilada previamente calentada aproximadamente a 60°C, realizando 5 enjuagues (se calentarán 25 ml por muestra).

Una vez concluido se colocara cada muestra en charolas de aluminio en la estufa a 103±1 °C durante 12 h.

Pasadas las 12 horas se retiraran las charolas en desecadores donde estarán durante 30 minutos procediéndose después a pesarlas (en la misma balanza que se pesaron las bolsas para FDN).

Anotar como: Tara + residuo de incubación

Se tomarán las charolas y se introducirán en una estufa previamente caliente a 550°C durante 1.5 horas.

Acabada la incineración se abrirá y apagará la mufla y con pinzas se colocarán las charolas en desecadores donde permanecerán por una hora para después pesar.

Anotar como: Tara + cenizas de incubación

7.2.3. Cálculo

El cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\%DMO = \frac{MO \text{ inicial} - ((Tara - \text{residuos incubación}) - (Tara + \text{cenizas de incubación}))}{MO \text{ inicial}} * 100$$

En donde:

MO inicial = materia orgánica inicial (g)

MO inicial = $\frac{(\text{materia seca} - \text{cenizas})}{100} * \text{peso muestras (g)}$

7.3. Determinación de Fibra

Las fracciones de fibra se determinan de acuerdo al método descrito por método de Ankom Technology; basado el método desarrollado por Van Soest *et al.* (1991) el cual ofrece un cálculo preciso del total de fibra detergente neutra (FDN) compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina esta última una sustancia fenólica que se encuentra en la pared celular de las forrajes y de fibra detergente acida (FDA) compuesta por hemicelulosa y celulosa.

En el alimento la fibra o cantidad de pared de celular tiene efectos importantes en su valor nutritivo. En general mientras más bajo es el contenido de fibra, más alto es el contenido de energía, pero las fracciones de fibra son necesarias en las raciones para vacas lecheras para estimular la rumia y mantener la digestión.

De acuerdo a lo anterior se utilizó un Analizador de Fibra Ankom 2000, diseñado para determinar con precisión y eficientemente la FDN, FDA y Fibra Cruda (FC) de muestras de alimentos.

7.3.1. Análisis de FDA

7.3.1.1. Preparación de muestra

Usando un marcador resistente a solvente se identifica el total de las bolsas filtro que se utilizarán durante el análisis para que inmediatamente se pesen una a una y se registre dicho peso.

Se coloca una bolsa vacía abierta en el portabolsa y se tara el peso, después se añaden de 0.45 a 0.5 g de muestra a la bolsa filtro y se registra el peso exacto. Con ayuda de un sellador en el que el dial de calor se encuentre entre 4 y 5 se sella la bolsa filtro a 4mm de su extremo abierto (si el sello no es fuerte, volver a sellar la bolsa). Este segundo punto se repite para cada una de las muestras.

Posteriormente se colocan las bolsas filtro con la muestra (y por lo menos una bolsa blanco por corrida) en la bandeja portabolsas (máximo de tres bolsas por bandeja). Se apilan todas las bandejas en la barra de portabolsas, notando que la novena bandeja actúa como tapa por lo que no debe contener bolsas.

7.3.1.2. Proceso de la muestra

Se verifica que el suministro de agua caliente esté conectado y que la manguera de desagüe esté colocada de manera segura. Después se coloca la manguera de la solución Detergente Ácido a la Cubetainer y luego al puerto B del Analizador Ankom 2000.

Se abre la tapa del recipiente, se coloca en él el portabolsas con las muestras y se adiciona el peso en la barra del portabolsas. Se gira el interruptor de alimentación del Analizador en posición ON. La pantalla se iluminará y se permite seleccionar un procedimiento de análisis: se selecciona “ADF Select” en la pantalla y se presiona “ENTER” en el teclado numérico; a continuación se siguen las instrucciones de la pantalla.

En seguida se cierra la tapa del recipiente y se gira la manija hasta que quede apretada; se presiona “Start” en el teclado. Después de alrededor de 50 minutos

aparecerá el mensaje “Process complete” en la pantalla, que indica que la operación está completa. Se abre la tapa y se retiran las muestras.

Por último se retira el agua sobrante de las bolsas y se colocan en un vaso de precipitados de 250ml y se añade suficiente acetona para cubrirlos durante 3 a 5 minutos. Posteriormente se retiran las bolsas del vaso y se colocan en una rejilla para secar al aire. Una vez que estén secas, se colocan en el horno de 2 a 4 horas a una temperatura de 102 °C; pasado este tiempo se retiran las bolsas y se colocan en una bolsa desecante para enfriar a temperatura ambiente unos 10 ó 15 minutos. Se extrae cada una de las bolsas filtro y se pesa inmediatamente.

7.2.1.3. Cálculo

El cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ FDA (base as-received)} = \frac{100 \times (W3 - (W1 \times C1))}{W2}$$

En donde:

W1= Peso de la bolsa Tara

W2= Peso de la muestra

W3= Peso seco de la bolsa filtro con la fibra después del proceso de extracción

C1= Corrección bolsa blanco (corriente promedio del peso final oven-dried dividido por el peso original de la bolsa en blanco).

7.3.2. Análisis de FDN

7.3.2.1. Preparación de la muestra (mismo procedimiento que para FDA)

Usando un marcador resistente a solvente se identifica el total de las bosas filtro que se utilizarán durante el análisis para que inmediatamente se pesen una a una y se registre dicho peso.

Se coloca una bolsa vacía abierta en el portabolsa y se tara el peso, después se añaden de 0.45 a 0.5 g de muestra a la bolsa filtro y se registra el peso exacto.

Con ayuda de un sellador en el que el dial de calor se encuentre entre 4 y 5 se sella la bolsa filtro a 4mm de su extremo abierto (si el sello no es fuerte, volver a sellar la bolsa). Este segundo punto se repite para cada una de las muestras.

Posteriormente se colocan las bolsas filtro con la muestra (y por lo menos una bolsa blanco por corrida) en la bandeja porta bolsas (máximo de tres bolsas por bandeja). Se apilan todas las bandejas en la barra de porta bolsas, notando que la novena bandeja actúa como tapa por lo que no debe contener bolsas.

7.3.2.2. Proceso de la muestra

Se verifica que el suministro de agua caliente esté conectado y que la manguera de desagüe esté colocada de manera segura. Después se coloca la manguera de la solución Detergente Neutro a la Cubetainer y luego al puerto A del Analizador Ankom 2000.

Se abre la tapa del recipiente, se coloca el portabolsas con las muestras y se adiciona el peso en la barra del porta bolsas.

Se fija el ensamble de dosificador de Amilasa en el puerto B y el dispensador se llena a la mitad con agua. Se agregan 8ml de Amilasa en el dispensador y posteriormente se procede a llenar el dispensador con agua.

Se gira el interruptor de alimentación del Analizador en posición ON. La pantalla se iluminará y se permite seleccionar un procedimiento de análisis: se selecciona "NDF Select" en la pantalla y se presiona "ENTER" en el teclado numérico; a continuación se siguen las instrucciones de la pantalla.

Enseguida se cierra la tapa del recipiente y se gira la manija hasta que quede apretada; se presiona "Start" en el teclado. Después de alrededor de 50 minutos aparecerá el mensaje "Process complete" en la pantalla, esto indica que la operación está completa. Se abre la tapa y se retiran las muestras.

Por último se retira el agua sobrante de las bolsas y se colocan en un vaso de precipitados de 250ml y se añade suficiente acetona para cubrirlos durante 3 a 5

minutos. Posteriormente se retiran las bolsas del vaso y se colocan en una rejilla para secar al aire. Una vez que estén secas, se colocan en el horno de 2 a 4 horas a una temperatura de 102 °C; pasado este tiempo se retiran las bolsas y se colocan en una bolsa desecante para enfriar a temperatura ambiente unos 10 ó 15 minutos. Se extrae cada una de las bolsas filtro y se pesa inmediatamente.

7.3.2.3. Cálculo

El cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula

$$\% \text{ FDN (base as-received)} = \frac{100 \times (W3 - (W1 \times C1))}{W2}$$

En donde:

W1= Peso de Tara la bolsa

W2= Peso de la muestra

W3= Peso secos del bolso de filtro de la fibra después de proceso de extracción

C1= Corrección bolso blanco (corriente promedio del peso final oven-dried dividido por el peso original de la bolsa en blanco)

7.4. Determinación de cenizas

Esta determinación se basa en someter la muestra a combustión. La materia orgánica se oxida, y el residuo que contiene la materia mineral se llama cenizas.

Los compuestos inorgánicos o minerales son los otros elementos químicos que componen los alimentos, cuando se coloca una muestra de ellos en un horno y se mantiene la temperatura a 550°C durante 3 horas, la materia orgánica se quema, obteniendo así solo la parte mineral denominada ceniza (Wattiaux, 2002).

El procedimiento se realizará de acuerdo a los análisis establecidos en el Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR); para la obtención de cenizas es el siguiente:

Se identifican los crisoles en que se pesarán las muestras y se procede a pesarlos.

Posteriormente en el crisol, previamente pesado, se pesan 2 g de muestra.

Se precalienta una mufla a 550 °C.

Se calcinan las muestras durante 3 horas.

Se retiran los crisoles de la mufla (dejar enfriar la mufla antes de sacarlos) y colocarlos en el desecador hasta que se encuentren totalmente fríos.

Se pesan las muestras y se calcula el total de cenizas con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{(\text{crisol} + \text{cenizas} - \text{peso del crisol})100}{\text{peso de la muestra}}$$

7.5. Determinación de nitrógeno

Dado que el elemento característico de las proteínas es el nitrógeno, los métodos de cuantificación de proteína se basan esencialmente en la determinación del contenido de nitrógeno de la muestra.

Para determinar la proteína cruda se utilizó el método de Kjeldhal desarrollado en 1883 para determinar la cantidad de nitrógeno en un compuesto, de esta forma el porcentaje de proteína de un alimento típicamente se calcula como el porcentaje de nitrógeno multiplicado por 6.25 ($100/16=6.25$) lo que representa la proteína cruda, esto se refiere porque no todo el contenido de nitrógeno en el alimento está en forma de proteína (Wattiaux, 2002).

El proceso consta de cuatro pasos:

Preparación de la muestra. Se pesa 0.5 g de cada muestra sobre un papel libre de Nitrógeno (N). La muestra se envuelve con el papel libre de N y se coloca dentro de un tubo de digestión Büchi. Cada muestra debe tener su repetición y por corrida se debe poner un blanco.

Digestión. Se pre-calienta el Digestor Büchi al nivel 10 de temperatura por lo menos 10 minutos. El voltaje del digestor es de 220V. Posteriormente se agrega a cada tubo de digestión (donde previamente se colocó la muestra) una pastilla catalizadora de cobre y 12ml de ácido sulfúrico con un dispensador. Se coloca el tubo captador de gases con sus respectivos sujetadores de seguridad a los tubos de digestión y estos son introducidos en el Digestor al mismo tiempo que se conectan las mangueras de succión y se enciende el lavador de gases Scruber. La digestión tarda una hora hasta que las muestras estén claras. Por último el Digestor se pone a un calentamiento nivel 0 y las muestras se dejan enfriar.

Destilación. Previamente abierta el agua de enfriamiento del Destilador Büchi, este se enciende y se presiona la tecla “Pre Heating” una vez que el mensaje de espera haya desaparecido. Antes de usar el equipo se confirma que esté programado de la siguiente manera: H₂O-50ml, NaOH-60ml, Delay-5 sec, y por último Dist- 5 min. Posteriormente en un matraz Erlenmeyer de 250ml se adicionan 30ml de ácido bórico al 4% y 5 gotas de indicador verde de bromocolesterol-rojo de metilo para recibir el destilado. Se coloca cada uno de los tubos de digestión en el destilador con su respectivo matraz y se pulsa la tecla “Start” (primero se destilan los blancos); cuando la muestra esté totalmente alcalinizada (de color negro), se retira el matraz.

Titulación. Se titula con ácido clorhídrico 0.1 N hasta que el color cambie de verde a rosa. Se anota el volumen de ácido que se usó.

Cálculo. La fórmula para realizar el cálculo es la siguiente:

$$\% N = \frac{(14.01)(ml_{muestra} - ml_{blanco})(NHCl)}{(\text{Peso de la muestra})(10)}$$

En donde:

14.01 = Miliequivalente del nitrógeno

NHCl = Normalidad del ácido clorhídrico

ml muestra = ml de HCl 0.1N gastados en el destilado de cada muestra

ml blanco = ml de HCl 0.1N gastados con el destilado de los blancos

7.6. Análisis estadístico

Los datos recolectados a partir del análisis químico de las diferentes pajas fueron procesados en el programa para análisis estadístico Minitab - V14, bajo un diseño experimental de bloques completamente al azar (Little y Hills, 1985), cuyo modelo matemático es el siguiente:

$$Y = \mu + t_i + B_j + e_{ij}$$

En donde:

μ = Media general

t_i = Efecto debido al tratamiento (enzimática, líquido ruminal)

B_j = Efecto debido a bloques (muestras de pajas) (1, 2, 3, 4 y 5)

e_{ij} = Error experimental

VIII. LÍMITE DE ESPACIO

El total de muestras provienen de las comunidades de El Tepozán, Guanyó, El Tixhiñú, San Jerónimo, La Concepción, San Lucas y San Pedro Denxhi, pertenecientes al municipio de Aculco, ubicado en el altiplano del Estado de México.

El municipio tiene una extensión de 465.7 kilómetros (equivalente a una superficie de 46,570 hectáreas), de las cuales el 45% se destinan a la agricultura, el 20.92% es de uso pecuario y el 19.48% al uso forestal. Los principales cultivos son el maíz forrajero, el trigo, la avena forrajera, la cebada y el frijol. Alrededor de tres mil productores se dedican a la ganadería, siendo el ganado bovino de productor de leche el de mayor importancia; las principales comunidades con potencial ganadero son Bañé, San Antonio Pueblo, Tixhiñú, Guanyó y El Tepozán (Martínez, 2009).



Figura 1. Ubicación geográfica del municipio de Aculco con respecto al Estado de México. De este municipio se obtuvieron las diferentes pajas utilizadas en este trabajo.

Los análisis de laboratorio se realizaron en el Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR) de la Universidad Autónoma del Estado de México, ubicado en el Campus Universitario “El Cerrillo”, en el municipio de Toluca, Estado de México.

IX. LÍMITE DE TIEMPO

Los análisis de laboratorio se realizaron durante los meses de Septiembre de 2015 y concluyeron en Febrero de 2016.

El trabajo final de tesis se realizó durante los meses de Marzo, Abril y Mayo del 2016.

X. RESULTADOS

Evaluación de la digestibilidad *in vitro* en pajas

En el Cuadro 2 se presentan los resultados de la digestibilidad *in vitro* por el método de incubación con líquido ruminal. A partir de los valores de digestibilidad se pudo estimar el contenido de energía metabolizable; ya que la obtención de datos fiables acerca del valor energético de los forrajes es un requisito para la correcta formulación de dietas para rumiantes, además de que contribuye a su valorización como alimento (Flores *et al.*, 2003).

Los resultados indican que en esta técnica el rastrojo de maíz con un valor medio de 582 g/kg MS es la paja más digestible superando con más de 45 gramos a la paja de cebada que ocupa el segundo lugar en orden descendiente en cuanto a digestibilidad. La paja de trigo obtuvo el último lugar en cuanto a digestibilidad con 411 g/kg MS. Dado que la energía metabolizable va de la mano con el valor de la digestibilidad el rastrojo de maíz aporta más energía con 8.14 MJ/kg, seguido de la cebada, avena, sorgo y trigo con valores de 8.13, 8.07, 7.86 y 6.37 MJ/kg EM respectivamente.

Cuadro 2. Media de digestibilidad *in vitro* de la materia seca mediante incubación con líquido ruminal de cinco pajas evaluadas.

	Avena	Cebada	Maíz	Sorgo	Trigo	EEM	Significancia
DIVMS g/kg	531	535	582	516	411	0.85	P>0.05
EM MJ/kg	8.07	8.13	8.14	7.86	6.37	0.01	P>0.05

DIVMS= Digestibilidad *in vitro* de la materia seca. EM = Energía Metabolizable estimada.

En el Cuadro 3 se presentan los resultados obtenidos de digestibilidad *in vitro* mediante la técnica de Digestibilidad Enzimática de la Materia Orgánica de Riveros y Argamentaria, y los valores de energía metabolizable de cada tipo de paja. Los resultados en esta técnica indican que la digestibilidad en las pajas va de 562 g/kg MS (obtenida por el rastrojo de maíz) hasta 479 g/kg (valor de la paja de trigo). Al igual que en la técnica de incubación con líquido ruminal los valores más altos fueron los de la paja de maíz y los valores más bajos los de la paja de trigo, pero en este caso el segundo puesto fue ocupado por la paja de avena. En ambas técnicas el cuarto puesto fue ocupado por la paja se sorgo.

Cuadro 3. Media de digestibilidad de los cinco tipos de pajas evaluados mediante la técnica de digestibilidad enzimática *in vitro* de la materia seca de cinco pajas evaluadas.

	Avena	Cebada	Maíz	Sorgo	Trigo	EEM	Significancia
DIVMS g/kg	528	510	562	525	479	0.82	P>0.05
EM MJ/kg	8.03	7.77	8.49	7.98	7.33	0.01	P>0.05

DIVMS= Digestibilidad *in vitro* de la materia seca. EM = Energía Metabolizable estimada.

Comparación entre ambas técnicas de digestibilidad *in vitro*

En el cuadro 4 se presentan los resultados de la comparación estadística entre ambas técnicas de digestibilidad *in vitro*: de incubación con líquido ruminal y enzimática, mediante un análisis estadístico de diseño de bloques incompletos al azar. Los resultados no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en su comparación ($P>0.05$) tanto en la digestibilidad de materia seca como en materia orgánica.

Cuadro 4. Comparación entre los métodos de digestibilidad: Incubación con Líquido Ruminal y Digestibilidad Enzimática de la Materia Orgánica en MS y MO.

DIV	Con Líquido Ruminal	Enzimática	EEM	Significancia
DIV MS g/kg	515	521	0.82	P>0.05
DIV MO g/kg	574	580	0.85	P>0.05

DIV: Digestibilidad *in vitro* de un alimento, MS: Materia Seca, MO: Materia Orgánica, EEM: Error Estándar de la Media, NS: P>0.05

Composición química de las pajas

En el cuadro 5 se presentan los resultados en cuanto a contenido de Materia Seca (MS), Proteína Cruda (PC), Fibra Detergente Ácido (FDA), Fibra Detergente Neutro (FDN) y Energía Metabólica (EM), así como el resultado del respectivo análisis estadístico en las pajas utilizadas en SPLPE.

Cuadro 5. Composición química (g/kg MS) promedio de cinco pajas.

-	Avena	Cebada	Maíz	Sorgo	Trigo	EEM	P>0.05
MO	900	898	936	891	892	0.33	NS
Cenizas	99	101	63	108	107	0.33	NS
FDA	383	405	359	454	414	0.83	NS
FDN	606	610	556	610	621	0.36	NS
PC	44	43	40	37	36	0.18	NS

MO: Materia orgánica, FDA: Fibra Detergente Ácido, FDN: Fibra Detergente Neutro, PC: Proteína Cruda, EEM: Error Estándar de la Media, P>0.05: Probabilidad *no significativa (ns).

Comparación de ambas técnicas en cuanto a viabilidad como técnica de rutina

Como se menciona en la justificación, para una institución que se dedica a la investigación en producción animal, es de vital importancia estandarizar técnicas

que permitan conocer de manera eficiente los resultados requeridos en las investigaciones.

Flores *et al.* (2003) menciona que el principal inconveniente de la técnica de incubación con líquido ruminal es su laboriosidad por lo que en las labores rutinarias de estimación de digestibilidad en el laboratorio no es viable.

Aunado a esto se encuentra otra importante desventaja para la técnica de digestibilidad mediante incubación con líquido ruminal: la indudable dependencia (como su nombre lo indica) de una fuente de inóculo ruminal; necesitando así de una animal donante que conlleva gastos en alimentación (y mano de obra para su cuidado) e instalaciones para el mismo. Por otro lado, los resultados se ven afectados por la variabilidad y calidad del líquido ruminal influida por el animal, tipo de dieta y momento de extracción, así como por el cuidado en cual se mantienen las medidas de anaerobiosis, pH óptimo y temperatura del inóculo durante su manipulación.

Por otra parte la técnica de digestibilidad enzimática, comparada con la de incubación con líquido ruminal representa un tiempo de veinticuatro horas más corta y no depende de una fuente de inóculo ruminal para simular la digestibilidad. Como se puede observar las ventajas de la técnica de digestibilidad enzimática dan respuesta a las desventajas de la técnica de digestibilidad por incubación con líquido ruminal.

La técnica de digestibilidad enzimática debe ser favorecida simplemente porque la técnica de digestibilidad por incubación con líquido ruminal compromete el bienestar animal de la vaca fistulada que se requiere como donador del inóculo; y en lo personal, hoy en día en las ciencias biológicas, es muy importante dar atención siempre a garantizar el bienestar animal.

XI. DISCUSIÓN

Para la correcta evaluación de los materiales es necesario que los investigadores validen las técnicas que usan; contrastándolas con otros métodos. Aun cuando se considera que los forrajes son la fuente de alimentación más económica para los animales rumiantes, las investigaciones para determinar su valor son menores con relación a las conducidas en otros alimentos (Lachman y Araujo, 1999). Los datos obtenidos desde estudios en 1977 utilizando diferentes tipos de celulasas concluyen que estos métodos pueden ser usados para predecir la digestibilidad de los alimentos con bastante precisión comparada con la técnica de incubación con líquido ruminal descrita desde 1963 por Tilley y Terry (Tobal, 1997).

En el Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales de la Universidad Autónoma del Estado de México se han realizado con anterioridad comparaciones entre las técnicas *in vitro*: digestibilidad por incubación con líquido ruminal y enzimática, no mostrando diferencias estadísticamente significativas para los siguientes forrajes utilizados en Sistemas de Producción de Leche en Pequeña en Escala: praderas de clima templado (*Lolium perenne*, *L. multiflorum*, *Dactylis glomerata*, *Festuca arudinacea*, *Pennisetum clandestinum* asociadas con *Trifolium repens* y *T. pratense*), forraje de cereales de grano pequeño (*Avena sativa*, *Secale cereale* y Triticale) y ensilados de maíz; y el trabajo aquí presentado completa los estudios con los resultados para pajas y rastrojos, no habiendo diferencias significativas entre ambas técnicas.

Por lo tanto, la técnica de digestibilidad enzimática de la materia orgánica o la materia seca puede sustituir a la técnica de rutina (incubación con líquido ruminal) en casi la totalidad de los forrajes que se utilizan en los Sistemas de Producción de Leche en Pequeña Escala.

El método de incubación con líquido ruminal tiene la dificultad de tener que mantener animales fistulados en el rumen, que preferentemente deben ser de la misma especie para la cual se evalúan los forrajes, ya que se ha observado que con la utilización del líquido ruminal de especies diferentes, se obtienen resultados distintos.

Además, se ha observado que este método subvalora la digestibilidad en aquellos rangos que son inferiores a 650 g/kg MS lo cual puede deberse a la falta de tiempo de fermentación con líquido ruminal, especialmente en forrajes de baja calidad nutritiva (Tobal, 1997), lo que podría relacionarse con este trabajo ya que en las pajas y rastrojos los datos mostraron 15 g más de digestibilidad en la técnica enzimática, y como se sabe estas se consideran de baja calidad y su digestibilidad se encuentra por debajo de los 650 g/kg MS.

Por otra parte Di Marco (2011) indica que independientemente del método usado se puede definir a un forraje de baja calidad nutricional cuando este contiene valores de menos de 500 g/kg de DIVMS, más de 650 g/kg de FDN y de PC menos de 80 g/kg; todo lo anterior en base seca.

Los resultados de este trabajo de los análisis antes mencionados para las pajas y rastrojos utilizados en los Sistemas de Producción de Leche en Pequeña Escala en el noroeste del Estado de México indican que las pajas de Avena, Cebada, Maíz y Sorgo los ubican como forrajes entre baja y mediana calidad ya que sus digestibilidades superan los 500 g/kg MS y el promedio de su valor de Fibra Detergente Neutro llega sólo a 608 g/kg MS (incluida la paja de Trigo), mientras que el promedio total de PC sólo llega a 41 g/kg MS. En cambio la paja de Trigo con un promedio de digestibilidad de 445 g/kg MS sí cuenta con dos de las características que Di Marco (2011) indica para clasificar a un forraje de baja calidad.

XII. CONCLUSIONES

No existen diferencias en la digestibilidad de la MS y MO de pajas de avena, cebada, maíz, sorgo y trigo, determinada por las técnicas *in vitro*: método de incubación con líquido ruminal y técnica de digestibilidad enzimática.

Dados los laboriosos procedimientos para su montaje, los altos costos, su dependencia de un inóculo ruminal sumando así sus problemas con respecto al bienestar animal de la primera técnica, se puede concluir que la técnica de digestibilidad enzimática es la mejor opción para los análisis de rutina en el Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales de la UAEMex.

De acuerdo a los resultados de la composición química se concluye que, a excepción de la paja de trigo, las pajas utilizadas en los Sistemas de Producción de Leche en Pequeña Escala en el noroeste del Estado de México, no son totalmente de baja calidad ya que en general sus valores son mejores que los encontrados en la literatura y, basándonos en el principio de que la digestibilidad es el principal parámetro para la evaluación de calidad de un forraje, los valores de digestibilidad se encuentran por arriba de 500 g/kg MS y los de Fibra Detergente Neutro por debajo de 650 g/kg MS, característicos de forrajes de mala calidad.

XIII. LITERATURA CITADA

- Adapa P, Tabil L, y Schoenau G. (2009) Compaction characteristics of barley, canola, oat and heat straw. *Biosystems Eng.* 104:335-344.
- Alderman G, Cottrill BR. (1995): *Energy and Protein Requirements of Ruminants.* CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Ankom Technology, Operator's Manual Ankom 2000 Fiber Analyzer. Disponible en <https://ankom.com/instrument-manuals.aspx> (15 de diciembre 2015).
- Ankom Technology, Operator's Manual DaisyII Incubator Disponible en: <https://ankom.com/instrument-manuals.aspx> (15 de diciembre 2015).
- Castillo OF, Rodríguez SR, Prieto GF, y Román GAD. (2012) Caracterización Física y Química Proximal de Paja, Grano y Almidón de Cebada de la Variedad Esmeralda, Área Académica de Química, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Chamberlain AT, y Wilkinson JM. (2002): *Alimentación de la vaca lechera.* Editorial Acribia. Impreso en España. ISBN: 84-200-0971-7
- Di Marco O. (2011): Estimación de calidad de los forrajes, 20(240)-1, Facultad de Ciencias Agrarias, Argentina.
- Eckert R, Randall D, y Augustine G. (1994): *Fisiología Animal.* Interamericana McCraw Hill. Impreso en España. ISBN: 84-7615-436-0
- Espinoza OE, Álvares MA, Del Valle MC, y Chauvete M. (2005) La economía de los sistemas campesinos de producción de leche en el Estado de México,

Técnica Pecuaria de México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México

Fadul L., Wattiaux M., Espinoza A., Sánchez E., Arriaga C (2013): Evaluation of sustainability of smallholder dairy production systems in the highlands of Mexico during the rainy season. *Agroecology and Sustainable Food Systems*. 37:882-901.

Flores CA, González AA, Castro GJ, Castro GP, Cardelle CM, Fernández LB, Valladares AJ. (2003): Evaluación de métodos de laboratorio para la predicción de la digestibilidad *in vivo* de la materia orgánica de ensilajes de hierba y planta entera de maíz. *Pastos*, 33(1): 5-26

García PR. (2001) *Diccionario Básico de la Lengua Española*. Editorial LAROUSSE. Primera edición. Impreso en México. ISBN: 970-607-009-5.

Giraldo LA, Gutiérrez LA, y Rúa C. (2007): Comparación de dos técnicas *in vitro* e *in situ* para estimar la digestibilidad verdadera en varios forrajes tropicales, *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20(3), Universidad de Antioquia Colombia.

González MSS. (2000): Aprovechamiento de esquilmos y subproductos en la alimentación del ganado, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados, Estado de México, México.

Guzmán GJL, Gómez CA, Garrido VA, y Guerrero GJE. (1996): Mejora el valor nutritivo de las pajas de cereales, Departamento de Producción Animal, ETSIAM, Universidad de Córdoba, España.

Lachmann M, y Araujo FO. (1999): La estimación de la digestibilidad en ensayos con rumiantes, Facultad de Ciencias Veterinarias y Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

- Little TM y Hills F J. (1985): Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Editorial Trillas, DF.
- López VA, Morales SMS, Cabrera CR, y Arias M. (2001): Ingestión y digestibilidad aparente en llama (*Lama glama*). II. Heno de trébol rosado (*Trifolium partense*), heno de ballica (*Lolium multiflorum*), paja de poroto (*Phaseolus vulgaris*) y paja de avena (*Avena sativa*), Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Martínez BE. (2009): La lechería en el Estado de México: sistema productivo, cambio tecnológico y pequeños productores familiares en la región de Jilotepec. Bonilla Artiagas Editores, México.
- Martínez ED, Pulido RG, y Latrille E. (2001) Efecto de la paja de trigo tratada con álcali sobre el consumo de alimento y comportamiento ingestivo de vacas lecheras, Instituto de Zootecnia, Instituto de Producción Animal, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Maynard AL, Loosli KJ, Hintz HF, Warner RG. (1983): Nutrición animal. Séptima edición, Mc Graw Hill. México. ISBN: 0-07-041049-6.
- Mercado AAR. (2012): Asistencia técnica dirigida en nutrición y sanidad de ganado vacuno lechero, Universidad Nacional Agraria La Molina, La Molina, Perú.
- Parsi J, Godio L, Miazzi R, Maffioli R, Echevarria A, y Provencal P. (2001): Cursos de Producción Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Pérez CAE. (2015): Efecto de la amonificación de la paja de sorgo, sobre su valor nutricional, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón Coahuila.

- Relling AE, y Mattioli GA. (2003): Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina (pg. 5, 8, 15).
- Riveros E, Argamentarías A. (1987): Metodos Enzimáticos de Predicción de la Digestibilidad *In Vivo* de la Materia Organica de Forrajes, Avances en Produccion Animal, Vol. 12, Ed. Mario Silva G. 59-75, Chile.
- Secretaría de Fomento Agropecuario (2010): Estudios sobre la utilización de la paja de trigo, Universidad Autónoma de Baja California, Baja California, México.
- Tobal CF. (1997): Evaluación de los alimentos a través de los diferentes métodos de digestibilidad, Universidad Nacional de La Pampa, <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/anuavet/n1999a16tobal.pdf> (01 de marzo 2016).
- Van Soest PJ, Robertson JB, y Lewis BA. (1991): Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition, Department of Animal Science and Division of Nutritional Sciences, Cornell University, New York, U.S.A.
- Vancov T, McIntosh S. (2012): Mild acid preteatment and enzyme saccharification of *Sorghum bicolor* Straw. *Applied Energy*, 92(1): 422-423.
- Velásquez A, Arias R, Toneatti M. (2012): Effect of the type of substrate on the chemical composition and productivity of a protein concentrate of yeast origin. *Ciencia e Investigación Agraria*, 39(3): 427-428.
- Velasquez A, Marnet PG, Arias R. (2015): Improvement in nutritional quality in fibrous food via *in vitro* digestion by *Aspergillus niger*. *Ciencia e Investigación Agraria*, 42(1): 47-48.

- Wattiaux MA. (2002): Composición y análisis de alimentos. En Instituto Babcock para la investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Universidad de Wisconsin-Madison, <http://babcock.wisc.edu/es/node/143> (01 de diciembre 2015).
- Wolfgang SW. (2000): Alimentos complementarios para producción de carne, <http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/NUTRICION/TEORICOS/Tema%202.%20Material%20de%20lectura.%20Alimentos.%20Generalidades.pdf> (7 de abril de 2016).
- Yescas YR, Bársena GR, Mendoza MGD, González MSS, Cobos PM, Ortega CME. (2004): Digestibilidad *in situ* de dietas con rastrojo de maíz o paja de avena con enzimas fibrolíticas. *Agrociencia*, 38(1): 24-25.