



01674

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE n -ALCANOS Y ÓXIDO DE CROMO
PARA ESTIMAR CONSUMO Y DIGESTIBILIDAD EN OVINOS

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
MARICELA AYALA MARTÍNEZ

TUTOR:
FRANCISCO A. CASTREJÓN PINEDA

COMITÉ TUTORAL:
MA. ESTHER ORTEGA CERRILLA
JORGE LECUMBERRI LÓPEZ

México, D. F.

2005

m342010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A Javier por ser la luz que ilumina mi vida

A María y Gustavo por crearme y alentarme a ser

A Pilar por ser mi mejor amiga

A mi familia por existir

A ti por estar siempre a mi lado y enseñarme la maravilla de amar

AGRADECIMIENTOS

A mi **Tutor principal**, por sus enseñanzas y apoyo en todo momento.

A mi **Comité Tutorial**, por su tiempo, conocimientos y paciencia.

A mis sinodales **Humberto Troncoso Altamirano** y **Sergio González Muñoz**, por brindarme tiempo y conocimientos, invaluable

Al **MVZ. Juan M. Horta Ramírez**, por su tiempo y experiencia.

Al **MVZ. Janitzio Ariel Bautista Ordoñez**, por su tiempo y conocimientos.

Al **Q. Flavio Sinaí Barajas Torres**, por su esfuerzo en esta investigación

Al **Sr. Francisco Ramos Marchena** del Departamento de Botánica del Instituto de Biología de la UNAM por ayudar a identificar la especie *Brachiaria meiziana*

A la **Facultad de Química de la UNAM** por facilitar instalaciones y apoyo intelectual.

Al **Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Ovina FMVZ-UNAM** por facilitar sus instalaciones.

A todo las personas que laboran en el Departamento de Nutricional Animal y Bioquímica de la FMVZ-UNAM por su apoyo y amistad.

Al proyecto **PAPIIT IN205301** por el financiamiento brindado para la realización de esta investigación.

CONTENIDO

Introducción.....	1
Objetivos.....	4
Hipótesis.....	5
Revisión de literatura	6
Evaluación de los alimentos para rumiantes.....	6
Consumo de forraje.....	6
Digestibilidad de la materia seca	7
Digestibilidad <i>in vitro</i>	8
Digestibilidad <i>in situ</i>	8
Digestibilidad <i>in vivo</i>	9
Cuantificación de la producción fecal.....	9
Recolección total de heces.....	9
Método indirecto.....	10
Marcadores.....	10
Nitrógeno fecal.....	11
Lignina.....	11
Sílice y cenizas insolubles en ácido.....	11
Fibra detergente ácido o neutro indigestible.....	11
Constituyentes de la cutícula de las plantas.....	12
Óxido férrico.....	14
Sulfato de plata.....	14
Polietilenglicol.....	14
Fibra cromo mordente.....	14
Óxido de cromo.....	14
Material y Métodos	16
Primera fase	
Preparación de cápsulas de alcanos C ₃₂ y C ₃₆	16
Segunda fase	

Digestibilidad <i>in vivo</i>	16
Localización y duración	16
Animales.....	16
Etapa de adaptación.....	16
Etapa experimental.....	17
Tercera fase	
Análisis de laboratorio.....	18
Muestras de forraje.....	18
Muestras de heces.....	19
Evaluaciones.....	19
Producción fecal.....	20
Consumo de materia seca.....	20
Digestibilidad de la materia seca.....	21
Composición botánica de la dieta consumida por los ovinos.....	21
Análisis de la información.....	22
Resultados.....	24
Concentración de C ₃₂ y C ₃₆ en las cápsulas.....	24
Composición química de la pradera.....	24
Digestibilidad <i>in vivo</i> de nutrientes.....	24
Comparación de tres métodos para obtener la producción fecal.....	24
Evaluación del consumo de materia seca.....	25
Evaluación de la digestibilidad de la materia seca (DMS).....	27
Determinación de la composición botánica de la dieta consumida por los ovinos.....	28
Discusión.....	29
Concentración de C ₃₂ y C ₃₆ en las cápsulas.....	29
Composición química de la pradera y digestibilidad <i>in vivo</i> de nutrientes.....	30
Comparación de tres métodos para obtener la producción fecal.....	30
Evaluación del consumo de materia seca.....	31
Evaluación de la digestibilidad de la materia seca (DMS).....	32

Determinación de la composición botánica de la dieta consumida por los ovinos.....	32
Conclusiones	34
Recomendaciones.....	35
Referencias.....	36
Anexos	
Anexo 1	
Metodología para preparar cápsulas con una mezcla de C ₃₂ y C ₃₆	72
Anexo 2	
Técnica para la determinación de n-alcanos por cromatografía de gases.....	77
Anexo 3	
Ecuaciones completas para calcular el consumo utilizando n-alcanos.....	82
Anexo 4	
Ejemplo: Cálculo de n-alcanos consumidos y excretados de un animal en el día 1.....	83

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Marcadores internos para evaluar la digestibilidad y consumo en herbívoros	46
Cuadro 2 . Recuperación de n-alcános en heces de ovinos.....	47
Cuadro 3. Concentración de n-alcános (mg MS kg ⁻¹) de diferentes especies Vegetales.....	48
Cuadro 4. Concentración de n-alcános (mg MS kg ⁻¹) en la pared cuticular de diferentes partes de la planta de <i>Lolium perenne</i> y <i>Trifolium repens</i>	49
Cuadro 5. Marcadores utilizados para la evaluación de la producción fecal en herbívoros	50
Cuadro 6. Composición química del forraje (pradera mixta) consumido por los ovinos, durante el experimento.....	51
Cuadro 7. Digestibilidad <i>in vivo</i> (%) de la materia seca en ovinos alimentados con forraje obtenido de una pradera mixta durante el experimento.....	51
Cuadro 8. Digestibilidad <i>in vivo</i> (%) de la proteína cruda en ovinos alimentados con forraje obtenido de una pradera mixta en el experimento.....	52
Cuadro 9. Digestibilidad <i>in vivo</i> (%) de la materia orgánica en ovinos alimentados con forraje obtenido de una pradera mixta en el experimento.....	53
Cuadro 10. Digestibilidad <i>in vivo</i> (%) de la fibra detergente ácido en ovinos alimentados con forraje obtenido de una pradera mixta en el experimento.....	54
Cuadro 11. Digestibilidad <i>in vivo</i> (%) de la fibra detergente neutro en ovinos alimentados con forraje obtenido de una pradera mixta en el experimento.....	55
Cuadro 12. Adaptación a la normalidad de la variable producción fecal.....	55
Cuadro 13. Análisis de varianza para la variable producción fecal por tres métodos.....	56
Cuadro 14. Producción fecal total obtenida por tres diferentes métodos.....	56
Cuadro 15. Adaptación a la normalidad del porcentaje de error de los dos métodos alternativos para medir producción fecal, en relación al método directo	56
Cuadro 16. Análisis de varianza para el porcentaje de error de los dos métodos alternativos para medir producción fecal, en relación al método directo.....	57

Cuadro 17. Adaptación a la normalidad de la variable consumo de materia seca.....	57
Cuadro 18. Análisis de varianza para la variable consumo de materia seca.....	57
Cuadro 19. Consumo de materia seca obtenido por tres diferentes métodos.....	58
Cuadro 20. Adaptación a la normalidad del porcentaje de error de los métodos alternativos para medir consumo, en relación al método directo.....	58
Cuadro 21. Análisis de varianza para el porcentaje de error de los métodos alternativos en relación al método directo, para medir consumo de materia seca.....	58
Cuadro 22. Porcentaje de error de los métodos alternativos en relación al método directo en la evaluación de consumo de materia seca.....	59
Cuadro 23. Adaptación a la normalidad del porcentaje de digestibilidad de la materia seca.....	59
Cuadro 24. Análisis de varianza para la digestibilidad de la materia seca.....	59
Cuadro 25. Digestibilidad de la materia seca (%) por seis diferentes métodos....	60
Cuadro 26. Adaptación a la normalidad del porcentaje de error de los métodos alternativos para medir digestibilidad de la materia seca.....	60
Cuadro 27. Análisis de varianza para el porcentaje de error de los métodos alternativos en relación al método directo, para medir digestibilidad de la materia seca.....	60
Cuadro 28. Porcentaje de error en los métodos para medir digestibilidad de la materia seca.....	61
Cuadro 29. Composición botánica de la dieta consumida por los ovinos en la etapa experimental, obtenida por separación manual.....	61
Cuadro 30. Concentración de n-alcanos mg MS kg d ⁻¹ en <i>Lolium perenne</i> obtenido de una pradera mixta.....	62
Cuadro 31. Concentración de n-alcanos mg MS kg d ⁻¹ en <i>Pennisetum clandestinum</i> obtenido de una pradera mixta.....	63
Cuadro 32. Concentración de n-alcanos mg MS kg d ⁻¹ en <i>Brachiaria meziana</i> obtenida de una pradera mixta.....	64

Cuadro 33. Concentración de n-alcanos mg MS kg d ⁻¹ en otras especies (no deseables) obtenidas de una pradera mixta.....	64
Cuadro 34. Concentración de n-alcanos mg MS kg d ⁻¹ en diferentes especies obtenidas de una pradera mixta.....	65
Cuadro 35. Concentración de n-alcanos mg MS kg d ⁻¹ en heces de ovinos alimentados con forraje de una pradera mixta.....	66
Cuadro 36. Composición botánica de la dieta obtenida por separación manual.....	83
Cuadro 37. Cantidad de materia seca consumida y excretada por el animal.....	83
Cuadro 38. Cantidad de MS (kg d ⁻¹) consumida por especie.....	84
Cuadro 39. Concentración de n-alcanos (g/kg MS) en diferentes especies.....	84
Cuadro 40. Concentración de n-alcanos (g/kg MS) consumidos de las diferentes especies.....	85
Cuadro 41. Concentración total de n-alcanos (g/kg MS) consumidos.....	85
Cuadro 42. Concentración de n-alcanos (g/kg MS) en heces.....	86
Cuadro 43. Concentración total de n-alcanos (g/kg MS) excretados.....	86
Cuadro 44. Comparación de la cantidad de n-alcanos consumidos y excretados.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentración de n-alcános (C ₃₂ y C ₃₆) contenido en las muestras obtenidas de los lotes utilizados para el llenado de cápsulas utilizadas en el experimento.....	67
Figura 2. Concentración de n-alcános (C ₃₂ y C ₃₆) contenido en las cápsulas utilizadas en el experimento.....	67
Figura 3. Digestibilidad <i>in vivo</i> (%) de los nutrientes presentes en la dieta en el período de adaptación.....	68
Figura 4. Digestibilidad <i>in vivo</i> (%) de los nutrientes presentes en la dieta en el período en que se realizaron las evaluaciones.....	68
Figura 5. Producción fecal (kg MS d ⁻¹) obtenida por tres diferentes métodos.....	69
Figura 6. Consumo (kg MS d ⁻¹) obtenido por cuatro diferentes métodos.....	69
Figura 7. Digestibilidad de la materia seca (%) obtenida por seis diferentes métodos	70

ABREVIATURAS

CB	Composición botánica de la dieta
CMS	Consumo de materia seca
DMS	Digestibilidad de la materia seca
<i>DIVMS</i>	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca
Cr ₂ O ₃	Óxido de cromo
PFT	Producción fecal total
RTH	Recolección total de heces
mg	miligramo
g	gramo
kg	kilogramo
d	día
P	Probabilidad
h	horas
FDA	Fibra detergente ácido
FDN	Fibra detergente neutro
Kd	Tasa de digestión
Kp	Tasa de pasaje
ER	Extracción del residuo
C	Colorimetría
CG	Cromatografía de gases
d.e.	Desviación estándar
AA	Absorción atómica
ERF	Espectrofotometría de rayos fluorescentes
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
PC	Proteína cruda
Cen	Cenizas
MO	Materia orgánica
MS	Materia seca
BS	Base seca

RESUMEN

Ayala MM, Castrejón PFA, Lecumberrerri LJ y Ortega CME. “Comparación de las técnicas de n-Alcanos y óxido de cromo para estimar consumo y digestibilidad en ovinos”. El comportamiento productivo de los rumiantes es afectado por la calidad nutritiva de los forrajes disponibles, su digestibilidad, la composición botánica de la dieta (CB) y el consumo de materia seca (CMS) del animal. Es muy difícil obtener mediciones precisas de estas variables. Por esta razón el objetivo de este trabajo fue evaluar el CMS utilizando la proporción de n-alcanos ($C_{31}:C_{32}$, $C_{33}:C_{32}$), a través de la relación $Cr_2O_3/DIVMS$ y medida directamente; la producción fecal total (PFT) se evaluó por recolección total de heces (RTH) y con marcadores (n-alcano C_{36} y Cr_2O_3); la digestibilidad de la materia seca (DMS) se obtuvo por diferentes métodos: *in vivo*, digestibilidad *in vitro* de la materia seca (*DIVMS*), n-alcanos (C_{33}/C_{36} , C_{31}/C_{36}); óxido de cromo (Cr_2O_3) y n-alcano (C_{36} o C_{31}/Cr_2O_3). La composición botánica medida por el método directo de separación manual y utilizando la técnica de n-alcanos por el método de ecuaciones simultáneas por matrices. Se utilizaron 10 ovinos raza Suffolk de 40.78 ± 2.09 kg de PV, alimentados con forraje obtenido de una pradera mixta. Los ovinos, se alojaron en jaulas metabólicas, con bolsas recolectoras y arneses, se dosificaron 2vd, con 2 cápsulas de gelatina (una con 59.64 mg de C_{32} y 63.04 mg de C_{36} y otra con 250 mg de Cr_2O_3). Por 14 d se recolectó la PFT y se obtuvieron muestras fecales directamente de recto, antes de cada dosificación. En los últimos 7d, se realizaron las mediciones de las variables: CMS, DMS y PFT. El CMS fue diferente ($P < 0.05$) para los métodos directo, n-alcanos $C_{31}:C_{32}$, y $Cr_2O_3/DIVMS$, y no diferente ($P > 0.05$) con los métodos n-alcanos $C_{33}:C_{32}$ y directo; al comparar la diferencia porcentual del error en relación al método directo, la técnica de n-alcanos $C_{33}:C_{32}$, presentó menor error en la medición de CMS. La PFT a través del n-alcano C_{36} fue diferente ($P < 0.05$) a la obtenida por Cr_2O_3 y por RTH; al calcular la diferencia porcentual del error en relación con el método directo no se encontró diferencia ($P > 0.05$), entre los métodos alternativos. La DMS *in vitro* fue diferente ($P < 0.05$) a la obtenida por C_{31}/Cr_2O_3 y C_{33}/Cr_2O_3 y no diferente ($P > 0.05$) por el método *in vivo*, C_{31}/C_{36} y C_{33}/C_{36} , al comparar la

diferencia porcentual del error con el método directo, las relaciones C_{33}/C_{36} y C_{31}/Cr_2O_3 , fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$), mostrando estas la menor y mayor diferencia respectivamente. La CB obtenida por separación manual fue: (61.43%) *Lolium perenne*, (11.13%) *Pennisetum clandestinum*, (9.44%) *Brachiaria meziana*, (3.88%) *Trifolium repens*, (0.62%) *Trifolium pratenses*, (0.81%) *Trifolium hybridum*, (0.47%) *Bromus inermis* y (12.29%) otras especies. Con la técnica de n-alcanos no fue posible obtener el cálculo de CB, debido a la gran variación en el perfil de n-alcanos en heces y forrajes. La técnica de n-alcanos es factible de ser utilizada, para obtener CMS, PFT y DMS, por ofrecer resultados cercanos al método directo, sin embargo para el cálculo de CB, no es factible utilizarlo, en praderas que no sean homogéneas.

ABSTRACT

Ayala MM, Castrejón PFA, Lecumberrerri LJ and Ortega CME. "Comparison of n-alkanes and chromium oxide methods for estimating intake and digestibility sheep. The behavior of the ruminants depends on the nutritive value of the forages available, the botanical composition (BC) of the consumed diet and the dry matter intake (DMI) of the animal. This quantification is necessary, to increase the ruminants production, but are difficult to quantify. For this reason, the objective was estimated the digestibility of dry matter (DDM) by: method *in vivo*, digestibility *in vitro* of dry matter (*DIVDM*), n-alkanes and chromium oxide (Cr_2O_3); the DMI was estimated directly, also with n-alkanes $\text{C}_{31}:\text{C}_{32}$ and $\text{C}_{33}:\text{C}_{32}$, and through $\text{Cr}_2\text{O}_3/\text{DIVDM}$; estimates of faecal output (FO), by collection total faecal (CTF) and with external markers (n-alkane C_{36} y Cr_2O_3). 10 Suffolk sheep were used with weight 40.78 ± 2.09 kg, they were fed, with mixed forages. The sheep, kept in metabolic jails, with collecting bags and harnesses, the animals were dosed twice a day, with 2 gelatine capsules (59.64 mg C_{32} and 63.04 mg C_{36} and other with 250 mg Cr_2O_3), it was measured directly FO and samples were collected rectal faecal, before the dose, during 14d. At last 7d, were measure: DMI, DDM y FO. The DMI was different ($P < 0.05$) for direct method, n-alkanes $\text{C}_{31}:\text{C}_{32}$, and $\text{Cr}_2\text{O}_3/\text{DIVDM}$, but not different ($P > 0.05$) for n-alkanos $\text{C}_{33}:\text{C}_{32}$ y direct method, when comparing the mistake percentage difference of direct method, the technique of n-alkanes $\text{C}_{33}:\text{C}_{32}$, had less difference for estimated DMI ($P < 0.05$). The Of with n-alkane C_{36} was different ($P < 0.05$) with Cr_2O_3 and with CTF; there was no significant difference ($P > 0.05$) to comparative difference to direct method. The DDM *in vitro* was different ($P < 0.05$) for method $\text{C}_{31}/\text{Cr}_2\text{O}_3$ y $\text{C}_{33}/\text{Cr}_2\text{O}_3$ and not different ($P > 0.05$) for direct method, $\text{C}_{33}/\text{C}_{36}$ and $\text{C}_{31}/\text{C}_{36}$, when comparison of the difference percentage with direct method, $\text{C}_{33}/\text{C}_{36}$ and $\text{C}_{31}/\text{Cr}_2\text{O}_3$, were different ($P < 0.05$), showed less and more difference respectively. (61.43%) *Lolium perenne*, (11.13%) *Pennisetum clandestinum*, (9.44%) *Brachiaria meziana*, (3.88%) *Trifolium repens*, (0.62%) *Trifolium pratenses*, (0.81%) *Trifolium hybridum*, (0.47%) *Bromus inermis* y (12.29%) weeds, were the estimated species by manual separation. The technique n-alkanes was not possible calculate of BC, because

there is a large variation in perfil of n-alkanes of faeces and forages. The technique n-alkanes will be used to obtain IDM, FO y DDM, because it offers good estimation like directs methods, but it is expensive and complicated, because this is a arduos technique. For the calculation of BC, won't be use, when the meadow is not homogenous, renewed and used intensively.

INTRODUCCIÓN

En los sistemas de producción pecuaria, la nutrición es uno de los rubros más importantes, ya que de ésta depende que el animal pueda expresar su potencial genético de producción, si se cubren las necesidades de nutrimentos para mantenimiento y hay excedentes que sean transformados en producto. De las materias primas a utilizar en la alimentación de rumiantes los forrajes son la opción más económica, por ser un recurso natural disponible a muy bajo costo.

El uso de forrajes está sujeto al conocimiento de sus características nutricionales, como el contenido de nutrientes, consumo y digestibilidad, por lo que no es suficiente conocer el análisis químico, sino también se debe considerar los efectos del proceso de digestión, absorción y metabolismo animal (Bondi, 1989).

Las pruebas de digestibilidad permiten evaluar la proporción de nutrientes presentes en una dieta, son ingeridos y absorbidos por el aparato digestivo (Church y Pond, 1994). La digestibilidad depende principalmente de la composición nutritiva de la dieta, y es afectada por el alto contenido fecal de materiales de origen no dietético, como compuestos nitrogenados, ácidos grasos, minerales y carbohidratos no estructurales de origen endógeno (Church y Pond, 1994). Por tanto, los coeficientes de digestibilidad determinados por diferentes métodos se denominan *aparentes* ya que es difícil cuantificar con exactitud las cantidades de un elemento endógeno presente en las heces, ocasionando la subestimación de su digestibilidad verdadera.

En dietas basadas en forrajes, la digestibilidad *in vivo* es afectada por diversos factores, como la selección del animal en función de la oferta del material, disponibilidad de agua, tasa de pasaje, eficiencia metabólica del animal y las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa). De manera contraria, cuando se realiza la técnica *in vitro* los factores mencionados no influyen sobre su determinación (Cochran *et al.*, 1986).

Para la determinación de la digestibilidad *in vivo* de dietas completas o de determinados nutrientes, se han empleado diversos métodos entre los cuales se

encuentran la recolección total de heces (RTH) y el método indirecto con marcadores.

La RTH es el método más confiable para medir digestibilidad, ya que involucra directamente factores tanto del alimento como del animal (Basurto y Tejada 1992), incluyendo la medición de la ingestión de una dieta de composición conocida y la recolecta total de heces; sin embargo, la técnica tiene limitaciones con relación a la precisión de la estimación del coeficiente de digestibilidad, representadas principalmente por la pérdida de metano por medio del eructo, producto de la fermentación ruminal de los carbohidratos, el cual se considera digerido. Los coeficientes de digestión, determinados por diferencia entre los nutrientes digeridos y los excretados no siempre reflejan su disponibilidad (Ortega 1987, Bondi 1989), además este método es laborioso y costoso (Basurto y Tejada 1992; Brandyberry *et al.*, 1991). Lo anterior ha hecho necesario la utilización de marcadores en estudios de digestión y consumo.

Los marcadores son compuestos de referencia usados para monitorear aspectos físicos como la tasa de pasaje y químicos como la hidrólisis, haciendo evaluaciones cuantitativas o cualitativas de la fisiología nutricional; se pueden colocar en la dieta o administrarse oralmente (marcadores externos) o bien ser constituyentes de la misma (marcadores internos) (Kotb y Luckey 1972).

Para que se pueda considerar una sustancia como marcador, debe ser inerte, no tóxica, no tener efectos fisiológicos, no ser absorbida, ni metabolizada en su paso por el tubo digestivo, debe mezclarse y homogenizarse con el alimento, además se debe recuperar completamente en heces, no tener influencia sobre la digestión, absorción o motilidad del tubo digestivo y, principalmente, tener cualidades que permitan su medición precisa (Kotb y Luckey 1972).

El óxido de cromo, es un marcador externo (Pond *et al.*, 1987), inerte, insoluble en agua y no se asocia con los componentes de la dieta, ofrece la ventaja de tener una recuperación completa en heces y además de que existen varios métodos analíticos para su determinación. Dentro de las limitaciones del óxido de cromo se encuentra la incapacidad de realizar evaluaciones individuales

del consumo (Dove y Mayes, 1996) y, principalmente, que se debe tener un especial cuidado en su manipulación, porque es un elemento carcinogénico (Pond *et al.*, 1987).

Otro tipo de marcadores son los alcanos, hidrocarburos de cadena larga, que se encuentran en la cera cuticular de los forrajes por lo que es posible utilizarlos como marcadores internos o externos, para evaluar el consumo voluntario, digestibilidad y composición de la dieta (Mayes *et al.*, 1986; Dove y Mayes, 1991; Dove y Mayes 1996; Dove y Mayes 2000) debido a que estos compuestos difieren en los patrones de distribución y concentración entre especies vegetales y partes de las mismas (Hameleers y Mayes, 1998; Dove y Mayes, 1996; Dove y Mayes, 2000).

Cuando los hidrocarburos presentes en las plantas se utilizan en combinación con n-alcanos sintéticos se puede determinar el consumo individual de cada animal (Dove y Mayes, 1991; Dove y Mayes 2000). Al utilizar el n-alcano sintético C₃₆, que se encuentra en muy baja concentración en las plantas, se puede evaluar la producción fecal y así conocer la digestibilidad del forraje consumido por los rumiantes.

Por lo anterior, la presente investigación tuvo la finalidad de demostrar que la utilización de n-alcanos en la determinación de digestibilidad, consumo voluntario y composición botánica, es similar o mejor que la técnica tradicional del óxido de cromo y que además ofrece evaluaciones similares al método directo. De manera que se pueda disminuir la utilización del óxido de cromo, que al ser un producto carcinogénico, pone en riesgo la salud de las personas que lo manipulan, y se disminuya el manejo de los animales, además de ser una técnica menos laboriosa.

Objetivos

- Evaluar la producción fecal utilizando la técnica de n-alcanos y el método de óxido de cromo (Cr_2O_3), para compararlas con la recolección total de heces (RTH).
- Medir el consumo de materia seca utilizando la técnica de n-alcanos, y el método de Cr_2O_3 /digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) para compararlas con la medición *in vivo*.
- Determinar la digestibilidad de la materia seca por medio de la técnica de n-alcanos y la técnica de n-alcanos/ Cr_2O_3 , para compararlas con la medición *in vivo*.
- Obtener la composición botánica de la dieta utilizando la técnica de n-alcanos por el método de ecuaciones simultáneas por matrices (Newman *et al.*, 1995), para compararla con el método directo.

Hipótesis

- La evaluación de la producción fecal mediante la técnica de n-alcanos es más eficiente que el método con Cr_2O_3 , al compararlas con la medición *in vivo*.
- La técnica de n-alcanos es mejor que la de Cr_2O_3 /digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) para determinar el consumo de forraje con relación a la medición *in vivo*.
- La técnica de n-alcanos es más eficiente que la de n-alcanos/ Cr_2O_3 , en la determinación de la digestibilidad de la materia seca, al compararlos con la medición *in vivo*.
- Con la técnica de n-alcanos se puede obtener la composición botánica de la dieta, por el método de ecuaciones simultáneas por matrices (Newman *et al.*, 1995).

REVISIÓN DE LITERATURA

Evaluación de los alimentos para rumiantes

Durante varias décadas, ha sido necesario evaluar los alimentos que serán consumidos por rumiantes, por tal razón la caracterización de los forrajes inició con la evaluación de las características morfológicas y productivas, posteriormente la evaluación química, ofreció mayor conocimiento, sin embargo presenta muchas deficiencias para evaluar los alimentos destinados a los rumiantes, ya que sus componentes no representan fracciones químicas o nutritivas con un comportamiento definitivo en la fisiología. Por tanto, ha sido necesario implementar técnicas diversas para tener una evaluación completa de los forrajes para rumiantes, como el fraccionamiento de la fibra (Van Soest, 1982; Tejada, 1992), de la proteína (Roe *et al.*, 1990), digestibilidad *in vitro*, *in situ* e *in vivo* de la materia seca y orgánica (Burch y William, 1975).

Consumo de forraje

La producción pecuaria puede ser mejorada mediante el aumento del consumo de alimento, y una más eficiente digestión y metabolismo (Church, 1993). El consumo del forraje es importante para calcular la eficiencia y la conversión alimenticia del ganado, por influir sobre la productividad; sin embargo, su evaluación está limitada porque es modificado por factores como son el tamaño corporal y el estado fisiológico del animal, características físico-químicas del forraje y condiciones ambientales (Church, 1993). Por tanto, es una medida de gran utilidad en la evaluación de los forrajes, ya que es el principal factor que influye sobre el valor nutritivo de éstos; esta medición debe realizarse *in vivo* por lo menos durante 10 días permitiendo un consumo a libre acceso y cuantificando el rechazo del animal (Castellanos *et al.*, 1990).

Los procesos más comunes para evaluar el consumo del forraje son la combinación de la digestibilidad *in vivo* o *in vitro* con la medición de la producción

de heces; otra manera es con ecuaciones de regresión (NRC, 2001) o modelos de simulación (Allen y Mertens, 1988; Mertens, 1993).

Digestibilidad de la materia seca

La digestión es lo que sucede con el alimento mientras se encuentra en el tubo digestivo, depende de las enzimas presentes y las funciones fisiológicas del animal, las propiedades del alimento incluyendo susceptibilidad a la hidrólisis enzimática, sustancias inhibitorias de éstas y la capacidad del tubo digestivo para procesar el alimento. Para que el alimento sea digerido tiene que ser degradado químicamente, parcialmente emulsificado, algunos de sus componentes serán absorbidos en el tubo digestivo, otros volatilizados a través de calor o gas, por boca o ano, y el residual aparecerá en heces acompañado de compuestos endógenos (Burch y William, 1975; Church, 1993).

La digestibilidad es la diferencia entre lo ingerido y lo excretado; su determinación es el conjunto de procedimientos de campo, laboratorio, matemáticos o estadísticos encaminados a encontrar coeficientes de digestibilidad de los alimentos o de sus componentes, para evaluar comparativamente a los alimentos, ya sea de dietas integrales o bien de ingredientes individuales; el valor más comúnmente utilizado es el coeficiente de digestibilidad aparente y se expresa como porcentaje de la materia seca (Castellanos *et al.*, 1990). La fórmula general, para obtener la digestibilidad es:

$$\text{Digestibilidad (\%)} = \frac{\text{consumido} - \text{excretado}}{\text{consumido}} \times 100$$

La digestibilidad aparente tiene limitaciones como son que refleja solamente la capacidad de ingestión de los animales utilizados en la determinación, por lo que no se debe utilizar el resultado obtenido en otros animales, la medición es específica para el tipo y condiciones del alimento o ingrediente utilizado en la determinación, no se consideran factores de corrección para el manejo especial de los animales en experimentación, algunos nutrientes no se pueden evaluar por tener un comportamiento dinámico, en el tubo digestivo, además de que algunas

fracciones de alimento no se evalúan correctamente por falta de técnicas adecuadas de laboratorio. El concepto de digestibilidad verdadera es un concepto teórico, ya que sería necesario hacer una diferenciación de los componentes que aparecen en las heces de origen endógeno.

El coeficiente de digestibilidad no es la medida ideal para indicar el valor nutritivo de un alimento, pero no hay duda de que refleja en gran medida el nivel de aprovechamiento que se puede esperar de los alimentos y nutrientes ofrecidos al ganado; por tanto, tiene mayor valor que un simple análisis químico proximal.

Digestibilidad *in vitro*: La digestibilidad *in vitro* es una fermentación que se practica en el laboratorio, a través de un sistema cerrado, esta fermentación es producida por microorganismos presentes en el líquido ruminal utilizado como inóculo, acompañado de una solución amortiguadora, seguida de una digestión con pepsina en medio ácido añadiendo HCl, para eliminar la proteína microbiana existente y que permanezca únicamente la materia seca no digerida. Este método no refleja de ninguna manera las condiciones que realmente ocurren en el rumen, el cual es un sistema abierto; no considera la digestión intestinal ni la excreción endógena del animal (Tejada, 1992).

Por tanto, aunque esta técnica se puede utilizar para predecir el valor nutritivo de los forrajes y estudiar los factores que afectan su digestibilidad; sin embargo, no debe ser utilizada para evaluar factores que se presentan *in vivo*, como la cinética de digestión.

Digestibilidad *in situ*: Esta técnica se basa en la desaparición del material colocado en bolsas de nylon u otro material, introducidas en el rumen de animales fistulados, la desaparición se mide en intervalos de tiempo (de 0 a 96 h) dependiendo del alimento que se evalúe. La ventaja de este método es que la digestión se lleva directamente dentro de rumen con la participación de microorganismos ruminales en su ecosistema natural.

Este método se utiliza para calcular la tasa de digestión, tasa de pasaje, además de proporcionar una amplia visión de la degradación de los componentes

nutricionales a través del tiempo, a diferencia de la digestibilidad *in vivo*, la cual arroja una sola medición (Castellanos *et al.*, 1990).

Digestibilidad *in vivo*: La digestibilidad *in vivo* es un método con mayor valor para evaluar los alimentos. Cuando se evalúan dietas basadas en forrajes, la digestibilidad *in vivo* es afectada por factores que afectan el consumo y la selección del animal en función de las características del material disponible, como la edad fenológica, estado de madurez y la especie vegetal. Además de este método considera las características climáticas y del animal. Se considera una digestibilidad aparente, porque no se hace la diferenciación del material endógeno presente en heces, para calcularla es necesario conocer el consumo y la producción fecal. Este método es el más confiable, pero costoso, vulnerable y laborioso, además de ser necesario un excesivo manejo del ganado. (Cochran *et al.*, 1986).

Cuantificación de la producción fecal

Conocer la producción fecal de los animales es importante, ya que nos permite evaluar el consumo y la digestibilidad, dos factores importantes en la nutrición de rumiantes, por ofrecer la posibilidad de evaluar diferentes alimentos de mejor manera. El cálculo de la producción fecal puede obtenerse de dos maneras:

Recolección total de heces (RTH): La recolección diaria de heces puede ser determinada utilizando bolsas recolectoras con arneses que las mantienen sujetas al animal, pueden vaciarse una vez al día o cada 12 h, aunque este manejo implica mayor trabajo, sin embargo los animales sufren menos molestias, ya que el peso excesivo de la bolsa puede interferir con sus hábitos normales. Una vez vaciada la bolsa el contenido deberá pesarse, mezclarse y tomar una alícuota, para su almacenamiento y posterior análisis (Castellanos *et al.*, 1990).

Este procedimiento es considerado el método más preciso, ya que involucra factores del alimento y del animal (Basurto y Tejada, 1992), aunque tiene limitaciones como la pérdida de metano por eructo a través de la fermentación de

carbohidratos, por lo que no siempre refleja la disponibilidad de los nutrientes (Ortega, 1987). Es laborioso (Huhtanen *et al.*, 1994), y tiene alto costo de mantenimiento (Basurto y Tejada, 1992), imposibilita el uso de hembras (Bradyberry *et al.*, 1991), además de ser molesto para los animales por el uso del arnés y la bolsa recolectora (Doyle *et al.*, 1994).

Método indirecto: Cuando es difícil realizar la RTH para determinar la digestibilidad, pueden emplearse sustancias inertes de referencia conocidas como los marcadores, es necesario administrarlos en una cantidad conocida y posteriormente recolectar muestras representativas de heces, diariamente, para obtener la cantidad del marcador presente en estas.

Marcadores

Para que un compuesto se considere marcador ideal, deberá ser inerte y carecer de efectos tóxicos, ser físicamente similar o estar íntimamente relacionado con el material a marcar (sólido-líquido), no ser absorbible, no metabolizable, tener un método de análisis específico, sensitivo y económico, no afectar y no ser afectado en el tubo digestivo, por enzimas o microorganismos (Church, 1993). Sin embargo, ninguno de los marcadores existentes, cumple con las características ideales. Debe estandarizarse el marcador para condiciones específicas y así determinar el grado de error probable en las evaluaciones, por lo cual es recomendable evaluar diferentes materiales en condiciones particulares de investigación (Lascano *et al.*, 1990).

Existen marcadores internos y externos, los cuales se han utilizado para proveer información sobre la utilización del forraje por el animal, para evaluar la digestibilidad, consumo voluntario, producción fecal y la tasa de pasaje de líquidos y sólidos a través del tubo digestivo.

Los **marcadores internos** (Cuadro 1) son aquellos constituyentes naturales de las plantas que no pueden ser absorbidos, ni digeridos por el animal, y varían entre dietas, por lo que es necesario evaluar su empleo antes de su aplicación (Suvold y Cochran, 1991). Entre estos se encuentran:

Nitrógeno fecal: Marcador que se utiliza más para la predicción de la digestibilidad que para obtener el consumo. La relación entre el nitrógeno fecal y la digestibilidad no es constante, ya que puede influir la especie y el estado de madurez del forraje, nivel de consumo, infección parasitaria, especie animal, fertilización con nitrógeno de la pradera y contenido de fibra en la dieta. Se debe tener precaución en las aplicaciones de los datos obtenidos con este marcador, por ofrecer condiciones específicas (Sunvold y Cochran, 1991).

Lignina: La lignina es un polímero indigestible de varios componentes (alcohol fenilpropanoide, ácido ferulico y ácido paracumárico) y forma parte de la estructura de la pared celular de las plantas, en los forrajes puede estar asociada a partículas fibrosas de la dieta. Existen algunos factores que afectan la recuperación fecal de lignina, como son: la inmadurez de las plantas consumidas por el animal, que da como resultado una polimerización menor, por tanto algunos de los carbohidratos que están asociados a este complejo, pueden ser digestibles; los componentes de bajo peso molecular pueden ser absorbidos y excretados por orina (Van Soest, 1982; Fahey Jung, 1983).

Sílice y cenizas insolubles en ácido: El sílice fue uno de los primeros marcadores propuesto como indicador para evaluar la digestibilidad, en investigaciones posteriores se ha encontrado que su recuperación es variable, lo que se atribuye a problemas de absorción, excreción urinaria y contaminación del suelo (Kotb y Luckey, 1972). Sin embargo, se recomienda para la evaluación de consumo en pastoreo. Las cenizas insolubles en ácido se han utilizado para evaluar la digestibilidad, obteniendo resultados confiables, si la dieta contiene menos de 0.75% de cenizas insolubles en ácido. La variación diurna en heces, es un problema al utilizar este (Thoney *et al.*, 1985).

Fibra detergente ácido o neutro indigestible: La fibra indigestible tiene una recuperación de 98% en heces, por lo que sirve como indicador de la digestibilidad, aunque es posible que la recuperación de las fibras indigestibles

sea incompleta ya que influye el tamaño de partícula y el estado de madurez de la planta (Robertson y Van Soest, 1981).

Constituyentes de la cutícula de las plantas: La pared celular de las plantas está formada por complejas mezclas de lípidos, incluyendo hidrocarburos de cadena larga, alcoholes, cetonas, ácidos grasos, ésteres, aldehídos, esteroides, glicerol y ácidos solubles, los cuales se encuentran en todas las partes de la planta como hoja, tallo, fruto y flor. Esta pared celular funciona como una barrera contra factores adversos como el frío, calor, hongos u otros microorganismos. Casi el 50% de la pared celular está compuesta por n-alcenos (John, 1992).

Los **n-alcenos** son hidrocarburos de cadena larga saturados, el prefijo n (normal) es para resaltar que la cadena no está ramificada; contienen enlaces sencillos y estos compuestos son casi completamente insolubles en agua, por ser no polares, tienden a ser menos volátiles a medida que aumenta el peso molecular; a temperatura ambiente son sólidos con apariencia de cera (Fessenden y Fessenden, 1983; Brown *et al.*, 1993; Vollhardt *et al.*, 1996). Son fáciles de identificar ya que se encuentran en cantidades suficientes, aunque requieren cromatografía de gases. La mayor desventaja de los n-alcenos es la recuperación variable en heces (Cuadro 2), ya que influye la edad, estado fisiológico y la especie del animal; así como el estado fenológico, especie, parte de la planta y clima el clima presente. Por tanto, no es posible estandarizar la concentración de estos compuestos. Se han utilizado los n-alcenos para evaluar la digestibilidad, consumo, producción fecal y composición botánica (Mayes *et al.*, 1986; Dove y Mayes, 1991; Dove y Mayes, 1996; Mayes *et al.*, 1994).

Grace y Body (1981) descubrieron que los hidrocarburos de cadena larga (C₁₉:C₃₂) del forraje eran recuperados en heces, y sugirieron utilizar estos compuestos como marcadores internos, pero en ese momento era difícil su análisis. Mayes y Lamb (1984) sugirieron utilizar los n-alcenos para evaluar la digestibilidad, mientras que Mayes *et al.* (1986) utilizaron, para medir indirectamente el consumo, n-alcenos sintéticos de cadena par como C₃₂ y C₂₈ como marcadores externos y los n-alcenos C₃₁ y C₃₃ propios de la planta como

marcadores internos. La mayor ventaja de la utilización de n-alcános es que se puede obtener el consumo animal individual (Dove y Mayes, 1991). Para obtener la producción fecal se ha utilizado el n-alcáno C₃₆ de origen sintético (Molina *et al.*, 2004).

Para obtener la composición botánica consumida por los animales en pastoreo, se han utilizado métodos matemáticos como ecuaciones simultáneas (Newman *et al.*, 1995) y cuadrados mínimos no negativos (Dove y More, 1995) por medio de matrices matemáticas, para lo cual, es necesario conocer el perfil de n-alcános de heces, así como de los forrajes incluidos en la dieta (C₂₅-C₃₅), ya que los cambios en la pared celular de las plantas ofrece una clara diferencia en el perfil de n-alcános por especie vegetal, etapa de maduración (Laredo *et al.*, 1991) y parte de la planta (Cuadros 3 y 4). Para que la composición botánica calculada sea similar a la consumida por los animales, es necesario utilizar el mismo número de marcadores (n-alcános), que de especies presentes en la ración.

La composición botánica, se puede obtener por otros métodos como son: la separación manual de las especies vegetales consumidas, que además de ser laboriosa, se restringe a muestras frescas (Dove y Mayes, 1996); por medio de observación de fragmentos vegetales provenientes del esófago, contenido ruminal o heces en un microscopio estereoscópico, y con la utilización de isótopos en muestras de tejido de los animales (Holecheck *et al.*, 1982; Dove y Mayes, 1996; Dove *et al.*, 1999; Cornelis *et al.*, 1999). En general todos los métodos tradicionales tienen muchas limitaciones, por ser destructivos, laboriosos y con un alto costo para el bienestar animal. Por tanto, la estandarización del método de n-alcános para calcular la composición botánica consumida por los animales, ofrece ser un método en el cuál se requiere de menor manejo animal, por utilizar solo una pequeña muestra de heces, sin embargo requiere de un muestreo representativo de la especies vegetales.

Los **marcadores externos** (Cuadro 5) no son constituyentes naturales del forraje, se han utilizado para evaluar la producción fecal y el consumo voluntario (Pond *et al.*, 1987, Church, 1993). Entre estos se encuentran:

Oxido férrico: Este compuesto no se mezcla completamente con el bolo alimenticio por lo cual se acumula en el rumen; es muy variable y su recuperación es muy pobre, lo que ha reducido su utilización en rumiantes (Pond *et al.*, 1985).

Sulfato de plata (Ag_2S): Este marcador es un metal muy pesado, es insoluble en el tubo digestivo, su recuperación en heces y su determinación analítica es idónea, pero su elevado costo ha limitado su utilización (Scheneider y Flatt, 1975).

Polietilenglicol (PEG): Este material es extremadamente soluble en agua, su recuperación en heces es casi completa, presenta pocos problemas para su análisis, pero es precipitado con taninos, cuando se combina con alimentos con alta cantidad de estos compuestos (Ellis *et al.*, 1982).

Fibra cromo mordente: Fue desarrollado por Uden *et al.*, (1980) para atrapar el cromo a la fibra vegetal a través de la formación de enlaces, permaneciendo a lo largo del tubo digestivo, de esta manera se incrementa la densidad de la fibra y la tasa de pasaje del marcador puede ser diferente a la fibra no marcada. Se ha utilizado como marcador para estudios de digestibilidad y para determinar el avance del bolo alimenticio (Pond *et al.*, 1987; Van Soest 1994; Merchen, 1993).

Óxido de cromo (Cr_2O_3): Este compuesto es el más antiguo y comúnmente empleado de los marcadores externos (Pond *et al.*, 1987; Basurto y Tejada 1992; Van Soest, 1994), es insoluble en agua y no se asocia con los componentes del bolo alimenticio, viaja en forma de suspensión, pudiendo formar un sedimento en el retículo-rumen y ser transferido esporádicamente a los intestinos, lo que afecta su patrón de excreción. La variación diaria de la excreción fecal del marcador no contribuye como fuente de error, ya que puede evitarse al realizar el muestreo dos veces al día (Van Soest, 1994). El empleo del óxido de cromo debe hacerse en forma cuidadosa, ya que es un elemento carcinogénico (Pond *et al.*, 1987). En ensayos de pastoreo Cr_2O_3 se ha administrado en cápsulas de gelatina una o dos veces al día, observando que la dosificación del marcador dos veces al día, permite una determinación más exacta

de la excreción fecal, aunque rara vez la cantidad del marcador administrada coincide con la cantidad excretada (Owens y Hanson, 1992; Doyle *et al.*, 1994), debido a una falta de equilibrio del marcador en el ambiente ruminal (Córdova, 1996).

MATERIAL Y METODOS

El experimento se desarrolló en tres fases:

Primera fase

Preparación de cápsulas de alcanos C₃₂ y C₃₆

En la primera fase se estableció la metodología para obtener las cápsulas utilizadas para dosificar una cantidad aproximada de 75 mg de alcano C₃₂ y 75 mg alcano C₃₆ (Anexo 1), ya que Mayes (1986), Dove y Mayes (1991,1996) utilizaron una concentración similar, la cual fue realizada en laboratorio de farmacéutica de la Facultad de Química de la UNAM, de febrero a junio de 2003. Se elaboraron 16 lotes de 32 g de mezcla cada uno, suficiente cada lote para 50 cápsulas. Para la cuantificación de n-alcanos C₃₂ y C₃₆ presentes en 18 cápsulas y en 16 mezclas se utilizó cromatografía de gases (Anexo 1), en el laboratorio de Análisis Especiales del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM.

Segunda fase

Digestibilidad *in vivo*

Localización y duración

El trabajo de campo se efectuó del 21 julio al 31 de agosto de 2003 en el Centro de Extensión Investigación y Producción Ovina de la FMVZ de la UNAM, ubicado en Tres Marias, Morelos. En esta fase se adaptó los ovinos al consumo de forraje de una pradera mixta y se realizó la prueba de digestibilidad *in vivo* por recolección total de heces.

Animales

Se utilizaron diez machos ovinos enteros Suffolk, con peso inicial de 40.78 ± 2.09 y final de 38.14 ± 1.70 kg.

Etapas de adaptación

Los ovinos fueron sometidos a tres períodos de adaptación. En el primero se cambió la dieta y se adaptó a los animales por 14 d al consumo de forraje de

una pradera mixta de ballico perenne (*Lolium perenne*), kikuyo (*Penisetum clandestinum*) y trébol blanco (*Trifolium repens*), en pastoreo del 21 de julio al 3 de agosto de 2003. En el segundo periodo los ovinos fueron adaptados a las jaulas metabólicas durante 7 d, del 4 al 10 de agosto de 2003. En el tercer periodo los ovinos fueron adaptados a los arneses y bolsas recolectoras de heces del 11 al 17 de agosto de 2003.

En los dos últimos periodos, los ovinos fueron alimentados a las 0600, 1200. y 1800 horas, con forraje cortado y picado (aproximadamente 2 cm, tamaño de partícula), de la misma pradera mixta utilizada en la adaptación, más una premezcla mineral y agua a libre acceso. En el último periodo se midió el consumo voluntario para luego ajustarlo al 90% y así proporcionarlo en la etapa experimental.

Etapa experimental

El periodo experimental duró 14 d (18 al 31 de agosto de 2003); diariamente se realizó un muestreo del forraje por medio del método de cuarteo, y se obtuvieron tres muestras:

- La primera (aproximadamente 1 kg), se colocó en bolsa de papel y plástico y se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su almacenamiento.
- La segunda (aproximadamente 250 g) se colocó en bolsa de plástico y papel, y se almacenó en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- La tercer muestra (aproximadamente 100 g) se colocó en bolsa de plástico con cierre hermético, se congeló con nitrógeno líquido, y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Durante toda la etapa experimental (14 d), los ovinos fueron dosificados con cuatro cápsulas al día; dos por la mañana y dos por la tarde; conteniendo una cápsula 59.64 mg de dotracontano (C_{32}) + 63.04 mg hexatriacontano (C_{36}) (Anexo 1) y en la otra 250 mg de Cr_2O_3 .

Debido a que los marcadores externos necesitan alrededor de 5 a 7 d para equilibrarse en el ambiente ruminal, los ovinos se sometieron a un periodo de adaptación de 7 d, para ambos marcadores, previo al periodo en que se realizaron

las determinaciones; se realizó el muestreo de heces dos veces al día, durante todo el experimento (14 d) directamente del recto, antes de cada dosificación. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico con cierre hermético y se congelaron en nitrógeno líquido, y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se midió la recolección total de heces a las 0500 y 1730 horas. Las heces se recolectaron directamente de la bolsa recolectora y se pesaron en una balanza granataria con capacidad de 2 kg; posteriormente se obtuvo una alícuota que se congeló en nitrógeno líquido y se conservó en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tercera fase

Análisis de laboratorio

La tercera fase se realizó en el laboratorio de bromatología en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica en la FMVZ de la UNAM.

Muestras de forraje

En la fase de campo se obtuvieron tres muestras de forraje, que posteriormente fueron analizadas en el laboratorio:

La primera muestra se descongeló a temperatura ambiente, se deshidrató en estufa de aire forzado a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, se molió con criba 0.5 mm en un molino de cuchillas (Thomas Wiley Laboratory mill modelo 4, marca Arthur H. Thomas Company) y posteriormente se realizaron las siguientes determinaciones:

- Contenido de materia seca, proteína cruda, cenizas (AOAC, 1990).
- Fibra detergente neutro y fibra detergente ácido (Waldern 1971).
- Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (Tilley y Terry, 1963).

La segunda muestra fue se descongeló en refrigeración y se dividió en dos partes: La primera (aproximadamente 200 g), se mantuvo a temperatura ambiente, para separar las diferentes especies y así obtener la composición botánica en base seca; las muestras individuales de cada especie se deshidrataron y se molieron con criba 1 mm en un molino de café, se determinó MS y cenizas (AOAC, 1990). La segunda parte conformada por la mezcla de especies (aproximadamente 50 g), se deshidrató en estufa de aire forzado a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, se

molieron con criba 0.5 mm en un molino de cuchillas (Thomas Wiley Laboratory mill modelo 4, marca Arthur H. Thomas Company) y posteriormente se determinó MS y cenizas (AOAC, 1990).

La tercer muestra se descongeló en refrigeración para obtener dos muestras: La primera (75 g) se sometió a separación manual de las diferentes especies, las cuales se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ individualmente y posteriormente se liofilizaron; la segunda (25 g) se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y liofilizó. Ambas muestras se molieron con criba de 1 mm en un molino de café para posteriormente determinar el perfil de alcanos por cromatografía de gases modificando la técnica de Mayes *et al.* (1986); Vulich *et al.* (1995) (Anexo 2).

Muestras de heces

Las muestras fecales obtenidas del recto en la fase de campo fueron liofilizadas y molidas con criba de 1 mm en un molino de café, para determinar el contenido de MS, el perfil de alcanos por cromatografía de gases modificando la técnica de Mayes *et al.* (1986); Vulich *et al.* (1995) (Anexo 2) y la concentración de Cr_2O_3 por espectrofotometría de absorción atómica, previa digestión ácida de las heces (Fenton y Fenton, 1979).

Las muestras obtenidas por recolección total de heces se descongelaron a temperatura ambiente, se deshidrataron en estufa de aire forzado a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se molieron en un molino de cuchillas (Thomas Wiley Laboratory mill modelo 4, marca Arthur H. Thomas Company) con criba de 0.5 mm, posteriormente se realizaron las siguientes determinaciones:

- Contenido de materia seca, proteína cruda, cenizas (AOAC, 1990).
- Fibra detergente neutro y fibra detergente ácido (Waldern, 1971).

Cabe mencionar que el peso en seco de las muestras fecales tomadas del recto de cada animal, se añadió al peso obtenido en la recolección total de heces, para conocer la producción fecal total individual.

Evaluaciones

Al conocer el comportamiento de los marcadores durante la etapa experimental, se consideró que el punto de equilibrio de los marcadores se

presentó a los siete días del experimento. Por esta razón se realizaron las determinaciones de digestibilidad *in vivo*, utilizando los datos obtenidos en los últimos 7 d del experimento (del 25 al 31 de agosto), así como los registros de consumo de alimento, que también se midió durante toda la etapa experimental.

Las evaluaciones obtenidas fueron las siguientes:

- **Producción fecal**

La producción fecal se midió directamente por RTH y también se evaluó utilizando los marcadores C_{36} y Cr_2O_3 , utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Producción fecal (g/d)} = \frac{\text{Marcador administrado (mg d}^{-1}\text{)}}{\text{Marcador en heces (mg g}^{-1}\text{)}}$$

Se comparó la producción de heces medida directamente con la obtenida por C_{36} y por Cr_2O_3 .

- **Consumo de materia seca**

El consumo de materia seca se obtuvo por:

Medición directa

$$\text{MS ofrecida} - \text{MS rechazada}$$

Medición a través de la relación $C_{31}:C_{32}$

$$I \text{ (kg MS d}^{-1}\text{)} = \frac{(H_i H_j^{-1}) * D_j}{F_i - (H_i H_j^{-1})F_j}$$

(Anexo 3)

Medición a través de la relación $C_{33}:C_{32}$

$$I \text{ (kg MS d}^{-1}\text{)} = \frac{(H_i/H_j) * D_j}{F_i - (H_i/H_j)F_j}$$

Donde:

I= Consumo

F_i y H_i = Concentraciones en forrajes y heces respectivamente, de C_{31} o C_{33}

F_j y H_j = Concentraciones en forrajes y heces respectivamente, de C_{32}

D_j = Dosis diaria de C_{32}

****En las heces lo único importante es la relación $C_{31}:C_{32}$ o $C_{33}:C_{32}$ (Dove y Mayes 1991, Dove y Mayes 1995)**

Medición a través de la técnica de Cr₂O₃/DIVMS

$$\text{Consumo de MS kg d}^{-1} = \text{Producción fecal} / (1 - \text{DIVMS})$$

Se comparó el consumo obtenido directamente, contra la medición hecha utilizando la relación C₃₁:C₃₂, la relación C₃₁:C₃₃ y la técnica de Cr₂O₃/DIVMS.

Digestibilidad de la materia seca

La digestibilidad de la materia seca se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Digestibilidad} = 1 - (\text{producción fecal} / \text{consumo})$$

Determinándola de tres maneras:

In vivo

$$\text{Digestibilidad \%} = \frac{\text{MS consumida kg d}^{-1} - \text{MS excretada kg d}^{-1}}{\text{MS consumida kg d}^{-1}}$$

Determinación utilizando el consumo obtenido por medio de las relaciones de n-alcenos C₃₁:C₃₂ y C₃₃:C₃₂ y la producción fecal obtenida a través del n-alceno C₃₆

$$\text{Digestibilidad (\%)} = \frac{\text{MS consumida (C}_{31} \text{ o } 33: \text{C}_{32}) - \text{MS excretada (C}_{36})}{\text{MS consumida (C}_{31} \text{ o } 33: \text{C}_{32})} \times 100$$

Medición utilizando el consumo obtenido por la relación de n-alcenos C₃₁:C₃₂ y C₃₃:C₃₂ y la producción fecal obtenida a través de Cr₂O₃

$$\text{Digestibilidad (\%)} = \frac{\text{MS consumida (C}_{31} \text{ o } 33: \text{C}_{32}) - \text{MS excretada (Cr}_2\text{O}_3)}{\text{MS consumida (C}_{31} \text{ o } 33: \text{C}_{32})} \times 100$$

Composición botánica de la dieta consumida por los ovinos

La composición botánica se obtuvo por tres métodos:

Separación manual

Obteniendo el peso total de la mezcla de forrajes, y posterior a la separación manual el peso de cada especie encontrada.

Cálculo utilizando el perfil de n-alcenos presente en forraje y heces

Utilizando la información sobre las concentraciones de n-alcenos en las diferentes especies vegetales del forraje y la información sobre estos mismos en

heces, se determinó la composición botánica de la dieta por el método matemático de Ecuaciones simultaneas utilizando matrices (Newman *et al.*, 1995)

Análisis de la información

Las evaluaciones de DMS, CMS y PFT obtenidas por los métodos de n-alcanos, Cr₂O₃, y directo, fueron analizadas y comparadas entre sí, lo que constituyó una primera variable.

Debido a que se considera que las mediciones obtenidas a través del método directo (digestibilidad *in vivo*, medición directa del CMS y RTH), ofrecen un error mínimo, las evaluaciones obtenidas por los métodos alternativos o indirectos (n-alcanos y Cr₂O₃), se compararon con el método directo para conocer que tanto se acercaban a este valor.

La diferencia entre los métodos alternativos y el método directo, se obtuvo a través del porcentaje de error, el cuál se calculó como el valor absoluto del resultado de dividir la observación de cada uno de los métodos entre el valor resultante del método directo, lo cual se consideró como una nueva variable.

Debido a que se realizaron varias mediciones sobre el mismo animal, se consideró un modelo de observaciones repetidas, tomando al animal como bloque, bajo el siguiente modelo:

$$y_{ij} = \mu + \beta_i + \alpha_j + \varepsilon_{ij}$$

y_{ij}= Variable (evaluación o porcentaje de error) a analizar del animal i-ésimo, del tratamiento (método de medición) j-ésimo μ = Media general

β_i = Efecto de bloque. La unidad de experimentación i-ésimo bloque. $i=1,2,3,4,5,6,7, 8, 9, 10$ (animal)

α_j = Efecto del tratamiento (método de medición) j-ésimo tratamiento
 $j= 1$ (n-alcanos), 2 (Cr₂O₃), 3 (Directo) o cualquier método de medición

ε_{ijk} = Residual. Las fuentes de variación que no son tratamientos, ni bloques
(Daniel, 2002 y Kuehl, 2001)

En este modelo se supone que las observaciones de cada animal son dependientes, por tanto se midió el efecto del bloque(animal) y en los casos en que no fue significativo, se optó por utilizar un modelo más simple:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

y_{ij} = Variable a analizar

μ = Media general

τ_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

$i = 1$ (n-alcanos), 2 (Cr_2O_3), 3 (directo) o cualquier método de medición

ε_{ij} =Residual (Error experimental).

(Daniel, 2002 y Kuehl, 2001)

El análisis estadístico se realizó con técnicas paramétricas, que se basan en el supuesto de que las variables siguen una distribución normal y por tanto se midió el ajuste a esta distribución, mediante las pruebas de sesgo y kurtosis, así como por su prueba conjunta.

La Kurtosis se basa en el tamaño de las colas de una distribución, las distribuciones con colas relativamente grandes se conocen como leptokúrtica, las distribuciones con las colas pequeñas se llaman platikúrtica y una distribución con la mismo Kurtosis que la distribución normal es mesokúrtica (Amarra, 1986).

En los casos en que no se presentó un buen ajuste a la distribución normal, la variable fue transformada con el método de Box-Cox (Abramowitz and Segun, 1972).

La comparación entre medias se obtuvo realizando una prueba de Tukey ($P < 0.05$).

RESULTADOS

Concentración de C₃₂ y C₃₆ en las cápsulas

Al realizar el análisis de los lotes se encontró una concentración de 58.60 mg \pm ^(DE) 3.82 para C₃₂ y 63.53 mg \pm ^(DE) 3.09 para C₃₆. La concentración obtenida en las cápsulas fue 59.64 mg \pm ^(DE) 4.75 para C₃₂ y 63.04 mg \pm ^(DE) 4.93 para C₃₆ (Figura 1 y 2). La dosificación utilizada en el experimento, fue la obtenida en las cápsulas analizadas.

Composición química de la pradera

La composición química de la pradera mixta fue similar en el período de adaptación y en el período en el que se realizaron las mediciones durante el experimento como se muestra en el Cuadro 6.

Digestibilidad *in vivo* de nutrimentos

El porcentaje general de digestibilidad *in vivo* de la MS fue 71.61 \pm ^(DE) 1.91 y 69.59 \pm ^(DE) 1.83, de la MO 74.19 \pm ^(DE) 2.01 y 72.16 \pm ^(DE) 0.97, de la PC fue de 70.33 \pm ^(DE) 2.30 y 69.20 \pm ^(DE) 0.99; de la FDA 61.10 \pm ^(DE) 4.05 y 58.73 \pm ^(DE) 3.82 y de la FDN 70.94 \pm ^(DE) 3.03 y 70.20 \pm ^(DE) 0.71; en el período de adaptación y evaluación respectivamente (Figuras 3 y 4). Los valores individuales se muestran en los Cuadros 7,8,9,10 y 11.

Comparación de tres métodos para obtener la producción fecal total

La variable producción fecal total (PFT) obtenida al día, fue sometida a las pruebas de kurtosis y sesgo, esta variable, no se ajustó a la normalidad, por lo cual, fue necesario transformarla con el método de Box y Cox. La variable transformada presentó una mejor adaptación a la normalidad (Cuadro 12), aunque ligeramente leptokúrtica.

^{DE} =Desviación estándar

En la prueba conjunta no se detectó diferencia estadísticamente significativa del ajuste de normalidad ($P > 0.05$). Por tanto se utilizó la variable "normalizada". Al realizar el análisis de varianza con observaciones repetidas, no se encontró efecto del animal ($P > 0.05$). Por tanto, se realizó un análisis de varianza de una sola vía (Cuadro 13) y se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en el valor de PFT, obtenido por los tres métodos. Al realizar la prueba de Tukey, se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) del método de n-alcános ($0.2933 \text{ kg} \pm^{(DE)}0.05$) con los métodos de RTH ($0.2537 \text{ kg} \pm^{(DE)}0.03$) y Cr_2O_3 ($0.2483 \text{ kg} \pm^{(DE)}0.04$), siendo estos dos últimos estadísticamente no diferentes ($P > 0.05$) (Cuadro 14, Figura 5).

Para dimensionar la diferencia entre los métodos, se obtuvo el valor absoluto del porcentaje de "error", entre los dos métodos alternativos (Cr_2O_3 y n-alcános) en relación al método directo (RTH), a este porcentaje se le aplicó la prueba de sesgo y kurtosis y se detectó una falta de ajuste a la normal, por lo que se transformó con el método Box y Cox, la nueva variable no presentó diferencia significativa de falta de normalidad (Cuadro 15). Posteriormente se realizó un análisis de varianza de la variable porcentaje de error "normalizada", en el cual no se encontró evidencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$), entre los porcentajes de error de los métodos alternativos (Cr_2O_3 y n-alcános) en relación al método directo (RTH) (Cuadro 16).

Evaluación del consumo de materia seca

Al aplicar la prueba de sesgo y kurtosis sobre la variable consumo de materia seca (CMS), se encontró que se alejaba mucho de la distribución normal y fue necesaria su transformación con el método de Box y Cox. A la variable transformada se le aplicó la misma prueba y se observó una mejor adaptación a la normalidad (Cuadro 17). Sin embargo, la variable transformada fue francamente leptokúrtica y al realizar la prueba conjunta se obtuvo un nivel de significancia

^{DE}= Desviación estándar

menor al aceptado ($P = 0.002$). Para el análisis, se utilizó la variable “normalizada”, que aunque no tuvo el ajuste deseado se acercó más a la normal. En esta variable el animal tuvo efecto estadísticamente significativo ($P < 0.05$), por lo que se consideró como bloque. En el análisis de varianza con observaciones repetidas, se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 18). Al realizar la prueba de Tukey se encontró que la evaluación del CMS por el método de n-alcanos $C_{31}:C_{32}$ ($0.983 \text{ kg MS}^{d-1} \pm (DE)0.31$), es estadísticamente diferente ($P < 0.05$) a los métodos de $Cr_2O_3/DIVMS$ ($0.748 \text{ kg MS}^{d-1} \pm (DE)0.18$), directo ($0.841 \text{ kg MS}^{d-1} \pm (DE) 0.09$) y n-alcanos $C_{33}:C_{32}$ ($0.841 \text{ kg MS}^{d-1} \pm (DE)0.16$); el método de $Cr_2O_3/DIVMS$ es estadísticamente diferente ($P < 0.05$) a los métodos de n-alcanos $C_{31}:C_{32}$, método directo y n-alcanos $C_{33}:C_{32}$; sin embargo el método de n-alcanos $C_{33}:C_{32}$ y el método directo no fueron estadísticamente diferentes entre sí ($P > 0.05$) (Cuadro 19, Figura 6).

Se calculó la diferencia porcentual de los métodos alternativos, en relación al directo, para obtener una nueva variable, a la cual se le aplicó la prueba de sesgo y kurtosis y se encontró un fuerte alejamiento a la distribución normal (sesgo a la derecha y leptokúrtica). La variable transformada por el método de Box Cox presentó un adecuado ajuste a la normal, por lo que se utilizó la diferencia porcentual “normalizada” (Cuadro 20). En esta diferencia porcentual “normalizada”, no hubo efecto de animal, por lo que se utilizó un análisis de varianza de una vía (Cuadro 21) y se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre los tres métodos alternativos (n-alcanos $C_{33}:C_{32}$, $Cr_2O_3/DIVMS$ y n-alcanos $C_{31}:C_{32}$), sin embargo el método de n-alcanos $C_{33}:C_{32}$, presentó menor porcentaje de “error” que los métodos de alcanos $C_{31}:C_{32}$ y $Cr_2O_3/DIVMS$, en relación al método directo (Cuadro 22).

^{DE} = Desviación estándar

Evaluación de la digestibilidad de la materia seca (DMS)

La variable digestibilidad de la materia seca (DMS), se encontró que se aleja mucho de la normal, al realizar la prueba de sesgo y kurtosis, por tanto, fue necesaria su transformación con el método de Box y Cox. A la variable transformada se le aplicó la misma prueba y se observó una mejor adaptación a la normalidad (Cuadro 23); por esta razón, se trabajó con la variable “normalizada”.

Al realizar un análisis de varianza con observaciones repetidas, se encontró que, para esta variable no hubo efecto estadísticamente significativo ($P > 0.05$) de animal. Por tanto, se realizó el análisis de varianza de una vía (Cuadro 24), para la variable DMS, en el cual, se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre los métodos ($66.25 \% \pm ^{(DE)}3.87$, *in vitro*; $66.54 \% \pm ^{(DE)}5.17$, método directo (*in vivo*); $68.38 \% \pm ^{(DE)}8.90$, n-alcanos C_{33}/C_{36} ; $67.12 \% \pm ^{(DE)}12.57$, n-alcanos C_{31}/C_{36} ; $69.71 \% \pm ^{(DE)}7.05$, n-alcano C_{36}/Cr_2O_3 y $72.35 \% \pm ^{(DE)}9.61$, n-alcano C_{31}/Cr_2O_3). Mediante la prueba de Tukey se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) del método *in vitro* con los métodos n-alcano C_{33}/Cr_2O_3 y n-alcano C_{31}/Cr_2O_3 , así como del método n-alcano C_{31}/Cr_2O_3 con los métodos directo (*in vivo*), *in vitro*, n-alcano C_{31}/C_{36} y n-alcano C_{33}/C_{36} . No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) entre los métodos de n-alcanos C_{31}/C_{36} , n-alcanos C_{33}/C_{36} , n-alcano C_{33}/Cr_2O_3 , el método directo (*in vivo*) e *in vitro*, así como entre los métodos de C_{31}/Cr_2O_3 y n-alcano C_{33}/Cr_2O_3 (Cuadro 25, Figura 7).

Se calculó la diferencia porcentual de cada uno de los métodos alternativos con relación al directo y se obtuvo una nueva variable, a la cual, se le aplicó la prueba de sesgo y kurtosis, detectando un fuerte alejamiento de la distribución normal (Cuadro 26), por lo que fue necesaria su transformación. La variable transformada por el método de Box Cox presentó un adecuado ajuste a la normal, por lo que se utilizó la variable de diferencia porcentual “normalizada”.

El análisis de varianza (Cuadro 27) de la variable diferencia porcentual de los métodos alternativos (n-alcano C_{31}/Cr_2O_3 , n-alcano C_{36}/Cr_2O_3 , n-alcanos C_{33}/C_{36} , n-alcanos C_{31}/C_{36}) para obtener la DMS, sólo mostró diferencias

estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre los métodos de n-alcano C_{33}/C_{36} y n-alcano C_{31}/Cr_2O_3 . Entre los métodos de n-alcanos C_{31}/C_{36} , alcano C_{33}/Cr_2O_3 e *in vitro*, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) (Cuadro 28).

Determinación de la composición botánica de la dieta consumida por los ovinos

Al realizar la separación manual de las especies presentes en la muestra de forraje proveniente de la pradera mixta se encontraron siete especies, *Lolium perenne* $61.43 \% \pm 7.83$, especies no deseables $12.29 \% \pm 6.00$, *Pennisetum clandestinum* $11.13 \% \pm 3.12$, *Brachiaria meziana* $9.44 \% \pm 5.53$, *Trifolium repens* $3.88 \% \pm 1.40$, *Trifolium pratenses* $0.62 \% \pm 1.63$, *Trifolium hybridum* $0.81 \% \pm 1.24$, y *Bromus inermis* $0.47 \% \pm 1.24$, de inclusión (Cuadro 29).

No fue posible obtener el cálculo de composición botánica con la técnica, de n-alcanos a través de ecuaciones simultáneas (Newman *et al.*, 1995) por matrices, debido a que el perfil de alcanos en las especies vegetales, fue muy variable (Cuadro 30, 31, 32, 33 y 34), así como la recuperación en heces (Cuadro 35). Al realizar los cálculos matemáticos para obtener la composición botánica de la dieta consumida por los ovinos, se obtuvieron resultados negativos. Al comparar los n-alcanos consumidos con los excretados, utilizando los métodos directos, se apreció (Anexo 4), que la variabilidad en el contenido de n-alcanos en forrajes y heces no permitió obtener la composición botánica de la dieta consumida por los ovinos, por cálculos matemáticos.

DISCUSIÓN

Concentración de C₃₂ y C₃₆ en las cápsulas

Para este experimento se innovó una técnica (Anexo 1) para obtener cápsulas de gelatina con una mezcla de C₃₂ y C₃₆, que ofreciera mayor facilidad de preparación y certeza en la concentración de n-alcános al dosificar. Como se puede observar en las Figuras 1 y 2, la concentración obtenida de los lotes y las cápsulas fue similar, presentando mayor concentración del n-alcáno C₃₆ que del C₃₂ y una variación para los lotes de 3 mg y 4 mg para las cápsulas. Aunque en la preparación de la mezcla se esperaba una cantidad de 75 mg de C₃₂ y 75 mg de C₃₆ por cada cápsula, el no obtener las cantidades esperadas, no limitó su utilización ya que lo importante es conocer la dosificación utilizada en el experimento.

Diversos investigadores han utilizado pelets formados con papel Whatman, impregnados con los n-alcános disueltos en heptano (Mayes *et al.*, 1986; Vullich *et al.*, 1990; Reeves *et al.*, 1996; Dove *et al.*, 2000) y encontraron resultados satisfactorios porque no tuvieron grandes variaciones en la concentración de los n-alcános sintéticos, utilizados como marcadores. Mayes *et al.* (1986) elaboraron pelets utilizando como marcadores externos, los n-alcános C₂₈ y C₃₂ impregnados en celulosa con heptano, ácido palmítico y ácido esteárico, con lo que obtuvieron concentraciones con variación de 2.9 mg para C₂₈ y 1.1 mg para C₃₂. Vullich *et al.* (1990) utilizaron pelets con C₃₂ y C₃₆ disueltos en heptano e impregnados en celulosa, con los cuales obtuvieron una recuperación muy similar de los dos n-alcános, con una variación de 2.7 mg en lotes y 1.7 mg en cápsulas. Por tal razón se recomienda emplear la técnica utilizada en este experimento, por ser económica y sencilla en su preparación.

Composición química de la pradera y digestibilidad *in vivo* de nutrimentos

En el Cuadro 6 se puede observar que el forraje consumido por los ovinos durante el experimento, presentó una composición química homogénea, de calidad, capaz de satisfacer los requerimientos de mantenimiento de los animales utilizados en el estudio. Mayes *et al.*, 1986, utilizaron *Lolium perenne* (15% MS, 20.7% PC, 10.1 % Cen y 24.8% FDA) y Balocchi *et al.*, (2002) con una pradera mixta compuesta por *Lolium perenne*, *Bromus valdivianus*, *Poa annua*, *Trifolium repens* y especies de hoja ancha (16% MS, 21.3% PC, 44.6 % FDN y 11.1% Cen), encontraron valores químicos similares a los que se obtuvieron con el forraje obtenido de la pradera mixta, utilizada en este experimento. La digestibilidad *in vivo* de los nutrientes FDA, FDN, PC y MO (Figuras 3 y 4) no presentó variación en las dos etapas del experimento, mostrando así que las condiciones experimentales fueron las adecuadas.

Comparación de tres métodos para obtener la producción fecal

La evaluación de la producción fecal total (PFT) obtenida con el método n-alcano C₃₆ presentó una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con el método de Cr₂O₃ y método directo (RTH). En la Figura 5, se puede observar que con el marcador n-alcano C₃₆ se presentó sobre valoración de la producción fecal, en relación con la RTH y el método de Cr₂O₃, lo cual es semejante a lo obtenido por Ferret en 1999. De manera contraria Dove y Mayes (1991); Dove y Mayes, (1996); Dove y Mayes, (2000), encontraron que, con el método de Cr₂O₃ la PFT se sobre valora y con el método de n-alcano C₃₆ la valoración es cercana a la obtenida con la RTH.

Sin embargo, en esta investigación al calcular la diferencia del porcentaje de error de los métodos alternativos (Cr₂O₃, n-alcano C₃₆) en relación al método directo y compararla, no fue estadísticamente diferente ($P > 0.05$), por tanto, los dos métodos alternativos (n-alcano C₃₆ y Cr₂O₃), ofrecen valores confiables de la producción fecal total, por ser muy cercanos a los obtenidos con el método directo (RTH).

Evaluación del consumo de materia seca

El consumo de materia seca obtenido con el método de n-alcenos $C_{31}:C_{32}$ fue significativamente diferente ($P < 0.05$), al obtenerlo con los métodos de n-alcenos $C_{33}:C_{32}$, $Cr_2O_3/DIVMS$ y directo. La evaluación del CMS obtenido con el método $Cr_2O_3/DIVMS$ fue significativamente diferente ($P < 0.05$), al obtenido con los métodos de n-alcenos $C_{31}:C_{32}$, directo y n-alcenos $C_{33}:C_{32}$. Sin embargo los métodos de n-alcenos $C_{33}:C_{32}$ y directo, no fueron estadísticamente diferentes ($P > 0.05$). La relación $C_{31}:C_{32}$ presentó una sobre valoración del CMS y la relación $Cr_2O_3/DIVMS$ una sub valoración de esta variable (Figura 6). La relación $C_{33}:C_{32}$ ofreció la mejor valoración del CMS, al calcular la diferencia porcentual, por ser el método con menor porcentaje de error en relación al método directo (Cuadro 22). Lo anterior coincide con Dove *et al.*, (2000), quienes encontraron que el consumo de materia seca, obtenido con las relaciones $Cr_2O_3/DIVM$ se sub valora, con $C_{31}:C_{32}$ se sobre valora y con $C_{33}:C_{32}$ es cercano al método directo. Sin embargo Malossini (1996) encontró un valor de consumo mayor con $Cr_2O_3/DIVM$ al compararlo con el método de n-alcenos $C_{31}:C_{32}$. Varios investigadores (Reeves *et al.*, 1996, Mayes y Dove, 2000; Molina *et al.*, 2004) han coincidido en que la relación $C_{33}:C_{32}$ es el mejor método para determinar el consumo de materia seca, debido que tiene menor variación en la recuperación en heces de estos n-alcenos. Según Vullich (1990), la valoración del consumo es similar al utilizar las relaciones $C_{33}:C_{32}$ y $C_{31}:C_{32}$. Mayes *et al.* (1986) mencionan que el n-alceno natural C_{33} y el n-alceno dosificado C_{32} ofrecen la más baja discrepancia en relación al método directo, seguidos por los n-alcenos $C_{29}:C_{28}$ y C_{35} como marcador interno; sin embargo en esta investigación se confirmó, que los métodos que utilizan n-alcenos sub valoran el CMS, excepto cuando se utiliza la relación $C_{33}:C_{32}$. Además de que es posible que el valor de CMS, obtenido por medio de la técnica de n-alcenos, varíe con la edad, estado fisiológico y especie del animal, así como por el perfil de n-alcenos presentes en el forraje, el cual es diferente por edad y parte de la planta. Por esta razón al elegir los n-alcenos a utilizar para evaluar el consumo se debe considerar la variabilidad en el perfil de alcanos presentes en heces y

forraje, al elegir los n-alcenos a utilizar para evaluar el consumo. Por ejemplo, Hameleers (1998), cuando utilizó una pradera con una proporción alta de *Trifolium* sp, el cual tenía una concentración elevada de C₃₁ y baja de C₃₃, eligió utilizar el n-alceno C₃₁ para la determinación de consumo, pero al presentar el C₃₁ una recuperación más alta que el C₃₂, se presentó una sobre valoración del consumo. Por tal razón es recomendable utilizar el método de n-alcenos siempre y cuando el perfil de la dieta muestre condiciones adecuadas para llevar a cabo una buena recuperación de estos marcadores y por consiguiente una buena valoración del consumo de materia seca.

Evaluación de la digestibilidad de la materia seca (DMS)

Con el método *in vitro* se encontró una sub valoración y con la relación n-alceno C₃₁/Cr₂O₃ una sobre valoración de la DMS (%) (Figura 7). Lo cual coincide con lo reportado por Dove y Mayes (1991) ya que encontraron que el método *in vitro*, el valor de DMS (%) es menor que el obtenido con el método *in vivo*, debido a que el primer método no se considera el efecto del tubo digestivo del animal y el comportamiento de intercambio de productos ruminales (Tejada, 1992).

El método C₃₁/Cr₂O₃ para evaluar la DMS (%) presentó el mayor porcentaje de error (Cuadro 28) al compararlo con el método directo. En cambio el método n-alcenos C₃₃/C₃₆, ofreció el menor porcentaje de error con relación al método directo, por lo tanto este método ofreció, los resultados mas parecidos a los obtenidos con el método directo.

Determinación de la composición botánica de la dieta consumida por los ovinos

Al utilizar la técnica de n-alcenos y emplear métodos matemáticos (Newman *et al.*, 1995), para calcular la composición botánica de la dieta, no fue posible obtenerla, debido a la fuerte variación que se presentó en el perfil de los forrajes y en las heces (Anexo 4). Smith *et al.*, (2000) mencionan que el perfil de n-alcenos es variable no solo por especie y edad de la planta, sino también por parte de la

planta y época del año, lo cual dificulta su utilización para calcular la composición botánica. La concentración de los n-alcenos C_{25} - C_{35} presentes en los forrajes, es baja regularmente, sin embargo cuando se presentan factores adversos para la planta, como sequías, heladas, plagas o presencia de plantas indeseables; la concentración de los n-alcenos puede incrementarse de manera considerable en las plantas, por ser un sistema de defensa para estas (Laredo, *et al.*, 1991). La gran variación en la concentración de n-alcenos C_{25} , C_{27} y C_{29} , en las plantas completas que formaron parte de la dieta, en la presente investigación, se atribuye, a que estas presentaron inflorescencias o frutos, debido a que estas partes de las plantas contienen la mayor cantidad de estos n-alcenos (Baker *et al.*, 1994). En las condiciones de esta investigación la técnica de n-alcenos no mostró resultados satisfactorios para calcular la composición botánica de la dieta consumida por los ovinos, debido a que el forraje obtenido de la pradera mixta, tenía diferentes especies, con edad fenológica y estado de madurez variable. De manera contraria, en estudios realizados por Dove y Mayes (1991,1996), Dove *et al.* (2000) quienes utilizaron praderas homogéneas, ya que fueron renovadas constantemente, la relación entre gramíneas y leguminosas fue adecuada, sin la presencia de malezas o plantas no deseables, bajo un sistema de pastoreo intensivo, favoreció la estandarización del perfil de n-alcenos, presentes en los forrajes consumidos por los animales utilizados, con lo cual pudieron calcular la composición botánica de la dieta empleando métodos matemáticos (Newman *et al.*, 1995; Dove y More, 1995).

CONCLUSIONES

La evaluación de la producción fecal total, utilizando la técnica de n-alcanos no es diferente ($P>0.05$) a la obtenida por la técnica con Cr_2O_3 , al compararlas con la RTH.

La técnica de n-alcanos $\text{C}_{33}:\text{C}_{32}$ es mejor ($P<0.05$) que la técnica de n-alcano/ Cr_2O_3 , para determinar el consumo de materia seca, en comparación con la medición *in vivo*.

La técnica de n-alcanos $\text{C}_{33}/\text{C}_{36}$ es más eficiente ($P<0.05$) que la técnica de n-alcanos/ Cr_2O_3 , en la determinación de la digestibilidad de la materia seca, al compararlos con la medición *in vivo*.

Con la técnica de n-alcanos, no fue posible obtener la composición botánica de la dieta consumida por los ovinos, por el método de ecuaciones simultáneas por matrices propuesta por Newman (1995).

RECOMENDACIONES

La técnica propuesta (Anexo 1), para obtener cápsulas de gelatina con la mezcla de C_{32} y C_{36} , es factible de ser utilizada, por ser sencillo su desarrollo. Sin embargo como se obtuvo una variación ligeramente más alta, que con la técnica de pelets de celulosa impregnados con n-alcenos, utilizada en otros estudios, se recomienda que para posteriores estudios se realice un estudio comparativo entre las técnicas utilizadas anteriormente y la utilizada en este experimento, para evaluar si la técnica con la cual se obtienen los n-alcenos para dosificar influyen sobre las mediciones de consumo, digestibilidad, y producción fecal.

Utilizando el Cr_2O_3 como marcador externo, se obtuvieron valores de consumo de materia seca, producción fecal total y digestibilidad de la materia seca muy similares a los obtenidos con los métodos directos respectivos, por lo que se recomienda ampliamente su utilización, por ser una técnica sencilla y económica, sin embargo se debe considerar que el Cr_2O_3 , es un compuesto carcinogénico.

La técnica de n-alcenos ofreció mediciones muy cercanas al método directo, al evaluar el consumo de materia seca utilizando la relación $C_{33}:C_{32}$, la producción fecal total con el n-alceno C_{36} y la digestibilidad de la materia seca utilizando la relación del n-alceno C_{33}/C_{36} , por lo cual puede ser utilizada, siempre y cuando se tengan las condiciones necesarias para su análisis, ya que es una técnica laboriosa y costosa.

Para el cálculo de la composición botánica de la dieta consumida por los ovinos, la técnica de n-alcenos, no ofreció buenos resultados, en las condiciones de este experimento, ya que para su utilización, es necesario estandarizar el perfil de n-alcenos por especie, época del año y parte de la planta, lo cual es muy difícil en las condiciones de nuestro país, por contar con praderas muy heterogéneas, con una gran diversidad vegetal, especies que alcanzan su etapa de madurez en diferente tiempo y de las cuales en ocasiones se desconoce la edad de establecimiento. Por tanto, se recomienda utilizar las técnicas tradicionales que aunque son laboriosas y requieren manejo del ganado, ofrecen valores de composición botánica confiables, en comparación al método directo.

REFERENCIAS

Abramowitz M and Stegun IA. 1972. Manual de funciones matemáticas con fórmulas, gráficas y tablas matemáticas. 9ª. Ed. Nueva York. Dover. 928 p.

Amarra JJA. 1986. El significado del kurtosis: Darlington Reesaminado. *Amer. Statist.* 40: 283-285.

Allen MS and Mertens DR. 1988. Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. *American Institute of Nutrition.* 261-270.

A. O. A. C. Official Methods of Analysis 1990. *Association of Official Analytical Chemists* (15 th ed.) Arlington, V.A.

Baker SK, Klein L. 1994. Potential to use n-alkanes in plant cuticular waxes to discriminate plant parts of subterranean clovers eaten by ruminantes. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production.* 20:419.

Balocchi LO, Pulido FR y Fernández VJ. 2002. Comportamiento de vacas lecheras en pastoreo con y sin suplemento con concentrado. *Agric. Tec.* 62(1):23-36.

Basurto, R y Tejada HI. 1992. Digestibilidad aparente de la pulpa deshidratada de limón. Comparación de métodos para estimarla. *Téc. Pec. Méx.* 30 (1) :13-22.

Bondi AA. 1989. *Nutrición Animal.* Acribia S.A. Zaragoza, España. 546 p.

Brandyberry SD, Cochran RC, Vanzant ES and Harmon DL. 1991. Technical note: Effectiveness of diferent methods of continuos marker administration for estimating faecal output. *J. Anim. Sci.* 69:4611-4616.

Brown TD, Lemay HE, Bursten BE. 1993. Química. La ciencia central. 2a. ed. Estado de México. Prentice-Hall-Hispanoamericana. 220p

Burch HS and William PF. 1975. The Evaluating of feeds trough digestibility experiments. The University of Georgia Press Athens. USA. 423 p.

Castellanos RA, Llamas LIG, Shimada AS. 1990. Manual de técnicas de investigación en ruminología. 1ª. Ed. Consultores en producción animal. México, D.F. 267 p.

Church DC and WC Pond. 1994. Fundamentos en nutrición y alimentación de los animales. Limusa-Grupo noriega. México.

Church DC. 1993. El rumiante. Fisiología digestiva y nutrición. 1ª. Ed. Zaragoza, España. 639 p.

Cochran R, Adams J, Wallace L and Galyean M. 1986. Predicting digestibility of diferent diets with internal markers. Evaluation of four potential markers. *J. Anim. Sci.* 63:1476-1483.

Córdova FD. 1996. Efecto de la suplementación nitrógenada y un cultivo de levadura (*Sacharomyces cerevisae*) en la digestibilidad y consumo de heno de pasto insurgente (*Brachiaria brizantha*) en toretes. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.

Cornelis J, Casaer J and Henry M. 1999. Impact of season, habitatand research techniques on diet composition of roe deer: A review. *J. Zoology.* London 248:195-207.

Daniel WW. 2002. Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª.ed. Limusa Wiley. 755 p.

Dove H, Wood JT, Simpson RJ, Levry BJ, Galford KL, Siever-Kelly C and Craverella TA. 1999. Spray topping annual grass pasture with glyphosate to delay loss of feeding value during summer. III. Quantitative basis of the alkane-based procedures for estimating diet selection and herbage intake by grazing sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 50:475-485.

Dove H. and Mayes RW. 1991. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores. A review. *Aust. J. Agric. Res.* 42: 913-952.

Dove H. and Mayes RW. 1995. Using cuticular wax alkanes to estimate herbage intake in animals fed supplements. *Annales Zootechnie.* 44, 237.

Dove H. 1992. Using the n-alkanes of Plant Cuticular Wax to Estimate the Species Composition of Herbage Mixtures. *Aust. J. Agric. Res.* 43:1711-1724.

Dove H and Moore AD.1995. Using a least-squares optimisation procedure to estimate diet composition based on the alkanes of plant cuticular wax. *Aust. J. Agric. Res.*46:1535-1544.

Dove H. and Mayes RW. 1996. Plant wax components: a new approach to estimating intake and diet composition in herbivores. *J. Nutr.* 126 (1):13-26.

Dove H, Freer M and Foot JZ. 2000. The nutrition of grazing ewes during pregnancy and lactation: a comparison of alkane based and chromium/*in vitro* based estimates of herbage intake. *Aust. J. Agric. Res.* 51:765-777.

Doyle PT, Casson L, Cransberg J and Rowe J. 1994. Faecal output of grazing sheep measured by total collection or using chromium sesquioxide. *Small Ruminant Research* 13: 231-236.

Ellis WC, Lascano CE and Owens FN. 1982. Solute and particulate flow markers. In: Protein requirements for cattle: Symposium Oklahoma State University.

Fahey GC and Jung G. 1983. Lignin as a marker in digestion studies. A review. *J. Anim. Sci.* 57:220.

Fenton TW. and Fenton M. 1979. An improved procedure for the determination of chromic oxide in feed and feces. *Can. J. Anim. Sci.* 59:631-634.

Ferret A, Plaixaats J, Caja G and Prió P. 1999. Using markers to estimate apparent dry matter digestibility, faecal output and dry matter intake in dairy ewes fed Italian ryegrass hay or alfalfa hay. *Small Ruminant Research.* 33:145-152.

Fessenden RJ y Fessenden JS. 1983. Química Orgánica. Iberoamericana. 1077 p.

Grace ND and Body DR. 1981. The possible use of long chain (C19-C32) fatty acids in herbage as an indigestible faecal marker. *J. Agric. Sci. Cam.* 97: 743-5.

Hameleers A. and Mayes R W. 1998. The use of n-alkanes to estimate herbage intake and diet composition by dairy cows offered a perennial ryegrass/white clover mixture. Blackwell Science Lid. *Grass and Forage Science.* 53:164-169.

Holechek JL, Vavra M and Pieper RD. 1982. Botanical composition determination of range herbivores diets: A review. *J. Range Management.* 35, 309-315.

Huhtanen PK, Kaustell and S Joakk. 1994. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Anim. Feed Sci. Tech.* 48:211-227.

Kotb AR and Luckey TD. 1972. Markers in nutrition. *Nutrition abstracts and reviews.* 42:813-845.

Kuehl RO. 2001. Diseño de experimentos. Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones. 2ª. Ed. Thomson. 666 p.

Laredo MA, Simpson GD, Minson DJ and Orpin DG. 1991. The potential for using n-alkanes in tropical forages as a marker for the determination of dry matter intake by grazing in ruminants. *J. Agric. Sci. Cam.* 50:67-75.

Lascano CR, Borel R, Quiroz L, Zorrilla C y Chávez Y. 1990. Recomendaciones sobre metodología para la medición de consumo y digestibilidad *in vivo*. Nutrición de Rumiantes. Guía metodológica de investigación. IICA-ALPA-RISPAL. San José Costa Rica . 159-168.

Lippke HWC, Ellis J and Jacobs BF. 1986. Recovery of indigestible fiber from feces of sheep and cattle on forage diets. *J. Dairy Sci.* 69:403-408.

Malossini F, Bovolenta S, Piasentier E, Piras C and Martillotti F. 1996. Comparison of n-alkanes and chromium oxide methods for estimating herbage intake by grazing dairy cows. *Anim. feed Sci. Technol.* 61: 155-165.

Mayes RW and Lamb CS. 1984. The possible use of alkanes in herbage as indigestible faecal markers. *Proc. Nutr. Soc.* 43 39A.

Mayes RW , Lamb CS and Colgrove PM. 1986. The use of dosed and herbage n-alkane markers for the determination of herbage intake. *J. Agric. Sci. Camb.* 107:161-170.

Mayes RW, Beresford NA, Lambs CS, Barnet CL, Howard BJ, Jones BEV, Erikson O, Hove K, Pederson O and Stainess BW. 1994. Novel approaches to the estimation of intake and bioability of radiocaesium in ruminants grazing forested areas. *Sci.Total Environ.* 157:289-300.

Mayes RW and Dove H. 2000. Measurement of dietary nutrient intake in free-ranging mammalian herbivores. *Nutrition Research Reviews.* 13:107-138.

Merchen, NR. 1993. Digestión, absorción y excreción en los rumiantes. En: DC Church. *El Rumiante, fisiología digestiva y nutrición.* Tomo I. Acribia.S.A. Zaragoza, España. pp. 191-223.

Mertens DR. 1993. Kinetics of cell wall digestión and pasaje in ruminants. In: Jeinh HG, Buxton DR, Halfield RD and Rolph J. 1993. *Forage cell wall structure and digestibility.*Chapter 21. pp. 535-549.

Molina DO, Matamoros Z, Almeida C, Tedesxhi A. 2004. Evaluation of the dry matter intake predictions of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System with Holstein and dual-purpose lactating cattle in the tropics. *Anim Feed Sci and Technol.* 114:261-278.

NRC. 2001. *Nutrient Requirement for Dairy Cattle*, seventh ed. National Academy Press Washington, DC.

Newman JA, Thompson WA, Penning PD and Mayes RW. 1995. Least-squares estimation of diet composition from n-alkanes in herbage and faeces using matrix mathematics. *Aust. J. Agric. Res.* 46: 793-805.

Ortega CME. 1987. Factores que afectan la digestibilidad del alimento en rumiantes. Estudio recapitulativo. *Rev. Vet. Mex.* 18:55-60.

Owens FN and Handson CF. 1992. Symposium external and internal markers. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *J. Dairy Sci.* 75:2605-2617.

Patal S and Rappoport Z. 1992. The chemistry of alkanes and cycloalkanes. John Wiley & Sons. Baffins Lane, Chichester, West Sussex England.

Penning PD and Johnson RH. 1983. The use of internal markers to estimate herbage digestibility and intake 1. Potentially indigestible cellulose and acid insoluble ash. *J. Agric. Sci.* 100:127-132.

Penning PD and Johnson RH. 1983. The use of internal markers to estimate herbage digestibility and intake 2. Indigestible and detergent fibre. *J. Agric. Sci.* 100:133-138.

Pond KR, Ellis WC, James WD and Deswysen AG. 1985. Analysis of multiple markers in nutrition research. *J. Dairy Sci.* 68: 745-750.

Pond KR, Burns JC and Fisher DS. 1987. External Markers- Use and methodology in grazing studies. Proceeding, Grazing livestock nutrition conference. North Carolina State University and USDA, ARS. 49-43.

Reeves M, Fulkerson WJ, Kellaway RC and Dove H. 1996. A comparison of three techniques to determine the herbage intake of dairy cows grazing kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) pasture. *Austr. J. Experimental Agric.* 36: 23-30.

Robertson JB and Van Soest. 1981. The detergent system of analysis and its application to human foods . The analysis of dietary fiber. Marcell Dekker New York.

Roe MN, Sniffen O and Chase LE. 1990. Techniques for measuring protein fractions in feedstuffs, In:Proceedings of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, Rochester NY, 24-26 October, pp.81-88.

Romney DL, Sendalo DSC, Owen E, Mtenga L and Mayes RW. 1996. Effects of tethering management on feed intake and behaviour of Tanzania gotas. *Small Ruminant Res.* 19:113-120.

Smith LW. 1989. A review of the use of intrinsically ¹⁴C and rare earths-labeled neutral detergent fiber to estimate particle digestion and passage. *J. Anim.Sci.* 67,2123-2128.

Smith DG, Mayes RW and Raats JG. 2001. Effect of species, plant part, and season of harvest on n-alkane concentration in the cuticular wax of common rangeland grasses from southern Africa. *Aust. J. Agric. Res.* 52:875-882.

Schneider BH and Flatt WP. 1975. The evaluation of feeds through digestibility experiments. The universidad de Georgia Press, Athens, Georgia. 423 p.

Sunvold H and Cochran R. 1991. Technical note: Evaluation of acid detergent lignin alkaline peroxide of alfalfa, Bromegrass, and prairie hay digestibility by beef steers. *J. Anim. Sci.* 69:4951-4955.

Tejada HI.1992. Control de calidad y análisis de alimentos para animales. Ed. Patronato de apoyo a la investigación y experimentación pecuaria en México. A. C. México, D.F. 397p.

Thonney ML, Plhof BA, De Carlo MR.1985. Sources of variation of dry matter digestibility measured by the acid insoluble ash marker. *J. Dairy Sci.* 68:661.

Titgmeier EC. 1997. Desig and interpretation of nutrient digestion studies. *J. Anim. Sci.* 75:2235-2247.

Tilley JMA and Terry JH. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grassland Soc.* 18: 104-111.

Uden P, Colucci PE, Van Soest PJ. 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta rate of pasaje studies. *J. Sci. Food and Agric.* 31: 625-632.

Van Soest PJ. 1982. Nutritional Ecology of the Ruminant. Book. Inc Corvallis, Oregón . 374 p.

Van Soest PJ. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. Cornell University Press. II Ed. Pp.108-195.

Vollardt KPC and Schore NE. 1996. Química orgánica 2a. Ed. Barcelona. Ediciones Omega. 389 p.

Vulich SA, O'Riordan EG and Hanrahan JP. 1991. Use of n-alkanes for the estimation of herbage intake in sheep: accuracy and precision of the estimates. *J. Agric. Sci. Cam.* 116: 319-323.

Vulich SA, Hanrahan JP and Crowley BA. 1995. Modification of the analytical procedures for the determination of herbage and faecal n-alkanes used in the estimation of herbage intake. *J. Agric. Sci. Cam.* 124: 71-77.

Waldern DE. 1971. A rapid micro-digestion procedure for neutral and acid detergent fiber. *Can. J. Anim. Sci.* 51:67-69.

Cuadro 1. Marcadores internos para evaluar la digestibilidad y consumo de herbívoros.

Marcador	Tipo	Análisis	Recuperación	Fase de asociación	Usos adicionales
Lignina	Fracción fibrosa	ER	Variable	Sólida	kp
Lignina ácido detergente	Fracción fibrosa	ER	Variable	Sólida	
FDA indigestible	Fracción fibrosa	ER	Variable	Sólida	
FDN indigestible	Fracción fibrosa	ER	Variable	Sólida	kp
Celulosa potencialmente indigestible	Fracción fibrosa	ER	Variable	Sólida	
Cenizas insolubles en ácido	Silicatos	ER	Alta	Sólida	
Sílice	Silicatos	Varios	Alta	Sólida	
Cromógeno	Pigmento	C	Variable		
Ácidos grasos de cadena larga	Componentes de la pared celular	CG	Alta	Principalmente Sólida	
n-alcanos de cadena larga	Componentes de la pared celular	CG	Media/Alta	Principalmente Sólida	Consumo, CB, kp, kd

FDA= Fibra detergente ácido FDN= Fibra detergente neutro ER=Extracción del residuo C=Colorimetría CG=Cromatografía de gases
kd=Tasa de digestión Kp=Tasa de pasaje CB=Composición botánica

Adaptado de Kotb y Luckey, 1972; Penning y Johnson, 1983; Smith, 1989; Dove y Mayes, 1996

Cuadro 2. Recuperación de n-alcános en heces de ovinos

n-alcáno	Recuperación (%)	d.e.
C ₂₈	93	6
C ₂₉	91	5
C ₃₀	96	3
C ₃₁	93	6
C ₃₂	88	3
C ₃₃	88	5
C ₃₅	91	5
C ₃₆	86	2

d.e.=Desviación estándar

Adaptado de Vulich, et al., 1991

Cuadro 3. Concentración de n-alcenos (mg MSkg⁻¹) de diferentes especies vegetales

n-alcano	Gramíneas			Leguminosas	
	<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Lolium perenne</i>	<i>Trifolium repens</i>	<i>Trifolium pratense</i>
C ₂₇	20	105, 40	36, 19, 26,20	38, 19	30, 34
C ₂₈	2	8	5,6,7,0	7,0	11, 0
C ₂₉	38	260, 230	73,142, 163, 109	109, 75	408, 376
C ₃₀	2	11,12	9, 12, 14, 0	5, 0	5, 3
C ₃₁	58	250, 242	137, 220, 261,215	67, 66	57, 42
C ₃₂	2	4, 0	7, 9, 8, 0	1, 0	1, 0
C ₃₃	21	43, 57	99, 116, 110, 141	7, 5	11, 8
C ₃₅	0	0, 7	9, 18, 7, 12	0	0,2

Adaptado de Malossini et al., 1990; Dove y Mayes, 1996

Cuadro 4. Concentración de n-alcános (mg MS kg⁻¹) en la pared cuticular de diferentes partes de la planta, de *Lolium perenne* y *Trifolium repens*

Forraje	Parte de la planta	C ₂₅	C ₂₇	C ₂₈	C ₂₉	C ₃₀	C ₃₁	C ₃₂	C ₃₃	C ₃₅
<i>Lolium perenne</i>	Hoja	7.3	21.1	5.4	102.7	10.5	168.2	8.1	137.1	15.7
	Vaina	8.3	21.6	5.8	97.3	5.0	82.8	3.3	36.4	3.1
	Base	7.9	13.8	6.0	40.3	2.5	27.5	1.6	11.6	0.8
	Tallo	5.6	10.4	1.3	29.3	1.4	34.9	3.2	19.7	1.4
	Inflorescencia	238.0	416.9	17.7	550.5	34.7	592.2	14.0	42.8	4.6
<i>Trifolium repens</i>	Hoja	15.5	51.2	6.2	100.0	6.1	47.6	2.5	5.6	n.d
	Pecíolo	10.8	37.7	3.8	40.7	0.8	11.6	1.0	5.3	n.d
	Estolón	16.3	13.6	2.3	31.5	0.8	20.9	1.0	4.8	n.d
	Flor	91.9	165.4	35.5	601.4	64.2	751.2	30.2	64.1	n.d

nd= No detectable

Adaptado de Dove y Mayes, 1996

Cuadro 5. Marcadores utilizados para la evaluación de la producción fecal en herbívoros.

Marcador	Tipo	Análisis	Recuperación	Fase de asociación	Usos adicionales
Cr ₂ O ₃	Óxido insoluble	AA o ERF	Muy alta	Ninguna, es denso	Complemento
TiO ₂	Óxido insoluble	AA o ERF	Muy alta	Ninguna, es denso	
BaSO ₄	Sal insoluble	ERF	Muy alta	Ninguna, es denso	Radiografías
Se, Er, Eu, Yt, Yb	Tierras raras solubles	AA o ERF	Media/alta	Principalmente sólida	Kd, kp, complemento
Ru-Fenantrolina	Complejo soluble	AA o ERF	Alta	Principalmente sólida	kd, kp
Fibra cromo mordente	Fibroso	AA o ERF	Muy alta	Sólida	kp
Partículas plásticas	Polímero insoluble	Físico	Muy alta	Ninguna	kd, kp, e identificación fecal
Alcanos sintéticos	Insoluble en pared	CG	Media/alta	Principalmente sólida	Consumo, complemento, kp
CrEDTA	Complejo soluble	AA o ERF	Media/alta	Líquida	kd, kp
CoEDTA	Complejo soluble	AA o ERF	Media/alta	Líquida	kd, kp
Polietilenglicol	Polímero soluble	Turbidez	Alta	Líquida	kd, kp

AA= Absorción atómica

ERF = Espectofotometría de rayos fluorescentes

CG=Cromatografía de gases

kd=Tasa de digestión

Kp=Tasa de pasaje

Adaptado de Kotb y Luckey, 1972; Uden et al., 1980; Dove y Mayes, 1996

Cuadro 6. Composición química del forraje (pradera mixta) consumido por los ovinos, durante el experimento

Determinaciones	Adaptación		Evaluación	
	(7 d) ^{&}		(7 d) ^{&}	
	Promedio	d.e.*	promedio	d.e.*
Materia seca %	12.01	0.56	12.06	0.91
% BASE SECA				
Proteína cruda	16.58	1.27	16.83	1.86
Cenizas	11.40	1.33	10.99	0.64
Materia orgánica	88.60	1.33	89.01	0.64
Fibra detergente neutro	55.00	3.06	60.09	2.77
Fibra detergente ácido	31.38	2.94	31.33	3.35

d.e.*Desviación estándar

[&]Se realizó una determinación por cada día

Cuadro 7. Digestibilidad *in vivo* (%) de la materia seca en ovinos alimentados con forraje obtenido de una pradera mixta durante el experimento

Animal	Adaptación		Evaluación	
	(7d) ^{&}		(7d) ^{&}	
	Promedio	d.e.*	promedio	d.e.*
1	68.51	7.25	71.08	3.55
2	68.23	7.36	70.80	3.69
3	71.27	5.09	67.33	5.69
4	73.44	4.65	68.89	4.22
5	73.30	8.49	70.60	4.55
6	72.96	6.28	67.47	5.73
7	73.10	6.17	69.03	6.56
8	71.98	10.87	67.23	4.61
9	72.47	5.05	70.46	5.38
10	70.83	6.90	72.54	3.20

d.e.*Desviación estándar

[&]Se realizó una determinación por cada día

Cuadro 8. Digestibilidad *in vivo* (%) de la proteína cruda en ovinos alimentados con forraje obtenido de una pradera mixta en el experimento

Animal	Adaptación		Evaluación	
	(7d) ^{&}		(7d) ^{&}	
	promedio	d.e.**	promedio	d.e.**
1	64.59	11.19	71.37	4.88
2	67.71	9.17	71.11	1.64
3	70.42	6.73	67.95	3.88
4	72.44	6.24	68.67	5.08
5	72.64	8.52	70.70	4.46
6	72.65	7.14	66.68	4.04
7	70.98	9.91	69.05	4.20
8	70.12	12.74	67.07	3.79
9	71.45	6.34	70.22	4.15
10	69.73	9.93	72.05	4.45

d.e.*Desviación estándar

[&]Se realizó una determinación por cada día

Cuadro 9. Digestibilidad *in vivo* (%) de la materia orgánica en ovinos alimentados con forraje obtenido de una pradera mixta en el experimento

Animal	Adaptación		Evaluación	
	(7d) ^{&}		(7d) ^{&}	
	promedio	d.e.*	promedio	d.e.*
1	71.59	7.24	73.84	3.37
2	70.77	7.42	73.04	3.64
3	73.48	5.06	70.28	5.37
4	75.79	4.82	71.88	4.13
5	75.55	8.58	73.34	4.43
6	75.64	6.16	70.99	5.29
7	75.40	6.13	71.84	6.45
8	74.54	11.01	70.69	4.63
9	74.93	5.09	73.53	5.36
10	73.27	7.18	75.41	3.05

d.e.*Desviación estándar

[&]Se realizó una determinación por cada día

Cuadro 10. Digestibilidad *in vivo* (%) de la fibra detergente ácido en ovinos alimentados con forraje obtenido de una pradera mixta en el experimento

animal	Adaptación		Evaluación	
	(7d) ^{&}		(7d) ^{&}	
	promedio	d.e.*	promedio	d.e.*
1	54.42	15.13	60.75	4.91
2	56.05	11.37	58.37	7.92
3	58.26	11.71	56.94	13.93
4	62.23	13.50	62.29	7.69
5	64.11	13.38	57.92	12.90
6	65.44	16.94	55.84	9.60
7	63.00	8.73	58.16	7.67
8	62.76	21.87	58.06	16.61
9	63.59	9.44	60.29	13.18
10	58.46	15.91	63.09	4.20

d.e.*Desviación estándar

[&]Se realizó una determinación por cada día

Cuadro 11. Digestibilidad *in vivo* (%) de la fibra detergente neutro en ovinos alimentados con forraje obtenido de una pradera mixta en el experimento

Animal	Adaptación		Evaluación	
	(7d) ^{&}		(7d) ^{&}	
	promedio	d.e.*	promedio	d.e.*
1	66.16	10.88	69.87	6.46
2	67.24	6.16	70.10	5.49
3	73.13	4.86	69.63	6.08
4	72.26	7.33	71.25	5.87
5	71.64	13.36	70.54	5.28
6	72.32	10.93	67.35	6.87
7	72.46	6.50	70.46	5.68
8	71.64	11.98	70.09	7.45
9	71.58	6.91	72.51	6.59
10	68.96	10.92	73.16	4.05

d.e.*Desviación estándar

[&]Se realizó una determinación por cada día

Cuadro 12. Adaptación a la normalidad de la variable producción fecal

Variable	Sesgo	Kurtosis	Conjunta	
	P	P	Jí cuadrada	P
Original	0.001	0.006	14.88	0.0006
Normalizada	0.926	0.029	4.84	0.0887

P= Probabilidad

Cuadro 13. Análisis de varianza para la variable producción fecal por tres métodos

F	SC	G	CM	R	Sig
Método	0.474	2	0.237	18.492	4.0835E-08
Residual	2.653	207	1.28E-02		
Total	3.127	209			

F = Fuente de variación, SC = Suma de cuadrados, CM = Cuadrados medios, R = Razón de varianza
G = Grados de libertad, Sig = Significancia

Cuadro 14. Producción fecal total obtenida por tres diferentes métodos

Método	Media	*Observaciones	d.e.
Cr ₂ O ₃	0.248 ^b	70	0.049
n-alcanos	0.293 ^a	70	0.051
RTH	0.253 ^b	70	0.038
Total	0.265	210	0.05

d.e.*Desviación estándar

Cuadro 15. Adaptación a la normalidad del porcentaje de error de dos métodos alternativos para medir producción fecal, en relación al método directo

Variable	Sesgo	Kurtosis	Conjunta	
	P	P	Jí cuadrada	P
Original	0.000	0.000	47.30	0.0000
Normalizada	0.806	0.686	0.22	0.8941

P=Probabilidad

Cuadro 16. Análisis de varianza para el porcentaje de error de los dos métodos alternativos para medir producción fecal, en relación al método directo

F	SC	G	CM	R	Sig
Método	0.579	1	0.579	2.866	0.093
Residual	27.906	138	0.202		
Total	28.485	139			

F = Fuente de variación, SC = Suma de cuadrados, CM =Cuadrados medios, R= Razón de varianza
G = Grados de libertad, Sig = Significancia

Cuadro 17. Adaptación a la normalidad de la variable consumo de materia seca

Variable	Sesgo	Kurtosis	Conjunta	
	P	P	Jí cuadrada	P
Original	0.000	0.000		0.0000
Normalizada	0.991	0.000	12.42	0.0020

P=Probabilidad

Cuadro 18. Análisis de varianza para la variable consumo de materia seca

F	SC	G	CM	R	Sig
Método	2.1959	3	0.7320	16.1075	1.1837E-09
Animal	2.5955	9	0.2884	6.3462	3.7583E-08
Residual	12.1333	267	0.0454		
Total	16.9247	279			

F = Fuente de variación, SC = Suma de cuadrados, CM =Cuadrados medios, R= Razón de varianza
G = Grados de libertad, Sig = Significancia

Cuadro 19. Consumo de materia seca obtenido por tres diferentes métodos

Método	Media	*Observaciones	d.e.
Directo	0.841 ^b	70	0.095
n-alcanos	0.983 ^c	70	0.316
C ₃₁ :C ₃₂			
n-alcanos	0.841 ^b	70	0.162
C ₃₃ :C ₃₂			
Cr ₂ O ₃ /DIVMS	0.748 ^a	70	0.183
Total	0.853	280	0.221

d.e.*Desviación estándar

Cuadro 20. Adaptación a la normalidad del porcentaje de error de los métodos alternativos para medir consumo, en relación al método directo

Variable	Sesgo	Kurtosis	Conjunta	
	P	P	Jí cuadrada	P
Original	0.000	0.000	.	0.0000
Normalizada	0.880	0.710	0.16	0.9228

P=Probabilidad

Cuadro 21. Análisis de varianza para el porcentaje de error de los métodos alternativos en relación al método directo, para medir consumo de materia seca

F	SC	G	CM	R	Sig
Método	18.882	2	9.441	24.01	4.1927E-10
Residual	81.393	207	0.393		
Total	100.275	209			

F = Fuente de variación, SC = Suma de cuadrados, CM =Cuadrados medios, R= Razón de varianza

G = Grados de libertad, Sig = Significancia

Cuadro 22. Porcentaje de error de los métodos alternativos en relación al método directo en la estimación de consumo de materia seca

Método	Media	Observaciones	d.e.
n-alcano C ₃₁ :C ₃₂	29.71%	70	0.275
n-alcano C ₃₃ :C ₃₂	9.90%	70	0.122
Cr ₂ O ₃ /DIVMS	19.44%	70	0.155

d.e. = Desviación estándar

Cuadro 23. Adaptación a la normalidad del porcentaje de digestibilidad de la materia seca

Variable	Sesgo	Kurtosis	Conjunta	
	P	P	Jí cuadrada	P
Original	0.000	0.000	60.93	0.0000
Normalizada	0.762	0.065	3.49	0.1743

P=Probabilidad

Cuadro 24. Análisis de varianza para la digestibilidad de la materia seca

F	SC	G	CM	R	Sig
Método	6.804E+09	5	1.361E+09	6.37	1.0219E-05
Residual	8.840E+10	414	2.135E+08		
Total	9.520E+10	419			

F = Fuente de variación, SC = Suma de cuadrados, CM = Cuadrados medios, R = Razón de varianza

G = Grados de libertad, Sig = Significancia

Cuadro 25. Digestibilidad de la materia seca (%) por seis diferentes métodos

Método	%	Observaciones	
	Media		d.e.
<i>In vivo</i>	69.54 ^{ab}	70	5.16
<i>In vitro</i>	66.25 ^a	70	3.87
n-alcano C ₃₃ /C ₃₆	68.38 ^{ab}	70	8.90
n-alcano C ₃₁ /C ₃₆	67.12 ^{ab}	70	12.57
C ₃₁ / Cr ₂ O ₃	72.35 ^c	70	9.61
C ₃₃ / Cr ₂ O ₃	69.71 ^{bc}	70	7.05
Total	68.89	420	8.56

d.e. = Desviación estándar

Cuadro 26. Adaptación a la normalidad del porcentaje de error de los métodos alternativos para medir digestibilidad de la materia seca

Variable	Sesgo	Kurtosis	Conjunta	
	P	P	Jí cuadrada	P
Original	0.000	0.000		0.0000
Normalizada	0.850	1.000	0.04	0.9822

P=Probabilidad

Cuadro 27. Análisis de varianza para el porcentaje de error de los métodos alternativos en relación al método directo, para medir digestibilidad de la materia seca

F	SC	G	CM	R	Sig
Método	4.38	4	1.095	3.086	0.016
Residual	122.403	345	0.355		
Total	126.783	349			

F = Fuente de variación, SC = Suma de cuadrados, CM =Cuadrados medios, R= Razón de varianza

G = Grados de libertad, Sig = Significancia

Cuadro 28. Porcentaje de error en los métodos para medir digestibilidad de la materia seca

Método	%	d.e.
	Media	
<i>In vitro</i>	7.78 ^{ab}	0.04
n-alcano C ₃₃ /C ₃₆	7.17 ^a	0.08
n-alcano C ₃₁ /C ₃₆	11.67 ^{ab}	0.14
C ₃₁ / Cr ₂ O ₃	11.94 ^b	0.10
C ₃₃ / Cr ₂ O ₃	8.21 ^{ab}	0.07

d.e. = Desviación estándar

Cuadro 29 . Composición botánica de la dieta consumida por los ovinos en la etapa experimental, obtenida por separación manual

Especie	Día							Promedio (d.e).*
	1	2	3	4	5	6	7	
	% base seca							
<i>Lolium perenne</i>	58.10	56.89	65.39	71.38	47.68	66.47	64.11	61.43 (7.83)
<i>Pennisetum clandestinum</i>	17.18	8.93	11.66	9.59	7.45	12.03	11.10	11.13 (3.12)
<i>Brachiaria meziana</i>	7.41	3.97	7.59	7.05	21.13	10.77	8.16	9.44 (5.53)
<i>Trifolium repens</i>	2.55	3.24	4.87	3.58	3.07	3.24	6.60	3.88 (1.40)
<i>Trifolium pratenses</i>	0	0	0	4.31	0	0	0	0.62 (1.63)
<i>Trifolium hybridum</i>	0	3.12	0	0	2.57	0	0	0.81 (1.40)
<i>Bromus inermis</i>	0	3.28	0	0	0	0	0	0.47 (1.24)
Otras especies (no deseables)	14.76	21.07	10.5	4.08	18.10	7.49	10.03	12.29 (6.00)

d.e.= Desviación estándar

Cuadro 30 . Concentración de n-alcenos mg MS kg⁻¹ en *Lolium perenne* obtenido de una pradera mixta

Especie: <i>Lolium perenne</i>									
mg MS kg⁻¹									
Días									
n- alcano	1	2	3	4	5	6	7	promedio	d.e.*
20	0.8	0.0	12.8	10.9	12.2	10.2	17.0	9.1	6.3
21	2.7	2.8	4.5	4.8	13.5	8.6	4.1	5.8	3.9
22	8.2	8.4	20.8	13.0	36.1	25.2	8.6	17.2	10.7
23	17.2	19.2	25.4	22.7	82.1	56.4	19.8	34.7	24.9
24	25.0	29.9	40.2	31.1	128.0	89.4	30.0	53.4	39.7
25	42.9	52.1	66.5	69.3	212.1	143.7	50.0	91.0	63.3
26	39.8	48.2	67.1	51.0	226.8	152.0	45.2	90.0	71.7
27	63.4	80.4	95.4	96.7	293.6	203.6	71.2	129.2	86.4
28	46.2	56.2	77.8	58.0	258.4	180.8	52.5	104.3	82.5
29	112.8	163.9	168.2	143.9	308.9	251.6	130.9	182.9	71.1
30	49.3	55.8	71.3	56.9	217.5	149.9	49.5	92.9	65.4
31	189.0	248.8	230.8	210.7	289.3	273.4	201.8	234.8	37.5
32	38.1	39.8	53.9	45.7	161.1	118.2	35.7	70.3	49.3
33	184.4	162.5	152.3	157.4	231.6	204.9	168.0	180.2	28.9
35	95.0	79.7	62.7	81.5	127.5	120.8	101.6	95.5	23.2

d.e. =Desviación estándar

Cuadro 31. Concentración de n-alcamos mg MS kg⁻¹ en *Pennisetum clandestinum* obtenido de una pradera mixta

Especie: <i>Pennisetum clandestinum</i>									
mg MS kg ⁻¹									
Días									
n-alcano	1	2	3	4	5	6	7	promedio	d.e.*
22	21.6	6.8	6.8	6.8	6.8	0.0	0.0	7.0	7.2
23	21.3	24.5	17.2	8.7	17.4	0.0	0.0	12.7	9.9
24	53.0	31.0	37.9	20.5	70.1	0.0	0.0	30.3	26.1
25	36.3	41.9	28.2	24.8	30.9	0.0	0.0	23.2	16.7
26	28.7	31.6	21.0	20.6	24.1	0.0	0.0	18.0	12.9
27	33.3	41.9	20.2	19.5	31.1	0.0	0.0	20.9	16.2
28	11.2	14.6	4.5	2.8	9.0	0.0	0.0	6.0	5.7
29	85.9	73.5	57.0	51.0	75.5	22.4	21.2	55.2	25.6
30	36.7	38.3	31.7	29.9	36.1	0.0	0.0	24.7	17.1
31	111.7	116.7	96.9	100.5	145.8	103.5	109.4	112.1	16.3
32	0.0	16.6	14.4	0.0	0.0	0.0	0.0	4.4	7.6
33	178.2	200.0	157.3	191.3	274.4	190.9	196.8	198.4	36.5
35	90.2	130.3	79.5	118.6	191.2	154.4	144.1	129.8	38.3

Los n-alcamos que no se reportan, no fueron detectados

d.e. =Desviación estándar

Cuadro 32. Concentración de n-alcenos mg MS kg⁻¹ en *Brachiaria meziana* obtenida de una pradera mixta

Especie: <i>Brachiaria meziana</i>									
mg MS kg ⁻¹									
Días									
n-alceno	1	2	3	4	5	6	7	promedio	d.e.*
29	33.7	73.4	52.9	41.5	57.6	48.4	61.6	52.7	13.2
31	40.1	114.3	64.0	49.6	51.8	48.9	59.9	61.2	24.7

Los n-alcenos que no se reportan, no fueron detectados

d.e.=Desviación estándar

Cuadro 33 . Concentración de n-alcenos mg MS kg⁻¹ en otras especies (no deseables) obtenidas de una pradera mixta

Especie: Maleza									
mg MS kg ⁻¹									
Días									
n-alceno	1	2	3	4	5	6	7	promedio	d.e.*
22	6.8	6.9	6.8	6.8	6.8	11.9	6.8	7.6	1.9
29	55.1	132.2	50.5	83.3	76.5	38.3	48.4	69.2	32.0
31	131.7	258.4	108.6	113.5	194.9	70.4	74.3	136.0	68.1
33	65.1	91.7	0.0	56.7	66.7	0.0	0.0	40.0	38.9

Los n-alcenos que no se reportan, no fueron detectados

d.e.=Desviación estándar

Cuadro 34. Concentración de n-alcenos mg MS kg⁻¹ en diferentes especies obtenidas de una pradera mixta

mg MS kg ⁻¹				
Especie				
n-alceno	<i>Trifolium repens</i>	<i>Trifolium pratense</i>	<i>Bromus inermis</i>	<i>Trifolium hybridum</i>
22	6.8	13.8	8.7	6.2
25	0.0	0.0	6.7	0.0
26	0.0	0.0	0.0	20.6
28	0.0	0.0	0.0	31.3
29	55.5	94.2	76.8	0.0
31	116.4	217.4	152.2	93.4
33	55.0	0.0	90.0	0.0

Los n-alcenos que no se reportan, no fueron detectados

Cuadro 35 . Concentración de n-alcenos mg MS kg⁻¹ en heces de ovinos alimentados con forraje de una pradera mixta

n-alcenos	mg MS kg ⁻¹													
	Días													
	1	d.e.*	2	d.e.*	3	d.e.*	4	d.e.*	5	d.e.*	6	d.e.*	7	d.e.*
25	32.58	33.98	17.49	4.02	28.64	24.67	24.81	5.34	29.05	10.69	31.25	11.86	30.70	13.78
26	18.03	20.72	10.45	4.48	16.29	6.00	16.40	10.04	19.05	14.84	22.05	14.55	21.85	17.41
27	82.89	50.55	58.76	8.34	77.11	19.93	97.04	43.17	88.26	17.09	92.48	29.79	86.99	19.75
28	36.70	32.01	24.93	6.52	33.08	11.34	35.51	16.82	34.46	16.66	39.49	19.56	37.55	18.52
29	263.03	89.21	195.77	13.98	242.88	41.96	325.61	80.38	301.58	30.89	243.86	24.95	252.87	27.63
30	40.22	18.55	29.37	4.41	35.11	4.55	47.02	16.33	42.76	11.73	40.28	12.60	40.38	13.05
31	499.50	94.03	440.51	27.95	522.08	80.11	690.33	127.47	636.16	61.03	499.52	24.80	514.68	37.24
++32	426.20	72.88	463.41	84.65	463.24	94.45	540.99	150.36	572.47	96.03	469.32	69.46	490.84	41.80
33	367.38	23.70	385.62	30.94	410.96	67.71	468.26	70.05	479.31	29.08	414.08	36.55	413.71	30.92
35	166.39	14.90	186.79	10.74	179.56	43.15	193.11	25.17	203.88	29.82	197.49	68.56	213.87	22.10
++36	390.39	87.79	408.89	68.42	404.67	81.69	451.16	102.46	499.97	65.82	419.09	75.75	438.10	45.66

d.e.= Desviación estándar

Los n-alcenos que no se reportan, no fueron detectados

Los alcenos iluminados, son los utilizados para la evaluación de consumo, digestibilidad y producción fecal.

++ Alcenos sintéticos, utilizados como marcadores externos, dosis diaria = C₃₂: 119.28 y C₃₆: 126.8.

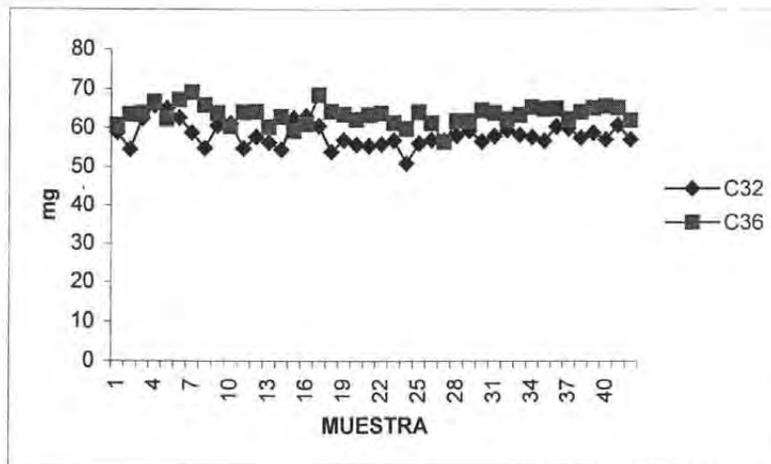


Figura 1. Concentración de n-alcenos (C_{32} y C_{36}) contenido en las muestras obtenidas de los lotes utilizados para el llenado de cápsulas utilizadas en el experimento.

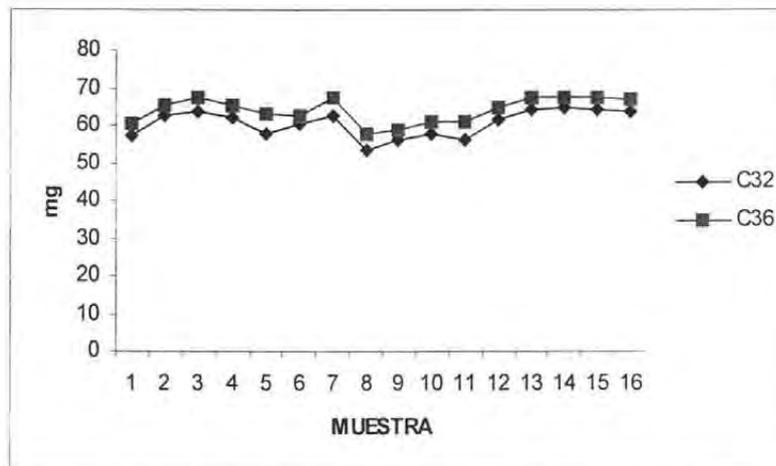


Figura 2. Concentración de n-alcenos (C_{32} y C_{36}) contenido en las cápsulas utilizadas en el experimento.

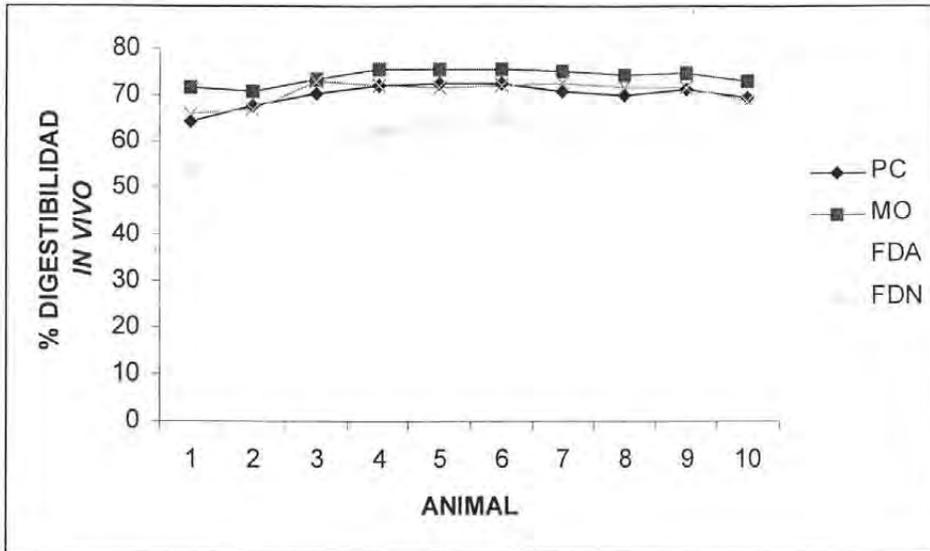


Figura 3. Digestibilidad *in vivo* (%) de los nutrientes presentes en la dieta en el período de adaptación.

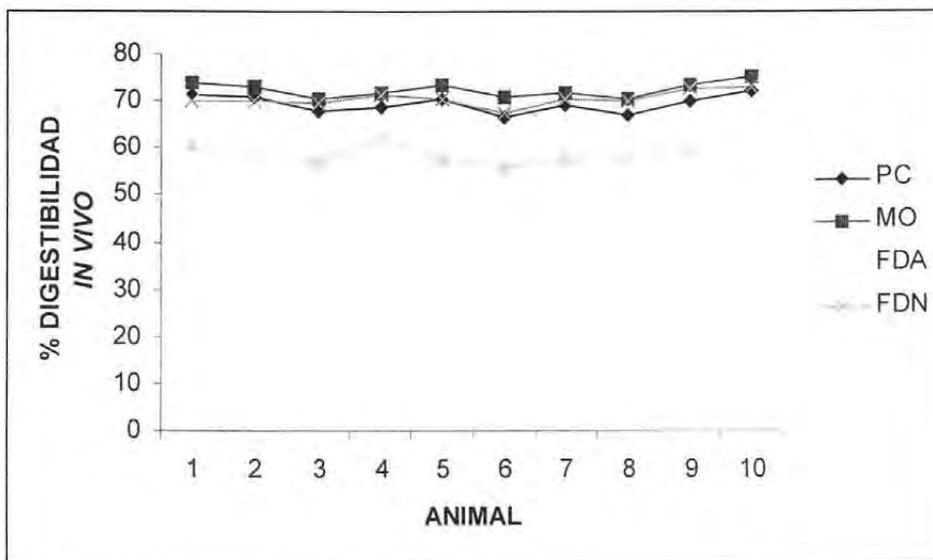


Figura 4. Digestibilidad *in vivo* (%) de los nutrientes presentes en la dieta en el período en que se realizaron las evaluaciones

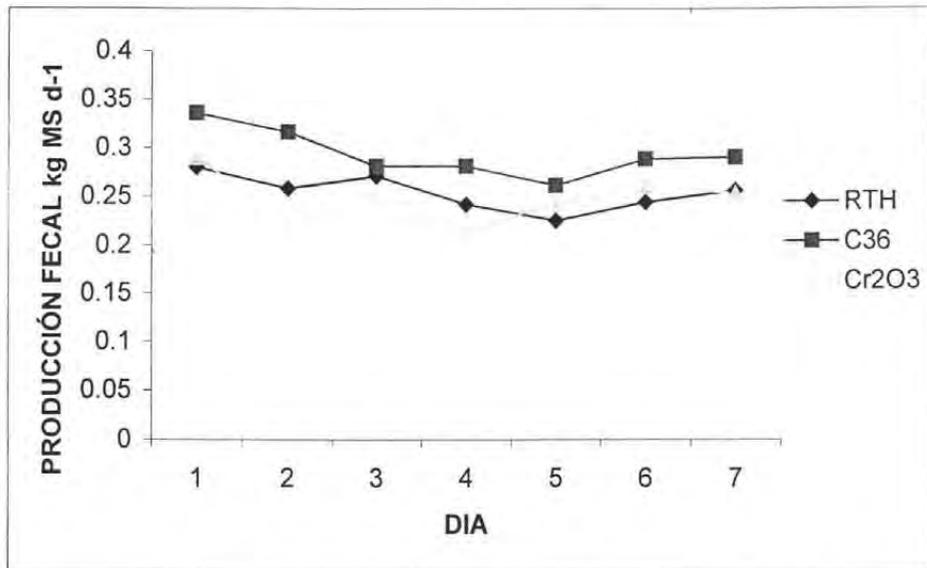


Figura 5. Producción fecal (kg MS d⁻¹) obtenida por tres diferentes métodos

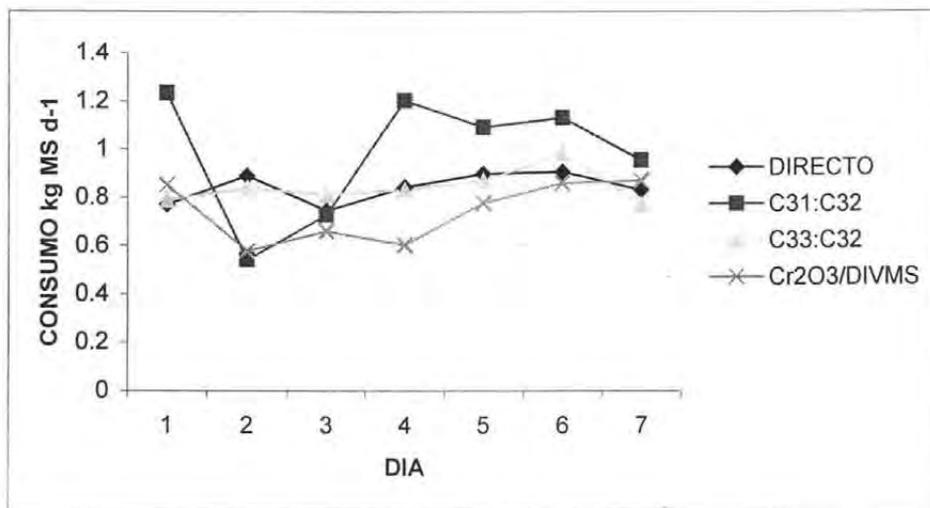


Figura 6. Consumo (kg MS d⁻¹) obtenido por cuatro diferentes métodos

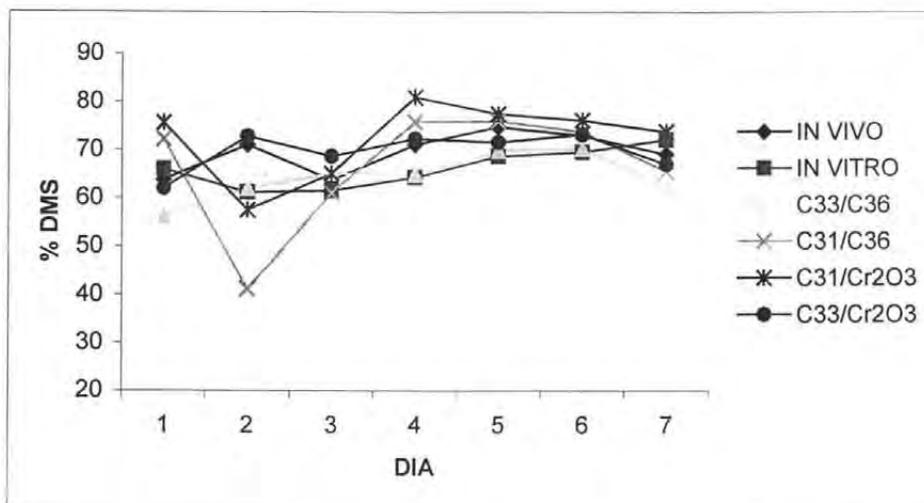


Figura 7. Digestibilidad de la materia seca (%) obtenida por seis diferentes métodos

ANEXOS

ANEXO 1

Metodología para preparar cápsulas con una mezcla de C₃₂ y C₃₆

- Preparación de 32 g de mezcla para 50 cápsulas

Material

Baño maría

Platina (Thermoline, modelo SP46925, CIMAREC2)

Termómetro de inmersión de -20 a 110°C Marca Tylor

Charola de plástico

Vasos de precipitados de 100 mL (Numerados del 1 al 2)

Vasos de precipitados de 250 mL (Numerados del 1 al 2)

C₃₂ (3.75g)

C₃₆ (3.75g)

Avicel pH 101 (15.5g)

Lactosa (2g)

Tensioactivo-Tween 20 (2g)

Aceite vegetal (5g)

Espátula cromo-níquel

Tamiz # 20

Papel manila

Balanza analítica Sartorius BL 1205

Varilla de vidrio

Bolsa de plástico

Procedimiento

1. En un vaso de precipitado de 250 mL no. 1, depositar C₃₂, C₃₆, aceite vegetal y el Tensioactivo.
2. En un vaso de precipitado de 100 mL no. 1, depositar la lactosa
3. En un vaso de precipitado de 250 mL no. 2, depositar el avicel pH101
4. Colocar el vaso de precipitado de 250mL no. 1 en una platina caliente y homogenizar con la varilla de vidrio hasta obtener una consistencia líquida

5. Introducir el vaso de precipitado de 250 mL no. 1, utilizado en el paso 4 conteniendo la solución líquida en un baño maría a 80° C
6. Agregar el avicel a la solución obtenida en el paso 5 y homogenizar con la varilla de vidrio, hasta obtener una mezcla homogénea
7. Agregar la lactosa a la mezcla homogénea obtenida en el paso 6 y homogenizar con varilla de vidrio, hasta obtener una mezcla homogénea
8. Retirar del baño maría el vaso de precipitado de 250 mL no. 1 con la mezcla final obtenida del paso 7 y dejar enfriar
9. Tamizar la mezcla obtenida en el paso 8, a través de un tamiz del # 20 y obtener el tamizado en una charola de plástico cubierta con papel manila
10. Depositar en una bolsa de plástico previamente pesada el tamizado obtenido en el paso 9
11. Obtener el peso de la bolsa con el tamizado obtenida en el paso 10

- **Llenado de cápsulas**

En cápsulas de gelatina doble cero depositar 640 mg de la mezcla de C₃₂ y C₃₆, para obtener aproximadamente 75 mg de cada alcano.

Nota: Es importante cuantificar la cantidad exacta contenida en cada g de mezcla y en cada cápsula, para posteriormente obtener mediciones más precisas

- **Técnica para cuantificar los alcanos C₃₂ y C₃₆ en 1 g de mezcla y en el contenido de las cápsulas**

Material

Aparato Soxhlet GERHARDT, PRECISION CIENTIFIC CO. Serie L7

Matraz de bola fondo plano de 250 mL con punta esmerilada 24X45

Condensador para soxhlet 24X40-34X45

Refrigerante para soxhlet 34x45

Cartucho de celulosa Whatman 25X80 mm

Heptano °(n-C₇) (J.T. Baker 99.5%)

Matraz volumétrico 100 mL

Matraz volumétrico 10 mL (Numerados del 1 al 7)

Matraz volumétrico 25 mL

Micro pipeta 50 μ L

Condiciones para cromatografía de gases

Se utilizó un cromatógrafo de gases modelo Perkin Elmer Autosystem XL

T° detector: 320 °C

T° inyector: 320 °C

T° horno: 250 °C

Rampa: Se inicia con 3 min

Incrementa 20 °C/minuto hasta llegar a 300 °C

Se mantiene por 10 minutos

Preparación de la curva estándar

1. Depositar en un matraz volumétrico de 25 mL, 25 mg de C₃₆ y 25 mg de C₃₂, aforar con heptano.
2. Depositar 10 mg del estándar interno C₃₄ en un matraz volumétrico de 10 mL y aforar con heptano.
3. Depositar 1 mL de la solución obtenida en el paso 1 y 1 mL de la solución obtenida en el paso 2 la cual contiene estándar interno (C₃₄) en el matraz volumétrico no. 1 de 10 mL y aforar con heptano.
4. Depositar 2 mL de la solución obtenida en el paso 1 y 1 mL de la solución obtenida en el paso 2 la cual contiene estándar interno (C₃₄) en el matraz volumétrico no. 2 de 10 mL y aforar con heptano.
5. Depositar 3 mL de la solución obtenida en el paso 1 y 1 mL de la solución obtenida en el paso 2 la cual contiene estándar interno (C₃₄) en el matraz volumétrico no. 3 de 10 mL y aforar con heptano.
6. Depositar 4 mL de la solución obtenida en el paso 1 y 1 mL de la solución obtenida en el paso 2 la cual contiene estándar interno (C₃₄) en el matraz volumétrico no. 4 de 10 mL y aforar con heptano.

7. Depositar 5 mL de la solución obtenida en el paso 1 y 1 mL de la solución obtenida en el paso 2 la cual contiene estándar interno (C_{34}), en el matraz volumétrico no. 5 de 10 mL y aforar con heptano.
8. Obtener con una micro pipeta $1\mu\text{L}$ de la solución obtenida en los pasos 3,4,5,6 y 7 para realizar las inyecciones necesarias en el cromatógrafo de gases para obtener la curva estándar
9. Utilizando la relación área /concentración, realizar una regresión lineal simple, para obtener la ecuación necesaria para ser utilizada posteriormente en la cuantificación de las muestras.

Procedimiento para la extracción de alcanos en muestras de mezclas o cápsulas

1. Depositar 1 g de mezcla en un cartucho de celulosa y colocarlo en el condensador.
- 1.' Abrir la cápsula de gelatina y depositar el contenido en un cartucho de celulosa, para posteriormente colocarlo en el condensador.
2. Depositar 100 mL de heptano reactivo en un matraz de bola.
3. El condensador del paso 1 o 1' y el matraz de bola, se colocan en el aparato de soxhlet para reflujo durante $2\frac{1}{2}$ horas .
4. Retirar el matraz de bola con la solución obtenida en el paso 3, para depositar la solución en un matraz volumétrico de 100 mL y aforar con heptano .
5. Tomar una alícuota de 1 mL de la solución obtenida en el paso 4 y 1 mL de la solución que contiene el estándar interno C_{34} (obtenida en el paso 2 de la preparación de la curva estándar) y colocarlo en un matraz volumétrico de 10 mL y aforar con heptano.
6. Obtener con una micro pipeta $1\mu\text{L}$ de la solución obtenida en el paso 5 para realizar las inyecciones necesarias en el cromatógrafo de gases para obtener el cromatograma.

7. Obtener la relación área/concentración y utilizar la ecuación obtenida en el paso 9 de la preparación de la curva estándar, para obtener la cuantificación de los alcanos.

ANEXO 2

Técnica para la determinación de n-alcenos por cromatografía de gases

Material

Matraz de ebullición de fondo redondo de 50 mL

Rotavapor marca BÜCHI

Probeta 25 mL

Soporte universal

Pinza de tres dedos

Condensador Leibig 309 mm

Pipeta Pasteur 9"

Bulbo de hule ámbar

Vial de vidrio de borosilicato con tapa de 1 mL

Pipeta digital con punta inyectora de 1000 μ L

Punta de pipeta de 50-1000 μ L

Heptano (n-C₇) (J.T. Baker 99.5%)

Alcohol etílico P.A.

Columna de sílica gel

Jeringa de 10 mL

Algodón

Vaso de precipitados (10 mL)

Silica gel 60-200 mallas (J.T. Baker)

Heptano (n-C₇) (J.T. Baker 99.5%)

Solución hidroalcohólica de KOH 1M

Matraz volumétrico 1L

Probeta 500 mL

Balanza granataria OHAUS explore capacidad 2 kg

KOH (Lentejas J.T.Baker)

Alcohol etílico (Q.P.)

Agua destilada

Estándares de n-alcános

n-Alcanos	Laboratorio	Pureza %
C20	Stockroom	99.0
C21	Stockroom	99.5
C22	Stockroom	99.5
C23	Stockroom	99.0
C24	Stockroom	99.0
C25	Stockroom	99.0
C26	Stockroom	99.0
C27	Aldrich Chem	99.0
C28	Stockroom	99.5
C29	Aldrich Chem	99.0
C30	Stockroom	99.4
C31	Fluka Chemic	99.5
C32	Stockroom	99.0
C33	Fluka Chemic	97.0
C34	Fluka Chemic	97.0
C35	Fluka Chemic	99.5
C36	Stockroom	99.1

Procedimiento

- **Preparación de la solución KOH 1M**

1. Se mezclan 500 mL de agua destilada y 500 mL de alcohol etílico.
2. En un matraz volumétrico de 1 L se depositan 57 g de KOH, para ser disuelta con la solución obtenida en el paso 1.
3. Cuando el KOH este completamente disuelto, se afora con la solución del paso 1.

- **Preparación del estándar interno a una concentración $3 \times 10^{-4} \text{M}$**

1. Se deposita 1.43 mg de C_{34} en un matraz volumétrico de 10 ml y se afora con heptano.

- **Preparación de la curva estándar**

1. Se deposita en un matraz volumétrico de 10 mL, la siguiente cantidad (g) de n-alcános:

n-Alcano	Peso(g)	Concentración (M)
C_{20}	0.0141	5×10^{-3}
C_{21}	0.0148	5×10^{-3}
C_{22}	0.0155	5×10^{-3}
C_{23}	0.0162	5×10^{-3}
C_{24}	0.0169	5×10^{-3}
C_{25}	0.0176	5×10^{-3}
C_{26}	0.0183	5×10^{-3}
C_{27}	0.0190	5×10^{-3}
C_{28}	0.0197	5×10^{-3}
C_{29}	0.0204	5×10^{-3}
C_{30}	0.0211	5×10^{-3}
C_{31}	0.0218	5×10^{-3}
C_{32}	0.0225	5×10^{-3}
C_{33}	0.0232	5×10^{-3}
C_{35}	0.0246	5×10^{-3}
C_{36}	0.0253	5×10^{-3}

2. Los n-alcános depositados en el matraz volumétrico del paso 1 se disuelven en 5ml de heptano y se colocan en un matraz volumétrico de 10 mL, el cual se afora con heptano, para formar la solución madre
3. De la solución madre obtenida en el paso 2, se toma respectivamente 0.025, 0.05, 0.25, 0.5, 2.5 y 4.5 mL y se colocan en matraces de 5 mL

4. A cada matraz obtenido en el paso 3 se le agrega 0.5 mL de la solución del estándar interno y se aforan con heptano.
5. Se toma 1 μ L de la solución obtenida en cada matraz en el paso 4, para ser inyectado en el cromatógrafo de gases y así obtener la curva de calibración.

- **Preparación de la columna de sílica gel**

1. Se retira el embolo de la jeringa.
2. Se deposita un pequeño pedazo de algodón en el fondo de la camisa de la jeringa, para que la sílica no salga.
3. En un vaso de precipitado de 10 mL se pesan 3 g de sílica gel y se agrega 5ml de heptano, se mezcla con movimientos oscilatorios, hasta obtener una solución homogénea.
4. La solución obtenida en el paso 4, es vertida en la camisa de la jeringa preparada en el paso 2, enjuagando el vaso con heptano, hasta que se asiente la sílica gel.
5. Se coloca un pedazo pequeño de algodón sobre la columna de sílica gel.

- **Preparación de la muestra de forraje o excretas según sea el caso**

1. Moler la muestra liofilizada con criba de 1 mm.
2. Pesar 0.5 g de muestra molida y depositarla en un matraz de fondo redondo de 50 mL (Realizar este paso por triplicado).
3. Agregar al matraz del paso 2, 1 mL de la solución que contiene estándar interno C₃₄, 5 ml de KOH 1M en solución alcohólica 50:50 y 5 mL de alcohol etílico.
4. Colocar el matraz del paso 3 a reflujo en baño maría a 90° C durante 3 ½ horas.
5. Transcurrido el tiempo retirar el matraz del reflujo y dejar enfriar.
6. Al matraz obtenido en el paso 5 se le agregan 10ml de heptano y 2ml de agua y se homogeniza.

7. Se separa la fase orgánica de la solución obtenida en el paso 6, utilizando una pipeta Pasteur, para posteriormente depositarla en un matraz de fondo redondo de 50 mL
8. Repetir 3 veces el paso 6 y 7.
9. La fase orgánica obtenida se evapora en un rotavapor hasta sequedad, para posteriormente ser resuspendido con 2 mL de heptano.
10. La solución obtenida en el paso 9, se eluye en una columna de sílica gel con 20 mL de heptano, y se colecta en un matraz de fondo redondo
11. La solución obtenida en el paso 10 se evapora a sequedad, para posteriormente ser resuspendida con 1 mL de heptano y se coloca en un vial de vidrio
12. La solución obtenida en el paso 11 es evaporada y posteriormente resuspendida con 300 μ L de heptano
13. Se toma una alícuota de 1 μ L de la solución obtenida en el paso 12 para ser analizada en el cromatógrafo de gases.

ANEXO 3

Ecuaciones completas para calcular el consumo utilizando n-alcenos

Derivación de la expresión para el cálculo de consumo de forraje utilizando la concentración de n-alcenos en el forraje y en las heces

La concentración natural de las cadenas de alcanos en el forraje (F_i) y en las heces H_i , respectivamente. Asumiendo que la recuperación en heces de los alcanos del forraje es 1.0, la indigestibilidad del forraje se da por:

$$\text{Indigestibilidad} = H_i/F_i$$

De manera similar la concentración de la dosis, en relación con la concentración de alcanos en el forraje (F_j) y heces (H_j) respectivamente, y la dosis diaria de este alcano D_j . El consumo del forraje (I), producción fecal (O) la cual se da por:

$$O = \frac{\text{Dosis} + \text{consumo de las cadenas de alcanos del forraje}}{\text{Concentración de alcanos en heces}}$$

De esta manera:

$$\text{Consumo} = \frac{\text{Concentración en heces}}{(1 - \text{Digestibilidad})} = \frac{\text{Concentración en heces}}{\text{Indigestibilidad}}$$

$$I = (D_j + I * F_j / H_j) / (H_i / F_i) = (D_j + I * F_j) / F_j * (H_i / F_i)$$

$$I * H_j / F_j = H_i * D_j + H_i * I * F_j$$

$$I * (H_j * F_i - H_i * H_j) = H_i * D_j$$

$$I = H_i * D_j / H_j * F_i H_i / F_j = H_i * D_j / H_j * (F_i - (H_i / H_j) * F_j)$$

$$I \text{ (kg MS/d)} = \frac{H_i / H_j * D_j}{F_i - (H_i / H_j) F_j}$$

I = Consumo

F_i y H_i = Concentraciones en forrajes y heces respectivamente, de C_{31}

F_j y H_j = Concentraciones en forrajes y heces respectivamente, de C_{32}

D_j = Dosis diaria de C_{32} (Dove y Mayes, 1991)

ANEXO 4

Ejemplo: Cálculo de n-alcenos consumidos y excretados de un animal en el día 1.

1) Se considero la proporción de cada especie, presente en la dieta consumida por el ovino, lo cual se obtuvo realizando la separación manual de cada especie presente en la muestra, se deshidrató y con base en la cantidad de materia seca total, se indica el porcentaje de cada especie. Los resultados de la presente investigación se muestran en el Cuadro 36.

Cuadro 36. Composición botánica de la dieta obtenida por separación manual

Especie	% BS
<i>Lolium perenne</i>	58.100
<i>Pennisetum clandestinum</i>	17.184
<i>Brachiaria meziana</i>	7.409
<i>Trifolium repens</i>	2.551
Otras especies (no deseables)	14.756

2) Se determinó la cantidad consumida de materia seca de cada especie, lo cual se calculó utilizando los kg de MS total consumidos por el animal (Cuadro 37), por el porcentaje de inclusión de la especie en la dieta. Los resultados obtenidos se señalan en el Cuadro 38

Cuadro 37. Cantidad de materia seca consumida y excretada por el animal.

	MS kg d⁻¹	
ANIMAL	CONSUMIDO	EXCRETADO
1	0.75	0.18

Cuadro 38. Cantidad de MS (Kg d⁻¹) consumida por especie

Especie	Kg MS d⁻¹
<i>Lolium perenne</i>	0.44
<i>Pennisetum clandestinum</i>	0.13
<i>Brachiaria meziana</i>	0.06
<i>Trifolium repens</i>	0.02
Otras especies (no deseables)	0.11

3) Se determinó la cantidad (g/kgMS) de n-alcano, presente en cada especie (Cuadro 39).

Cuadro 39. Concentración de n-alcanos (g/kg MS) en diferentes especies

Especie	29	30	31	33	35
	g/kg MS				
<i>Lolium perenne</i>	0.113	0.049	0.189	0.184	0.095
<i>Pennisetum clandestinum</i>	0.086	0.037	0.112	0.178	0.09
<i>Brachiaria meziana</i>	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Trifolium repens</i>	0.055	0.000	0.116	0.055	0.000
Otras especies (no deseables)	0.055	0.000	0.132	0.065	0.000

4) Se multiplicó la cantidad de n-alcanos presente en cada especie por la cantidad consumida. Los resultados en la presente investigación se indican en el Cuadro 40.

Cuadro 40. Concentración de n-alcenos (g/kg MS) consumidos de las diferentes especies

	Especie				
	LP	PC	BM	TR	OE
	g/kg MS				
29	0.049	0.011	0.002	0.001	0.006
30	0.022	0.005	0.002	0.000	0.000
31	0.083	0.014	0.002	0.002	0.015
33	0.081	0.023	0.000	0.001	0.007
35	0.042	0.012	0.000	0.000	0.000

LP= *Lolium perenne* PC=*Pennisetum clandestinum* BM=*Brachiaria meziana*
 TR= *Trifolium repens* OE=Otras especies

5) Se suma la cantidad consumida de cada n-alceno, presente en las diferentes especies, para obtener el total de n-alceno consumido. Los resultados en la presente investigación se indican en el Cuadro 41.

Cuadro 41. Concentración total de n-alcenos (g/kg MS) consumidos.

ALCANO	Total de n-alcenos consumidos g MS d ⁻¹
29	0.069
30	0.028
31	0.116
33	0.112
35	0.053

6) Se determinó la cantidad de n-alcenos en heces (Cuadro 42) y se multiplicaron esos resultados por la materia seca excretada (Cuadro 37). Los resultados en la presente investigación se indican en el Cuadro 43

Cuadro 42. Concentración de n-alcenos (g/kg MS) en heces

ALCANO	n-alcenos g/kg MS
29	0.23
30	0.48
31	0.41
33	0.38
35	0.60

Cuadro 43. Concentración total de n-alcenos (g/kg MS) excretados.

ALCANO	Total de n-alcenos excretados g/kg MS
29	0.04
30	0.09
31	0.07
33	0.07
35	0.11

7) Al comparar la cantidad de n-alcenos consumidos (Cuadro 44), con la cantidad de n-alcenos excretados (Cuadro 43). Los resultados en la presente investigación se indican en el Cuadro 44. Se puede observar que los n-alcenos consumidos (C₃₀ y C₃₅), presentaron un valor mayor en heces, que en el forraje consumido, lo cual no es posible. De esta manera al utilizar estos valores, para el cálculo de composición botánica de la dieta se obtuvieron, valores aberrantes.

Cuadro 44. Comparación de la cantidad de n-alcenos consumida y excretados

ALCANO	Total de n-alcenos consumidos	Total de n-alcenos excretados
	G MSkg d⁻¹	
29	0.07	0.04
30	0.03	0.09
31	0.11	0.07
33	0.11	0.07
35	0.05	0.11