RECOMENDACIONES SOBRE LA UTILIZACION DE LOS METODOS *IN VITRO, IN SITU* Y ENZIMATICO EN EL ESTUDIO DE LA DIGESTION DE ALIMENTOS

Diego González[1], *Manuel E. Ruiz, Francisco Romero, Danilo Pezo*

1. Digestion *in vitro*

a. Donante de licor ruminal

(1) Dieta. Idealmente debe haber coincidencia entre el alimento que consume el animal donante y el (los) alimento (s) a evaluar. Sin embargo, en la evaluación *in vitro* se distinguen dos objetivos generales: 1) la evaluación masiva de germoplasma (selección primaria) y 2) la generación de información puntual para el desarrollo de modelos de digestión, con miras a la predicción del consumo voluntario. En el primer caso no es factible que los donantes estén adaptados a los alimentos a evaluar y, además, el propósito es clasificar los distintos germoplasmas. En este caso, se recomienda proveer a los animales una dieta de calidad intermedia (con respecto al germoplasma en evaluación) que asegure una adecuada actividad celulolítica. En el segundo caso, la coincidencia alimentaria es primordial. En ambos casos, los animales donantes deben recibir una alimentación adecuada en cuanto al suministro de nitrógeno y minerales.

(2) Adaptación dietética. Para análisis rutinarios, el aspecto de adaptación dietética no es de preocupación, siempre y cuando se mantenga la condición de que los donantes reciban una dieta intermedia, y que estén adecuadamente provistos de nitrógeno y minerales. Es decir, las fluctuaciones en calidad y disponibilidad de alimento deben corregirse a lo largo del año.

[1] Coordinador del grupo de trabajo.

Copyrighted material

Para el análisis específico de alimentos seleccionados, la adaptación de los animales debe tomar por lo menos 14 días, dependiendo del grado de cambio con respecto a la dieta previa. Cuando se trate de evaluar alimentos no tradicionales, el período de adaptación puede ser mayor, siendo el criterio para declarar al donante adaptado, la estabilidad en el consumo voluntario. Durante el período de adaptación no debe usarse el licor ruminal.

(3) Frecuencia de alimentación. Este aspecto sólo aplica a condiciones en que el donante se mantiene en corral. Según evidencias, una frecuencia de alimentación de dos veces por día es semejante a frecuencias mayores, en cuanto a la tasa de recambio ruminal y la tasa de digestión (Ruiz Paz y Thiago, 1988). En todo caso, la interrogante sobre la frecuencia de alimentación queda reducida en gran medida si se aseguran condiciones ad libitum. Cualquier frecuencia que se use, debe ser mantenida durante todo el período experimental.

Otro aspecto de relevancia es el momento en que se debe obtener el licor ruminal. En situaciones en que se alimente dos o tres veces por día, se recomienda que esto se efectúe en un momento intermedio entre una y otra alimentación. Si la frecuencia de alimentación es de una vez por día, es preferible hacer la extracción del licor inmediatamente antes de efectuar la alimentación.

(4) Edad. El criterio fundamental es que el animal tenga una actividad ruminal plena. Se recomienda fistular los animales después del estrés del destete (en el caso de ovejas, una vez que hayan alcanzado un tamaño apropiado para la fístula), y no usarlos como donantes después que hayan alcanzado la madurez. En el caso de bovinos esto implica que los animales deben estar entre uno y cinco años de edad (Ruiz Paz y Thiago, 1988), mientras que en los ovinos el intervalo sería de uno a cuatro años.

b. Variación entre especies e individuos

Existen diferencias entre especies en cuanto a tasas de digestión y de recambio y, asociado a esto, diferencias en población microbiana en las pruebas de digestibilidad *in vitro* Estas diferencias tienden a desaparecer debido al uso de soluciones "buffer" y nutritivas, además de que la tasa de recambio no puede ser medida en estas pruebas.

La variación entre individuos se contrarresta teniendo el cuidado de que el licor ruminal sea una muestra compuesta de por lo menos dos donantes.

c. Manejo del licor ruminal

(1) Método de extracción. La extracción del licor puede hacerse a mano o por bombeo, sin que ello altere los resultados. En el caso que se desee aumentar la actividad celulolítica del

Copyrighted material

inóculo, se debe obtener contenido ruminal (licor + material sólido) para separar los microorganismos celulolíticos adheridos a la fibra, según se explica más adelante. En cualquier caso, el licor debe tomarse de los diferentes compartimientos del rumen, en forma aleatoria, pero asegurando que una parte se obtenga de la región ventral anterior.

(2) Manejo del licor. El tiempo transcurrido desde la extracción hasta la preparación final del inóculo debe ser el mínimo necesario. Se recomienda que los animales se mantengan cerca del laboratorio a fin de que el tiempo transcurrido entre la extracción y la inoculación no sea superior a los 15 minutos.

Dos prácticas que disminuyen el riesgo de reducción de la actividad fermentativa del inóculo son mantener el frasco de colección a una temperatura de alrededor de 40°C, y llenar a capacidad el frasco, evitando así la oxigenación del material. El material obtenido debe ser filtrado en por lo menos cuatro capas de gasa, para evitar el paso de partículas.

d. Preparación de la muestra a ser digerida

(1) Tamaño de partícula. A medida que el tamaño de partícula se reduce la estimación de la digestibilidad aumenta. Sin embargo, a tiempos prolongados de incubación, los valores de digestibilidad acumulada tienden a asemejarse. Como ejemplo, a 96 h la diferencia en digestibilidad acumulada entre partículas de 0.4 y 1.96 mm es de 2.4 unidades porcentuales, pero a 48 h la diferencia es de 4.7 unidades. Se recomienda que el tamaño de partícula se estandarice a 1 mm.

(2) Cantidad de muestra. Si se reduce la cantidad de muestra, manteniendo constante el volumen de inóculo, se incrementa la estimación de digestibilidad y la variabilidad entre duplicados. A fin de compensar parcialmente posibles errores de manejo del método, y previendo que el investigador podría incluir análisis posteriores en el residuo, se recomienda que para un volumen de 50 ml de inóculo se use 0.5 g de muestra. En el caso particular de tener que analizar un gran número de muestras, y en función de la economía de reactivos, se puede reducir a 0.25 g de muestra y 25 ml de inóculo.

e. Observaciones sobre el método

(1) Relación licor/"buffer". Manteniendo la incubación a 48 h, una relación de 10 ml de "buffer" por 40 ml de licor ruminal es suficiente para producir resultados que difieren poco (aproximadamente dos unidades) de la digestibilidad *in vivo*, así como del valor de digestibilidad potencial.

(2) Solución "buffer". Existe una gran proliferación de soluciones "buffer". Un punto en que hay acuerdo es que éstas deben mantener un rango

Copyrighted material

de pH óptimo de 6.7 a 7.0, recomendándose 6.9 para la digestión de materiales celulósicos y 6.8 para materiales ricos en almidón. El "buffer" a usar debe proveer una fuente constante de nitrógeno. La importancia de ésto es mayor cuando se analizan materiales pobres en proteína. Sin embargo, también es necesario añadir una fuente de azúcares reductores para evitar tiempos de latencia excesivamente largos. Si no se añade azúcar, la adición de nitrógeno no ejercerá ningún efecto sobre la digestión. Se recomienda usar la solución "buffer" de McDougall, por ser la más frecuentemente usada. A ésta se recomienda añadir sulfato de amonio y glucosa, quedando la composición (cantidades por litro, peso/volu nen) como sigue:

9.80 g $NaHCO_3$
7.00 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (3.71 g anhidro)0.57 g KCl
0.47 g NaCl
0.12 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
0.17 g $SO_4(NH_4)_2$
0.50 g glucosa

Según el procedimiento de Mc Dougall, hay que preparar también una solución al 4% (peso/volumen) de cloruro de calcio. Antes de usar el "buffer" se añade 1 ml de dicha solución por litro de "buffer", gaseándose luego con CO_2 durante una hora.

(3) Tipo de tubo. De preferencia deben usarse tubos de vidrio de 100 ml. En caso de usar tubos de plástico, es preferible que éstos sean de polietileno que de policarbonato, pues con los primeros se obtienen mejores resultados (Moore y Mott, 1975). También se pueden usar frascos Erlemmeyer de 125 ml, con el inconveniente de ocupar más espacio en la incubadora, aunque tienen la ventaja de producir valores de digestibilidad más altos (2-4 unidades porcentuales), por la mayor superficie de contacto que se obtiene entre substrato e inóculo. En forrajes de baja digestibilidad, las diferencias entre tubo y frasco Erlemmeyer son mayores. En substratos de alta digestibilidad, la diferencia es nula.

(4) Gaseado. El usar gaseo continuo o gaseo único es una decisión que depende de tres factores: 1) Número de muestras a procesar, 2) Facilidades con que se cuenta en el laboratorio y, 3) Preferencia o comodidad del investigador. Por ejemplo, sería impráctico y engorroso el usar gaseo contínuo cuando se tienen que procesar un gran número de muestras, como sería el caso de la evaluación primaria de germoplasma.

(5) Frecuencia de agitación. Se recomienda la práctica de agitar suavemente el contenido de los tubos una hora después de iniciada la incubación, hasta que se vea que las partículas estén humedecidas, seguida por dos agitaciones adicionales en el primer día. En el segundo día se deben agitar tres veces.

(6) Réplicas. Como norma general, cada determinación debe hacerse en duplicado. Sin embargo, en la práctica, y por las limitaciones de

Copyrighted material

laboratorio, tiempo y recursos, se recomienda que si el muestreo de campo ya tiene réplicas, éstas no se junten en muestras compuestas, para poder hacer determinaciones sin duplicado. Para fines de ilustración se citan las siguientes situaciones:

- Un experimento de pastoreo en que se obtienen muestras compuestas de cada tratamiento a diferentes épocas: El análisis de digestibilidad debe hacerse en duplicado dentro de cada época para cada muestra.

- Un experimento de pastoreo en que se obtienen varias muestras de cada potrero en cada época: Se hace un análisis de digestibilidad, sin réplica, de cada muestra.

- Un experimento de corral, donde de un comedero comunitario se obtiene una muestra del alimento rechazado: Se hace la determinación de digestibilidad *in vitro* en duplicado.

(7) Estándares. Es necesario tener un estandar interno, pudiendo el material usado para ese propósito provenir de un forraje cuya digestibilidad in vivo es conocida. Se recomienda que el estándar interno represente dos o tres diferentes niveles de digestibilidad *in vitro* (alto, mediano y bajo).

(8) Duración de las fases celulolítica y enzimática. Se recomienda mantener la fase celulolítica en 48 h. En el caso de la fase enzimática, estudios de CIAT y del Comité NC-64 (USDA) indican que la fase enzimática debe limitarse a 24 h. En el caso de forrajes muy fibrosos y de bajo contenido proteico, la fase enzimática puede eliminarse.

(9) Filtrado. Con el fin de mantener homogeneidad entre laboratorios, se recomienda el uso de un papel de filtrado rápido (Whatman 54). En el caso de determinaciones en MO, se deberá usar un papel filtro con bajo contenido de cenizas (Whatman 541).

(10) Tratamientos especiales. En el caso de alimentos que presenten problemas de filtrado, como aquellos con alto contenido de grasa, se recomienda la utilización de "surfactantes" (Solka Floc, Hyflo Supercel).

(11) Parámetros a medir. Los siguientes son los parámetros de mayor significado nutricional:

- Valor D, definido como la cantidad de MO digerible expresada como porcentaje de la MS.

- Digestibilidad de la MO (DMO).

- Digestibilidad de la MS (DMS).

- Digestibilidad de los componentes de la pared celular.

Si el objetivo es determinar el valor energético del alimento, es preferible calcular el valor D. En el caso de analizar los componentes de la pared celular, se puede efectuar el análisis de los componentes en el

Copyrighted material

residuo. En muestras contaminadas con tierra, es preferible calcular la DMO. La mayor utilidad de la DMS es en trabajos de evaluación primaria de germoplasma, por su facilidad y rapidez.

Todos los métodos de digestibilidad *in vitro* resultan en una estimación de la digestibilidad aparente. Sólo en el caso en que la fase de digestión con pepsina sea seguida por un análisis de NDF en el residuo, se puede estimar la digestibilidad verdadera.

2. Degradación enzimática

Si bien los métodos de degradación enzimática son aplicables en la evaluación primaria de germoplasmas, en la selección inicial de recursos alimenticios y para la predicción del valor energético, no lo son así para otros objetivos. Aún en el caso en que estos métodos son aplicables, contienen limitaciones relacionadas principalmente con el costo y disponibilidad de enzimas, y el requerimiento de especificidad de las mismas con respecto al substrato.

Experiencias en la utilización de celulasas para estimar la digestibilidad del componente fibroso de concentrados, forrajes verdes de clima templado y ensilajes, indican que este método es tan efectivo y, en ciertos casos, hasta superior al método de digestibilidad *in vitro*. En los casos en que se ha concluido esto se demuestra mayor precisión, repetibilidad y menor tiempo de digestión. Para forrajes tropicales, aparentemente no hay evidencia de que la efectividad del método enzimático sea menor que la del método de digestibilidad *in vitro*. Sin embargo, esta es un área que requiere mayor investigación, recomendándose la realización de estudios comparativos entre estos métodos y los *in vitro*, la estandarización de procedimientos y la definición de condiciones mínimas necesarias para la aplicación de estos métodos a nivel de análisis rutinarios.

3. Digestibilidad *in situ*

a. Características de las bolsas

(1) Material. Las bolsas que se utilicen deben ser preferentemente de dacrón (poliester), debido a que esta tela está hecha de fibras soldadas y no tejidas. Esto evita los problemas que se presentan cuando se trabaja con nylon, el cual tiende a estirarse con el uso repetido de las bolsas, variando el tamaño original de los poros. Al fabricar las bolsas, se deben coser con hilo de poliester (no algodón), evitando dejar ángulos rectos en la base de las bolsas. Las costuras deberán sellarse con un pegamento resistente al agua, de preferencia uno de los utilizados para pegar vinil.

(2) Tamaño de los poros. La tela de dacrón a ser usada deberá tener un tamaño de poro que varíe entre 30

Copyrighted material

y 50 µm. Dado que el grosor de las fibras puede variar, también es importante considerar la densidad de poros, la cual puede variar entre 1600 y 2000 poros/cm^2.

(3) Tamaño de la bolsa. Se han utilizado diferentes tamaños de bolsa; sin embargo, si se consideran las cantidades de muestra frecuentemente empleadas y la relación superficie de bolsa/peso de muestra, se concluye que el tamaño de bolsa recomendable es de 17 x 9 cm.

b. Características de la muestra

(1) Tamaño de partícula. El tamaño de partícula recomendado para muestras a ser digeridas *in situ* varía en función de la naturaleza del material evaluado. En el caso de pajas, henos muestras secas de forraje y granos se recomienda moler la muestra usando un tamiz de 2 a 3 mm. En forrajes frescos y ensilajes el tamaño de partícula deberá ser de 5 mm. Es preferible no moler los suplementos proteicos y los concentrados comerciales, a menos que estén en forma de "pellets", caso en que deberán ser molidos ligeramente con un mortero.

(2) Cantidad de muestra y su relación al tamaño de la bolsa. A menudo la cantidad de muestra que se utiliza en estos estudios es de 5 g; sin embargo, la cantidad a ser incubada variará de acuerdo con los análisis que se deseen hacer en el residuo. Para la estimación de la superficie de la bolsa, se debe considerar el área de ambas caras. Con base en esto, la relación cantidad de muestra/tamaño de la bolsa recomendada es de 10-15 mg/cm^2.

c. Características del animal fistulado

Las técnicas *in situ* pueden trabajarse ya sea con ovinos o bovinos, debiendo considerarse que en los primeros el número de bolsas a introducir en una corrida es de 6 a 9, mientras que en bovinos pueden introducirse de 24 a 36 bolsas por corrida. Con respecto a la edad del animal fistulado y su dieta, aplica lo descrito para el animal donante en la sección de digestión *in vitro*. El único caso en que la dieta varía es cuando se estudian interacciones entre alimentos (efecto de la dieta sobre la degradación de diferentes alimentos).

d. Localización de las bolsas dentro del rumen

(1) Posición de las bolsas. Las bolsas deberán colocarse preferentemente en la región ventral del rumen, dejándoles cierta libertad de movimiento, a fin de que estén expuestas a las diferentes condiciones del rumen.

(2) Método de sujeción. Para sostener las bolsas dentro del rumen, éstas deben amarrarse a cadenas, tubos o anillos plásticos con peso. Cualquiera que sea el método de sujeción, es importante que la distancia

Copyrighted material

entre la cánula y las primeras bolsas sea de 20 a 25 cm en ovejas, y de 40 a 50 cm en bovinos.

e. Repeticiones

La variabilidad de las determinaciones es mayor entre animales, seguido por períodos y menor entre bolsas incubadas en el mismo animal. Por ello, se recomienda que las determinaciones se hagan en tres animales y dos períodos por animal, con una sola bolsa por cada muestra. Si el propósito es determinar la tasa de degradación, se puede considerar una sola bolsa por cada tiempo dentro de período y animal, con duplicados para los tiempos más cortos de incubación.

f. Tiempos de incubación

En el caso de estudios en los que se pretende estimar las tasas de degradación, se recomienda introducir las bolsas en forma secuencial y extraerlas todas del rumen simultáneamente, a fin de tener un lavado uniforme de las mismas.

Los tiempos de incubación recomendados como mínimo, en el caso de suplementos proteicos, son: 2, 4, 6, 12, 24 y 36 h; en forrajes de alta calidad y leguminosas : 2, 4, 6, 12, 24 y 48 h; y en gramíneas tropicales y residuos fibrosos: 2, 6, 12, 24, 48 y 72 h. Los tiempos intermedios podrían variarse en función del punto de inflexión detectado en estudios piloto.

4. Modelos matemáticos

En teoría, todos los componentes nutritivos del alimento requieren de un período antes de que se inicie la fermentación microbiana, denominado período de latencia. En el caso de los componentes de la pared celular, este período de latencia es el necesario para que los microorganismos entren en contacto físico con el substrato. En el caso de la fermentación de la MS, MO y PC, la degradación aparente es detectable desde un principio y difícilmente se observa un período de latencia, dado que existen enzimas proteolíticas y amilolíticas en el fluido ruminal.

Si bien existen modelos que permiten estimar el período de latencia, la experiencia indica que este parámetro es altamente variable y poco reproducible. A falta de mejores técnicas de análisis y modelos, se recomienda basar la evaluación de la cinética de digestión en los parámetros de tasa de digestión y digestibilidad potencial. En la práctica se utiliza el tiempo de digestión media, el cual se ha definido de distintas formas. Una de ellas es el tiempo requerido para alcanzar una digestibilidad equivalente al 50%, lo que tiene poca aplicación con materiales cuya digestión es menor al 50%. Otra forma ha sido el tiempo requerido para alcanzar una digestibilidad igual al 50% de la digestibilidad potencial. Esta definición tampoco es satisfactoria pues no considera la fracción soluble del alimento. Una definición de mayor sentido nutricional es el tiempo re-

Copyrighted material

querido para que se digiera la mitad de la fracción digerible por acción microbiana. En este caso, la fórmula para calcular este valor depende del modelo matemático descriptivo de la cinética ruminal y siempre se expresa en función de los otros parámetros: digestibilidad potencial, tasa de digestión y valor de digestión a tiempo = 0 (en casos en que no hay período de latencia) o el valor de digestión al final del período de latencia (en casos en que éste exista).

La selección del modelo a aplicar en estudios de digestión *in vitro* o *in situ* depende de dos factores principales: 1) Coherencia del modelo con eventos biológicos y 2) Facilidades de computación. Obviamente, un criterio adicional en la selección del modelo es el grado de ajuste de éste a las observaciones; sin embargo, este criterio no debe primar sobre el criterio de que el modelo tenga sentido biológico.

Si existen facilidades de computación que permitan procesos iterativos para llegar a definir los parámetros, se recomienda utilizar modelos no lineales, que permiten escoger expresiones con sentido biológico y consideran que la digestión del alimento en el rumen no procede en forma lineal. Por otro lado, el uso de modelos no lineales requiere de cierto conocimiento matemático; además, estos modelos no diferencian las tasas de digestión de las fracciones muy fácilmente degradables de las lentamente degradables (a menos que se usen modelos no lineales de dos compartimientos). En la actualidad hay programas para microcomputadoras que permiten la generación de ecuaciones no lineales por métodos iterativos (SAS, SYSTAT y otros).

En caso de no existir facilidades computacionales, queda la alternativa de emplear funciones linearizables o aplicar la técnica de "resolución gráfica" descrita por Shipley y Clark (1972), que es un método visual de aproximación y, por lo tanto, sujeto a errores de apreciación subjetiva. El método de linearización fue concebido por Smith *et al*. (1971), asumiendo una cinética de digestión de primer orden y una tasa constante de degradación. Este método fue corregido para reconocer que existe, en la digestión de la fibra una fracción de digestión rápida y otra de digestión lenta. En la práctica, la estimación de esta última fracción ha presentado problemas por el comportamiento un tanto errático de los datos.

a. Análisis de datos: un ejemplo

Consecuente con la recomendación de usar modelos no lineales para describir el proceso de fermentación microbiana, se ofrece a continuación una serie de considerandos e ilustraciones de su aplicación.

(1) El modelo no lineal. Tal y como indica Pezo (ver su contribución en esta publicación), existe una variedad de modelos exponenciales. Por su simplicidad y significado biológico, se prefiere usar el modelo de Orskov y McDonald (1981), que se expresa así:

Copyrighted material

$$Y = a + b(1-e^{-kt}) \qquad [1]$$

donde:

Y = Digestibilidad acumulativa del componente nutritivo, %.
a = Intercepto a t = 0, o el valor de digestibilidad al final del período de latencia.
a+b = Digestibilidad potencial del componente nutritivo.
k = Tasa de digestión por acción fermentativa.

(2) Expresión de resultados. Los resultados de la incubación de alimentos *in vitro* e *in situ* generalmente se expresan en términos de porcentaje de digestibilidad acumulativa con respecto al material inicial.

(3) Análisis inicial. El primer paso en el análisis de los datos consiste en graficar la digestibilidad acumulativa (Y) *vs.* tiempos de incubación (X). Así por ejemplo, la representación gráfica de la degradación ruminal de alfalfa deshidratada (Cuadro 1) se presenta en la Figura 1.

Este ejercicio no sólo ayuda a detectar valores fuera de la tendencia general de los datos ("outliers"), sino que también ayuda a decidir sobre el modelo matemático a utilizar.

(4) Cómo calcular los parámetros. El ejemplo escogido muestra un período aparente de latencia de 2 h (Fig. 1). Si el modelo matemático

Cuadro 1. Degradación *in situ* en ovejas de alfalfa deshidratada.

Tiempo de incubación, h	Degradación acumulativa de la MS, %			
	Oveja 1	Oveja 2	Oveja 3	Promedio
0	35.1	32.8	33.8	33.9
1	34.6	31.8	32.9	33.1
2	33.8	33.0	36.7	34.5
3	36.9	38.7	38.1	37.9
4	42.8	44.5	44.1	43.8
6	51.3	51.8	53.2	52.1
9	55.8	55.2	57.0	56.0
12	61.4	61.0	63.0	61.8
18	69.4	70.1	69.0	69.5
24	71.1	71.1	72.0	71.4
36	73.6	74.1	74.0	73.9
48	73.3	73.9	74.2	73.8

Copyrighted material

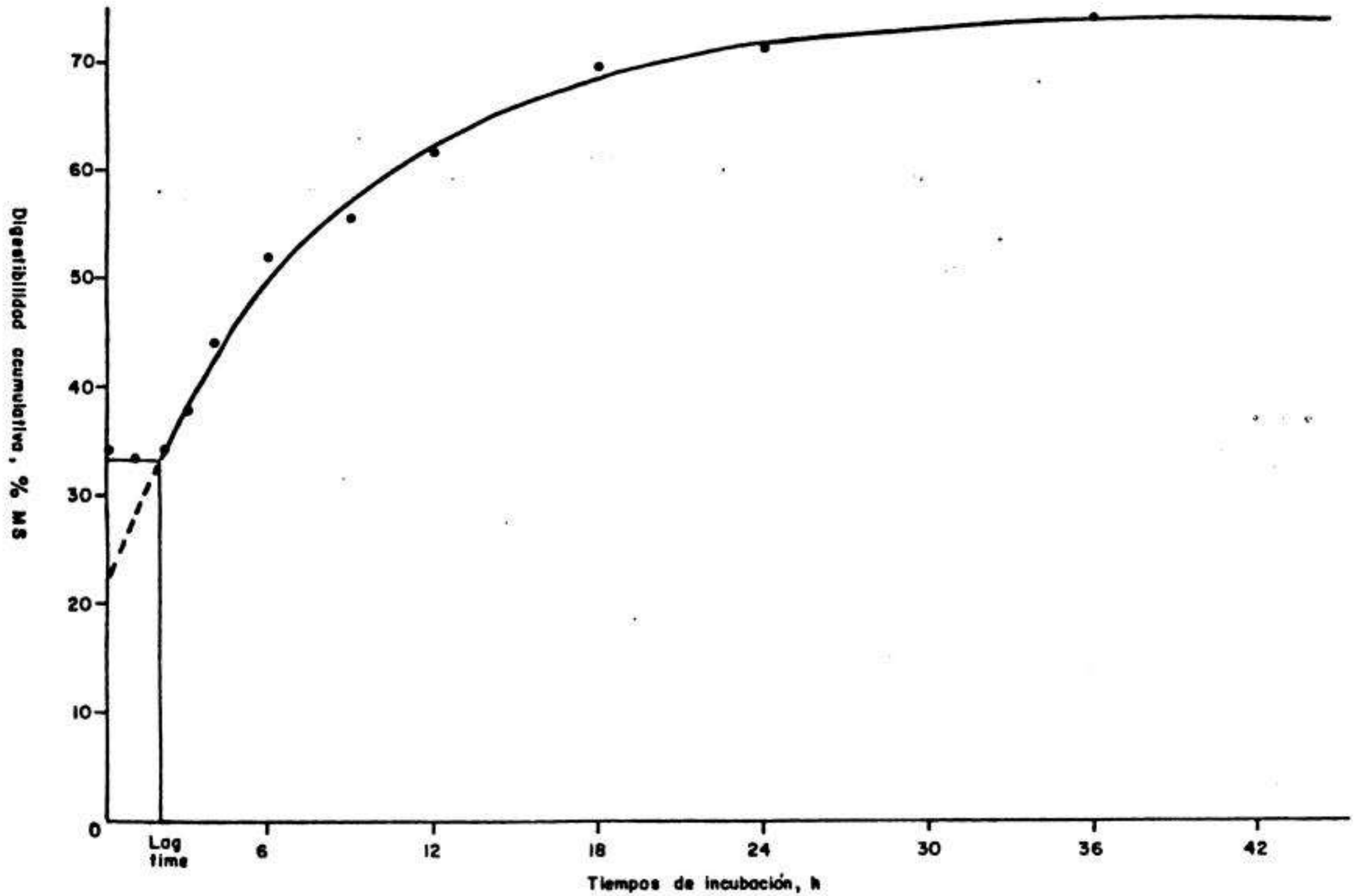

Fig. I Representación gráfica (manual) de la digestibilidad acumulativa de alfalfa deshidratada

Copyrighted material

escogido es uno que no estima la duración del período de latencia, el modelo aplicará únicamente a valores de "t" 2. En el ejemplo, cuando "t"= 2, Y es aproximadamente 25.0; es decir, "a" (el intercepto) = 25.0.

La digestibilidad potencial se estima proyectando el valor de digestibilidad acumulativa sobre el eje de las "X", hasta alcanzar un valor asintótico, que en el ejemplo sería de 74. Es decir, "(a+b)"= 74. El valor de "b" se calcula por diferencia, restando de "(a+b)" el valor de "a", o sea, 74.0-25.0= 49.0.

Para estimar el valor "k", se escoge un valor cualquiera de "Y" digamos 55, y se estima a que "t" corresponde este valor. En el ejemplo de la Figura 1, el "t" correspondiente es 8. El despeje de "k" en la función [1] se hace de la siguiente forma:

$$1-e^{-kt} = (Y-a)/b \qquad [2]$$

$$-e^{-kt} = ((Y-a)/b)-1 \qquad [3]$$

$$e^{-kt} = 1-((Y-a)/b) \qquad [4]$$

$$e^{-kt} = 1+((a-Y)/b) \qquad [5]$$

$$-kt = \ln[1+((a-Y)/b)] \qquad [6]$$

$$k = -\ln[1+((a-Y)/b)]/t \qquad [7]$$

Sustituyendo en [7] los valores encontrados y para Y= 55,

$$k = -\ln[1+((25.0 - 55.0)/49)]/8$$

$$k = 0.94738/8$$

$$k = 0.118$$

Entonces, los valores del Cuadro 1 y los valores estimados de "a", "b" y "k" se someten a un proceso de iteración, para definir los verdaderos valores de la función [1]. En el ejemplo el resultado es:

$$Y = 22.5 + 52.0\ (1-e^{-0.121t})$$

Si se desea calcular el parámetro tiempo de digestión media ($t_{1/2}$) con el modelo [1], la fórmula es:

$$t_{1/2} = (-\ln 0.5)/k \qquad [8]$$

Sustituyendo,

$$t_{1/2} = (-\ln 0.5)/0.121$$

$$t_{1/2} = 5.7 \text{ h.}$$

Se recuerda que la fórmula para el cálculo de $t_{1/2}$ es dependiente del modelo matemático usado.

Para calcular el tiempo de latencia en la digestión de MS, MO o PC de acuerdo a [1], se requiere determinar la fracción soluble de dichos componentes. La fracción soluble de la pared celular (FND) se puede considerar que tiene un valor de cero. En el caso de querer determinar la fracción soluble cuando se utiliza la técnica *in vitro*, esto se puede hacer añadiendo a la muestra el inóculo (licor ruminal + solución "buffer") e inactivando inmediatamente las bacterias con cloruro de mercurio ($HgCl_2$). Luego se filtra y se determina el peso del residuo siguiendo los mismos

Copyrighted material

pasos del proceso de digestibilidad *in vitro*. La diferencia entre el peso inicial de la muestra y el peso del residuo representa la fracción soluble. También se puede determinar la fracción soluble introduciendo las muestras en bolsas de dacrón y lavándolas tal y como se hace con bolsas incubadas en el rumen.

Con base en el valor de la fracción soluble (a') y los parámetros de la ecuación no lineal [1] (a, b y k) se puede calcular el tiempo de latencia (t_o) según la siguiente fórmula (Orskov y McDonald, 1981):

$$t_o = 1/k \ln[b/(a+b-a')]$$

5. Referencias

MOORE, J.E.; MOTT, G.O. 1975. Fermentation tubes for *in vitro* digestion of forages. Journal of Dairy Science 59:167.

ORSKOV, E.R.; McDONALD, I. 1981. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. Journal of Agricultural Science (Cambridge) 92:499.

RUIZ PAZ, M.E.; THIAGO, L.R.R. DE S. 1988. Methodological aspects in ruminal digestion studies. 1. Effect of feeding frequency. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 23:797.

SHIPLEY, R.A.; CLARK, R.E. 1972. Tracer methods for *in vivo* kinetics: Theory and applications. New York, EE.UU., Academic Press. 347 p.

SMITH, L.W.; GOERING, H.K.; WALDO, D.R.; GORDON, D.H. 1971. *In vitro* digestion rates of forage cell wall components. Journal of Dairy Science 54:71.

Copyrighted material