

# Determinación "in vitro" de algunos nutrientes en cinco forrajeras cultivadas en la República Argentina<sup>1</sup>

M. H. C. K. DE RIVERÓS<sup>2</sup> y E. E. VONESCH<sup>3</sup>

(Recibido : 18 de octubre de 1967)

## RESUMEN

Se estimó el grado de aprovechamiento de algunos nutrientes en pasturas, por diferencia entre los valores analíticos del forraje y los registrados en el residuo remanente de la digestión « in vitro », en relación con la digestibilidad total de la materia seca.

Se aplicó la técnica de digestibilidad « in vitro » de TILLEY y TERRY, modificada y ampliada a macro escala.

Se estableció el grado de aprovechamiento de materia orgánica, nitrógeno total, celulosa, lignocelulosa, lignina, cenizas, fósforo, calcio, magnesio y sílice en cuatro gramíneas y una leguminosa.

## SUMMARY

The degree of utilization of some pastures nutrients was estimated by difference between the analytical values of the forrage and those of the remaining residue of the « in vitro » digestion, in relation with the total digestibility of the dry matter.

TILLEY and TERRY's « in vitro » digestibility technique modified and amplified to macro scale was applied.

The degree of utilization of organic matter, total nitrogen, fiber, lignocellulose, lignin, ash, phosphorus, calcium, magnesium and silica was established in four grasses and one legume.

La determinación del valor nutritivo de las pasturas tuvo importante impulso en los últimos años, debido a las técnicas de digestibilidad "in vitro" que ofrecen estrecha correlación con los ensayos "in vivo". Los métodos "in vitro" tomaron difusión principalmente a través de la técnica de TILLEY y TERRY (1963), por su exactitud y relativa sencillez en la predicción del valor alimenticio de los forrajes. Los resultados expresados sobre materia seca u orgánica son globales y no indican

acerca de la utilización de los distintos constituyentes de las pasturas.

El interés en conocer el comportamiento de diferentes componentes de los forrajes, nos llevó a realizar ensayos de digestibilidad "in vitro", en macro escala, y así poder establecer en cada caso el grado de aprovechamiento de algunos de ellos.

En la presente contribución se determinó el porcentaje aprovechable de nitrógeno total, fibra, lignocelulosa, lignina, cenizas totales, calcio, fósforo, magnesio y sílice, basándose en la diferencia entre la cantidad originalmente valorada en el forraje y la hallada en el residuo indigerido-insoluble.

<sup>1</sup> Cátedra de Química Biológica. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad de Buenos Aires.

<sup>2</sup> Profesora adjunta.

<sup>3</sup> Profesor titular.

## MATERIAL Y METODOS

Estos experimentos se realizaron sobre forrajeras procedentes de parcelas experimentales de la Cátedra de Forrajicultura de la F.A.V., cosechadas en estado vegetativo en el mes de agosto de 1966.

Sobre muestras representativas de cada pastura se practicaron los análisis forrajeros y de digestibilidad "in vitro" (ésta última en micro y macro escala). El residuo indigerido-insoluble, fue a su vez sometido a los correspondientes análisis.

En base al porcentaje solubilizado, resultado de la diferencia entre el contenido en la pastura y del residuo, se calculó la cantidad aprovechable para cada constituyente.

Los ensayos se efectuaron sobre el siguiente material: falaris, mata dulce (*Phalaris tuberosa*), agropiro alargado (*Agropyron elongatum*), raigras criollo (*Lolium multiflorum*); pasto óvillo (*Dactylis glomerata*) y alfalfa (*Medicago sativa*).

## TÉCNICAS:

*Determinación de humedad:*

En estufa de tiraje forzado a 60-70° C y posteriormente en vacío, hasta constancia de peso.

*Preparación y molienda:*

El material desecado a 60-70° C fue molido en aparato Labconco, homogeneizado en mezclador en V y cuarteado; efectuándose sobre alícuotas las distintas valoraciones.

*Proteína bruta:*

Por determinación del nitrógeno total según la técnica de Kjeldahl, modificada. Mineralizando con mezcla sulfo-perclórica y selenio como catalizador. Valoración del amoníaco por colorimetría mediante reacción de Nessler. La evaluación se practicó sobre 500 miligramos de muestra. Conversión a proteína: factor 6,25.

*Grasa bruta:*

Por extracción con solvente Shell N° 7, a base de hidrocarburos alifáticos, con rango de destilación entre 60-70° C, en extractor de grasas Goldfish.

*Fibra bruta:*

En aparato condensador de fibra, Laboratory Construction, según la técnica del A.O.A.C. (1960).

*Lignocelulosa y lignina:*

La valoración del complejo lignocelulósico y la lignina se basó en el método indicado por GAILLARD (1958), tomando en cuenta las observaciones de FISHER (1961) y nuestra experiencia, VONNESH y RIVERÓS (1966).

*Cenizas:*

Por incineración a 520° C.

*Fósforo:*

En cenizas según técnica del A.O.A.C. (1960), por colorimetría mediante la reacción del azul de molibdeno.

*Calcio y magnesio:*

Por complexometría en las cenizas según SCHWARZENBACH (1946).

*Sílice:*

En las cenizas por eliminación con ácido fluorídrico en medio sulfúrico.

*Digestibilidad:*

Se siguió la técnica de digestibilidad "in vitro" de TILLEY y TERRY (1963), que se desarrolla en dos etapas, una con líquido ruminal, seguida por otra con pepsina clorhídrica y reduciendo a 24 horas de duración la fermentación rúmica y a igual lapso la péptica. Se trabajó con líquido ruminal procedente de ovinos experimentalmente fistulizados.

Los ensayos se realizaron de acuerdo a la técnica original sobre 500 miligramos de muestra y en macro escala sobre 30 gramos, guardando las correspondientes proporciones de inóculo y solución reguladora.

Cada ensayo se hizo con muestras problema por triplicado, con dos forrajes de digestibilidad conocida (alta y baja) (muestras pauta), y además dos testigos, con solución buffer y líquido ruminal. Los valores consignados son los resultados prome-

dios de por lo menos dos ensayos realizados en otras tantas oportunidades.

chable :: 100 : x = nutriente aprovechable por ciento de materia seca del forraje.

**Cálculos:**

El grado de aprovechamiento o utilización se deduce de la siguiente manera:

100 gramos materia seca del forraje — % digestibilidad de la materia seca = % materia seca residual.

100 : % nutriente en el forraje :: % materia seca residual : x = nutriente en el residuo.

% nutriente en el residuo — nutriente en el residuo = nutriente aprovechable.

% nutriente en el forraje : nutriente aprove-

**RESULTADOS**

Los análisis químicos y de digestibilidad "in vitro" se detallan en el cuadro I. En el cuadro II se dan los datos analíticos correspondientes al residuo no digerido proveniente del ensayo de digestibilidad de cada pastura. En el cuadro III se reúnen los valores correspondientes a los forrajes, a su residuo indigerido y al porcentaje aprovechado de los principales componentes, calculados en base a la digestibilidad de la materia seca determinada en la pastura.

CUADRO I. — Composición y digestibilidad « in vitro »

Especie	Humedad %	Materia seca %	Valores expresados sobre materia seca %														
			Materia orgánica	Proteína (N x 6,25)	Grasa bruta	Fibra bruta	Lignocelulosa	Lignina	Extractivo no nitrogenado	Cenizas totales	Fósforo mg	Calcio mg	Magnesio mg	Sílice	Relación Ca/P	Relación Ca/Mg	Digestibilidad « in vitro » de la materia seca
<i>Phalaris tuberosa</i> ..	76,8	23,2	84,8	12,6	2,7	23,1	31,4	3,8	46,4	15,2	242,5	498,2	273,7	7,6	2,1	1,8	59,1
<i>Agropyron elongatum</i> .....	73,6	26,4	87,8	16,0	4,3	28,3	33,0	3,8	39,2	12,2	205,0	429,6	290,0	5,5	2,1	1,5	69,5
<i>Lolium multiflorum</i>	83,8	16,2	89,2	15,0	4,3	20,8	25,4	3,7	49,1	10,8	305,0	484,1	209,4	3,0	1,6	2,3	71,8
<i>Dactylis glomerata</i>	74,9	25,1	88,8	14,2	4,3	24,3	38,3	6,8	46,0	11,1	196,3	520,2	293,0	2,6	2,7	1,8	51,6
<i>Medicago sativa</i> ...	79,9	20,1	91,9	24,4	1,9	22,6	28,1	5,1	43,0	8,1	330,0	1054,6	276,2	0,7	3,2	3,8	60,9

CUADRO II. — Composición porcentual del residuo « no digerido »

Especie	Materia orgánica	Nitrógeno total	Fibra bruta	Lignocelulosa	Lignina	Cenizas totales	Fósforo mg	Calcio mg	Magnesio mg	Sílice
<i>Phalaris tuberosa</i> .....	82,8	2,20	30,0	50,7	11,7	17,5	45,1	120,3	84,2	14,8
<i>Agropyron elongatum</i> .....	85,4	2,66	33,6	55,8	24,7	14,6	48,5	144,5	94,4	12,0
<i>Lolium multiflorum</i> .....	88,6	3,06	33,0	56,3	18,2	11,4	33,7	209,6	47,5	7,5
<i>Dactylis glomerata</i> .....	88,0	2,57	31,7	51,8	17,8	12,0	15,2	177,2	56,4	8,0
<i>Medicago sativa</i> .....	94,5	1,86	45,4	57,1	22,1	5,5	13,4	179,2	50,0	2,3

CUADRO III. — Aprovechamiento porcentual del forraje en base a su digestibilidad<sup>4</sup>

Especie	<i>Phalaris tuberosa</i>	<i>Agropyron elongatum</i>	<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Medicago sativa</i>
Digestibilidad «in vitro» de la materia seca %.....	59,1	69,5	71,8	51,6	60,0
Materia orgánica. { forraje	84,8	87,8	89,2	88,8	91,9
{ no digerido	82,5	85,4	88,6	88,0	94,5
{ aprovechable	60,2	70,3	72,0	52,0	59,8
Nitrógeno total.. { forraje	2,01	2,56	2,40	2,27	3,92
{ no digerido	2,20	2,66	3,06	2,57	1,86
{ aprovechable	55,2	67,8	63,6	44,6	81,4
Fibra bruta..... { forraje	23,1	28,3	20,8	24,3	22,6
{ no digerido	30,9	33,6	33,0	31,7	45,4
{ aprovechable	45,3	63,8	55,3	36,9	21,5
Lignocelulosa... { forraje	31,4	33,0	25,4	38,3	28,1
{ no digerido	50,7	55,8	56,3	51,8	57,1
{ aprovechable	34,0	48,4	37,5	34,5	20,5
Lignina..... { forraje	3,8	3,8	3,7	6,8	5,1
{ no digerido	11,7	24,7	18,2	17,8	22,1
{ aprovechable	-25,9	-98,3	-38,7	-26,7	-69,4
Cenizas totales... { forraje	15,2	12,2	10,8	11,2	8,1
{ no digerido	17,5	14,6	11,4	12,0	5,5
{ aprovechable	51,2	63,5	70,2	48,1	73,5
Fósforo mg..... { forraje	242,5	205,0	305,0	196,3	330,0
{ no digerido	45,1	48,5	33,7	15,2	13,4
{ aprovechable	92,4	92,8	90,1	96,3	98,4
Calcio mg..... { forraje	498,2	429,6	484,1	520,2	1054,6
{ no digerido	120,3	144,5	209,6	177,2	179,2
{ aprovechable	90,1	89,7	87,8	83,5	93,4
Magnesio mg.... { forraje	273,7	290,0	209,4	293,0	276,2
{ no digerido	84,2	94,4	47,5	66,4	50,0
{ aprovechable	87,4	90,0	93,6	89,0	92,9
Sílice..... { forraje	7,6	5,5	3,0	2,6	0,7
{ no digerido	14,8	12,0	7,5	8,0	2,34
{ aprovechable	19,9	33,5	28,9	-51,1	-37,6

<sup>4</sup> El nutriente aprovechable está expresado por ciento de materia seca del forraje.

#### DISCUSION

La apreciación más correcta de la digestibilidad aparente de los alimentos resulta del balance entre la ingesta y la excreta. Los métodos por balance, «in vivo», son los que ofrecen mayores garantías pero su técnica costosa y larga, requiere instalaciones adecuadas.

En los métodos «in vitro» se incuban con líquido ruminal y en condiciones controladas pequeñas muestras de forraje, calculándose la digestibilidad de la materia seca o de la materia orgánica, a partir de los pesos de estos componentes en la muestra y en el residuo insoluble remanente del proceso fermentativo y péptico. El residuo de la digestión «in vitro» es una mezcla de la fracción

no digerida, de microorganismos y de los productos de su actividad.

Los resultados obtenidos empleando la técnica "in vitro" mencionada guardan estrecha relación con los resultados "in vivo", ALEXANDER (1967). En nuestro caso no se realizaron ensayos "in vivo" pero los valores obtenidos "in vitro" fueron oportunamente comparados con los datos correspondientes a patrones de forrajes con consumo y porcentaje de digestibilidad "in vivo" conocidos, preparados por el Programa Cooperativo de Evaluación Nutritiva de los Forrajes y que nos fueron suministrados por el Centro de Investigaciones y Enseñanza de la Zona Templada\*.

El conocimiento de la digestibilidad global y parcial "in vitro" permite calcular por análisis del forraje y del residuo el grado de aprovechamiento de distintos componentes orgánicos y minerales.

La necesidad de contar para el análisis químico con suficiente cantidad de material, obligó a ampliar la muestra de 500 miligramos a 30 gramos. En ambas escalas los valores fueron concordantes.

Los resultados de nuestros ensayos merecen las siguientes consideraciones: El aprovechamiento de la materia orgánica concuerda con el de la materia seca ya que su diferencia en ningún caso supera al 1,1%.

Las proteínas y demás componentes azoados, se expresan en nitrógeno (cuadros II y III), debido a que en el residuo no pudo reconocerse la presencia de proteínas con los reactivos corrientes. En nuestro caso, en la digestión rúmimo-péptica aparentemente se hidrolizan todas las sustancias proteicas. Los resultados demuestran que la utilización del nitrógeno total de la ingesta "in vitro" concuerda con la indicada en los ensayos "in vivo" de "La Estanzuela".

La fibra bruta, que incluye lignina, lignocelulosa, celulosa, hemicelulosas y pectinas, tiene un grado de aprovechamiento que abarca desde 36,9% a 63,8% en las gramíneas y es de 21,5% en la leguminosa.

La digestibilidad de la lignocelulosa es inferior a la de la fibra bruta, y sus valores son relativamente uniformes para las gramíneas: promedio 38,6%; en la alfalfa ambos componentes tienen una digestibilidad muy similar.

\* INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS de la OEA, La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

Respecto a la lignina, existen discrepancias sobre su aprovechamiento. Las diferencias acerca de su utilización se atribuyen por una parte, al grado de incrustación e insolubilidad en que se halla en el vegetal, a su heterogeneidad, a las variaciones del tenor proteico y al ciclo vegetativo. Los resultados negativos anotados indican poco o ningún grado de aprovechamiento y en todos los casos la cantidad de lignina hallada en el residuo superó a la del correspondiente forraje. Los saldos fueron siempre negativos; alcanzando en el agropiro a -98,3%. Según JARRIGE y MINSON (1964), se puede admitir que los polisacáridos de las membranas tienen una digestibilidad que depende sobre todo del grado de lignificación y que podría ser casi total si las enzimas microbianas pudieran penetrar en los tejidos de la planta. Para JOURNET y JARRIGE (1962) la lignina es prácticamente indigestible. JARRIGE y MINSON (1964), constataron en el raigras y en el dactylis los coeficientes de digestibilidad de las hemicelulosas y de la celulosa, que varían en forma sensiblemente paralelos, dentro de límites de 52,5% y 90,9% y de 45,4% y 96,7%, respectivamente.

Una buena nutrición mineral exige un adecuado equilibrio entre aniones y cationes razón por la que la composición cuali y cuantitativa de las cenizas es de la mayor importancia. Sus cantidades y proporciones tienen notable influencia sobre el organismo animal. El aprovechamiento integral de las cenizas supera por lo general al 50% del tenor en el forraje. Las cantidades anotadas abarcan desde 48,1% al 70,2% en las gramíneas y fue de 73,5% en la leguminosa.

El fósforo es un elemento altamente aprovechado, ya que su utilización supera en todos los casos el 90% y llega en la alfalfa al 98,4%. El calcio presenta también un alto grado de aprovechamiento, en las gramíneas va de 83,5% a 90,1% y en la leguminosa llega a 93,4%. Los valores registrados para el magnesio fueron en general, similares a los del calcio: entre 87,4% y 93,6% en las gramíneas y 92,9% en la leguminosa.

Las funciones y la importancia de la sílice en los sistemas biológicos son poco conocidas. Las gramíneas tienen casi siempre un tenor relativamente elevado; oscila entre 1% y 4% de la materia seca, llegando en algunas hasta un 10%. En nuestros análisis fluctuó entre 2,6% y 7,6% en

las gramíneas, y fue más bajo en la leguminosa, 0,7 %. Estos valores expresados sobre materia seca equivalen a un 23 % y 50 % respectivamente de las cenizas totales. Se destacan los elevados valores hallados en el residuo no digerido, con porcentuales positivos para *Phalaris*, *Agropyron* y *Lolium* y negativos para *Dactylis* y *Medicago*. Estos resultados concuerdan en principio con los valores positivos y negativos hallados en los ensayos "in vivo" por NOTTLE y col. (1966) y similares a los de GALLUP y col. (1945), con una recuperación en heces del 94,5 % al 135,3 %.

#### CONCLUSIONES

La digestibilidad "in vitro" en macro escala permite, basada en el análisis del forraje y del residuo indigerido, estimar el grado de aprovechamiento de distintos componentes de un forraje.

La determinación del grado de aprovechamiento "in vitro" propuesta deberá ser corroborada sobre mayor número de muestras y comparada con ensayos "in vivo".

#### BIBLIOGRAFÍA

- ALEXANDER, R. H. 1967. *Establecimiento de un sistema de digestibilidad « in vitro », en el laboratorio. Métodos in vitro » para determinar el valor nutritivo de los forrajes.* Montevideo. Ed. O. Paladines. Serie miscelánea N° 4 : 101-145.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURE CHEMISTS. 1960. *Official and Tentative Methods of Analysis.* 9° Ed. Washington. W. Horwitz. 832 p.
- CRAMPTON, E. W. 1962. *Nutrición animal aplicada.* Trad. A. M. Barrado y M. Abad Gavín. Zaragoza. Acribia. 415 p.
- FISHER, H. 1961. *Quantitative determination of lignin in hay.* Acta Agric. Scandinavica. Sup. 10. Stockholm, 43 p.
- GAILLARD, B. D. E. 1958. *A detailed summative analysis of the crude fibre and nitrogen-free extractives fractions of roughages. I. Proposed scheme of analysis.* J. Sci. Food. Agric. 9 : 170-177.
- GALLUP, W. D. et al. 1945. *The use of silica as a reference substance in digestion trials with ruminants.* J. Animal Sci. 4 (1) : 68-71.
- JARRIGE, R. and MINSON, D. J. 1964. *Digestibilité des constituants du raygrass anglais S24 et du dactyle S37 plus spécialement des constituants glucidiques.* Ann. Zootech. 13 (2) : 117-150.
- JARRIGE, R. 1965. *La composition des fèces du mouton et ses relations avec la digestibilité du fourrage.* Fourrages. N° 22 : 65-67.
- JOURNET, M. et JARRIGE, R. 1962. *Analyse des constituants glucidiques des plantes fourragères. III. Etudes sur le dosage de la lignine.* Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 2 : 223-250.
- LE BARS, H. et VAILLANT, R. *Biochemie du rumen.* Congreso Mundial de Alimentación Animal. Parte I. Madrid. 2-8 de octubre de 1966. 874 p.
- NOTTLE, M. C. 1966. *Silica metabolism of merino sheep.* Australian J. Agric. Res. 17 (2) : 175-182.
- SCHWARZENBACH, R. 1946. *New methods for determining certain cations.* (Univ. Zurich) Helv. Chim. Acta. 29 : 1338.
- STALLACUP, O. T. and DAVIS, G. V. 1965. *Assesing the feeding value of forrages by direct and indirect methods.* Agric. Exp. Sta., Univ. of Arkansas, Fayetteville. Bull. 704. 30 p.
- TILLEY, J. M. A. and TERRY, R. A. 1963. *A two stage technique for in vitro digestion of forrage crops.* J. Brit. Grassl. Soc. 18 : 104-111.
- VONESCH, E. E. y RIVEROS, M. H. C. K. DE. 1966. *Contribución al estudio analítico del complejo lignocelulósico y lignina en pasturas.* Rev. Fac. Agron. y Vet. Bs. As. 16. (entrega III) 27-35.