



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

2 ef.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLAN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

ELABORACION DE DOS MARCADORES
INDIGESTIBLES: Co-EDTA Y Cr-MORDANTE PARA
LA EVALUACION DE LA CINETICA DE FLUIDOS
Y PARTICULAS EN RUMIANTES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

APOLONIO TORRES FONSECA

ASESORES: MSC. ZOILA IRMA TEJADA CASTAÑEDA
MC. JOSE ROBERTO SALCEDO MEZA
PHD ELISEO MANUEL HERNANDEZ BAUMGARTEN

CUAUTITLAN IZCALLI, MEXICO.

1998.

TESIS CON
LLA DE ORIGEN

25 8735



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 está 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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR

DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN

VERDAD NACIONAL
A/PENSA DE
MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodriguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Elaboración de dos marcadores indigestibles: Co-EDTA

y Cr Mordante para la evaluación de la cinética de fluidos
y partículas en ruminantes.

que presenta El pasante: Apolonio Torres Fonseca

con número de cuenta: 9057255-3 para obtener el TITULO de:
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI FAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 17 de Septiembre de 1997

PRESIDENTE M.V.Z. Jorge Luis Rico Pérez

Jorge Luis Rico Pérez

VOCAL M.V.Z. Jesús Guevara Vivero

SECRETARIO M. en C. Zoila Irma Tejada Castañeda

PRIMER SUPLENTE M. en C. Patricia García Rojas Montiel

SEGUNDO SUPLENTE Ing. Jesús Guevara González

Jesús Guevara González

DEDICATORIAS

Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer toda una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo constantes, solo quiero que sientan que el objetivo logrado también es suyo, y que la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue su incondicional apoyo

A mis padres

Efraín Torres D

Celia Fonseca F

A mis Hermanos

Por el apoyo absoluto y motivante que siempre me han brindado, Francisca, Rosalba y Agustín

En especial a mi hermana Fortunata por brindarme su ayuda y apoyo

A mis cuñados y cuñada, Juan Humberto, Salome Marcos y Rocio

A mis sobrinos, Geovani, Eveling, Citlalli, Angela, Edder Kanna y Efraín

Soñar es ver la vida de otro modo,

y es olvidar un poco lo que es

Un sueño es casi nada y mas que todo

más que todo es soñar lo casi nada después

OASIS BUESA

AGRADECIMIENTOS.

A la MSc Zoila Irma Tejada C.

Gracias por orientarme en la asesoría del trabajo de tesis, apoyo incondicional brindado en situaciones difíciles, y a la confianza para realizar este trabajo

Al PhD. Eliseo Hernandez B

Gracias por motivarme en el área del conocimiento, y por brindarme su amistad y confianza

Al MSc Roberto Salcedo M

Gracias por haberme brindado sus conocimientos en la asesoría del trabajo de tesis y el apoyo otorgado en la realización de esta

Se agradece al personal del laboratorio de Nutrición animal de Ajuchitlan, Queretaro por la ayuda brindada para la realización de este trabajo de tesis ya que sin ella, no sería posible finalizarlo. En especial agradezco al PhD Juan de Dios Garza Flores por su ayuda brindada durante mi estancia en las instalaciones del posgrado

También se agradece el apoyo del Patronato de apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuario en México A C Y a todas las personas y amigos que me han apoyado, en especial al personal del área de Micotoxinas, Ing Ennque Vera G y al personal del área de Microscopía Electrónica Técnico Rodolfo Robles, Ignacio Garcia y Alfredo Rivera

Un especial agradecimiento al Dr Rutilo Castellanos Molina por haberme permitido formar parte como becario en el Proyecto N° 2567Pb de CONACYT

INDICE GENERAL.

	Pags.
DEDICATORIAS	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	7
1 0 INTRODUCCION	9
2 0 REVISION BIBLIOGRAFICA	11
2 1 - Consideraciones generales	11
2 2.- Importancia de la cinética ruminal	12
2 3 - Marcadores indigestibles	13
2 4.- Antecedentes con marcadores	15
2 4 1 - Marcadores de fase líquida	16
2 4 2 - Marcadores de fase sólida	17
2 5 -Dosisificación y Determinación de los marcadores	20
2 6 - Análisis matemática e interpretación	20
2 6 1 - Marcadores sólidos	21
2 6 2 - Marcadores líquidos	23
3 0 OBJETIVO	24
4 0 UBICACION DEL PROYECTO	25
5 0 MATERIALES Y METODOS	26
5 1 - Preparación de marcadores	26
5 1 1 - Preparación del complejo Co-EDTA	26
5 1 2 - Preparación de la fibra mordante	27
5 2 - Mordantado de la Fibra	28
5 2 1 - Cálculo de los reactivos para el mordantado de la fibra	28
5 2 2 - Mordantado de la fibra	29
5 3 - Determinaciones realizadas	30

6 0 ANIMALES Y ALIMENTACION	31
7 0 DETERMINACION DE LA TASA DE PASAJE Y FLUJO RUMINAL	32
8 0 RESULTADOS	33
8 1 - Tasa de pasaje de sólidos	33
8 2 - Tasa de dilucion	37
9 0 DISCUSION	39
10 CONCLUSIONES	40
11 ANEXO	41
11 1 - Determinación de Fibra Detergente Neutro	41
12 REFERENCIAS	43

INDICE DE FIGURAS.

	Pags
Figura N° 1 Descripción gráfica del modelo matemático	20
Figura N° 2 Curva de excreción de partículas	22
Figura N° 3 Regresión establecida entre el tiempo (x) y el logaritmo natural de la concentración de un marcador de fase líquida	23

INDICE DE CUADROS.

Cuadro 1 Tiempos de muestreo y concentraciones de Cr en heces	33
Cuadro 2 Concentración del pico del marcador Cr en fibra	35
Cuadro 3 Valores para estimar la regresión lineal	36
Cuadro 4 Concentraciones del marcador Co-EDTA	37
Cuadro 5 Parámetros de flujo ruminal en la fracción líquida	38

RESUMEN

El presente trabajo fue realizado con el fin de revisar la metodología para elaborar marcadores indigestibles que reúnan las características específicas para ser empleados en la evaluación de cinética de líquidos y de sólidos, importantes en los estudios de nutrición animal particularmente en pruebas básicas de evaluación de alimentos y dietas para rumiantes.

En este tipo de evaluaciones se usan compuestos de referencia (marcadores) los cuales son dosificados en animales intactos o fistulados con canulas permanentes. Para que posteriormente sea determinada su concentración en líquido ruminal, duodenal o en heces.

Considerando que las tasas de flujo son medidas como la velocidad a la cual una sustancia en particular es reemplazada al pasar de un segmento del tracto gastrointestinal al siguiente o en las heces, es clara la utilidad de usar sustancias de referencia para evaluar las fracciones sólidas o líquidas. Con base en lo anterior, el objetivo principal de este estudio fue revisar la metodología de elaboración de dos marcadores para medir el flujo de líquidos (EDTA-Co) y de sólidos (Cr-mordantada). Asimismo, se evaluó la cinética de las fracciones de sólidos y líquidos de un bovino (*Bos taurus*) consumiendo un nivel alto de cerdaza (20 %).

En general la confección de ambos marcadores se realizó como lo describe Udén, et al. (1980). Para elaborar el marcador de sólidos se usó rastrojo de maíz, el cual tiene un contenido elevado de paredes celulares o fibra detergente neutro (FDN) y como fuente de cromo (Cr) se usó dicromato de sodio ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), ya que es necesario que durante el mordantado de la fibra se alcancen concentraciones de Cr de 12% al 14% de la FDN. El rastrojo fue lavado con un detergente y agua caliente con el objeto de purificar la fibra eliminando proteínas, almidones y otros compuestos solubles y secado a $100^\circ\text{C} / 16 \text{ h}$. Se determinó la cantidad de Cr en la fibra por espectrofotometría de absorción atómica.

Para el marcador de líquidos se utilizaron ácido etilendiaminetetracético (EDTA) y acetato de cobalto (Co) (CH_3COO) $4 \text{ H}_2\text{O}$) y se determinó la concentración de Co por medio de espectrofotometría de absorción atómica.

Los resultados obtenidos mostraron 11.86 % (118.6 mg/ml) de Cr en la fibra mordantada y 0.36 % (3.600 /lt) de Co en la solución EDTA-Co. Con estos valores se calculó la cantidad que debería infundirse en los animales de prueba.

Los marcadores se dosificaron una sola vez a través de la cánula ruminal. El marcador de fase sólida fue muestreado en las heces en los siguientes tiempos postdosificación: 6, 8, 10, 12, 16, 22, 28, 36, 48, 60 y 72 h. El marcador de solutos se muestro en el líquido ruminal en los siguientes tiempos "después de," postdosificación: 2, 4, 6, 10, 16, y 24 h. En ambos casos se tomó una muestra blanco antes de la dosificación (00 h). La determinación de las concentraciones de ambos metales, en líquido ruminal y en heces se hizo de igual manera que en los marcadores. Para la descripción de la cinética de sólidos se usó el modelo de Grovum y Williams (1973).

El flujo de sólidos en el rumen (k_1) fue de 0.094 % / h, en tanto en el ciego y colon proximal (k_2) la tasa fraccionaria de paso estimada fue de 0.196 % / h. El tiempo de tránsito (T) fue 6.74 h. De acuerdo con el consumo (2.6 % PV) k_1 fue estimado en 0.0681 % / h. Los parámetros de flujo ruminal de la fracción líquida fueron estimados de acuerdo con Galyan (1984). La tasa de dilución (TD) fue de 7.030 % / h. El volumen ruminal (VR) de 53.76 l. El tiempo de recambio (TR) fue de 14.223 h, en tanto la tasa de flujo de líquidos (TFL) fue estimada en 3.77 l / h.

1.0 -INTRODUCCION

Es evidente que la ganadería bovina en México es una actividad económica de gran importancia, ya utiliza recursos forrajeros representados por agostaderos naturales y praderas inducidas en más del 50 % del territorio nacional y está presente en todas las entidades federativas. Asimismo, la producción de carne de bovino para abastecer el mercado interno es la actividad pecuaria con mayor importancia nacional por el valor de la producción y la generación de empleo rural, además, la exportación de becerros ha sido una fuente importante generadora de divisas para el país (Rivera et al., 1997).

De acuerdo con información de la FAO (1997), durante la presente década la producción de carne en el mundo creció a un ritmo anual promedio de 3.3 %. Sin embargo, estadísticas de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR, 1997) muestran que la producción de carne de bovino registró una contracción del 5.83 % en el período de 1995 a 1996. Así, durante la década de los años noventa el inventario nacional de ganado bovino se ha venido reduciendo con una tasa media anual del 1.49 %. Sin embargo, a nivel mundial, se ha constatado que mientras la producción de carne de bovino en los países desarrollados permanece estable en aquellos en vías de desarrollo hay una tendencia al crecimiento. Ante el panorama mundial y nacional de la producción de bovinos para el abasto de carne se requiere que esta actividad productiva experimente cambios profundos para seguir siendo un negocio rentable y competitivo, capaz de aprovechar las oportunidades que ofrece el mercado externo e interno y, así poder enfrentar las amenazas implícitas en el entorno de una economía abierta y a la competencia internacional.

Es innegable, que la producción de carne de res está estrechamente ligada a la disposición y uso racional de los recursos forrajeros: granos (sorgo, maíz), subproductos de la industria azucarera (melaza), subproductos de origen animal (hanna de carne y pescado), subproductos agrícolas (pata de sorgo, rastrojo de maíz) y desperdicios pecuarios (polinaza y cerdaza), sin descartar el uso de premezclas suplementarias (minerales, vitaminas, y otros aditivos). También, es del dominio público que el progreso de ésta industria depende de la generación de avances tecnológicos y de la aplicación de conceptos novedosos y científicos de la nutrición en rumiantes.

El pasaje de sólidos y la tasa de dilución son conceptos que pueden ser de utilidad valiosa en la comprensión del ambiente ruminal que en corto plazo ayudan a la manipulación de éste en beneficio de una mayor productividad. No obstante, tradicionalmente en México los alimentos utilizados en los sistemas de producción de carne han sido estudiados por medio de técnicas diversas como la composición química, digestibilidad (in vivo, in vitro e in situ) y concentración energética. Así, como el comportamiento animal (ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia y rendimiento de la canal).

La investigación sobre la alimentación intensiva de ganado podría ser orientado hacia al estudio de la cinética de sólidos y líquidos por medio del uso de marcadores de referencia, ya que sin lugar a dudas las dietas elaboradas con base en granos, subproductos de la industria azucarera, subproductos agrícolas y desperdicios pecuarios tienen un impacto sobre el pasaje de sólidos y también un efecto ventajoso sobre la tasa de dilución y por tanto favorecen la eficiencia de producción microbiana.

El presente estudio se realizó con la finalidad de corroborar e implementar técnicas más eficaces en la elaboración de marcadores indigestibles de fase sólida (fibra mordantada) y fase líquida (Co-EDTA) aplicados en la nutrición animal.

Para tal efecto se estudió la cinética de estos marcadores en bovinos fistulados con cánulas ruminales y duodenales permanentes alimentados con dietas altas en cerdaza.

2.1 - Consideraciones generales

La digestión en el tracto gastrointestinal de los rumiantes es el resultado de un número de procesos dinámicos (Ellis et al 1982). El flujo digestivo en dichos animales está ampliamente influenciado por sus características anatómicas, al parecer, el surco reticular es la estructura que contribuye más al proceso de fermentación ruminal debido a que permite el paso de los nutrientes más digeribles al tracto bajo (Czerkawski, 1985). El mecanismo normal que hace progresar el paso de la digesta a lo largo del tracto digestivo de los mamíferos es el peristaltismo.

En los rumiantes el transporte de la digesta a través del tracto digestivo es realizado por movimientos muy diferentes al peristaltismo típico, debido a que los pliegues y paredes del retículo-rumen presentan un regular y casi constante movimiento (Balch, 1970).

La digestión en los rumiantes es caracterizada por

- a - Una extensiva hidrólisis de los alimentos a cargo de los microorganismos
- b - La hidrólisis enzimática posgástrica

Algunos microbios se adhieren cerradamente a las partículas indigestibles y tienen una tasa de flujo determinada por las partículas del material al cual se han unido. Otros microbios flotan libremente y tienen una tasa de flujo ampliamente determinada por la fase líquida. Algunas se adhieren transitoriamente y tienen una tasa de flujo intermedia entre partículas y fase líquida. Finalmente algunas se adhieren a la pared ruminal para que su tasa de flujo invariablemente sea muy baja en las partículas. En cambio, la digestión posgástrica es caracterizada por la digestión hidrolítica de los productos del metabolismo protoplasmático microbiano y productos de fermentación, así como entidades solubles de la dieta que escapan al rumen, al metabolismo y la absorción (Ellis et al 1982).

El término tasa de flujo denota la tasa a la cual una sustancia en particular es reemplazada debido al pasaje de un sitio a otro subsecuente en el tracto gastrointestinal o en las heces. La tasa de flujo es análoga a la tasa de recambio. No obstante, la terminología en los estudios con marcadores ha sido confusa, ya que en los estudios de microbiología ruminal se utiliza el término "Tasa de dilución" para los fluidos en un medio con cambios en la fermentación, en cambio los nutricionistas y fisiólogos, cuando discuten la salida de materiales (fluidos y pequeñas partículas) del rumen, a esa fracción que escapa le denominan "Tasa de pasaje" o "Tasa de recambio" (Owens y Hanson, 1992)

2.2 - Importancia de la cinética ruminal en el crecimiento bacteriano

La eficiencia del crecimiento bacteriano está directamente relacionada con la tasa de dilución de las bacterias y/o del contenido ruminal, pero debido a que las bacterias están parcialmente asociadas con los sólidos y con la pared ruminal, la tasa de crecimiento puede ser o no necesariamente paralela a la tasa de recambio de los líquidos (Owens e Isaacson, 1977, Owens y Bergen, 1983)

El incremento en la tasa de dilución propicia un aumento en la tasa de crecimiento bacteriano (Harrison, et al, 1976 Stern y Hoover, 1979) y por consecuencia el crecimiento bacteriano asciende a valores más altos (Bergen, 1979, Haspell, 1979, Evans, 1981) Esto se debe en gran parte a que la proporción de energía consumida para mantenimiento en relación a aquella destinada al crecimiento disminuye (Hobson y Wallace, 1982) Aunado a este fenómeno la utilización de nitrógeno no proteico se incrementa (Bull, et al, 1979), la proteína dietética sobrepasa el rumen en mayor proporción, se reduce el almacenamiento bacteriano intracelular de almidón, potencialmente se reduce el tiempo para la digestión de la fibra, decrece el número de protozoos, al mismo tiempo se puede presentar un cambio macromolecular de las células microbianas y existe la posibilidad de presentarse cambios en los productos finales de la fermentación (Bergen y Yokoyama 1977) La existencia de una relación positiva entre la tasa de dilución y la eficiencia puede ser posible a uno o más de los siguientes factores: Autólisis reducida de las bacterias, reducción en el consumo de bacterias por protozoos, cambio en la población microbiana, debido ya sea a cambios en la disponibilidad del sustrato o en "lavado" de organismos que crecen lentamente (Buttery, 1981)

2.3 - Marcadores indigestibles o sustancias de referencia

En general, los marcadores son compuestos de referencia usados para monitorear aspectos químicos (hidrólisis y síntesis) y físicos (flujo) de la digestión (Owens y Hanson, 1992)

Los marcadores indigestibles o de referencia se emplean en el ganado para evaluar el consumo y digestibilidad (Galvayan, 1984). También para estimar la cinética del tracto digestivo de los rumiantes (Owens y Hanson, 1992) así como para determinar el sitio y la extensión de la digestión de los alimentos. Así mismo, estos son útiles en la cuantificación de la síntesis de proteína microbiana ruminal (Stem y Hoover, 1979, Brodenck y Merchen, 1992)

Tres diferentes tipos de marcadores de flujo son necesarios para corresponder a las tres fases de interés en el rumen

- a - Flujo de partículas: Flujo de entidades indigestibles inicialmente presentes en las porciones de partículas de la dieta las cuales tienden a ser insolubles en la digesta
- b - Flujo de solutos: Flujo de solutos derivados de la dieta y metabolismo microbiano
- c - Flujo microbiano: Flujo de microorganismos en su respectiva fase, distribuidos o asociados (Ellis et al., 1982)

La extensión del potencial de hidrólisis de las entidades digestivas (Waldo, et al., 1972) en un alimento dependen de

- 1 - La tasa de digestión
- 2 - El pasaje entre los sitios de hidrólisis

La tasa de hidrólisis varía en las diferentes entidades de un alimento. No obstante, la tasa de pasaje de esas entidades tiende a ser similar puesto que los residuos de la porción indigestible son un componente de los residuos indigestibles de un alimento. Las partículas residuales indigestibles comprenden una parte de la digesta pero pueden tener una tasa de flujo diferente del alimento original. Por lo tanto los marcadores de flujo para las entidades indigestibles pueden quedar asociadas con partículas derivadas de un alimento específico con el cual el marcador originalmente fue asociado.

La asociación o unión ideal puede existir a lo largo del tracto gastrointestinal sin embargo, una unión puede ser empleada en los segmentos gastrointestinales de interés (Ellis et al., 1982) La especificación de un alimento probado con el cual el marcador fue originalmente asociado es importante la masticación durante la ingestión influye en la distribución del tamaño de partícula que entra en el rumen y consecuentemente la tasa de pasaje. Al considerar el alimento in todo, el marcador puede ser distribuido uniformemente en cada parte del alimento específico que alcanza una concentración singular del marcador en todos los tamaños de partícula (Ellis et al., 1982) Varios investigadores han descrito las características que debería tener un marcador, algunas de las cuales son las siguientes

- 1 - Debe ser inerte, sin efectos tóxicos o fisiológicos para el animal o su microbiota
- 2 - No debe ser absorbido o metabolizado por el tubo digestivo
- 3 - Debe ser físicamente similar o estar asociado con el material a marcar
- 4 - No debe ser influenciado por la secreción gastrointestinal, digestión, absorción o motilidad
- 5 - Debe tener propiedades fisicoquímicas las cuales permitan análisis cuantitativos precisos y que no interfieran con otros análisis (Kolb y Luckey, 1972, Hydén, 1970, Fairchney, 1975)

Desafortunadamente ningún marcador cumple satisfactoriamente con todos los criterios anteriormente enlistados (Ferreiro 1990) No obstante, es posible seleccionar un marcador apropiado con base en condiciones específicas experimentales que garanticen efectividad en las mediciones (Galyean, 1984), ya que los requerimientos de un marcador de flujo varían dependiendo de las características de los procesos digestivos que se van a evaluar (Ellis et al., 1982) Mientras algunos investigadores han clasificado los marcadores de acuerdo con sus propiedades funcionales (insolubles en agua, solubles en agua, no absorbibles, isótopos metabólicos y marcadores unidos a partículas) (Kolb y Luckey, 1972, Ellis et al., 1982), otros los han clasificado de acuerdo a características de eficiencia (facilidad de preparación, flujo digestivo, cinética ruminal, digestión migración de partículas y microbios biosíntesis absorción y exactitud de análisis) (Owens y Hanson 1992) estas clasificaciones han sido desarrolladas a través de la verificación de los resultados de prueba

2.4 - Antecedentes de investigación con marcadores

Según Hyden (1970), en 1887 el investigador alemán Wildt publicó los resultados de su estudio acerca de la digestión en las diferentes partes del tracto gastrointestinal de la oveja, usando sílica con el alimento como sustancia de referencia, intento seguir la marcha de la digestión con respecto a la fibra bruta, extracto libre de Nitrógeno, proteína bruta, sustancias orgánicas, materia seca, agua y vanos de los constituyentes de las cenizas (Na, K, Ca, Mg, Fe, S y Cl). Estudió también los efectos netos de la absorción y secreción en las diferentes partes del tracto digestivo y calculó el tiempo de retención de la digesta en estas secciones. En una publicación posterior (Wildt, 1879, citado por Hyden, 1970) da más datos de sus experimentos con esta técnica.

Aunque algunas de las conclusiones obtenidas por Wildt pueden considerarse anticuadas, la mayor parte de sus observaciones son todavía de gran interés y merecedoras de todo respeto, especialmente en lo que respecta a los conceptos básicos en que se fundan sus experimentos. A pesar de que la sílica, es probablemente de un valor muy restringido como marcador, Wildt fue el primero que investigó un metabolito mediante su relación con una sustancia que podría ser determinada cuantitativamente. De esta forma pudo calcular los cambios que tenían lugar en el tracto digestivo (Hyden, 1970).

El investigador sueco Edin (1918, 1926), citado por Hyden, (1970) empleó el sexquióxido de cromo como sustancia de referencia en un método cuantitativo muy perfeccionado para la determinación de la digestibilidad. En su "método del indicador" incorporaba el marcador en unas tiras de papel preparadas de un modo especial o en "macarrones" (Edin, et al, 1944, citados por Hyden, 1970), para asegurar una mezcla con alimento y para evitar una excreción desigual.

Parece ser, que fue Gray (1947), citado por Balch, (1970) el primero que usó un marcador para seguir los cambios en el volumen del líquido del rumen. Estudiando la absorción de los ácidos grasos volátiles en un rumen vaciado y lavado pudo determinar las velocidades relativas de absorción de los ácidos, comparando los cambios de concentración en relación a una cantidad constante de pectina añadida con la solución problema. No obstante, en condiciones fisiológicas, la degradación de la pectina por los microorganismos hace a esta sustancia no utilizable.

El polietilenglicol (PEG) fue introducido por Sperber, et al (1953) como un marcador líquido, más tarde también fue empleado por Hydén (1955) para valorar el recambio de la fase líquida del rumen. Este grupo de investigadores argumentaron en su momento, que debido a las características químicas del PEG (compuesto de cadena larga muy polimerizado, con peso molecular medio de 4000, sólido y soluble en agua) no se absorbe en el aparato digestivo y se distribuye satisfactoriamente en los fluidos de la digesta. No obstante, Czerkawski y Breckenbidge, (1969) demostraron que PEG (4000 PM) tiende a unirse con el material sólido de algunas dietas. Además, este se puede precipitar cuando se suministran dietas ricas en taninos (Kay, 1969). Algunos investigadores concluyeron que algo de PEG puede ser absorbido puesto que sólo recuperaron el 95 % cuando estudiaron la recuperación del marcador en la digesta y heces de conejos y borregos (Pickard y Stevens, 1972, Downes y McDonald, 1964).

En la década de los sesenta el Cr-EDTA fue propuesto como un marcador líquido por Downes y McDonald (1964) sin embargo más tarde Goodal y Kay (1973) demostraron que este ocupa una gran parte de los fluidos ruminales aun mas que el PEG. También se conoce que la absorción del Cr-EDTA es semejante a la del PEG (Downes y McDonald, 1964). Dobson, et al (1976) encontraron que la absorción del Cr-EDTA fue afectada por la presión osmótica del rumen y por consecuencia fue sobreestimado (10%, aproximadamente) el flujo de entrada y salida del agua en el rumen.

Si la absorción involucra el cambio del anión del ion monovalente Cr-EDTA en el rumen, el error puede ser disminuido a través de la dilución con Cr-EDTA en frío Udén, et al. (1980) encontraron comparable el Co-EDTA con el Cr-EDTA, ya que la excreción uniana fue de 2% y 3% respectivamente en la mayoría de los animales excepto en conejos en los que se encontró (30% del marcador en orina) La recuperación in vivo del Co-EDTA fue de 0.07 a 8 g de Co como Co-EDTA $\cdot 3H_2O$ lo que equivale al 90 % del total, después de 82 horas de haber sido administrado

2.4.2 - Marcadores de fase sólida.

Algunos marcadores sólidos, sales de Bismuto, $BaSO_4$, y Cr_2O_3 pueden ser excluidos como buenos marcadores de pasaje puesto que sus propiedades físicas tienen poca correspondencia con la fracción sólida de la digesta. Esto también es verdad para algunos otros marcadores tales como

*Nueces de Brasil en polvo

*Carbon de madera

*Piezas de goma

*Esferas de cristal

*Hebras de algodón

*Semillas

*Balones

*Piezas de plástico

las cuales han sido usadas en el pasado (Kotb y Luckey, 1972) Por algún tiempo, la información producida de esos marcadores en relación al pasaje no fue confiable debido a que la estimación de tasas absolutas requiere de varios modelos de estudio

Según Builen et al (1953) el pasaje de bacterias libres en el rumen de borregos fue exitosamente monitoreado cuando usaron aluminio con un trazador de Indio¹⁹² dando una gravitación similar para las bacterias. No obstante, a las conclusiones estos investigadores asumieron que esto es improbable ya que las bacterias pueden ser unidas a las partículas del material con un consecuente pasaje disminuido (Udén et al., 1980). Desde 1920, se han usado tintes que "manchan" el alimento (Kotb y Luckey, 1972). Las mediciones cuantificadas con tintes no han sido tan exitosas, excepto en el caso de violeta de antraquinona. No obstante, más tarde estos tintes fueron reportados como sustancias apreciablemente absorbidas en el tracto gastrointestinal (Kotb y Luckey, 1972). Según Balch (1950) la técnica de tinción y conteo de partículas en las heces es cuestionable ya que, el cálculo del tiempo de retención medio depende del tamaño de malla del tamiz usado para lavar las heces después del conteo (Ellis y Huston, 1967). La desintegración de las partículas a través de la digestión y el proceso de rumia incrementan las porciones finas, las cuales no pueden ser recuperadas y contadas (Ellis y Huston, 1967).

La absorción de concentraciones bajas principalmente las tierras raras, por las partículas de alimento, ha sido la razón que estas sean usadas como marcadores (Marcus y Lengeman, 1962, Luckey, et al, 1975). La absorción ocurre a una concentración aproximadamente igual a la solubilidad molar correspondiente al hidróxido (10^{-7} - 10^{-8}) (Huston y Ellis, 1968) y es posible debido al cambio catiónico. El comportamiento radicaloidal ocurre a concentraciones bajas ambas del límite de solubilidad (Ellis, 1968).

El complejo Ce^{+2} -Pr⁺³ tiene preferencia por las partículas pequeñas en cultivos ruminales, indicando absorción de microorganismos y una migración de fracciones pequeñísimas, así como partículas que fueron digeridas (Huston y Ellis, 1968).

Los átomos de metales son fácilmente identificados y cuantificados como compuestos orgánicos. Sin embargo la preparación de complejos metálicos con fibra de plantas puede ser ventajoso, ya que proporciona una unión que puede resistir a las condiciones del tracto digestivo (Udén et al., 1980). Los elementos que pueden tener propiedades adecuadas incluyen los trivalentes y tetravalentes los cuales forman fuertes ligaduras con los componentes de las paredes celulares.

Sin embargo, la mayoría de estos elementos en cuestión tienen hidróxidos los cuales son insolubles a pH ruminal y no pueden ser fácilmente descubiertos si el elemento es movido como complejo del alimento o separado como hidróxido insoluble. Los átomos del metal mordantado pueden ser recuperados en la matriz de la fibra a la cual fue ligado. Dos elementos de interés son el Cr^{III} y Ce^{IV} los cuales forman complejos con ingredientes alimenticios (Matz, Van Soest, Vogt y Hildebrand, 1974, Citado por Udén et al., 1980). Cuando el Cr , Ce y Au -mordante en las paredes celulares de plantas fue incubado por 48 horas *in vitro* y también tratadas con detergente neutro (Goenig y Van Soest, 1970, citado por Udén et al., 1980)), la recuperación para Cr fue 10-67%, para Au 18-55% y para Cr 66-103%. La recuperación más baja de Cr fue asociada con un coeficiente de digestibilidad *in vitro* de las paredes celulares y una baja concentración de Cr en la fibra.

Udén et al. (1980) describieron la síntesis y los métodos para el análisis de dos marcadores de fase sólida Cr y Ce -mordante en las paredes de las células de plantas. Para estos marcadores se probó la estabilidad del complejo paredes celulares Cr y Ce con EDTA, ácido clorhídrico y microorganismos ruminales. Las paredes celulares fueron transformadas en indigestibles por el mordantado. En el caso del Cr , el marcador fue recuperado en un 98 % en la fibra después de una secuencia de simulaciones de digestión *in vitro*.

En cambio el Ce -mordante en paredes celulares fue digerido *in vitro* al 35 % usando un cultivo ruminal. El tratamiento con EDTA removió todo el Ce y 15 % de Cr . El ácido clorhídrico 0.01 M tuvo un efecto insignificante en la retención del Cr en las paredes celulares, sin embargo al 0.1 M removió 10% del marcador en promedio. La recuperación *in vivo* de Cr -mordante fue de 0.6 a 5 g lo que equivale al 90 % de la fibra administrada 10 días antes.

La serie de experimentos realizados por Udén et al (1980) demostraron que tanto Cr -Mordante como Co -EDTA son factibles de ser usados en forma simultánea cuando se plantea evaluar la cinética de partículas y de líquidos (Hart y Polan, 1984).

Todos los marcadores tienen la posibilidad de utilizar dos tipos de dosificación y muestreo, el marcador puede ser suministrado en una sola dosis (*pulse-dosing*) o también puede ser dosificado constantemente por un período de varios días, para alcanzar un estado estable (*steady state*), subsecuentemente el muestreo de la digesta es obtenido en sitios específicos a tiempos sucesivos. Alternativamente los animales pueden ser sacrificados para poder recuperar la concentración del marcador en varias secciones del tracto gastrointestinal (TGI) (Holleman et al., 1989). El sacrificio es rara vez usado y sólo se utiliza cuando se quiere verificar con precisión el marcador (Ørskov et al., 1988). La dosificación única típicamente es usada para estimar volumen digestivo y el tiempo de retención en sitios específicos del TGI. La dosificación continua es primeramente una medición instantánea de el flujo en un punto específico del TGI, por ejemplo flujo abomasal o duodenal y producción fecal. Aunque, la dosificación del marcador es baja cuando se opta por dosificar una sola vez la precisión es grande. La dosificación del marcador se puede realizar utilizando animales intactos o fistulados en diferentes porciones del tracto digestivo.

Existen diferentes procedimientos para la determinación de la concentración del elemento marcador en muestras de contenido ruminal, duodenal o heces (Ferreiro, 1990, Galyean, 1984). En general las técnicas para determinar los marcadores de fase sólida (Cr ó Yb) consisten de tres etapas. En la primera, se toma la muestra de referencia libre del marcador (tiempo 00 de muestreo) y otras muestras de heces tomadas directamente del TGI en tiempos sucesivos. La segunda, es la preparación de la muestra para determinar la concentración del elemento de referencia. La tercera etapa, consiste en determinar propiamente el marcador por medio de espectrofotometría de absorción atómica.

El Co se puede dosificar en capsulas gelatinizadas por via oral en animales intactos o directamente a través de la fistula ruminal ó en forma líquida. Antes de inficionar el marcador se requiere como en la fase sólida tomar una muestra blanco libre del elemento de referencia (tiempo 00 de muestreo) y posteriormente iniciar muestreos a tiempos sucesivos, directamente del rumen. Las muestras ruminales deben de someterse a filtracion y centrifugación (2 500 PPM/ 10 minutos) con la finalidad de eliminar las particulas suspendidas. La determinación del marcador se efectúa, por medio de espectrofotometria de absorción atómica.

2.6 - Análisis matemático e interpretación

La mayoría de los modelos de cinética consideran al rumen como una entidad homogénea y no como un conjunto de entidades que interactúan como fluidos libres, fluidos embebidos por partículas, partículas densas-pequeñas, partículas densas-grandes, partículas pequeñas flotantes y partículas largas flotantes. Grovum y Williams (1973), sugirieron cuando analizaron las curvas de excreción fecal de Cr en borregos que el reservorio con el tiempo de retención más largo (k_1) era el rumen y que el otro reservorio (k_2) era el ciego mas colon proximal (figura 1)



Figura 1 Descripción grafica del modelo matemático para la interpretación de la tasa de pasaje de partículas sólidas de Grovum y Williams (1973)

La tasa de pasaje se puede analizar a través de un sistema de los dos compartimentos con tiempos independientes usando la técnica de "Curve Peeling" (Shiple y Clark, 1972, citado por Ferreiro, 1990) o el modelo matemático de Grovum y Williams (1973)

$$Y = A e^{-k_1(t-TT)} - A e^{-k_2(t-TT)} \quad t > TT$$

Donde

Y = Concentración del marcador (ln)

K1 = Pasaje a través del rumen

K2 = Pasaje a través del ciego y el colon proximal

TT = Tiempo de tránsito

Ae = Ajuste de la concentración del marcador en la matena seca de las heces

Un gran número de observaciones permite la definición de una nueva curva de excreción de partículas marcadas en una escala semilogarítmica en un análisis de dos compartimientos tiempo independiente (figuras 1 y 2). Utilizando la técnica de "Curve Peeling", se asume que la parte descendente de esta regresión lineal calculada contra el tiempo, expresa la tasa constante más lenta (K1). Esta regresión debe extrapolarse en dirección del eje de las Y's

Los valores obtenidos en las extrapolaciones expresados en antilogaritmos, deben ser restados a los resultados obtenidos en la curva de excreción expresados también como antilogaritmos. Esta nueva serie de valores residuales sirven para calcular una regresión lineal residual contra el tiempo

La pendiente de esta segunda regresión expresa la tasa constante más rápida (K2). A la primera aparición de las partículas marcadas y es TT, el cual corresponde al punto en donde las dos líneas de regresión se interceptan (Grovum y Williams 1973)

El tiempo de tránsito representa el mínimo tiempo necesario para que una partícula pase a través del tubo digestivo hasta el punto de muestreo, sin entrar en ningún compartimento. El tiempo medio total de retención se calcula como

$$TT = \ln A_2 - \ln A_1 / k_1 - k_2$$

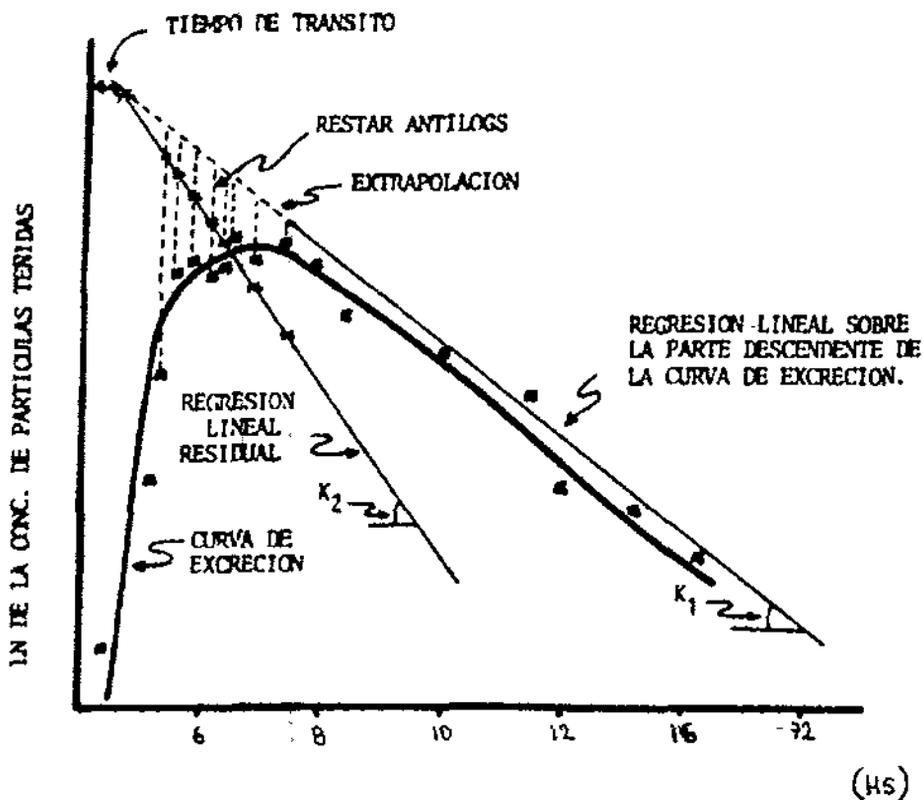


Figura 2 Curva de excrecion de partículas marcadas de acuerdo al modelo de Grovum y Williams (1973)

Para calcular la tasa de pasaje de la fracción líquida se gráficará el logaritmo natural de la concentración del marcador en el líquido ruminal (Eje Y), contra el tiempo en horas (Eje X). Se realiza una regresión lineal con estos dos juegos de datos (concentración del marcador y tiempo) y se extrapola al tiempo cero (figura 3). La relación de la infusión (ml ó g) sobre la concentración (g/l) al tiempo cero, da una estimación del volumen del rumen (l) (Galyan, 1984, Ferreiro, 1990)

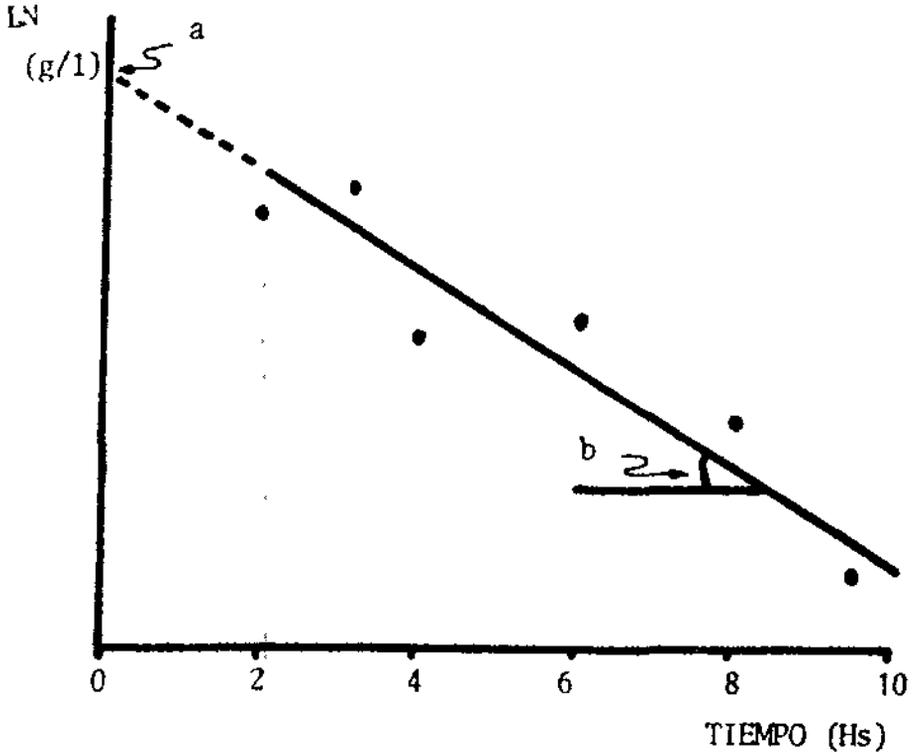


Figura 3 Regresión establecida entre el tiempo (x) y el logaritmo natural de la concentración de un marcador de fase líquida

3.0.- OBJETIVO

Elaboración y análisis de marcadores para el estudio de la cinética ruminal de partículas, con fibra mordantada con Cromo y de fluidos con Co-EDTA

4.0.- UBICACION DEL PROYECTO.

La preparación de los marcadores se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones disciplinadas en Microbiología, ubicado en el km 15.5 de la carretera libre México-Toluca. La aplicación de los marcadores se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinadas en Fisiología y Mejoramiento Animal del INIFAP- SAGAR localizado en el km 1 de la carretera a Colón, Municipio de Colón estado de Querétaro.

5.0.- MATERIALES Y METODOS

5.1 -Preparacion de marcadores

5.1.1 - Preparacion del complejo Co-EDTA para el estudio de la cinética de fluidos (Udén, et al , 1978, 1980, Galyan, 1984)

a - Se pesaron en una balanza granatana los siguientes reactivos

* 100 g de acetato de Cobalto $4H_2O$ ($Co(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$)

* 116.8 g de ácido etilendiaminetetracético (EDTA)

* 12 g de NaOH

b - Despues de pesar los reactivos se vertieron éstos dentro de un vaso de precipitado con una capacidad de

4 l. Posteriormente se adicionaron 800 ml de agua (H_2O) y se procedió a disolver con la ayuda de un agitador mecánico

c - Se adicionaron 100 ml de una solución al 30 % de peróxido de hidrogeno, el recipiente con la solución permaneció durante toda la noche a temperatura ambiente

d - Al siguiente día se agregaron 1200 ml de una solución de etanol al 95 % y se almacenó bajo refrigeración hasta el siguiente día

e - Se filtró la solución a través de un papel Whatman de filtración rápida (Nº 4) y posteriormente se lavó con 4 l de una solución de etanol al 80%

Las concentraciones de Co se determinó en un espectrofotómetro de absorcion atomica a una longitud de 357.9 nm con un ancho de ventana de 0.2 nm con flama de acetileno, corrector de interferencia de fondo y equipado con una lampara de cátodo hueco de Co

5.1.2 - Preparación de fibra de rastrojo de maíz mordantada con Cromo para el estudio de la cinética de partículas en el rumen (Uden et al, 1980)

Para la elaboración de este tipo de marcador, primero se tiene que determinar el contenido de la materia seca (MS) y de fibra detergente neutro (FDN) para posteriormente calcular la cantidad a inficionar a través de la fistula ruminal, estos métodos se realizan de acuerdo a lo propuesto por (Van Soest y Wine, 1967) Para mordantar la fibra, es conveniente usar una fuente de fibra con alto contenido de paredes celulares (FDN) En este caso se utilizó como fuente de fibra rastrojo de maíz (RM)

Es importante eliminar de la fuente de fibra (tanto como sea posible) los compuestos solubles ya que estos pueden reducir marcadamente el mordantado de la FDN con el Cr (Santiago, et al, 1990)

Pasos para la preparación de la fibra

a - Se pesó 1 Kg de rastrojo de maíz (RM)

b - El RM fue picado en un molino de martillos equipado con una cmba de aproximadamente 3/8 "

c - El RM fue depositado en un recipiente metálico de 30 l, y se adicionaron alrededor de 16 l de agua a una temperatura promedio de 56 °C, a continuación, se colocaron porciones de 100 a 150g del RM sobre un tamiz (malla N° 20), y se lavaron con agua caliente a 56 °C a presión durante de 40 seg /porción de fibra aproximadamente

d - Se pesaron dos lotes de muestra de 60 g de un detergente doméstico en una balanza granataria las que se diluyeron con agua caliente a 56 °C en el recipiente metálico de 30 l adicionando a continuación la paja (lavada) para eliminar los compuestos solubles agitando en una mezcladora HOBART durante los siguientes tiempos de agitación por muestra. 10, 15, 20 y 30 Min Posteriormente, se colocaron porciones de 100 a 150 g sobre el tamiz malla N° 20, y se lavaron nuevamente con agua caliente a 56 °C a presión hasta la eliminación del detergente Este procedimiento se realizó dos veces más

e - La fibra mordantada y lavada se exprimió manualmente y se colocó en charolas metálicas de 80 cm x 100 cm dispuestas en un ángulo de inclinación de 40° durante 30 min. para facilitar el escurrimiento del agua Una vez que se escurrió se colocó en una estufa de aire forzado (BLUE MATIC-60) a una temperatura constante de 100 °C/16 horas.

f - Una vez que el material fue deshidratado se tomaron tres muestras con la finalidad de determinar FDN en base seca. Para tal efecto las muestras fueron tomadas al azar y se prepararon para su análisis en un micromolino Wiley acondicionado con una criba de 1 mm de diámetro. La MS del RM fue determinada usando el método que propone (Tejada 1992)

5.2 - Mordantado de la fibra.

5.2.1 - Cálculo de los reactivos para el mordantado de la fibra

a - El Cr empleado en el proceso de mordantado se calcula con base al dicromato de sodio ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Peso molecular	298
Peso del Cr en molécula	104
Proporción de Cr en la molécula ($104 \times 100/298$).....	35 %

b - Contenido porcentual de la fracción fibrosa, del Cr y ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)

* Contenido de MS en el RM	90	BS
* Contenido de FDN en MS (paja purificada y lavada)	90	BS
* Contenido de Cr en la fibra mordante	13	BS
* Contenido de ácido ascórbico en fibra	50	BS

c - Cálculo del contenido de FDN/kg de RM (BS)

$$(\% \text{ FDN}) (\% \text{ MS}) / 1000 \text{ g} = (0.90) (0.99) \times 1000 = 891 \text{ g}$$

d - Cálculo del Dicromato de sodio por 100 g de FDN

$$(\% \text{ Cr en FDN}) (\% \text{ de Cr en la molécula del dicromato}) \times 100$$

$$(0.13)(35) \times 100 = 37 \text{ g}$$

e - Dicromato de sodio x kg de RM (BS)

$$(\text{Contenido FDN/KG, RM})(\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \text{ kg}) \times \text{kg, RM}$$

$$(0.891) (0.37) \times 1 \text{ kg} = 0.329 \text{ kg}$$

f - Ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) por kg de RM (BS)

$$(\text{Contenido de FDN/kg RM})(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6) \times \text{kg, RM}$$

$$(0.891)(0.5) \times 1 \text{ kg} = 0.445 \text{ kg}$$

5.2.2 - Mordantado de la fibra

a - Después de realizar los cálculos de los reactivos empleados en el mordantado se hace necesario medir el volumen de la fibra con la finalidad de poder calcular la cantidad de H₂O destilada (4 l de H₂O = 1 Kg de RM) que se requiere para hornear la fuente de fibra con el dicromato de sodio. En este paso se recomienda contar con suficiente H₂O destilada ya que para un kg de RM previamente lavado y desecado (99 % MS) se requieren 64 l, considerando que la relación volumen de agua / paja es de aproximadamente 16 l de agua por kg de paja.

b - Se disucleron 329 g de dicromato de sodio para un kg paja (99 % MS) en 4 l de H₂O en un vaso de precipitado la dilución se realizó con agitación manual por medio de una varilla de vidrio, la solución se tornó de un color de amarillo a naranja.

c - A un recipiente de reacción que contenía 60 l de H₂O destilada en ebullición se agregó la solución de dicromato de sodio (4 l) y la fibra purificada se cubrió con su tapa para parantizar una temperatura constante. El tiempo de calentamiento fue de 9 horas y se necesitaron alrededor de 67l más de H₂O destilada, la cual fue adicionada a intervalos de 8.4 hora. Para la adición de esta, primero fue vertida en la superficie de la tapa del recipiente, con objeto de que se arrastrará el material que se había adiendo a las paredes.

d - Una vez concluido el mordantado se lavó la fibra, colocándose en porciones de 100 a 150 g sobre un tamiz malla N° 20 para lavarse con agua a temperatura ambiente hasta la eliminación de residuos de dicromato y la desaparición del color naranja.

e.- Se disucleron 445 g de ácido ascórbico por kg paja (99 % MS) en 4 l de H₂O en un vaso de precipitado agitando con una varilla de vidrio. Posteriormente, se vertió la solución a un recipiente de plástico que contenía 16 l de agua, y se adicionó la paja purificada donde permaneció por dos horas.

f - La fibra mordantada se exprimió manualmente y fue colocada en charolas metálicas de 80 cm x 100 cm dispuestas en un ángulo de inclinación de 40 ° durante 30 min para facilitar el escurrimiento del agua. Para secarse finalmente en una estufa de aire forzado (BLUE MATIC-60) a una temperatura constante de 100 C/16 horas.

5.3 -Determinaciones realizadas

5.3.1 - Determinación de la concentración de cromo

a - Una vez que la fibra mordantada con Cr fue deshidratada, se procedió a moler el lote completo en un micromolino Wiley con una criba de 1 mm de diámetro. Posteriormente se tamizó en una malla del N° 20.

b - Se tomaron tres muestras de la fibra mordantada con cromo para determinar MS. Para tal efecto las muestras fueron tomadas al azar. La MS del RM fue determinada usando el método que propone Tejada (1992).

c - El lote de fibra mordantada se homogeneizó utilizando un molino de bolas (NORTON) por 30 min. Después se tomó una muestra representativa del lote utilizando el método de cuarteo, la que a su vez fue dividida en tres submuestras.

d - La digestión de la fibra mordante se realizó de la siguiente manera, se pesaron 2.5 g de muestra y se depositaron en un matraz Erlenmeyer de 200 ml, seguido se fueron agregando 10 ml de ácido más 20 ml de ácido clorhídrico. Se reposo durante 20 minutos y, en una platina la muestra más el pool de ácidos se calentó a 70°C durante 30 minutos. Posteriormente se reposo la alícuota durante un minuto, y en seguida se adicionó 10 ml ácido clorhídrico y se calentó durante 50 minutos a 100 °C. Se dejaron enfriar las muestras aproximadamente durante 50 minutos para ser posteriormente filtradas utilizando papel Whatman N° 1 y aforar a 200 ml.

Las concentraciones de Cr se determinaron en un espectrofotómetro de absorción atómica a una longitud de 357.9 nm con un ancho de ventana de 0.2 nm, con flama de acetileno, corrector de interferencia de fondo y equipado con una lámpara de cátodo hueco de Cr.

6.0.- ANIMALES Y ALIMENTACION

Un novillo de la raza Holstein y de aproximadamente 14 meses de edad con un peso vivo de 273 kg y equipado con canula ruminal fija y duodenal tipo "T". Se alimentó con una dieta elaborada con base en 20 % de cerdaza, 30 % de melaza, 20 % de grano de sorgo y 30 % de pata de sorgo.

Los análisis químicos (MS, ceniza y PC) de la dieta experimental fueron realizados de acuerdo a lo sugerido por Tejada, 1992. La materia orgánica fue determinada por incineración de la muestra en una mufla a 600 °C por cuatro horas. La concentración de energía metabolizable fue estimada del valor de la digestibilidad de la materia orgánica en base seca. La FDN y FDA fue determinada de acuerdo al método descrito por Tejada, 1992. El valor de Hemicelulosa se obtuvo de la diferencia entre FDA y FDN.

A la dieta experimental se le determinó la siguiente composición química: 90.87 % de MS, 11.35 % de PC, 10.59 % de Cenizas, 80.2 % de MO, 17.42 de FDA, 28.72 de FDN, 11.29 de Hemicelulosa y una concentración energética de 2.47 Mcal/kg de MS.

Los ingredientes de la dieta experimental fueron procesados y obtenidos de la siguiente manera: la cerdaza provenía de la granja porcícola ubicada en el CENIFMA de los animales en la etapa de crecimiento consumiendo la misma dieta. Las heces fueron sometidas a desecación solar antes de ser molidas y mezcladas con el resto de los ingredientes de la dieta. El sorgo se ofreció molido, en tanto la pata de sorgo fue picada en un molino de martillos utilizando una criba de 0.5" para la mitad de la paja y 5/8" para el resto de la pata de sorgo. También se ofreció melaza de caña de azúcar. El sorgo, la pata y la melaza provenían de un mismo lote y la dieta se ofreció como una dieta integral. Los animales fueron alimentados durante el período de adaptación a la dieta (7 días) y muestreo (3 días) se ajustó el consumo al 2.6 % de su peso vivo en base seca. El agua estuvo disponible todo el tiempo. La rutina de alimentación se inició a la misma hora (08:00) durante ambos períodos.

7.0.- DETERMINACIÓN DE LA TASA DE PASAJE Y FLUJO RUMINAL

Para la determinación de la fracción sólida se usó la propuesta de Grovum y Williams (1973). Para tal efecto, se tomaron muestras de heces directamente del recto durante 3 días. Los tiempos de muestreo pos-dosificación fueron los siguientes: 6, 8, 10, 12, 16, 22, 28, 36, 48, 60 y 72 h. Al inicio del período experimental se tomó una muestra blanco (tiempo 00) como referencia.

La descripción de la cinética de sólidos se cuantificó por el flujo de sólidos en el rumen (k_1) y en el ciego y colon proximal (k_2) así como el tiempo de tránsito (TT).

Para la determinación de fracción líquida se usaron los siguientes tiempos de muestreo pos-dosificación: 00, 02, 04, 06, 10, 16 y 24 h. Al inicio del período experimental se tomó una muestra blanco (tiempo 00) como referencia.

Los parámetros de flujo ruminal de la fracción líquida fueron estimados de acuerdo con Galyan (1984) en términos de tasa de dilución (TD), volumen ruminal (VR), tiempo de recambio (TR) y tasa de flujo de líquidos (TFL).

8.0.- RESULTADOS

Los analisis del marcador EDTA-Co muestran que contenia 0.360% de Co/100 ml de la solución y la fibra mordantada 11.86 g/100 de Cromo. Con estos valores se procedió a hacer los siguientes calculos

8.1 - Tasa de pasaje de sólidos

En el cuadro 1, se resumen los tiempos de muestreo, el peso de las muestras digeridas (BF y BS), el contenido de materia seca de las heces y la concentración de Cr en heces (mg/l, mg/g de heces)

Cuadro 1. - Tiempos de muestreo y concentraciones de cromo en heces

Tiempo (Hrs)	Peso	Peso	Concentración Cr	
	Muestra BF (g)	Muestra BS (g)	mg/l	mg/g (heces)
00	2.5008	2.3125	0.000	0.000
06	2.5029	2.3145	0.157	0.013
08	2.5018	2.3134	1.340	0.115
10	2.5002	2.3120	2.912	0.251
12	2.5027	2.3120	6.305	0.544
16	2.5008	2.3125	7.432*	0.642*
22	2.5035	2.3150	6.305	0.544
28	2.5049	2.3163	3.040	0.262
36	2.5039	2.3154	1.290	0.111
48	2.5019	2.3135	0.444	0.034
60	2.5012	2.3129	0.237	0.020
72	2.5001	2.3119	0.042	0.003

MS de las heces 92.4732 ± 0.09400

El primer paso es transformar la concentración de Cr de mg/l a mg/g de heces en base seca (BS). El procedimiento es el siguiente:

Ejemplo:

Primer tiempo de muestreo posdosificación (6 hrs), porcentaje materia seca de heces 92.4732 ± 0.0940

Peso de muestra en base seca 2.3145 g, concentración de Cr 0.157 mg/l

Para transformar la concentración de Cr en heces de mg/ml a mg de Cr/g heces en base seca se realizan las siguientes operaciones:

$$(\text{Peso de muestra como se tomó (BF)}) (\text{MS de heces}) = \text{g heces BS}$$

$$\text{g heces por la dilución} = \text{mg Cr en heces/ml}$$

Sustituyendo los valores del primer tiempo de muestreo posdosificación (6 hrs) se obtiene la concentración de Cr en mg/g de heces:

$$(2.5029) (0.924732) = 2.3145 \text{ g heces BS}$$

$$2.31258/200 \text{ ml} = 0.011572 \text{ mg/ml}$$

$$(0.011572) (1000) = 11.572$$

$$0.157/11.572 = 0.0135 \text{ mg Cr/g heces BS}$$

Para calcular el tiempo de tránsito (que es el tiempo que el marcador empieza a formar parte de las heces) se utilizó el siguiente modelo:

$$Y = Ae^{-k_1(t-1T)} - Ae^{-k_2(t-1T)} \text{ cuando } t > 1T$$

Sugerido por Grovum y Williams (1973)

El modelo asume dos compartimientos con tasas constantes K_1 y K_2 .

Para calcular k_1 , (cuadro 1) se localizó la concentración pico del marcador 7 432 mg Cr/l (16 h) y se realizó una regresión del \ln (logaritmo natural) de la concentración (a partir de la concentración pico) del marcador (Y) contra el tiempo (X)

Cuadro 2 - Concentración pico del marcador y transformación logarítmica de la regresión lineal residual

Tiempo (h)	Concentración	
	Cr mg/g (heces)	\ln
16	0.642	- 0.443
22	0.544	- 0.608
28	0.262	- 1.339
36	0.111	- 2.198
48	0.034	- 3.381
60	0.020	- 3.912
72	0.003	- 5.809

Regresión K_1

Constante (A) 1.2633

Coefficiente de X - 0.09408

r^2 0.99097

El valor absoluto de la pendiente es $= K_1$, por lo tanto K_1 es igual a 0.09408/hora en el rumen. La porción lineal de la curva de excreción es K_1

La ordenada es el ln A1 por tanto, A1 es obtenido del antilogaritmo de A1

$$A1 = 1.2633 \cdot \text{Antilogaritmo}$$

$$A1 = 3.5370$$

Hasta este paso y con base en esta regresión se predijo la concentración de Cr en la parte de la curva de excreción fecal antes del pico (16, 22, 28, 36, 48, 60 y 72 horas)

Para calcular K_2 Se utilizaron los parámetros encontrados (ordenada y pendiente) para estimar las concentraciones de marcador para los tiempos antes del pico (6, 8, 10 y 12)

Ecuación de regresión para calcular K_2

ln concentración estimada $A - K_1(t)$

ln concentración estimada $1.2633 - 0.09408(6) = 0.6988$

$$(8) = 0.5106$$

$$(10) = 0.3225$$

$$(12) = 0.1343$$

La concentración estimada es el producto del antilogaritmo del ln estimado

A la diferencia de la concentración real de la estimada se expresa como logaritmo y de estos valores se

realizo una regresión para calcular K_2

Cuadro 3 - Valores para estimar la regresión lineal sobre la curva descendente de la curva de excreción

tiempo	ln predicho	Concentración predicha	Concentración P-R real	ln
6	0.6988	2.0113	0.013 1.9983	0.6923
8	0.5106	1.6662	0.115 1.5512	0.4390
10	0.3225	1.3805	0.251 1.1295	0.1218
12	0.1343	1.1437	0.544 0.5997	-0.5111

Regresión K_2

Constante (A) 1 9528

Coefficiente de X -0 1963

r^2 0.975518

El valor absoluto de la pendiente es = K_2 por lo tanto K_2 es igual a 0 19637/hora (ciego y colon proximal) La porción lineal de la curva de excreción es K_2

La ordenada es el $\ln A_2$ por tanto, A_2 es obtenida del antilogaritmo de A_2

$$A_2 = 1\ 95283 * \text{Antilogaritmo}$$

$$A_2 = 7\ 04686$$

Para calcular el tiempo de tránsito (TT) que representa el tiempo desde la infusión a la primera aparición del marcador en las heces

$$TT = \ln A_2 - \ln A_1/K_1 - K_2$$

$$TT = 1\ 952 - 1\ 263/0\ 094 - 0\ 196 = 6\ 755\ h$$

a que la concentración de Co fue de 360 mg/100 ml de líquido. Se infundieron 100 ml de solución de Co-EDTA por la cánula ruminal. La infusión de Co-EDTA fue de 360 mg por dosis.

Los tiempos de muestreo pos-dosificación fueron 0, 2, 4, 6, 10, 16 y 24, h. Para cuantificar los parámetros de flujo ruminal de la fracción líquida se realizó una regresión de los tiempos de muestreo (X) y el logaritmo natural de la concentración del Co-EDTA (cuadro 4). A partir de los valores de la ecuación de regresión lineal fueron estimados tasa de dilución (TD), volumen ruminal (VR), tiempo de recambio (TR) y tasa de flujo de líquidos (TFL) (cuadro 5).

Cuadro 4 - Concentración del marcador (Co-EDTA) y transformación logarítmica de la regresión lineal residual.

Tiempo (h)	Concentración	
	Cr mg/g (heces)	ln
0	0.00	0.00000
2	5.82	1.76130
4	4.99	1.60740
6	4.17	1.42790
10	3.63	1.28920
16	2.15	0.76540
24	1.22	0.19880

Regresión

Constante (A) 1.2633

Coefficiente de X - 0.09408

Antilogaritmo (T0) 6.696

r² 0.99097

Donde A es el intercepto y, el antilogaritmo es la concentración al tiempo cero (T0), el coeficiente de X es la pendiente que corresponde a la tasa fraccional de dilución el cual se expresa en porcentaje/h. En tanto, el inverso es la tasa de recambio fraccional y, el volumen ruminal es igual a la concentración de la dosis dividida entre la concentración al tiempo cero. La tasa de flujo se estima dividiendo el volumen ruminal entre la tasa de recambio.

Cuadro 5 - Parámetros de flujo ruminal de la fracción líquida (Co-EDTA)

TFD	VR	TR	TFL
(%/h)	(l)	(h)	(l/h)
7.03	53.76	14.22	3.77

9.0.- DISCUSION

Las principales limitaciones en la preparación de los marcadores, son el costo ya que en ocasiones deben importarse, y la pureza de los reactivos empleados para su preparación

Las condiciones en las que se preparan esos marcadores deben tener en cuenta los reactivos usados y las reacciones químicas que van a ocurrir

En la preparación del marcador de líquidos, EDTA-Co debe tenerse cuidado al agregar el hidróxido de sodio al EDTA ya que este no es soluble en agua y al irse formando la sal sódica se solubiliza. La adición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) debe hacerse agitando con el objeto de distribuir homogéneamente y lograr la oxidación del Cobalto al agregar el etanol y eliminar mediante filtración cualquier residuo

Para la preparación de la fibra mordantada hay que lavar el rastrojo de maíz adecuadamente para purificar la fibra y lograr un mordantado más estable. En este trabajo se usó ácido ascórbico como agente reductor, aunque tal vez se pudiera usar bisulfito de sodio, el cual es un reductor más agresivo, de menor precio. La sustitución de Launil sulfato de sodio por un detergente comercial, mostró ser efectivo y de menor costo. Durante el mordantado hay que tener cuidado que la temperatura sea constante

Las concentraciones de los elementos minerales en los marcadores preparados (11.86 % de Cromo y 360 mg/100 ml de Cobalto), fueron los esperados y pudieron ser recuperados en las pruebas de cinética. Los resultados obtenidos en la cinética de sólidos mostraron los valores más altos de cromo a las 16 hrs. Para después disminuir, el tiempo de tránsito (tiempo en que el marcador empieza a formar parte de las heces) se calcula a partir de ese momento, al considerar los compartimentos con tasas constantes, este marcador permite predecir la concentración de cromo en la parte de la curva de excreción fecal antes del pico. De la regresión obtenida entre la diferencia de la concentración real y la estimada se calcula la constante K_2 (la absorción del ciego y colon proximal)

La tasa de dilución se calculó de la regresión obtenida entre los tiempos de muestreo y el ln de las concentraciones del Co-EDTA y a partir de estos valores se calculan la tasa de dilución, el volumen ruminal, el tiempo de recambio y la tasa de flujo de líquidos. Los cálculos para las pruebas de cinética son laboriosos, pero si se entiende su fundamento pueden aplicarse fácilmente

10 - CONCLUSIONES

1 - De acuerdo a los resultados obtenidos en la concentración de fibra Cr-mordante y Co-EDTA, de 11 86 mg/100 y de 360 mg/ 100 ml respectivamente se puede concluir que cumplen con lo establecido para ser empleados como marcadores de referencia y aplicarse en estudios de cinética de sólidos y líquidos en el tracto gastrointestinal de animales a través de la infusión de estos por la canula ruminal, cumpliendo las características particulares que debe reunir un marcador indigestible

2 - En general los marcadores son buenos, ya que son fáciles de administrar y de recuperarlos para el Cr, el porcentaje de recuperación oscila alrededor del 99% y para el complejo Co-EDTA de 98% demostrando por que son confiables de ser administrados como sustancias de referencia en animales de experimentación

3 - Los resultados también muestran que el empleo de estas sustancias utilizadas como marcadores indigestibles son de gran utilidad en estudios de nutrición animal (cinética de sólidos y líquidos) ya que son para su análisis posterior satisfactoriamente cuantificables y por lo tanto permiten predecir el tiempo de pasaje del material marcado a medir

11.1 - Determinación de la fibra detergente neutro

El principio del procedimiento de la fibra detergente neutro (FDN) es un método rápido para determinar los componentes de la pared celular en alimentos fibrosos vegetales. Aparentemente divide la materia seca al punto de que separe los constituyentes nutricionales solubles y accesibles de aquellos que no son totalmente aprovechables o que dependen de la fermentación microbiológica para su integración.

Material

- a) - Aparato de reflujo
- b) - Vasos Berzelius de 600 ml
- c) - Condensadores hechos de frascos redondos de 500 ml
- d) - Crisoles de filtro de vidrio de porosidad "C", porosidad gruesa con placa de 40 mm de diámetro, suficientemente grande para recibir 40 a 50 ml de líquido
- e) - Aparato de filtración

Reactivos: Por litro de solución

- a) - Agua destilada 1 l
- b) - 30g de sulfato lauril sódico
- c) - 14.61 de EDTA
- d) - 4.0g de hidróxido de sodio
- e) - 6.81 de tetraborato de sodio $10H_2O$
- f) - 4.56 de fosfato disódico anhidro
- g) - 10 ml de etilenglicol monoetiléter
- h) - Acetona use un grado libre de color y que no deje residuo al evaporarla
- i) - Alfa amilasa 2g:90 ml de agua + 10 ml de etilenglicol

El procedimiento es el siguiente

Pesar 0.5 g de muestra secada al aire y molida a través de un tamiz de 1 mm dentro de un vaso berzelius de 600 ml agregar 100 ml de una solución detergente neutro Poner en la parrilla del aparato de reflujo y calentarse para que la solución hierva en 5-6 minutos y reducir la temperatura cuando comienza la ebullición, para evitar la formación de espuma Ajustar la temperatura para que la ebullición sea constante por 60 minutos Poner en el aparato de filtración él o los cnsols tarados y pasar a través de ellos agua caliente (90 - 100 °C) al cabo de este tiempo se deja asentar de 10 a 15 segundos y se empieza a filtrar Secar los cnsols a 105 °C por 8 horas o toda la noche en estufa de aire forzado Se pesa en caliente y el residuo de fibra recuperado se registra en términos de paredes celulares Se incinera el contenido de los cnsols a 525 °C por 3 horas se enfrían y pesan La pérdida de peso son las paredes celulares libres de cenizas , método propuesto por Tejada, 1982

Los cálculos son los siguientes

Paredes celulares (%) en base parcialmente seca o tal como se ofrece = $\frac{\text{peso del cnsol} + \text{paredes}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$

celulres (g) - peso del cnsol (g) X 100 / peso de la muestra (g)

a) Paredes celulares en muestra " tal como se ofrece " X 100

Matena seca (%) de la muestra " tal como se ofrece "

b) Paredes celulares (%) en muestra parcialmente seca X 100

Matena seca (%) de muestra parcialmente seca

El % de contenido celular se calcula sustrayendo de 100 el % de paredes celulares en cada base

% de contenido celular = 100 - % de paredes celulares

Pickard D W and Stevens C E (1972) Digesta flow through the rabbit large intestine Amer J Physiol 223

1161

Rivera, V M, Espinosa, G. F., Mireles, L M A., Flouriak, G F., Iruégas, E L. oportunidades para el desarrollo de la ganadería bovina productora de carne en México FIRA, 1997 Boletín informativo No 295, Vol XXIX

México

SAGAR, 1997 Centro de Estadística Agropecuaria

Santiago-García, E Bernal-Santos, G y Romano_Muñoz, J L (1990) Obtención de paredes celulares mordantadas con cromo para estudios de cinética ruminal En Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Universidad Juárez Autónoma de Tabasco Villahermosa, Tab, Mex (12-16/11/90) 381

Sperber I Hydén S and Ekman J (1953) The use of polyethylene glycol as a reference substance in study of ruminant digestion Ann Agric Sweden 20 337

Stem, M.D and Hoover, W H (1979) Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis A review J Anim Sci 49,1590

Academia de Hernández, (1992). Control de Calidad y Analisis de Alimentos para Animales Sistema de Educación Continua en Producción Animal, A C

Van Soest, P J, Colucci, E and Van Soest, P J (1978) Investigation of of three passage markers Cr, Ce and Co New York State college of Agriculture and Life Sciences, Cornell University, Ithac NY ASAS Paper 578

Allen P, Colucci E and Van Soest P J (1980) Investigation of chromium, cerium and Cobalt as markers in
gesta rate of passage studies J Sci Food agric 31 625

Van Soest P J and Wine, R H (1967) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds IV The determination
of plant cell wall constituent J Assoc Off Anal Chem 50 50

Van Soest P J, Smith L W and Cox, E L (1972) Model of cellulose disappearance from the rumen J Dairy Sci.
55 125

Williams C H, D J David and O Iismaa 1962 The determination of chromic oxide in feces samples by atomic
absorption spectrophotometry J Agric Sci Cam 59 381-388