



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

TRABAJO FINAL DE GRADUACION

(MODALIDAD PASANTIA)

RES. Nº 4.186-C.D.

TITULO: Entrenamiento en técnicas de laboratorio para la determinación de Fibra Detergente Ácida y Fibra Detergente Neutra.

ALUMNO: Iery, Leandro Ezequiel

ASESOR: Ing. Agr. José Orlando Llamas

CATEDRA DE QUIMICA ANALÍTICA y AGRÍCOLA

Contenido

TITULO	2
INTRODUCCION:	2
OBJETIVOS	3
LUGAR DE REALIZACION.....	4
TIEMPO DURACIÓN.....	4
EQUIPOS Y MATERIALES REQUERIDOS	4
REACTIVOS	4
DESCRIPCION DE LAS TAREAS DESARROLLADAS:	5
RESULTADO	11
ANALISIS COMPLEMENTARIOS:.....	13
Determinacion de porcentaje proteina	13
Determinacion de porcentaje extracto etéreo.....	14
Determinacion de pH y conductividad electrica	14
Usos de sobres de tela vegetal.....	14
COMENTARIOS	15
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS	16

TITULO

Entrenamiento en técnicas de laboratorio para la determinación de Fibra Detergente Ácida y Fibra Detergente Neutra.

INTRODUCCION:

Los sistemas tradicionales para determinar el contenido de fibra en alimentos animales han sido el análisis proximal (método Weende) y el método de los detergentes de Van Soest (Van Soest *et al.*, 1991). Éste último tiene ventajas sobre el primero porque separa a los carbohidratos de acuerdo a su disponibilidad nutricional y hasta puede servir como un predictor de digestibilidad (Van Soest, 1994).

La fibra insoluble en detergente neutro (FDN) es el residuo remanente después de una solubilización del alimento en detergente neutro. Está compuesta por hemicelulosa, celulosa, lignina, cenizas y proteína ligada, y por esto ha sido comparada con el término “pared celular”. En algunos casos, las concentraciones de FDN y de pared celular son similares, pero en el caso de las leguminosas la concentración de FDN es mucho menor, debido a que las pectinas (componentes de la pared celular) son solubilizadas por el detergente neutro, no apareciendo en el residuo.

De todas las fracciones fibrosas, la FDN es la que mejor se correlaciona con el consumo voluntario, siendo por esto la fracción más importante dentro de la fibra a considerar.

La fibra en detergente ácido (FDA) es el residuo remanente de la solubilización del alimento en detergente ácido. Este detergente provoca la solubilización de los mismos componentes que el detergente neutro más la hemicelulosa. A pesar de las asociaciones estadísticas positivas encontradas entre concentración de FDA y digestibilidad (Weiss, 1994), no existe una base científica sólida que conecte estos dos parámetros (Van Soest *et al.*, 1991).

Desde el punto de vista de la fisiología de la nutrición, la fibra es la porción del alimento que:

- limita la digestión,
- requiere ser masticada para la reducción del tamaño de partícula y
- ocupa espacio en el rumen (Grant, 1991).

La fibra como nutriente contribuye al mantenimiento del funcionamiento ruminal (llenado ruminal y estímulo de las contracciones ruminales) y de las condiciones ruminales (pH, a través de la secreción salivar dependiente de la masticación y la rumia). Por otro lado, la fibra supone un inconveniente, en el sentido que limita el contenido energético de las raciones (baja digestibilidad) y el potencial de ingestión. La formulación correcta de raciones debe buscar el equilibrio entre la ingestión máxima de materia seca (niveles bajos de FDN) y en el mantenimiento de las funciones y condiciones normales del rumen (aportando unos niveles mínimos de FDN y FDA) (Church, 1989).

El contenido de esta en la dieta se asocia con la composición de la leche, ya que por medio de su digestión se producen los principales precursores de la grasa láctea. Además, la calidad y cantidad de fibra consumida afectan la capacidad de consumo voluntario y la cantidad de energía que pueda aportar una ración. Así, la fibra tiene implicaciones importantes en las prácticas de alimentación del ganado lechero al afectar la salud, la producción y servir para estimar el contenido de energía de los forrajes y alimentos, así como el consumo voluntario (Weiss, 1993a, 1993b).

Para cuantificar las fracciones de la pared celular de importancia nutricional frecuentemente se utiliza la metodología desarrollada por (Van Soest y Robertson, 1985), la cual determina los contenidos de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), hemicelulosa, celulosa, lignina y sílica en los alimentos y forrajes. Este método de fraccionamiento de la fibra involucra la utilización de sustancias detergentes y en la actualidad es la mejor metodología para cuantificar la fibra y sus componentes (Sniffen, 1992).

OBJETIVOS

- Entrenamiento en la recepción de muestras, acondicionamiento y procesamiento para su análisis.
- Determinar el contenido de fibra detergente ácida y neutra, en muestras de forrajes por medio de la técnica de Van Soest.

LUGAR DE REALIZACION

- Laboratorio de Química Analítica y Agrícola, Departamento de Física y Química, Facultad de Ciencias Agrarias – U.N.N.E.

TIEMPO DURACIÓN

320 Horas.

EQUIPOS Y MATERIALES REQUERIDOS

- Balanza analítica
- Sobres de papel madera
- Estufa
- Molino de martillo (para molienda gruesa)
- Molino tipo Wiley (para molienda fina)
- Tela Vegetal (para confección de sobres porta muestras)
- Campana de gases
- Plancha caliente
- Pinzas
- Pipetas
- Buretas de 1000 y 100 ml
- Vasos de precipitado de 500 ml
- Pissetas
- Cápsulas de porcelana
- Horno Mufla

REACTIVOS

- Solución detergente neutra.
- Solución detergente ácida.

DESCRIPCION DE LAS TAREAS DESARROLLADAS:

El trabajo se llevó adelante con muestras provenientes de ensayos de investigación propios de la cátedra. Fueron analizadas 13 muestras con sus respectivas repeticiones.

A las mismas se les dio ingreso al laboratorio, asentando los datos en un cuaderno de análisis. Posteriormente. Se procedió a etiquetarlas con un número de ingreso, se las colocó en bolsas de papel previamente taradas (Foto N°1a), obteniendo así su peso fresco (Foto N° 1b), luego se llevó a estufa (65-100°C) hasta obtener peso constante donde volvimos a pesarla, y por diferencias de peso se determinó contenido de humedad.

Una vez seca la muestra se realizó una molienda gruesa con un Molino de Martillo (Foto N° 2a) seguida de una molienda fina con Molino tipo Wiley con malla de diámetro de 1 mm (Foto N° 2b), obteniéndose un producto homogéneo como vemos en la (Foto N° 2c). Se procedió entonces al pesado de las muestras para los análisis correspondientes, para lo cual fue necesario la confección de sobres porta muestras. Los cuales fueron confeccionados con tela vegetal de un tamaño aproximado de 7 cm largo por 5 cm de ancho (Foto N° 3). En cada uno de estos sobres previamente tarados y numerados, se pesó 1 g de muestra.

Seguidamente fueron preparadas las soluciones (SDN y SDA) para lo cual utilizamos distintos reactivos:

SDN: (Foto N° 4)

- ✓ Agua destilada
- ✓ Lauryl sulfato de sodio USP
- ✓ Disodium hydrogen phosphate, anhydrous reagengrado
- ✓ 2 ethoxyethanol (etyne glycol monoethyl ether)

SDA: (Foto N° 5)

- ✓ Agua destilada
- ✓ Acido sulfúrico 1N
- ✓ Cetyl trimethylamonium bromide (CTAB) technical grade

Posteriormente con las muestras pesadas y colocadas en sus respectivos sobres, y con las soluciones preparadas (Foto N° 6) se procedió a la determinación de la FDN. Para ello se colocaron 4 sobres por cada vaso de precipitado de 500 ml a los que se le agregó 150 ml de SDN.

Los vasos de precipitado fueron llevados a plancha caliente bajo campana de gases (Foto N° 7), manteniéndolos 1 hora en ebullición (desde el inicio de la misma). Uno de los cuidados importantes fue mantener el volumen de solución constante lo que se realizó agregando agua destilada permanentemente ya que al evaporarse provocaría un aumento de la concentración de la solución, lo que podría provocar errores en la cuantificación.

Una vez transcurrido el tiempo establecido, se retiraron los vasos de la plancha y se realizaron repetidos lavados de los sobres con agua caliente hasta que desapareció todo rastro de solución, lo que se pudo comprobar por la desaparición total de la espuma. El paso siguiente fue llevarlos a estufa (100°C) hasta la obtención de peso constante (Foto N° 8) y se volvieron a pesar.

Con esos mismos sobres se inició la determinación de FDA y para ello se procedió de la misma manera que lo anteriormente descrito, pero esta vez la solución utilizada fue SDA.

Los sobres, después de una hora de ebullición en SDA, fueron lavados y colocados en estufa hasta peso constante.

Posteriormente fueron colocados en cápsulas de porcelana (previamente taradas) para su ascenización.

Se puso especial cuidado en asignar una cápsula a cada sobre con muestra (Foto N° 9). A continuación colocamos dentro de la cápsula la micro muestra contenida en el sobre para su posterior incineración en el horno mufla a 550 °C durante tres horas (Foto N° 10), obteniendo como producto de la incineración las cenizas de las muestras (Foto N° 11). Las cenizas fueron utilizadas para la posterior cuantificación de los macro y micronutrientes, tareas que no fueron objetivos de esta pasantía.

En las tablas N° 1 y 2 se observan los valores obtenidos de los % FDN y FDA.

Para obtener los porcentajes de FDA y FDN se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cz} = ((\text{Pc} + \text{Cz} - \text{Pc}) * 100 / 1\text{g}) * \text{Fc} =$$

Cz: cenizas

Pc: peso cápsula

Fc: factor de corrección

$$\% \text{ FDA o FDN} = ((\text{Ps} + \text{Ms} - \text{Ps}) * 100) - \% \text{ Cz} =$$

Ps: peso de sobre

Ms: materia seca

Cz: cenizas



Foto N° 1a: Tara de sobre.



Foto N° 1b: Sobre + materia fresca previo secado en estufa.



Foto 2a: Molienda gruesa de la muestra.



Foto 2b: Molienda fina con Molino tipo Wiley.

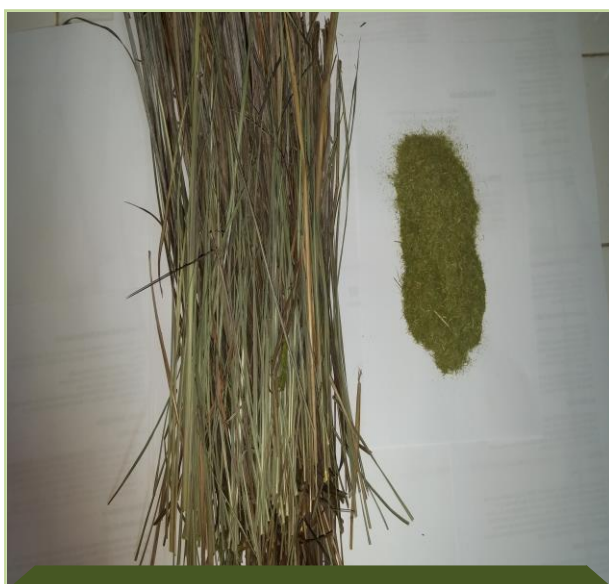


Foto 2 c: Muestra antes y después de la molienda gruesa y fina.



Foto N° 3: Confección de sobres porta muestras.



Foto N° 4: Reactivos para la preparación de SDN.



Foto N° 5: Reactivos utilizados en la preparación de SDA.



Foto N° 6: Sobres numerados y pesados con sus respectivas muestras.



Foto N° 7: Vasos de precipitado con las muestras en solución en plancha caliente.



Foto N° 8: Sobres en estufa.



Foto N° 9a: Sobres y cápsulas, previa incineración en horno mufla.



Foto N° 10: Cápsula + muestras en horno mufla.



Foto N° 11: Cenizas provenientes de la incineración de las muestras.

RESULTADO

A continuación se presentan los datos obtenidos de las muestras analizadas en el presente trabajo. Dichas muestras fueron de *Sorghastrum setosum* (Griseb.) Hitchc (paja amarilla), del Campo Anexo General Obligado, dependiente de la E.E.A. INTA Colonia Benítez (Chaco). El pastizal natural es la base forrajera de la ganadería de esta región, la calidad y disponibilidad, definen el tipo de ganadería que prevalece en la misma. Una característica es que están compuestos casi exclusivamente por especies estivales, como los pajonales de *Sorghastrum setosum* (Griseb.) Hitchc (Bernardis *et al.*, 2005).

Tabla N°1: Correspondiente a % FDN

Numero de muestra	Numero de sobre	Peso del sobre	Peso del sobre + MS	Peso de capsula	Peso de capsula + Cz	% FDN
1	1	0,2669	1,0117	18,7069	18,7433	70,84
1	2	0,2948	1,05	18,63	18,6746	71,06
2	3	0,2970	1,0421	17,7030	17,7389	70,92
2	4	0,3001	1,0428	11,961	11,9964	70,73
3	5	0,3034	1,0756	11,7567	11,7848	74,41
3	6	0,3	1,0754	17,8649	17,8922	74,81
4	7	0,3008	1,0811	9,6993	9,7518	72,78
4	8	0,3139	1,0948	10,5989	10,6509	72,89
5	9	0,3501	1,0973	14,1827	14,2326	69,73
5	10	0,3259	1,0534	15,0661	15,1038	68,98
6	11	0,2988	1,0475	20,9497	21,0099	68,85
6	12	0,27	1,0262	20,0166	20,0784	69,44
7	13	0,3008	1,0388	15,6028	15,6505	69,03
7	14	0,2724	1,0148	9,6813	9,7399	68,38
8	15	0,3031	1,0390	12,5606	12,6329	66,36
8	16	0,3387	1,0944	12,5598	12,6410	67,45
9	17	0,3467	1,0789	11,9623	12,0236	67,59
9	18	0,3273	1,0493	15,6022	15,6655	65,87
10	19	0,3321	1,0789	10,6	10,6408	70,6
10	20	0,2966	1,0565	9,6797	9,7218	71,78
11	21	0,3002	1,0664	11,7573	11,7919	73,16
11	22	0,2603	1,0276	12,5602	12,5944	73,31
12	23	0,2693	0,9809	14,1847	14,2089	68,74
12	24	0,3120	1,0314	18,7084	18,7281	69,97
13	25	0,3098	1,0163	15,0677	15,0964	67,78
13	26	0,2809	0,9931	9,7013	9,7288	68,47
Promedio						70,15

Tabla N° 2: Correspondiente a % FDA

Numero de muestra	Numero de sobre	Peso del sobre	Peso del sobre + MS	Peso de capsula	Peso de capsula + Cz	% FDA
1	1	0,2669	0,7302	18,7069	18,7433	42,69
1	2	0,2948	0,7779	18,63	18,6746	43,85
2	3	0,2970	0,7554	17,7030	17,7389	42,25
2	4	0,3001	0,7303	11,961	11,9964	39,48
3	5	0,3034	0,7856	11,7567	11,7848	45,41
3	6	0,3	0,7634	17,8649	17,8922	43,61
4	7	0,3008	0,7697	9,6993	9,7518	41,64
4	8	0,3139	0,7732	10,5989	10,6509	40,73
5	9	0,3501	0,8149	14,1827	14,2326	41,49
5	10	0,3259	0,7779	15,0661	15,1038	41,43
6	11	0,2988	0,7923	20,9497	21,0099	43,33
6	12	0,27	0,7568	20,0166	20,0784	42,5
7	13	0,3008	0,7431	15,6028	15,6505	39,46
7	14	0,2724	0,7377	9,6813	9,7399	40,27
8	15	0,3031	0,9131	12,5606	12,6329	38,44
8	16	0,3387	0,8092	12,5598	12,6410	38,93
9	17	0,3467	0,7680	11,9623	12,0236	36,5
9	18	0,3273	0,7743	15,6022	15,6655	38,37
10	19	0,3321	0,7781	10,6	10,6408	40,52
10	20	0,2966	0,7958	9,6797	9,7218	45,71
11	21	0,3002	0,7551	11,7573	11,7919	42,03
11	22	0,2603	0,7269	12,5602	12,5944	43,24
12	23	0,2693	0,7093	14,1847	14,2089	41,58
12	24	0,3120	0,7658	18,7084	18,7281	43,41
13	25	0,3098	0,7716	15,0677	15,0964	43,31
13	26	0,2809	0,7358	9,7013	9,7288	42,74
Promedio						41,65

En general en los pastizales, el contenido de fibra está sujeto a variaciones dadas por: la edad, estado fenológico, lugar donde crecen, temperatura, fecha y altura de corte. De acuerdo a la combinación de estas variables, vamos a tener diferentes porcentajes de FDN y FDA.

Los datos obtenidos para *Sorghastrum setosum* (Griseb.) Hitchc fueron de 70,15 % de FDN (tabla 1), y 41,65 % para FDA (tabla 2), estos resultados se encuentran dentro de los valores normales promedios para FDN de (75,00 %) y FDA de (38,90 %) (Arroquy, 2011). Conocer

estos valores es importante ya que la digestibilidad de la MS (materia seca) depende del contenido de FDN y de la digestibilidad de la FDN, cuando la concentración de fibra del forraje aumenta, el consumo y la concentración de la energía disminuyen (Combs *et al.*, 2000).

ANALISIS COMPLEMENTARIOS:

En esta experiencia también participé mientras realizaba mis determinaciones (a modo de observador y por propio interés), de otros análisis que fueron realizados en la cátedra como ser los de: % Extracto etéreo, % Proteína bruta, determinación de pH, % FDN y FDA, de muestras de silos de maíz, sorgo, maíz y sorgo en grano, subproductos de soja y algodón (pellet y expeler), que me permitieron tener una idea general de todos los productos que se utilizan y la importancia de estos en la formulación de dietas para alimentación animal.

Determinacion de porcentaje proteina

Para la determinación de % de proteína y nitrógeno se utilizaron muestras de forrajes y/o alimento balanceado utilizando el siguiente procedimiento. Se pesó 0,30 g de materia seca y se colocó en tubos de ensayo, luego se agregó mezcla catalítica ($\text{CuSO}_4 + \text{K}_2\text{SO}_4 + \text{Se}$) y ácido sulfurico, inmediatamente se colocaron los tubos en una plancha apenas caliente (50 °C) dentro de la campana de gases para realizar el inicio de la digestión durante aproximadamente unas 1 hs y después de este tiempo se aumenta la intensidad de la temperatura hasta aproximadamente 350 °C durante 3hs. Una vez terminada la digestión, la cual se reconoce por presentar la solución del tubo, un aspecto transparente de color celeste cristalino, que luego de enfriarse se llevó a volumen final de 25 ml, a partir del cual se realizó la destilación siguiendo la metodología de Kjeldahl. La destilación se realizó tomando de 2 ml de la muestra digerida anteriormente más 10 ml de agua destilada que se agregaron en un matraz de destilación, luego se colocó el matrás en el cabezal del equipo de destilación y se agregó 5 ml de hidróxido de sodio con una concentración de 30 %. El destilado se recogió en un erlenmeyer que contenía 5ml de ácido bórico con una mezcla de indicadores (rojo de metilo y verde de bromo cresol). La destilación utilizada es por arrastre de vapor y lo que se recoge en el erlenmeyer es amonio que al hacer contacto con la solución de ácido bórico se forma borato de amonio tomando una coloración verde por la mezcla de indicadores de pH presente en la misma. Este matraz con el borato de amonio se llevó al agitador para realizar la titulación mediante una bureta automática con Ácido Sulfúrico 0,01N hasta lograr un cambio de color a rosado, lo cual nos permitió determinar la cantidad de ácido gastado. (AOAC, 1995)

Determinacion de porcentaje extracto etéreo

Se pesó 1g de muestra de alimento balanceado o subproducto industrial y se colocó en cartucho de papel de filtro tapado con tapones de algodón, luego se armó el equipo Soxhlet (conexión del refrigerante con flujo de agua, la alargadera donde se deposita el cartucho y el matrás sobre la plancha caliente), con la muestra para la extracción de materia grasa mediante el reflujo del solvente orgánico (hexano), sobre el cartucho con la muestra. Se deja 3 a 5 horas en ebullición del solvente con reflujo y finalmente se recoge el contenido del matraz y se vuelca en un pequeño vaso con el registro de su tara vacío, luego ese vaso con el extracto de la muestra del cartucho se llevó a una campana de gases y luego a estufa por 24 horas. Pasado ese tiempo es retirado el vaso de la estufa se vuelve a pesar el vaso y la diferencia con la tara del vaso vacío corresponde a la grasa extraída de la cantidad de muestra pesada. (AOAC, 1995)

Determinacion de pH y conductividad eléctrica

Para realizar las determinaciones de pH y conductividad eléctrica se utilizó la relación (1:2,5 ml). Se pesaron 10 gr de muestra (lombricompuesto, silos de maíz o sorgo), y se le agregó 2,5 ml de agua por cada gr de muestra utilizada, luego se determinó pH y Conductividad. El pH se midió con un pHímetro, que consiste en un minivoltímetro con la escala graduada en unidades de pH, que mide la diferencia de potencial existente entre dos electrodos, uno de ellos de referencia, con lectura digital.

La conductividad eléctrica (CE), se midió con un conductímetro digital, con corrección automática para la temperatura ya que las lecturas se refieren a 25 °C.

Usos de sobres de tela vegetal

La metodología utilizada es de un laboratorio brasileño, donde el Ing. Agr. Alfredo Fernández realizó una pasantía docente en este tema (comunicación personal), esta metodología fue comparada y validada en el Laboratorio de Qca. Analítica-Agrícola de esta casa de estudios. Anteriormente se realizaba la metodología empleando filtros Gooch, los cuales son de un elevado costo lo cual dificulta su utilización por los recursos económicos necesarios. Para esta técnica se utiliza por cada gramo de muestra 1 vaso de precipitado de 600 ml y 1 filtro Gooch.

En cambio con el uso de los sobres, por cada vaso de precipitado se colocan 4 sobres de 1 g de muestra cada uno (en total se analizan 4 g de muestra). Lo que conlleva un ahorro de tiempo para realizar los análisis y fundamentalmente económico por el costo, a parte la cantidad de reactivo utilizado es menor, y los resultados obtenidos (valores) son similares.

COMENTARIOS

La experiencia realizada en el laboratorio fue provechosa para recordar, aprender y desarrollar los métodos utilizados en la determinación de la composición de los forrajes.

Más allá del aprendizaje y diferentes pasos del proceso, esta experiencia me permitió conocer todos los pasos desde que llega una muestra al laboratorio hasta la determinación final de su composición nutritiva.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS

Arroquy, J. 2011. Conservación de Forrajes de Pasturas Megatérmicas. 2ª Jornada Nacional de Forrajes Conservados. EEA INTA Manfredi.

Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th ed., 1995.

Bernardis A C, C A Roig, M Bennasar Vilches (2005) Productividad y calidad de los pajonales de *Sorghastrum setosum* (grises.) Hitchc., en Formosa, Argentina. Agric. Téc. (Chile) 65:177–185.

Church, D.C. (1989). The Ruminant Animal. O&B Books, NJ. Clin. Nutr. 25, 926-932.

Combs, D.K.; Beyer-Neumann, E.P.; Rodriguez, M.T.; Undersander, D.J.; Hoffman, P.C. 2000. Digestion kinetics of forages. Obtenido de: <http://www.umex.edu/ces/forage/wfc/DIGEST.html>.(15/08/2015).

Grant, R. 1991. Evaluating the feeding value of fibrous feeds for dairy cattle. In: http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/feeding/EVALUATING_FIBROUS_FEED_FOR_DAIRY_CATTLE.html

Jung, H.G. and M.S. Allen. 1995. Journal of Animal Science 73:2774-2790.

Sniffen, C.J., O'Connor, J.D., Van Soest, P.J., Fox, D.G and Russell, J.B. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. Journal of Animal Science 70, 3562-3577.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B. (1985) Analysis of Forages and Fibrous Feeds. Laboratory Manual for Animal Science 613, Cornell University, Ithaca, New York, 202 pp.

Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A. (1991): Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci., 74, 3583–3597.

Van Soest, P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.

Weiss, W.P. 1993a. Evaluating nutritional quality of alternative feeds using chemical analysis. Feeding and Nutrition.

In: [http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/feeding/NUTRITIONAL QUALITY OF ALT FEEDS.html](http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/feeding/NUTRITIONAL_QUALITY_OF_ALT_FEEDS.html)

Weiss, W.P. 1993b. Fiber requirements of dairy cattle: Emphasis NDF-Department of Dairy Science. Ohio, USA. pp. 63-76.

Weiss, W.P. 1994. Pages 644-681 In Forage Quality, Evaluation, and Utilization. ASA, CSSA and SSSA, Madison, WI, USA.