



UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**COMPARACION DE UNA TECNICA *IN SITU* Y UNA TECNICA *IN VITRO*
PARA ESTIMAR LA CINETICA DE DEGRADACION EN ALIMENTOS
PARA RUMIANTES**

ANA INES TRUJILLO LEZAMA

TESIS DE MAESTRIA EN NUTRICION DE RUMIANTES

**URUGUAY
2006**



UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**COMPARACION DE UNA TECNICA *IN SITU* Y UNA TECNICA *IN VITRO*
PARA ESTIMAR LA CINETICA DE DEGRADACION EN ALIMENTOS
PARA RUMIANTES**

ANA INES TRUJILLO LEZAMA

**Ing. Agr. MSc. María de Jesús Marichal
Directora de Tesis**

2006

**INTEGRACION DEL TRIBUNAL
DE DEFENSA DE TESIS**

**Roberto Kremer; DVM. MSc
Facultad de Veterinaria.
Universidad de la República – Uruguay**

**Francisco Santini; Ing. Agr. PhD
Instituto Nacional de Tecnología
Agropecuaria. Balcarce - Argentina**

**Lucía Piaggio; Ing. Agr. PhD
Secretariado Uruguayo de la Lana - Uruguay**

**A Camila, Manuel, Juan, Diego
y Polito.**

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han hecho posible la realización de este trabajo. Y muy especialmente:

A mi directora. Gracias Mariquita, por haberme impulsado a este emprendimiento, por la dirección de este trabajo, por tu estímulo, tus consejos, tus aportes y también sobretodo, por ser una buena amiga.

A ti, Mariana que ya estás por regresar, gracias por tu apoyo, por estar siempre cerca aunque nos separaron kilómetros, gracias también por ser una buena amiga.

A mis amigas del alma, Magela y Virginia que también siempre estuvieron cerca de mí.

A todo el personal del Laboratorio de Nutrición especialmente a ti Ana, por tu buena disposición frente al trabajo y por tu apoyo humano, a ti Shirley y a ti Gabriela, por haber podido intercambiar ideas y conocimientos; gracias por los buenos momentos vividos en nuestro Laboratorio durante la realización de este trabajo.

Al funcionario de la Estación de Pruebas, Daniel Agüero por el apoyo en el trabajo de campo con los animales fistulados.

Al Ing. Agr. Oscar Bentancur perteneciente al Departamento de Estadística y Cómputos por el asesoramiento estadístico, gracias Coco.

A la CSIC por el apoyo financiero a través del Programa de Becas de Apoyo para cursar Maestrías y Doctorados en la Universidad de la República.

A Germán, Sebastián, Federico y Antonia, los honorarios que estuvieron presentes para darme una mano, gracias también por las horas compartidas durante la realización de este trabajo.

El agradecimiento más especial va dirigido a mi familia, a la grande y a la chica. A la grande (mis padres, hermanos, y Lulú) gracias por el apoyo para que pudiera culminar este trabajo. A la chica, mis hijos, Camila, Manuel, Juan y Diego, gracias por el amor que me han dado y por la paciencia que me han tenido.

Y a ti Polito, el más grande de los agradecimientos, por estar siempre ahí, de manera incondicional, para estimularme, para apoyarme, para escucharme, para quererme.

INDICE

	Pág
AGRADECIMIENTOS	i
LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
HIPÓTESIS	8
OBJETIVOS	8
MATERIALES Y METODOS	
1. Alimentos evaluados	9
2. Metodologías evaluadas	9
3. Metodología <i>in situ</i>	10
4. Metodologías <i>in vitro</i>	11
5. Análisis químicos	12
RESULTADOS	
1. Caracterización de los alimentos	16
2. Valores de pH durante las incubaciones <i>in vitro</i>	18
3. Cinética de degradación de las pasturas	18
4. Cinética de degradación de los forrajes secos	28
5. Cinética de degradación de los subproductos agroindustriales	34
6. Cinética de degradación de los granos de cereales	43
7. Degradabilidades efectivas de los alimentos	46

INDICE (cont.)

DISCUSIÓN	
1. Cinética de degradación <i>in situ</i>	48
2. Comparación de las cinéticas estimadas por las diferentes metodologías	53
3. Comparación de las DE de la MS y de la FDN estimadas por las diferentes metodologías	58
CONCLUSIONES	62
ANEXOS	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE CUADROS

		Pág
Cuadro I.	Composición química de los alimentos	16
Cuadro II.	Valores de pH del inóculo inicial y promedio durante el transcurso de las incubaciones <i>in vitro</i>	18
Cuadro III.	Parámetros de la degradabilidad <i>in situ</i> de la MS de los alimentos	20
Cuadro IV.	Parámetros de degradabilidad de la MS de los distintos alimentos para los diferentes métodos.	29
Cuadro V.	Parámetros de degradabilidad <i>in situ</i> de la FDN de los distintos alimentos	30
Cuadro VI.	Parámetros de degradabilidad de la FDN de los distintos alimentos para los diferentes métodos	31
Cuadro VII.	Degradabilidades efectivas de la MS y de la FDN calculadas a partir de los parámetros obtenidos con la metodología <i>IS</i>	46
Cuadro VIII.	Degradabilidades efectivas de la MS y de la FDN para los diferentes métodos	47
Cuadro IX.	Parámetros de degradabilidad <i>in situ</i> de MS de pasturas y forrajes (datos de otros autores)	50
Cuadro X.	Parámetros de degradabilidad <i>in situ</i> de FDN de pasturas y forrajes (datos de otros autores)	51
Cuadro XI.	Parámetros de degradabilidad <i>in situ</i> de MS de algunos subproductos y concentrados energéticos (datos de otros autores)	52
Cuadro XII.	Distribución del total de alimentos según los valores de cada parámetro de la cinética de la MS estimado por las metodologías <i>IV</i> (similar, mayor o menor con respecto a la metodología <i>IS</i>)	53
Cuadro XIII.	Distribución del total de alimentos según los valores de cada parámetro de la cinética de la FDN estimado por las metodologías <i>IV</i> (similar, mayor o menor con respecto a la metodología <i>IS</i>)	54
Cuadro XIV.	Ecuaciones de correlación entre parámetros de la degradabilidad de la FDN estimados por <i>IS</i> y estimados por <i>IVA</i> o <i>IVAm</i>	57
Cuadro XV.	Ecuaciones de correlación entre las DE de la MS y de la FDN determinadas <i>IS</i> y determinadas por los métodos <i>IVA</i> o <i>IVAm</i> .	58
Cuadro XVI.	Ecuaciones de regresión entre las degradabilidades efectivas de la MS y de la FDN determinadas <i>IS</i> y las determinadas por los métodos <i>IVA</i> e <i>IVAm</i>	58
Cuadro XVII.	Ranking de los alimentos según las DE_{MS} para los diferentes métodos	59
Cuadro XVIII.	Ranking de los alimentos según las DE_{FDN} para los diferentes métodos	60

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Degradabilidad <i>in situ</i> de leguminosas (a) y de gramíneas (b)	21
Figura 2. Degradabilidad de la MS de trébol blanco (a) y de lotus (b) para las diferentes metodologías	22
Figura 3. Degradabilidad de la MS de avena (a) y raigrás (b) para las diferentes metodologías	23
Figura 4. Degradabilidad <i>in situ</i> de la FDN de leguminosas (a) y gramíneas (b)	25
Figura 5. Degradabilidad de la FDN de trébol blanco (a) y lotus (b) para las diferentes metodologías	26
Figura 6. Degradabilidad de la FDN de raigrás (a) y avena (b) para las diferentes metodologías	27
Figura 7. Degradabilidad <i>in situ</i> de la MS de forrajes secos (a) y degradabilidad <i>in situ</i> de la FDN de forrajes secos (b)	32
Figura 8. Degradabilidad de la MS de paja de cebada (a) y de heno de alfalfa (b) para las diferentes metodologías	33
Figura 9. Degradabilidad de la FDN de paja de cebada (a) y heno de alfalfa (b) para las diferentes metodologías	36
Figura 10. Degradabilidad <i>in situ</i> de la MS del farello de cervecería y de la pulpa de citrus	37
Figura 11. Degradabilidad <i>in situ</i> de la FDN del farello de cervecería y de la pulpa de citrus	38
Figura.12 Degradabilidad de la MS de la pulpa de citrus (a) y del farello de cervecería (b) para las diferentes metodologías	39
Figura 13. Degradabilidad de la FDN del farello de cervecería (a) y la pulpa de citrus (b) para las diferentes metodologías	41
Figura 14. Degradabilidad <i>in situ</i> de la MS de los granos de trigo y sorgo	42
Figura 15. Degradabilidad <i>in situ</i> de la FDN de los granos de trigo y sorgo	42
Figura 16. Degradabilidad de la MS del grano de trigo (a) y del grano de sorgo (b) para las diferentes metodologías	44
Figura 17. Degradabilidad de la FDN de los granos de trigo (a) y sorgo (b) para las diferentes metodologías	45
Figura 18. Relación entre la DE de la MS determinada por el método <i>IS</i> y la determinada por el método <i>IVA</i>	61
Figura 19. Relación entre la degradabilidad efectiva de la FDN determinada por el método <i>IS</i> y la determinada por <i>IVA</i>	61

RESUMEN

Parámetros de cinética de degradación de la materia seca (MS) y fibra detergente neutro (FDN) y degradabilidades efectivas de MS (DE_{MS}) y de FDN (DE_{FDN}) fueron determinados por método *in situ* (bolsa de nylon) (*IS*) y comparados con *in vitro* (*IV*) tecnología Ankom (*IVA* e *IVAm*). Se evaluaron: pasturas frescas (avena, raigrás, lotus y trébol blanco), forrajes secos (paja de cebada, heno de alfalfa), subproductos agroindustriales secos (farello de cervecería, pulpa de citrus) y granos (trigo, sorgo). Las muestras, secas y molidas a 2 mm fueron colocadas en bolsas (15 mg/cm^2 de superficie de bolsa) de poliéster (5 x 9 cm; porosidad $45 \mu\text{m}$, ANKOM 1020) ó (5 x 3 cm; $45 \mu\text{m}$) e incubadas *IS*, *IVA* o *IVAm* durante 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 h. En *IS*, las bolsas (por duplicado) fueron incubadas (dos momentos) en el rumen de 3 ovinos; en las *IV*, las bolsas (por sextuplicado) fueron incubadas en frascos del incubador (22-30 muestras/frasco) con solución buffer/fluido ruminal (80:20), mantenida hasta 96 h (*IVA*) o renovada a las 48 h (*IVAm*). Para MS y FDN, *IVA* e *IVAm* estimaron menores ($P < 0.05$) tasas de degradación y mayores ($P < 0.05$) tiempos lag que *IS*. Estas diferencias se ocasionan, principalmente, en fases tempranas de fermentación. Las DE_{MS} de *IS* fueron 23.5 % superiores ($P < 0.05$) a las *IV* (exceptuando paja de cebada), no difiriendo ($P < 0.05$) *IVA* e *IVAm*. Las DE_{MS} de *IS* y de las *IV*, estuvieron altamente correlacionadas y el ranqueo de los alimentos fue similar. Más investigación es requerida en factores que inciden en las condiciones *in vitro*.

Palabras claves: parámetros de cinética ruminal, *in situ*, *in vitro*, alimentos rumiantes

ABSTRACT

Kinetic rumen degradation parameters of dry matter (DM) and neutral detergent fiber (NDF), and ruminal DM and NDF effective degradability, (d_{DM} and d_{NDF}) measured by an *in situ* method (nylon bag technique) (*IS*) were compared with an *in vitro* (*IV*) method using Ankom technology. Milled dry samples of fresh pastures (oat, ryegrass, birdfoot trefoil, white clover), forages (alfalfa hay, barley straw), by-products (citrus pulp, brewers grains) and grains (wheat, sorghum), were incubated *IS* (by duplicate) in the rumen of 3 rams during 2 periods (incubation times: 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 h; sample weight: 15/cm² of free bag area; bag size: 5 x 9 cm; porosity 45µm-Ankom R510) or inserted (six replicates) in digestion jars (incubation times, sample weight and bag porosity were equal than *IS*, bag size 5 x 3 cm) with a buffer/fluid ruminal solution (80:20) until 96 h (*IVA*) or with renovated buffer/ruminal solution at 48 h (*IVAm*). Lower ($P<0.05$) degradation rates and higher lag time of DM and NDF were observed in *IVA* and *IVAm* than *IS*. These differences were mainly produced during early incubation times. The d_{DM} for *IS* were 23.5 % upper ($P<0.05$) than *IV* (with barley straw exception). Estimates of d_{DM} by *IS* and by *IV* were highly correlated; there was a similar feed ranking by the *IS* and *IV* techniques. The effects during *in vitro* early fermentation need to be more investigated.

Key words: kinetic parameters, *in situ*, *in vitro*, ruminant feedstuffs

INTRODUCCION

La evaluación de alimentos implica el uso de diferentes métodos para describir o caracterizar alimentos con respecto a sus habilidades para mantener distintos tipos y niveles de producción de los animales. Esos métodos deben ser efectivos y sencillos y deben generar información relevante para formular dietas de óptima calidad (Van der Honing y Steg, 1990; France et al., 2000).

Para estimar la cantidad y composición de los nutrientes digeridos así como las eficiencias de utilización de los nutrientes por el animal, es importante conocer los aspectos cuantitativos de las cinéticas de digestión de los alimentos (Mertens, 1993).

Actualmente, los modelos que predicen el valor nutritivo de los alimentos consideran aspectos dinámicos de la degradación de los nutrientes a nivel ruminal (Jarrige, 1989; Sniffen et al., 1992; AFRC, 1993; Nocek y Tamminga, 1991) y caracterizan los nutrientes no degradados a nivel intestinal (Jarrige, 1989; Sniffen et al., 1992). De esta manera se expresan los requerimientos de los animales y se caracterizan los alimentos considerando la partición de los nutrientes en el tracto gastrointestinal, diferenciando aquellos disponibles para la fermentación microbiana ruminal de aquellos disponibles para la digestión a nivel del intestino delgado (France et al., 2000).

La degradabilidad ruminal de los nutrientes que componen un alimento, así como las tasas de degradación, caracterizan propiedades intrínsecas de cada alimento. La cantidad de un alimento que se degrada en el rumen es el resultado de las tasas de degradación y de pasaje que actúan y compiten simultáneamente, determinando la proporción de los nutrientes consumidos que serán absorbidos y utilizados por el animal (Mertens, 1993; Van Soest, 1994). La tasa de degradación está muy relacionada también a factores inherentes al animal, como, la tasa de reducción de partículas a través de la rumia, la actividad microbiana y las condiciones ruminales (Lopez, et al., 2000).

Los carbohidratos son la fracción más importante en los alimentos de origen vegetal; en los forrajes representan entre el 50 – 80 % de la materia seca, constituyendo la principal fuente de energía para los rumiantes (Van Soest, 1994). El potencial de consumo de materia seca y la disponibilidad de energía de los forrajes depende de la concentración y digestibilidad de la pared celular (Jung y Allen, 1995). La digestibilidad de la pared celular está limitada a la degradación microbiana que ocurre en el rumen; su potencial de degradación dependerá de la concentración, la composición y la estructura de la misma. El estudio de la cinética de la pared celular en el rumen puede contribuir a predecir la digestibilidad y el valor nutritivo de diferentes combinaciones de forrajes y niveles de alimentación. También, puede ser utilizada para la predicción de la composición de los ácidos grasos volátiles producidos en el rumen, (lo cual es importante para conocer la partición de nutrientes) y para estimar la capacidad de consumo por su relación con los

factores físicos que lo regulan (Mertens, 1993; Stensig et al., 1994; Hvelplund, 1995).

En alimentos concentrados energéticos como los granos de cereales, la principal fuente de energía la constituyen los carbohidratos de reserva, y el aporte de energía dependerá, fundamentalmente, del sitio de digestión. El contenido de almidón y las diferencias en degradabilidad del mismo pueden explicar la variabilidad en productos de la fermentación y en disponibilidad de energía. Las variaciones en los contenidos y composición de pared celular de los granos afectan la energía disponible a nivel ruminal; mientras que en algunos granos, como la avena, la fermentación de sus cubiertas externas contribuyen a la energía digestible, en otros, como trigo y cebada, la degradabilidad de las paredes celulares permitirá la accesibilidad para la fermentación del almidón (Van Barneveld, 1999)

ANTECEDENTES

La cinética de la degradación de los alimentos en el rumen puede abordarse a través de estudios *in vivo* o mediante técnicas *in situ* o *in vitro*. Las determinaciones *in vivo* son las más ajustadas a la realidad y constituyen el patrón de referencia de otros métodos. Aún así, los resultados *in vivo* están restringidos a las condiciones experimentales bajo las cuales se han realizado, son muy difíciles de estandarizar e insumen mucha cantidad de tiempo y labor; por lo que, en general, no son empleados como técnicas de rutina en los laboratorios de evaluación de alimentos. Por tal motivo se han desarrollado otras técnicas como la técnica de la bolsa de nylon *in situ* y técnicas *in vitro* que permiten estimar la cinética de la degradación de los alimentos en el rumen. Cada metodología tiene ventajas y desventajas particulares, pero los resultados dependerán del objetivo de la evaluación y de las características del alimento evaluado (Hungtington y Givens, 1995)

La técnica *in situ* de la bolsa de nylon fue desarrollada primeramente para describir la dinámica de la degradación de la proteína (Orskov, 2000; Broderick y Cochran, 2000; Noziere y Michalet-Doreau, 2000). Existe abundante información generada por esta técnica, fundamentalmente en lo referido a fracciones proteicas; se encuentra incorporada en muchos de los sistemas actuales de evaluación de alimentos (NRC, 2003; Tamminga et al., 1994) y ha sido usada asiduamente como método de referencia para la validación de otros métodos de laboratorio (Hvelplund y Weisbjerg, 2000). Además de describir la cinética del nitrógeno en el rumen, el método también ha sido usado para describir la degradabilidad ruminal de otros componentes de los alimentos como la materia orgánica, la fibra detergente neutro (Silva y Orskov, 1988, Bruno-Soares, 2000), los almidones (Nocek, 1988; Herrera-Saldana, 1990; Pereira y Armentano, 2000; Noziere y Michalet-Doreau, 2000; Orskov, 2000) y también para describir la desaparición ruminal de los minerales en forrajes (Emanuele et al., 1991)

A pesar de estar ampliamente difundida, ha sido objeto de numerosas críticas debido a dificultades en su estandarización y su baja reproducibilidad y repetibilidad (Madsen y Hvelplund, 1994; Noziere y Michalet Doreau, 2000)

Revisiones exhaustivas sobre esta técnica indican que los resultados obtenidos pueden variar con el método de preparación de la muestra, los procedimientos de lavado y secado, el grado y naturaleza de las partículas perdidas, la secuencia y el sitio de incubación, la especie, número y dieta del animal huésped, el tamaño, costura y porosidad de la bolsa y la remoción de la contaminación microbiana (Huntington y Givens 1995; Noziere y Michalet-Doreau, 2000; Orskov, 2000). A su vez, por los costos de los procedimientos quirúrgicos y del mantenimiento de los animales se tornan metodologías caras y laboriosas que son difíciles de implementar como técnicas de rutina (Beever y Mould, 2000)

Los sistemas *in vitro*, para estimar características de los alimentos a nivel ruminal aparecen como metodologías alternativas a los métodos *in situ*. Estos sistemas proveen considerables ahorros en número de animales, cantidad de alimento, labores requeridas y tiempo utilizado en conducir los estudios. Igualmente importante, desde el punto de vista de la ética y el bienestar animal, estas técnicas no utilizan o reducen sustancialmente el número de animales fistulados. A su vez, mediante el uso de los procedimientos *in vitro* se puede mejorar y aumentar la precisión (repetibilidad) de los valores dentro de un mismo laboratorio y la reproducibilidad de los datos entre laboratorios.

En estos antecedentes, serán consideradas las metodologías *in vitro* que estudian la fermentación ruminal de la materia seca y la pared celular a través de la medición del sustrato desaparecido (o técnicas gravimétricas) y sus relaciones con otras metodologías de referencia.

Metodologías *in vitro* para estimar cinéticas ruminales que miden desaparición de sustrato

Dentro de este grupo de metodologías, básicamente, existen dos aproximaciones para simular la fermentación a nivel ruminal: incubaciones del sustrato con un inóculo de licor ruminal o heces (en solución buffer) o incubaciones con preparaciones de enzimas puras o combinaciones de enzimas y/o con microorganismos. Las técnicas enzimáticas para evaluar la degradación escapan a los antecedentes específicos del tema.

El procedimiento general en la mayoría de las metodologías gravimétricas *in vitro* es la medida de la desaparición del sustrato en un punto final (*end-point measurement*), no aportando información sobre cinéticas de digestión ruminal. Varias técnicas fueron desarrolladas para evaluar los alimentos en este sentido: la técnica de dos fases de Tilley y Terry (1963) para determinar la digestibilidad de la materia orgánica, en la cual la fermentación con fluido ruminal es seguida de una digestión con pepsina en medio ácido; la técnica de Goering y Van Soest (1970) para estimar digestibilidad verdadera en la cual se sustituye la digestión con pepsina por una digestión con solución detergente neutra y la técnica de simulación ruminal o "Rusitec" (Czerkawsky, 1986) que incluye la utilización de un rumen artificial, entre otras.

Con el objetivo de simplificar y mejorar la eficiencia en términos de trabajo y tiempo de la estimación de la digestibilidad *in vitro* Tilley y Terry (1963) y Van Soest (1970), la compañía Ankom (Ankom Technology Corporation, Fairport, N.Y) desarrolló una tecnología de fermentación *in vitro* Ankom. Esta tecnología consiste en una cámara de incubación (Daisy¹¹⁻²²⁰) que mantiene una temperatura de 39 °C. En esta cámara se colocan los contenedores de vidrio, los cuales poseen una válvula para escape de gases, que rotan lenta y continuamente. En cada contenedor se pone una mezcla de líquido ruminal y solución buffer en el cual se incuban las muestras de alimentos contenidas en bolsitas de material sintético (bolsas filtrantes Ankom F57). Vogel et al., (1999); Wilman and Adesogan, (2000) demostraron que esta técnica proporciona buenas predicciones en forrajes de la digestibilidad de la MS y FDN (48 h) de Tilley y Terry (1963).

Las técnicas anteriormente mencionadas también tienen la potencialidad de ser usadas para estimar las tasas de degradación (o cinéticas) de los alimentos y nutrientes específicos si se registran las mediciones del residuo indegradado, a través del tiempo (Adesogan, 2002).

Las estimaciones de la cinética de la digestión en condiciones *in vitro*, utilizando inóculo ruminal, se realizan colocando las muestras en tubos, matraces o en bolsitas dentro de incubadores con soluciones buffer mezclados con inóculos de fluidos ruminales y registrando la desaparición de sustrato en sucesivos intervalos de tiempo durante la fermentación del mismo.

Mould y Nordheim (1998) evaluaron el sistema de fermentación *in vitro* Ankom, realizando mediciones repetidas en el tiempo (6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 y 96 h) para estimar degradaciones de la MS y de la FDN de paja de cebada, ensilado de gramínea, heno y gramíneas deshidratadas usando el sistema de fermentación *in vitro* tecnología Ankom. Los autores concluyen que los patrones de degradación de la MS y de la FDN generados resultaron acordes a las características de los alimentos evaluados y que, al registrarse diferencias en la cantidad de residuo indegradado en las bolsitas hasta las 96 horas, se mantiene la actividad enzimática microbiana en los tiempos largos de incubación.

Mandebvu et al., (2001) estudiaron el efecto del cambio de la mezcla licor ruminal y solución buffer a las 48 h en las desapariciones *in vitro* de la MS y de la FDN, en ensilados de maíz y de alfalfa, heno de gramínea y paja de trigo, utilizando la tecnología Ankom. Dichos autores encontraron que el referido cambio incrementó los valores de desaparición *in vitro* de la MS y de la FDN a las 72 horas pero no detectaron modificaciones en las tasas de desaparición de la MS y de la FDN.

La cantidad de sustrato desaparecido (o degradado) así como la tasa a la que desaparece, se ven afectadas por diferencias en las características del medio de incubación (tipo y relación de buffer e inóculos utilizados, concentración microbiana, grado de saturación de CO₂, etc) especialmente durante las fases tempranas de la fermentación (Grant y Mertens, 1991).

Diferentes procedimientos de fermentación *in vitro* fueron evaluadas por Grant y Mertens (1991). Los autores compararon varios procedimientos diferentes de fermentaciones *in vitro*, evaluando paredes celulares de henos de alfalfa y bromus. Los efectos que se estudiaron, en forma combinada, fueron: tipo de recipiente donde se realiza la incubación (matraces de vidrio o tubos de polipropileno); tipo de solución buffer utilizada (con o sin agregado de triptona y microminerales; con o sin adición de solución reductora; solución buffer de McDougalls o solución buffer de Goering y Van Soest); cantidades de fluido ruminal y solución buffer (10:40, 32:8 ml, respectivamente); duración del procedimiento de gaseado con CO₂ (permanente o solo en el momento de la inoculación). Los diferentes procedimientos modificaron la tasa y la cantidad de FDN degradada, siendo el método de gaseado continuo de CO₂ y buffer con agregado de agentes reductores y aditivos, el que produjo mayores tasas de degradación y menores tiempos lag. Una exhaustiva revisión sobre el medio de incubación enfocada a la técnica de producción de gas ha sido publicada por Mould et al (2005a, 2005b), que concluye en la propuesta de un medio de fermentación simplificado. La simplicidad del medio de fermentación puede reducir costos y problemas asociados al suministro de componentes.

La información relativa a comparaciones entre las metodologías gravimétricas, *in vitro* e *in situ*, es escasa y los resultados no son concordantes entre sí.

La comparación de la desaparición de la materia orgánica de un amplio rango de alimentos para rumiantes (fibrosos de alta digestibilidad, fibrosos de baja digestibilidad, concentrados proteicos y concentrados almidonosos) usando la técnica *in situ* de la bolsa de nylon y la técnica *in vitro* Tilley y Terry (1963), realizada por Dewhurst et al., (1995), mostró una sobrestimación de las fermentaciones a favor de la técnica *in situ*. Esta estuvo asociada a la composición en carbohidratos de los distintos alimentos (a mayor contenido de almidón mayor sobrestimación), especialmente en los tiempos cortos o tempranos de la fermentación.

Wilman et al., (1996) estimaron las tasas y las cantidades de pared celular degradadas en ensilajes de gramíneas por cuatro metodologías diferentes, con el objetivo de seleccionar un método biológicamente válido con el cual se pudiera proporcionar información de cinéticas de pared celular con rapidez y bajo costo. Tres de las metodologías probadas consistieron en incubaciones *in situ* durante diferentes tiempos (3, 8, 16, 24, 45 y 72 h) con diferentes procedimientos realizados en las muestras de los ensilajes; la cuarta metodología consistió en una incubación *in vitro* tradicional Tilley y Terry (1963) durante los mismos tiempos de incubación que en *in situ*. Estos autores recomiendan la técnica *in vitro* de Tilley y Terry frente a las *in situ* por presentar menores errores estándares, mejor ajuste a la curva de degradación y mayor capacidad de generar información a menor costo y tiempo.

Scholljederes et al., (2002) compararon el método *in situ* y el sistema de fermentación *in vitro* tecnología Ankom en la determinación de la cinéticas

de degradación de la MO, FDN y N de un heno de bromus. Los datos obtenidos fueron variables, dependiendo del nutriente considerado y del tiempo de incubación en que se realizó la comparación. Las estimaciones de la digestibilidad de la MO *in situ* fueron mayores que las obtenidas *in vitro* a las 15, 24, 36 y 96 horas. A las 3, 36, 48 y 96 horas de incubación los valores de la degradación de la FDN fueron mayores con la metodología *in situ* que con la *in vitro*, mientras que no se encontraron diferencias en la estimación de las fracciones nitrogenadas.

La degradabilidad efectiva de la FDN a 48 horas estimada por la técnica *in situ* y la digestibilidad a las 48 horas por el sistema de fermentación *in vitro* tecnología Ankom de henos de forrajes de zonas montañosas fueron determinados por Spanghero et al., (2003). Los valores de degradabilidad efectiva de la FDN obtenidos mediante la técnica *in situ* (método de referencia) estuvieron altamente correlacionados con los valores de digestibilidad obtenidos por el sistema *in vitro* tecnología Ankom; siendo estos últimos mayores a 53.5%, obtenidos por la técnica de referencia. Además, la variabilidad de las mediciones *in vitro* fueron menores a las obtenidas por el procedimiento de referencia.

Los resultados de Graham y Aman (1984) de la comparación del método *in situ* y de un método *in vitro* (utilizando 10% de fluido ruminal) en la digestión de la materia seca y los carbohidratos estructurales de una paja de cebada mostraron patrones similares en la degradación de los constituyentes de la paja cuando fueron evaluados por los dos métodos. Sin embargo, la tasa y la cantidad de la MS degradada fue menor con la estimación del método *in vitro* que con el método *in situ*.

Varel y Kreikemeier (1994) compararon el método *in situ* y el método *in vitro* tradicional (20% de fluido ruminal) en la determinación de la cinética de digestión de la FDN de forraje de alfalfa y bromus. Los resultados indicaron menores tiempos lag, y mayor tasa de degradación y cantidad de FDN degradada cuando las estimaciones se realizaron con la técnica *in situ*.

Pollard et al., (2006) compararon métodos *in vitro* (tecnología Ankom, método de Tilley y Terry y producción de gas) con métodos *in situ* (usando bolsa de nylon o las bolsas filtrantes F57 Ankom) en la desaparición de la materia seca de distintas fuentes fibrosas para rumiantes. Los resultados del estudio indicaron que los métodos de producción de gas y el método *in situ* usando las bolsas Ankom subestimaron la MS desaparecida respecto al método *in vitro* Tilley y Terry y al *in situ* de la bolsa de nylon.

Los antecedentes estudiados muestran que el uso de el sistema *in vitro* con tecnología Ankom con mediciones repetidas en el tiempo puede constituir una alternativa a los estudios de degradabilidad *in situ* con algunas ventajas importantes. Se presenta como una técnica más sencilla en lo que respecta a la facilidad en el manipuleo de las muestras y al análisis químico de los residuos; así mismo, hay menor variabilidad en las mediciones en este sistema *in vitro* que en el *in situ* (Spanghero et al., 1993) y alta repetibilidad entre los valores registrados para cada tiempo de incubación (Mould y

Nordheim (1988). Sin embargo, es necesario considerar algunas limitaciones de esta técnica. Al igual que la técnica *in situ*, el material con el que está confeccionada la bolsa y el tamaño del poro de la misma son factores muy importantes que pueden afectar el peso del residuo indegradado. A su vez, se pueden generar efectos de digestibilidad asociativa durante las incubaciones en este sistema, como resultado de la presencia de fracciones solubles liberadas de las muestras al estar incubadas en el mismo recipiente (Wilman y Adesogan 2000). Así mismo, las características del inóculo ruminal deben ser tenidas en cuenta, ya que pequeñas variaciones debidas al efecto animal y al procedimiento de muestreo pueden agregarse a las variaciones ocasionadas por el uso de diferentes tipos de buffer, diferentes proporciones relativas de inóculo y medio buffer, diferentes grados de saturación de CO₂ y formas de gaseado, etc (Mould et al., 2005)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los modelos que predicen el valor nutritivo de los alimentos consideran aspectos dinámicos de la degradación de los nutrientes a nivel ruminal (Jarrige, 1989; Nocek y Tamminga, 1991; Sniffen et al., 1992; AFRC, 1993,) y caracterizan los nutrientes no degradados a nivel intestinal (Jarrige, 1989; Sniffen et al., 1992).

Los parámetros de la cinética de fermentación describen la digestión y caracterizan propiedades intrínsecas del alimento (Mertens, 1993) pero además, a nivel ruminal, dependen de un activo crecimiento y desarrollo de la población microbiana. La degradación de un alimento resulta de dos fuerzas competitivas que actúan simultáneamente, la tasa de pasaje y la tasa de degradación (Mertens, 1993; Van Soest, 1994).

La degradabilidad de los carbohidratos a nivel ruminal es un parámetro esencial en la predicción del valor energético de un alimento. El sistema de Cornell (Sniffen et al., 1992) divide los carbohidratos en 4 fracciones de acuerdo a sus tasas de degradación (A, B1, B2 y C) y utiliza los valores de esas fracciones y las tasas de degradación de las mismas para predecir la disponibilidad de nutrientes a nivel ruminal.

En alimentos para rumiantes, los parámetros que definen la cinética de la pared celular así como la cantidad de pared celular que es degradada, son importantes para predecir la disponibilidad de energía a nivel ruminal y también para predecir la capacidad de consumo (Weisberg et al., 1990; Hvelplund, 1994; Stensig et al., 1994).

La información de parámetros que definen la degradabilidad ruminal de alimentos para rumiantes a nivel nacional es muy escasa y ha sido originada empleando la técnica *in situ* (Marichal, com. pers)

El alto costo y el tiempo que insume la evaluación de alimentos mediante esta técnica, son factores que están limitando la generación de información nacional.

Dada la importancia de la caracterización de alimentos para rumiantes, particularmente en las cinéticas de degradación y las alternativas metodológicas que existen para estudiarlas, se plantea la evaluación de una técnica *in vitro* gravimétrica sencilla que puede constituir una alternativa promisoría a la metodología *in situ*.

HIPÓTESIS

Es posible estimar las cinéticas de degradación de alimentos para rumiantes a través de la utilización de una técnica *in vitro* gravimétrica utilizando el incubador Daisy¹¹⁻²²⁰ (sistema *in vitro* tecnología Ankom)

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar una técnica gravimétrica utilizando el sistema *in vitro* tecnología Ankom como alternativa a la técnica *in situ* en la caracterización de alimentos para rumiantes.

Objetivos específicos

1. Estimar y comparar las cinéticas de degradación de la materia seca y de la fibra detergente neutro de varios alimentos mediante las técnicas gravimétricas de fermentación *in situ* e *in vitro* tecnología Ankom.
2. Evaluar una alternativa o modificación de la técnica *in vitro* tecnología Ankom renovando la mezcla de licor ruminal y solución buffer a las 48 horas de incubación.

MATERIALES Y METODOS

1. Alimentos evaluados

El estudio comprendió alimentos de uso común en dietas de rumiantes, seleccionados de manera de abarcar un amplio rango en contenido y composición de la pared celular. Los mismos se agruparon en: a) pasturas frescas: avena (*Avena sativa*), raigrás espontáneo (*Lolium multiflorum*), lotus (*Lotus corniculatus*) y trébol blanco (*Trifolium repens*); b) forrajes secos: paja de cebada (*Hordeum vulgare*) y heno de alfalfa (*Medicago sativa*); c) subproductos agroindustriales: de la industria cervecera (farello seco) y de la elaboración de jugos cítricos (pulpa de citrus desecada) y d) granos de cereales: trigo (var. INTA Tijereta) y sorgo (híbrido Relámpago 55R con alto contenido en taninos).

Las muestras de lotus, heno de alfalfa y paja de cebada fueron proporcionadas secas y molidas por el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía y provenían de ensayos de evaluación nutricional. Las muestras de lotus correspondían a un corte realizado en setiembre de 1996 en estado vegetativo; las de raigrás y trébol blanco fueron cosechadas en primavera del 2003, fugado de cultivos, en estado vegetativo temprano, en la Estación Experimental Sayago de la Facultad de Agronomía. Las muestras de forraje de avena provinieron de un ensayo de asignación de forraje y fueron cosechadas en estado vegetativo a los 45 días del primer pastoreo en la Estación Experimental M. Cassinoni de la Facultad de Agronomía.

Las muestras de farello fresco y pulpa de citrus seca fueron suministradas por la Fábrica Nacional de Cervezas y Azucitrus, respectivamente. El farello húmedo fue sometido a un secado (60 °C) hasta peso constante previo a ser incluido en el ensayo.

Los granos de sorgo y trigo fueron aportados, respectivamente, por las Cátedras de Producción Lechera y de Cereales de la Facultad de Agronomía.

Todas las muestras fueron secadas a 60 °C y molidas a 2 mm usando un molino Wiley para forrajes.

2. Metodologías evaluadas

Se evaluaron 3 métodos para estimar los parámetros de la degradación ruminal de la MS y de la FDN.

Las técnicas evaluadas fueron las siguientes:

- Técnica de la bolsa de nylon *in situ* (IS) - tratamiento testigo
- Técnica *in vitro* gravimétrica utilizando tecnología Ankom (IVA)
- Técnica *in vitro* gravimétrica utilizando tecnología Ankom modificada (IVAm)

Los alimentos evaluados con las tres metodologías fueron: pasturas de leguminosas y gramíneas, heno de alfalfa, paja de cebada y los subproductos agroindustriales. El grano de trigo por presentar muy alta degradación se incubó solamente hasta las 48 h, por lo que no fue evaluado con la metodología *IVAm*. El grano de sorgo se incubó hasta las 96 h en las condiciones *in situ* e *in vitro*, pero debido a la pérdida de los datos en el tratamiento *IVA*, se compararon solamente los métodos *IS* e *IVAm*.

3. Metodología *in situ*

Las estimaciones de degradabilidad *in situ* fueron realizadas utilizando la técnica de la bolsa de nylon descrita por Orskov et al., (1980). Las muestras fueron colocadas en bolsas Ankom 1020 (Ankom Technology Corporation, Fairport, N.Y); las mismas eran de poliéster, de 5 * 9 cm., de poli filamento y con un tamaño de poro promedio de 50+/-15 µm. La relación tamaño de muestra a superficie de bolsa fue de aproximadamente 15mg/cm².

Para las incubaciones se utilizaron tres ovinos machos castrados capones (peso promedio 42 kg), provistos de cánulas ruminales, que se alojaron en bretes individuales. Los animales recibieron heno mezcla de alfalfa y gramíneas (17% de PC y 51 % FDN), a razón de 3% del peso vivo en MS, dos veces al día, teniendo libre acceso a sales minerales¹ y agua; se trataron de acuerdo a las Normas del Comité de Ética de la Universidad de la República.

Las muestras fueron introducidas en el rumen de cada uno de los 3 capones, inmediatamente después de la comida de la mañana, e incubadas durante 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 h en dos momentos diferentes (replicadas en el tiempo).

Se incubó una bolsa sin muestra (blanco) en cada capón a las 48 y 96 h, con el objetivo de ajustar el material entrante en las bolsas, debido a que el valor del blanco fue insignificante (0.01 g) los blancos se despreciaron. La consistencia del ambiente ruminal entre las distintas series de incubaciones fue evaluada incluyendo un heno de alfalfa como estándar de referencia en los todos los tiempos. Los valores estuvieron dentro del rango establecido del estándar.

Previo a la incubación, las bolsas fueron sumergidas en agua (39 - 40 °C, 30 minutos). Posteriormente a su remoción del rumen, fueron sumergidas en agua fría, para minimizar la actividad microbiana, y puestas a congelar. Una vez finalizado el estudio *in situ*, las bolsas fueron lavadas con agua fría en máquina de lavarropa doméstica automática (30l, 30 bolsas/lavado, 2 ciclos de 3 minutos) y secadas en estufa de aire forzado (60 °C, 48 h). Los valores de desaparición al tiempo cero (t_0) fueron estimados por sextuplicado en bolsas sumergidas en agua a 39 – 40 °C durante 30 minutos y manipuladas de manera similar a las incubadas, pero no introducidas en el rumen.

Con los residuos de la incubación de cada alimento y de cada tiempo de incubación se formaron muestras compuestas de las 2 repeticiones en el tiempo por cada capón para los posteriores análisis químicos.

4. Metodologías *in vitro*

4.1. Metodología *in vitro* tecnología Ankom (IVA)

Las estimaciones de degradabilidad *in vitro* de los alimentos fueron realizadas usando el sistema *in vitro* tecnología ANKOM descrito por Mould y Norsheim (1998) utilizándose una bolsa confeccionada de 5 x 3 cm con tela blanca de poliéster de mono filamento con tamaño de poro de 45µm. Aproximadamente 0.5 g de muestra de los distintos alimentos fueron pesados y colocados en las bolsas de poliéster. Las bolsas fueron selladas y expuestas a una digestión *in vitro* por 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 h usando el incubador Ankom DAISY^{II-220} (Ankom Technology Corporation, Fairport, NY) conteniendo 4 frascos o contenedores de digestión de 3.5 l de capacidad que rotaban constantemente en una cámara a 39 °C.

La relación de tamaño de muestra a superficie de bolsa fue la misma que se utilizó en el *in situ* (15 mg MS/cm² de bolsa) y se colocaron entre 22-30 bolsas por cada frasco de digestión.

El procedimiento *in vitro* fue realizado posteriormente al *in situ*, empleándose como donantes los mismos animales y manteniendo las mismas condiciones experimentales del procedimiento *in situ*.

Los termos en los que se recogió el líquido ruminal estaban con agua a 39 °C previo a la recolección y luego de la extracción fueron llevados al laboratorio para el proceso de filtrado. El filtrado se realizó en un baño María a 39 °C y bajo condiciones de CO₂, primero filtrando por 2 capas de gasas, luego por 8 capas y escurriendo bien los sólidos después de cada filtrado. Cada uno de los 4 contenedores del Daisy^{II} se encontraba termostatzado a 39 °C y las muestras fueron incubadas en 1600 ml de una solución buffer de pH entre 6.9 y 7.1 a 39°C. El buffer utilizado consistió en una mezcla de dos soluciones, A y B en proporción 5:1, de acuerdo a la técnica de digestibilidad *in vitro* según el procedimiento recomendado por Ankom (Ankom Technology Corporation, Fairport, NY)

La Solución A (1330 ml) estuvo compuesta por:

KH₂PO₄ - 10g/l;
MgSO₄·7H₂O - 0,5 g/l;
NaCl - 0,5 g/l;
CaCl₂·2H₂O - 0,1 g/l;
Urea - 0,5 g/l;

La Solución B (266 ml) tuvo la siguiente composición:

Na₂CO₃ -15,0 g/l

Na₂S.9H₂O - 1,0 g/l

A cada frasco se le agregó 400 ml de inóculo ruminal bajo condiciones constantes de CO₂, de modo que el inóculo ruminal representó el 20 % de la mezcla buffer y fluido ruminal. Las bolsas con las muestras, en sextuplicado, y una bolsa sin muestra (blanco), fueron introducidas al mismo tiempo en los frascos de digestión conteniendo la mezcla de fluido ruminal y el buffer y fueron removidas a las 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 h bajo condiciones de presencia de CO₂. Debido a la posible influencia de una muestra sobre otra en la fermentación, en cada contenedor se incubaron alimentos pertenecientes al mismo grupo. Cada vez que se abrían los frascos de digestión, para extraer las muestras que culminaban su período de fermentación, se tomaba una pequeña muestra para medir pH, también bajo condiciones de CO₂. El pH de los contenedores fue registrado para cada jarro y para cada tiempo. Las bolsas, una vez retiradas, fueron enfriadas y puestas a congelar. El lavado de las bolsas se realizó junto con los lavados de las bolsas de la metodología *in situ* para no tener variaciones en el procedimiento. Las mediciones de desaparición al tiempo cero fueron realizadas por sextuplicado junto con las estimaciones al tiempo cero del procedimiento *in situ*. Las bolsas conteniendo los residuos de las incubaciones luego de lavadas se secaron a 60 °C hasta peso constante.

4.2. Metodología *in vitro* tecnología Ankom modificada (IVAm)

En la metodología *in vitro* modificada se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, con la particularidad de la sustitución de la mezcla de fluido ruminal y buffer a las 48 horas por una nueva (los frascos de digestión fueron vaciados rápidamente manteniendo las muestras en condiciones de anaerobiosis, agregándose una nueva mezcla de buffer y licor ruminal).

Las determinaciones químicas fueron realizadas en un pool de los 6 residuos de la digestión *in vitro* para cada alimento y para cada tiempo de incubación. En los alimentos de muy rápida degradación (pulpa de citrus y granos de trigo y sorgo) se incubó mayor número de muestras en cada tiempo con el fin de obtener residuo suficiente para los análisis químicos.

5. Análisis químicos

En todos los alimentos evaluados se determinó el contenido de materia seca (MS) por secado de la muestra a 60 °C y a 105 °C, cenizas (C), nitrógeno total (Kjeldahl utilizando standard Lisina ppa) y extracto al éter (EE) según AOAC (1990). Los contenidos de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), y lignina determinada con ácido sulfúrico (Lig_{sa}), fueron determinados con tecnología Ankom (Fiber Analyzer 200, Ankom Technology Corporation, Fairport, N.Y) de forma secuencial (Van Soest et al., 1991). En los forrajes no se empleó sulfito de Na ni alfa amilasa en la

determinación de la FDN. En los subproductos agroindustriales y los granos de cereales se determinó FDN, sin uso de sulfito de Na, pero las muestras se preincubaron durante 18 h con alfa amilasa siguiendo el procedimiento de McQueen y Nicholson (1979). Las fracciones FDN y FDA no fueron corregidas por el contenido de cenizas insolubles.

En los residuos de las incubaciones de las metodologías *in situ* e *in vitro* se determinó MS a 60 °C y FDN. Los procedimientos para la determinación de la FDN en los residuos de las incubaciones *in situ* e *in vitro* fueron iguales que para las muestras de los alimentos originales.

6. Cálculos y análisis estadísticos

A cada alimento evaluado, se le aplicaron 3 metodologías de estimación de cinética de degradación ruminal (*IS*, *IVA* o *IVAm*).

Se realizaron determinaciones a través del tiempo (0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 h) de la desaparición de la MS y la FDN. Para cada metodología evaluada se ajustaron curvas de degradabilidad usando todas las repeticiones y se obtuvieron los parámetros junto con sus errores estándar.

Las estimaciones de los parámetros de las degradabilidades de la MS y de la FDN, en cada método, fueron obtenidas por un procedimiento NLIN de mínimos cuadrados iterativos de los ponderados usando el método Marquardt. El ponderado usado fue el inverso de la varianza (SAS, Versión 8.2., 2000)

El modelo empleado para la estimación de los parámetros fue el de Orskov y Mc Donald (1979):

$$D = a + b (1 - e^{-c \cdot t})$$

donde:

D: degradabilidad potencial de la MS determinada por método *IS*, *IVA* o *IVAm* y degradabilidad potencial de la FDN determinada por *IS*, *IVA* o *IVAm*

a: fracción soluble

b: fracción insoluble potencialmente degradable

c: tasa de degradación

t: tiempo de incubación

Cuando se observó tiempos lag en la degradación de la MS y/o en la degradación de la FDN, se usó el modelo que incluye el tiempo lag de Dhanoa (1988):

$$\begin{aligned} \text{para } t \leq L & \quad D = a \\ \text{para } t > L & \quad D = a + b (1 - e^{-c(t-L)}) \end{aligned}$$

donde:

D: degradabilidad potencial de la MS determinada por método *IS*, *IVA* o *IVAm* y degradabilidad potencial de la FDN determinada por *IS*, *IVA* o *IVAm*

a: fracción soluble

b: fracción insoluble potencialmente degradable

c: tasa de degradación

t: tiempo de incubación

L: tiempo de retraso en el inicio de la digestión ruminal

En todos los modelos (para cada alimento) se probó con el efecto Lag, cuando éste deba un valor de cero, se ajustó sin el lag.

Las degradabilidades efectivas de la MS (DE_{MS}) y de la FDN (DE_{FDN}) fueron calculadas a una tasa de pasaje (kp): 6 %/h de acuerdo a:

$$DE = a + [(b \cdot c) / (c + kp)] \cdot e^{-kpL},$$

donde:

DE: degradabilidad efectiva

a: fracción soluble

b: fracción insoluble potencialmente degradable

c: tasa de degradación

kp : tasa de pasaje

L: tiempo de retraso en el inicio de la digestión

Los parámetros a, b, c y L y las degradabilidades efectivas se compararon entre las distintas metodologías por intervalos de confianza ($\alpha=95\%$) usando los errores estándar de los estimadores obtenidos en el ajuste de las curvas.

El grado de asociación entre los parámetros “a”, “b” y “c” que describen la cinética de degradación, las DE_{MS} y las DE_{FDN} generadas por los métodos *in situ* e *in vitro*, se midieron a través de una análisis de regresión lineal (PROC GLM, SAS, 2000)

Los valores de pH de los tiempos de incubación de 72 y 96 horas de las dos metodologías in vitro evaluadas, *IVA* e *IVAm*, fueron comparados por intervalos de confianza ($\alpha=95\%$) para una media (Steel y Torrie, 1960).

RESULTADOS

1. Caracterización de los alimentos

Los análisis químicos de los alimentos utilizados en este trabajo se presentan en el Cuadro I.

Cuadro I. Composición química de los alimentos^a

Alimentos	MS	PC	FDN ^b	FDA ^b	Lig _{sa}	EE	C	CNF ^c
	(%)	----- (% base seca)-----						
Pasturas								
Trébol blanco	14,4	31,2	30,4	21,3	6,2	5,1	11,0	22,3
Lotus	16,9	30,7	38,3	22,0	9,3	4,6	10,3	16,1
Raigrás	14,0	22,4	52,4	29,4	2,5	5,4	12,5	7,3
Avena	15,8	19,9	47,1	31,4	4,5	3,4	13,0	16,7
Forrajes secos								
Alfalfa, heno	96,9	17,6	59,3	35,7	8,3	4,3	10,9	8,0
Cebada, paja	96,3	2,8	82,4	53,8	7,8	0,9	9,7	4,2
Subproductos agroindustriales								
Farelo de								
Cervecería	20,7	33,9	65,9	23,2	6,2	6,0	3,8	10,2 ^d
Citrus, pulpa	95,4	8,1	27,2	19,0	2,8	3,0	7,3	54,4
Concentrados								
Trigo, grano	96,0	20,0	13,0	3,8	1,2	1,3	2,0	63,7
Sorgo, grano	95,3	8,8	21,5	11,1	5,2	1,3	2,1	66,3

^aMS:materia seca; PC: proteína cruda; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácida Lig_{sa}: lignina determinada por detergente ácido; EE: extracto al éter; C: cenizas totales; CNF: carbohidratos no fibrosos

^b Valores de FDN y FDA sin corrección por las cenizas insolubles

^c CNF: 100-(FDN+PC+EE+C)

^d En la estimación de CNF del farelo se consideró el contenido de FDN corregido (46,1 en lugar de 65,9). Se corrigió considerando un 30% de la FDN como NIDN (dato obtenido de análisis químico del mismo subproducto pero de otra partida)

La información presentada de composición química es similar a las reportadas por tablas de composición química de alimentos para rumiantes (NRC, 2001, INRA, 1995; Mieres, 2004) con excepción de los elevados contenidos de PC del grano de trigo y de FDN del farelo de cerveza. El elevado valor proteico del trigo posiblemente responda a un efecto de la variedad y fertilización nitrogenada. El alto contenido de pared celular en el farelo de cerveza puede deberse a la presencia de compuestos nitrogenados de la pared celular. En este subproducto la proporción de N ligado a la pared celular en la fracción FDSN puede alcanzar valores tan altos como 40% (NRC, 2001). El contenido de NIDN en este subproducto obtenido de la misma fábrica pero de distinta partida, fue de 30 % de la FDN (Marichal et al., inédito).

La cantidad y características de los carbohidratos de los alimentos evaluados fueron diversas. Los carbohidratos estructurales contenidos en la pared celular, variaron de 13 % en el grano de trigo hasta 82% en la paja de

cebada, mientras que los carbohidratos no fibrosos variaron de 4 % en la paja de cebada a 66% en el grano de sorgo. El alto valor de carbohidratos no fibrosos en la pulpa de citrus (54%) estaría explicado por el contenido de azúcares y pectinas, que si bien no se determinaron en este trabajo, son elevados; el contenido de pectinas puede representar hasta 40% de la pared celular (Bampidis y Robinson, 2006).

La relación contenido orgánico celular (sustrayendo las cenizas) a pared celular, fue diferente entre los alimentos. En algunos alimentos (pulpa de citrus, granos de trigo y de sorgo, y pasturas leguminosas) el contenido orgánico celular fue mayor que la pared, encontrándose dentro de este grupo, además diferencias en esta relación. Las pasturas leguminosas presentaron 1.9 y 1.3 veces (trébol blanco y lotus, respectivamente) más contenido celular que pared; la pulpa de citrus 2.4 veces más, mientras que el grano de sorgo y el grano de trigo presentaron 3.5 y 6.5 veces más contenido celular que pared, respectivamente. La relación contenido celular orgánico a pared celular no llegó a la unidad en las pasturas gramíneas, el heno de alfalfa y el farelo de cervecería (0.76, 0.5 y 0.46, para gramíneas, heno de alfalfa y farelo de cervecería, respectivamente). En la paja de cebada el escaso contenido celular (8 %) define una relación contenido celular a pared celular de 0.01.

En referencias a los componentes de la pared celular, el contenido de hemicelulosas (estimado como la diferencia entre la FDN y la FDA) en relación al contenido total de pared celular varió entre 30 y 44% en los forrajes y la pulpa de citrus, mientras que en farelo y los granos de sorgo y trigo esta proporción fue 50, 48 y 71 %, respectivamente. El alto contenido en hemicelulosas de las paredes celulares de los granos cerealeros está representado principalmente por pentosanas poco digestibles (Sauvant y Michalet-Doreau, 1989). El contenido en celulosas (estimado como la diferencia entre FDA y Lig_{sa}) en relación al contenido total de FDN varió entre 20 y 28 % en los granos de cereales, entre 33 y 57 % en las pasturas, forrajes secos y farelo, mientras que alcanzó el 59 % en la pulpa de citrus. La mayor diferencia entre alimentos en los componentes de la pared celular fue observada para el contenido de Lig_{sa} en relación a la pared total. Los valores más altos fueron observados para las pasturas leguminosas, el heno de alfalfa y el grano de sorgo (24, 20, 14 y 24 % en lotus, trébol blanco, heno de alfalfa y sorgo, respectivamente), mientras que valores entre 9 y 10% fueron observados en pastura de avena, paja de cebada, pulpa de citrus y grano de trigo; el valor menor de Lig_{sa} /FDN lo presentó la pastura de raigrás (5%). Está bien documentado (Hacker, 1982; Van Soest, 1994) que el contenido de lignina de las paredes celulares de las leguminosas es mayor que el de las gramíneas, aunque la magnitud de la diferencia resulta mayor que la real debido al método comúnmente empleado para determinar lignina (Hatfield et al., 1994). El alto contenido de taninos del híbrido de sorgo estudiado posiblemente esté asociado a los altos contenidos de Lig_{sa} de la pared celular.

Los materiales incluidos en el ensayo proporcionaron un amplio rango en el contenido y constitución de la FDN lo que permitió las comparaciones de las

características de la fermentación ruminal entre las técnicas y los diferentes alimentos o grupos de alimentos.

2. Valores de pH durante las incubaciones *in vitro*

El pH de los fluidos ruminales extraídos de los capones para las distintas corridas de la metodología *in vitro* fue de 7,2 (DE: 0,08), mientras que el pH de las mezclas (buffer más fluido ruminal) introducidas en los frascos incubadores del Daisy^{II} fue de 7,06 (DE: 0,09). Los valores promedio de pH registrados durante el transcurso de las incubaciones para las diferentes corridas variaron entre 6,6 y 6,8 (Cuadro II). Los valores de pH del inóculo al inicio así como los registrados durante las incubaciones no presentaron diferencias ($p < 0.05$) entre las diferentes corridas, sin embargo, el valor de pH promedio durante las incubaciones a las 72 y 96 horas en la metodología IVA fue mayor ($p < 0.05$) que el valor registrado en la metodología IVAm para las mismas horas (7.01 y 6.59, respectivamente).

Cuadro II. Valores de pH del inóculo inicial y promedio durante el transcurso de las incubaciones.

Valores de pH del inóculo			
Corrida	Inicial	Promedio	ES
1	7,13	6,78	0,071
2	6,90	6,71	0,070
3	7,09	6,67	0,055
4	7,13	6,62	0,042
5	7,12	6,77	0,042
6	7,07	6,61	0,065
Recambio Inóculo	7,12		
7	6,90	6,81	0,040
Recambio Inóculo	7,08		
Promedio	7,06		

ES: Error estándar

3. Cinética de degradación de las pasturas

3.1. Cinética de la degradación *in situ* de la MS

En la Figura 1 se muestran las curvas de la MS desaparecida en las distintas horas de incubación estimadas por la metodología *in situ* (IS) para las pasturas leguminosas y gramíneas. La figura evidencia las diferencias en la

cinética de la degradación ruminal de la MS de las distintas pasturas que resultan en parámetros de degradabilidad diferentes ($P < 0.05$) (Cuadro III).

Se registran diferencias ($P < 0.05$), entre las pasturas, en las fracciones solubles (“a”), en las potencialmente degradable (“b”), en las tasas de degradación ruminal (“c”) y en la presencia y duración de tiempos lag.

Las fracciones solubles de las leguminosas fueron mayores ($P < 0.05$) que las fracciones solubles de las gramíneas, y las fracciones potencialmente degradable de las gramíneas fueron mayores ($P < 0.05$) que las de las leguminosas. La fracción “a” del trébol blanco (45%) fue mayor ($P < 0.05$) que la del lotus (41 %), la cual fue mayor ($P < 0.05$) que la del raigrás (38%) y avena (36%). La fracción potencialmente degradable del raigrás (53%) y la avena (50%) fueron similares ($P > 0.05$) y mayores ($P < 0.05$) que las de trébol blanco (45%) y lotus (44%), no observándose diferencias ($P > 0.05$) en los fracciones “b” entre las dos leguminosas.

Las tasas de desaparición de la MS de las leguminosas fueron mayores ($P < 0.05$) que las de las gramíneas siendo mayor ($P < 0.05$) en el trébol blanco (35.0 %/h) que en el lotus (16.7%/h), estas a su vez fueron mayores ($P < 0.05$) que en las dos gramíneas evaluadas, las cuales mostraron valores similares ($P > 0.05$) (7.9 y 7.4 %/h, en avena y raigrás, respectivamente).

En la cinética de degradación de la MS de las pasturas se estimaron tiempos lag que no diferían ($P > 0.05$) de cero hora en lotus y raigrás, mientras que en avena y trébol blanco en el modelo, al no observarse un tiempo de retraso en el inicio de la digestión, no se incluyó el tiempo lag.

3.2. Comparación de las cinéticas *in situ* e *in vitro* de la MS

La cinética de la degradación *in situ* de la MS fue diferente de la cinética estimada por el sistema *in vitro* tecnología Ankom (IVA) y de la estimada por el sistema *in vitro* tecnología Ankom modificada (IVAm) (Figura 2 y Figura 3; Cuadro IV). En las leguminosas evaluadas, no se observaron diferencias ($P > .05$) entre las metodologías en la estimación de la fracción “a” ($42,8 \pm 2,0$ %) ni de la fracción “b” ($43,5 \pm 1,8$ %). En las gramíneas, tampoco existieron diferencias ($P < 0.05$) en la fracción “a” pero sí las hubo en la fracción “b” al estimarla por las diferentes metodologías. En avena, los métodos evaluados generaron valores diferentes de la fracción “b” (50, 45 y 42 %, para IS, IVAm e IVA, respectivamente). En raigrás, las metodologías IS e IVAm estimaron similar valor de “b” (52%) y mayores ($P < 0.05$) que el valor estimado (41%) por IVA.

En las leguminosas, las tasas de desaparición estimadas por las metodologías *in vitro* (IVA e IVAm) fueron similares entre sí y menores ($P < 0.05$) que las estimadas por IS, en trébol blanco (5.1 y 5.4 vs. 34.1%/h, respectivamente) y en lotus (5.1 y 5.3 vs. 14.7%/h, respectivamente).

En avena, no se observaron diferencias ($P > 0.05$) en la estimación de las tasas para las distintas metodologías (8.4, 7.1 y 7.9 %/h, para IVA, IVAm e

IS, respectivamente), mientras que en raigrás la tasa de desaparición estimada por *IVA* (9.5%/h) fue mayor ($P < 0.05$) que la estimada por *IVAm* (6.3%/h), generando la metodología *IS* una tasa intermedia (7.4 %/h) que no difirió de las estimadas por *IVA* e *IVAm*.

Cuadro III. Parámetros * de la degradabilidad *in situ* de la MS de los alimentos

Alimentos	a (%)	ES	b (%)	ES	c (%/h)	ES	L (h)	ES	R ²
Pasturas									
Trébol Blanco	45,6 ^a	0,33	45,2 ^b	0,39	34,1 ^a	1,54	S/L	-	0,94
Lotus	41,1 ^a	0,36	43,5 ^b	0,60	14,7 ^b	0,95	1	0,38	0,97
Avena	35,7 ^b	0,69	50,1 ^a	1,10	7,9 ^c	0,46	S/L	-	0,97
Raigrás	38,4 ^b	0,50	52,6 ^a	0,68	7,4 ^c	0,41	0	0,27	0,98
Forrajes secos									
Alfalfa, heno	18,8 ^a	0,24	44,2 ^a	0,62	8,1 ^a	0,57	0	0,34	0,97
Cebada, paja	9,6 ^b	0,15	47,8 ^a	3,01	2,3 ^b	0,31	0	0,39	0,98
Subproductos									
Farelo de cervecería	14,3 ^b	0,19	53,1 ^b	0,74	7,3 ^b	0,38	S/L	-	0,95
Cítrus, pulpa	38,2 ^a	0,33	57,6 ^a	0,37	34,9 ^a	2,98	S/L	-	0,91
Granos									
Trigo, grano	22,5 ^a	0,73	70,7 ^a	0,77	55,5 ^a	2,10	S/L	-	0,95
Sorgo, grano	24,9 ^a	0,47	63,8 ^b	0,66	3,5 ^b	0,19	S/L	-	0,97

*parámetros: a: fracción soluble; b: fracción potencialmente degradable; c: tasa de degradación de la fracción b y L: tiempo lag.

R²: coeficiente de determinación

ES: error estándar

^{a,b}: en cada grupo de alimentos, valores con letras diferentes en las columnas difieren ($P < 0.05$)

S/L: modelo que no incluyó lag debido a la observación de los datos realizada previamente

Sólo en las metodologías *in vitro* se observó un tiempo de retraso en el inicio de la digestión en las cuatro pasturas consideradas. En lotus y avena se observaron valores de 5 a 6 horas mientras que en trébol blanco y raigrás los tiempos lag fueron de 1 a 2 horas.

3.3. Cinética de la degradación *in situ* de la FDN

En la Figura 4 se muestra las curvas de la cinética de la degradación de la FDN estimada por la metodología *in situ* (*IS*) para las pasturas de leguminosas y de gramíneas. Las figuras muestran curvas de desaparición de FDN diferentes entre las pasturas, y los parámetros que definen dichas

curvas de desaparición también son diferentes entre las pasturas (Cuadro V).

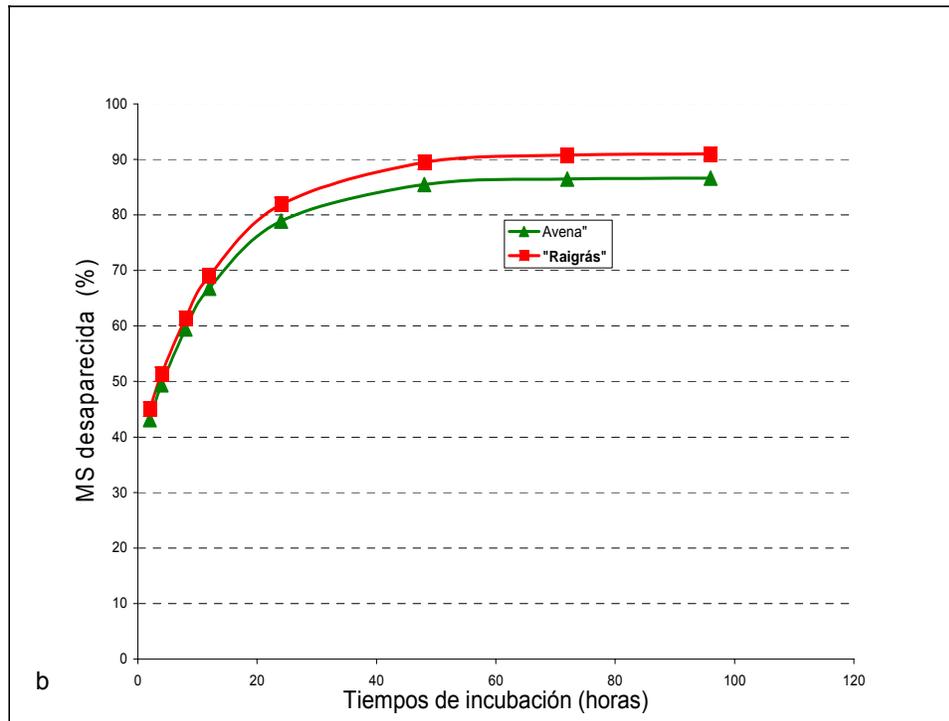
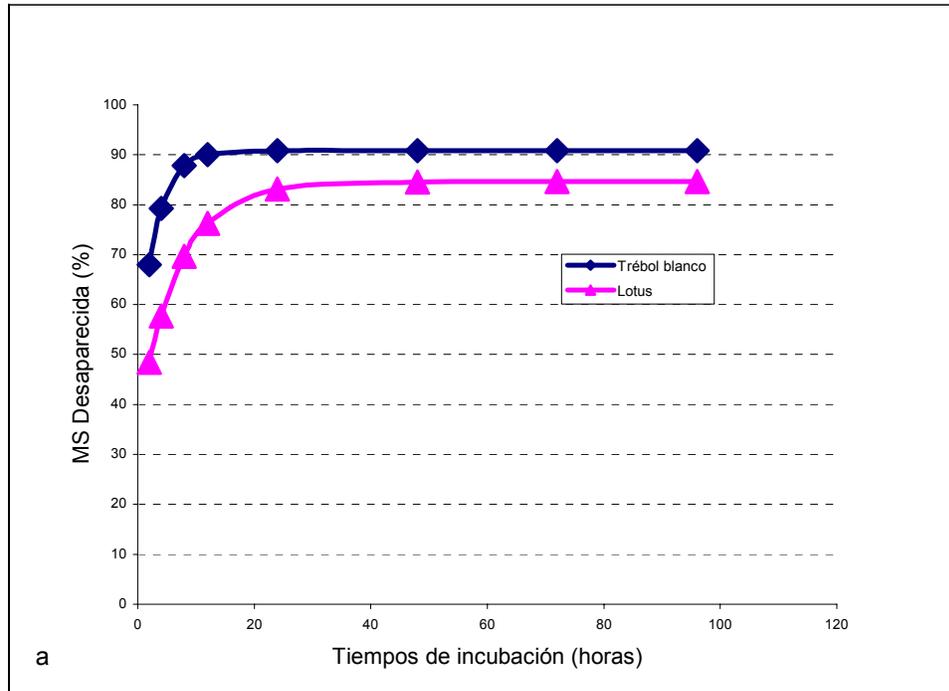


Figura 1. Degradabilidad *in situ* de leguminosas (a) y de gramíneas (b) (MS: materia Seca)

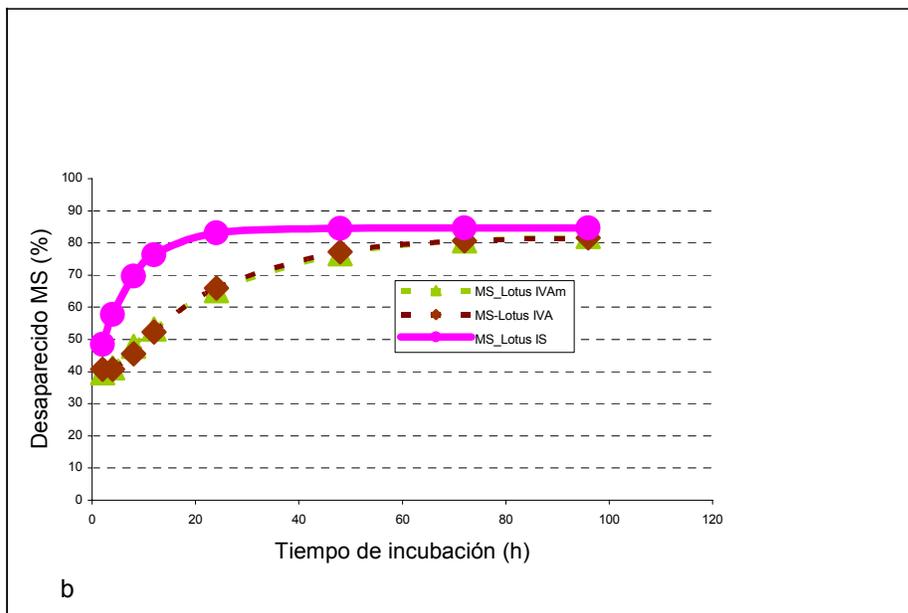
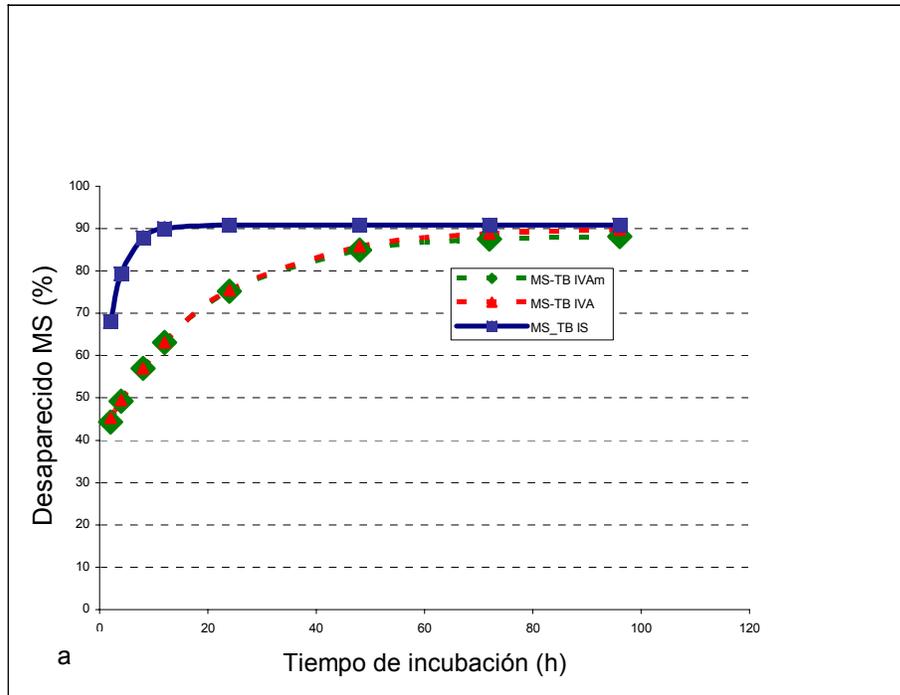


Figura 2. Degradabilidad de la MS de trébol blanco (a) y de lotus (b) para las diferentes metodologías (MS: materia seca; TB: trébol blanco; IS: in situ; IVA: in vitro Ankom; IVAm: in vitro Ankom modificado)

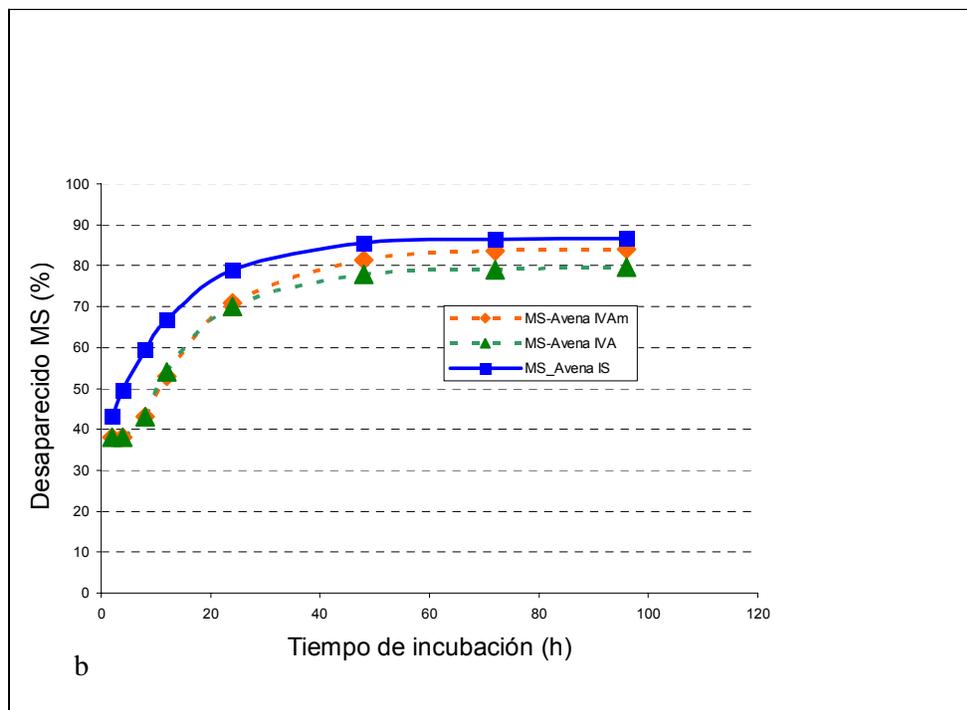
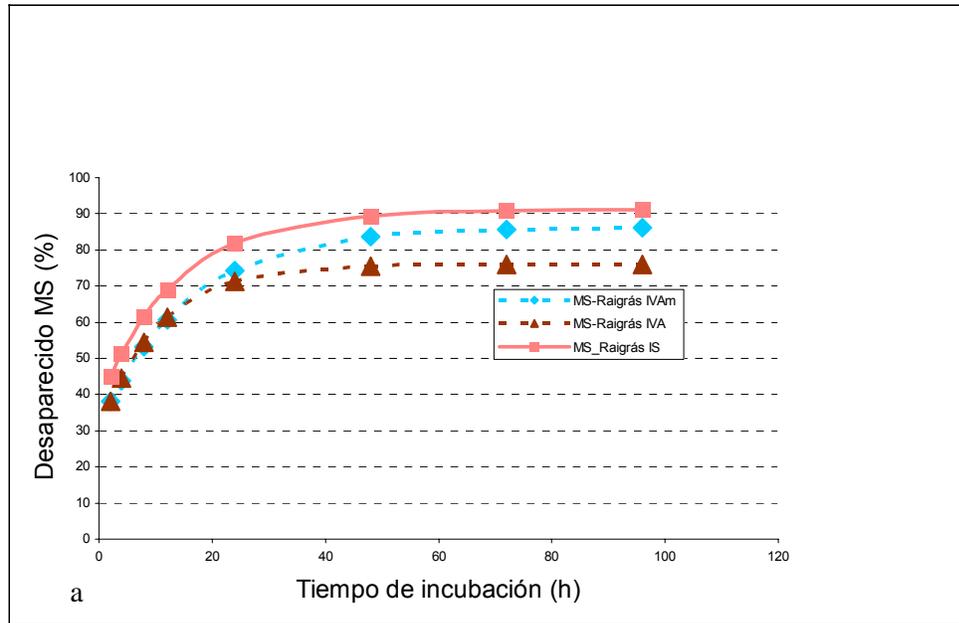


Figura 3. Degradabilidad de la MS de raigrás (a) y avena (b) para las diferentes metodologías (MS: materia seca; IS: in situ; IVA: in vitro Ankom; IVAm: in vitro Ankom modificado)

En raigrás, trébol blanco y avena no se registraron diferencias en las fracciones solubles (14, 12 y 8 %, respectivamente); en las fracciones potencialmente degradables, el raigrás presenta mayor ($P < 0.05$) fracción “b” que el trébol blanco (76 y 71 %/h respectivamente), siendo la fracción “b” de la avena un valor intermedio que no difiere de ambos (75%/h).

En lotus, la fracción soluble (7%) fue menor ($P < 0.05$) que en trébol blanco y el raigrás y no difirió ($P > 0.05$) de la avena; mientras que la fracción “b” del lotus (66%) fue la menor ($P < 0.05$) de todas las pasturas.

Las gramíneas presentaron tasas de desaparición de FDN (7.7 y 6.3 %/h, en avena y raigrás, respectivamente) similares ($P > 0.05$) y menores ($P < 0.05$) que las leguminosas, siendo mayor ($P < 0.05$) la tasa de desaparición de FDN en trébol blanco (21.3 %/h) que en lotus (13.1%/h) (Cuadro V).

El modelo estimó tiempos lag en el entorno de 1 h en lotus, avena y Raigrás, mientras que en trébol blanco en el modelo no se incluyó el lag (Cuadro V).

2.4. Comparación de las cinéticas *in situ* e *in vitro* de la FDN

La estimación de los parámetros de la cinética de la degradación de la FDN generada por las metodologías evaluadas (*IS*, *IVA* e *IVAm*) fue diferente entre las pasturas (Cuadro VI) (Figura 5)

En avena, la metodología *IS* y las *in vitro* generaron valores similares ($P > 0.05$) para la fracción “a” ($7 \pm 1,0$ %) y la fracción “b” ($71,5 \pm 4,2$ %).

En referencia a la fracción “a”, en trébol blanco, lotus y raigrás, los valores fueron en el entorno de 0 en las metodologías *in vitro*, en contraposición con la metodología *in situ* que estimó valores de 12%, 7% y 14% en trébol blanco, lotus y raigrás, respectivamente. En lotus, la fracción “b”, no mostró diferencia en los valores generados a partir de la metodología *in situ* (66%) o *in vitro* (*IVA*: 66%; *IVAm*: 68%). En trébol blanco, la fracción potencialmente degradable estimada por la metodología *IS* (71%) fue menor ($P < 0.05$) que la estimada por las *in vitro* no registrándose diferencias entre las metodologías *IVA* (80%) e *IVAm* (78%). La metodología *IS* (76%) generó, en raigrás, un valor similar al generado por la metodología *IVA* (76%) pero menor ($P < 0.05$) que la metodología *IVAm* (80%) (Cuadro VI).

Las tasas de desaparición estimadas por *IVA* e *IVAm* fueron menores ($P < 0.05$) que las estimadas por *IS* en trébol blanco (4.3, 4.6 vs. 21.3 %/h, respectivamente), en lotus (5.1, 4.8 vs. 13.1 %/h, respectivamente), y en avena (5.0 y 5.5 vs. 7.7 %/h, respectivamente) mientras que, no se observaron diferencias ($P > 0.05$) en la estimación de las tasas entre las distintas metodologías en raigrás (Cuadro VI y Figuras 5 y 6).

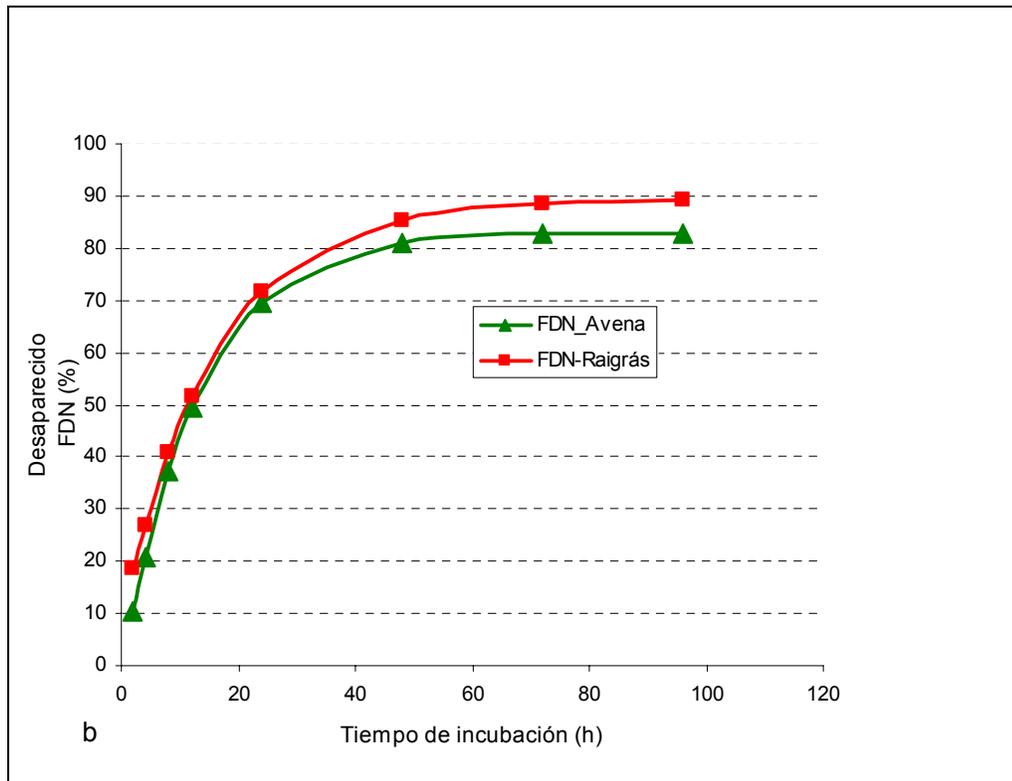
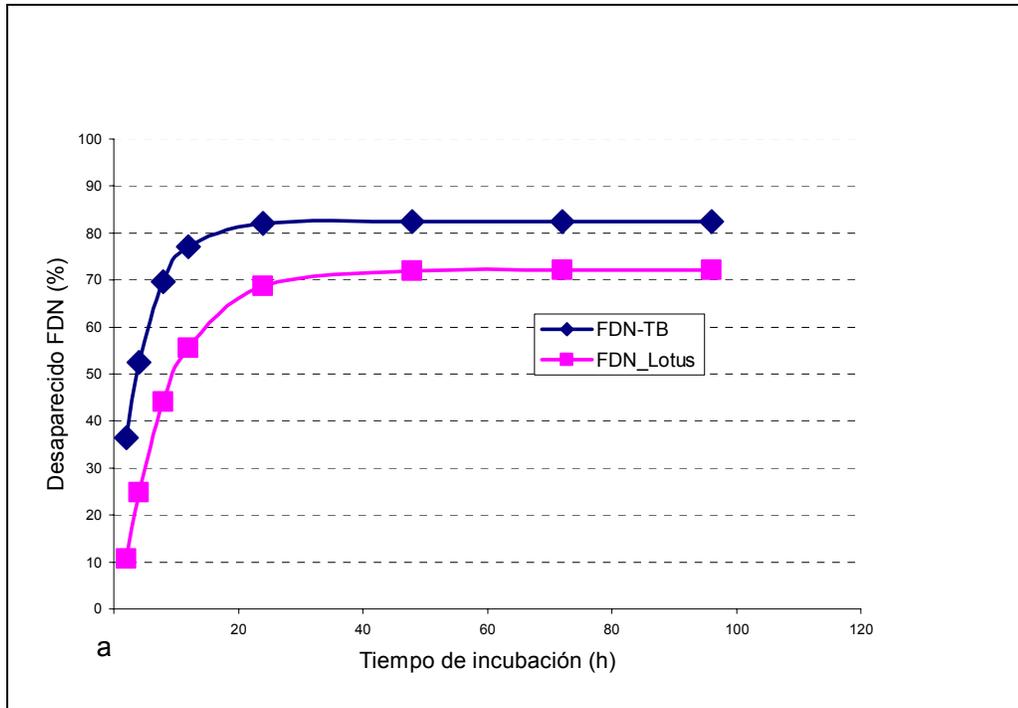


Figura 4. Degradabilidad in situ de la FDN de leguminosas (a) y gramíneas (b) (FDN: fibra detergente neutro; TB: trébol blanco)

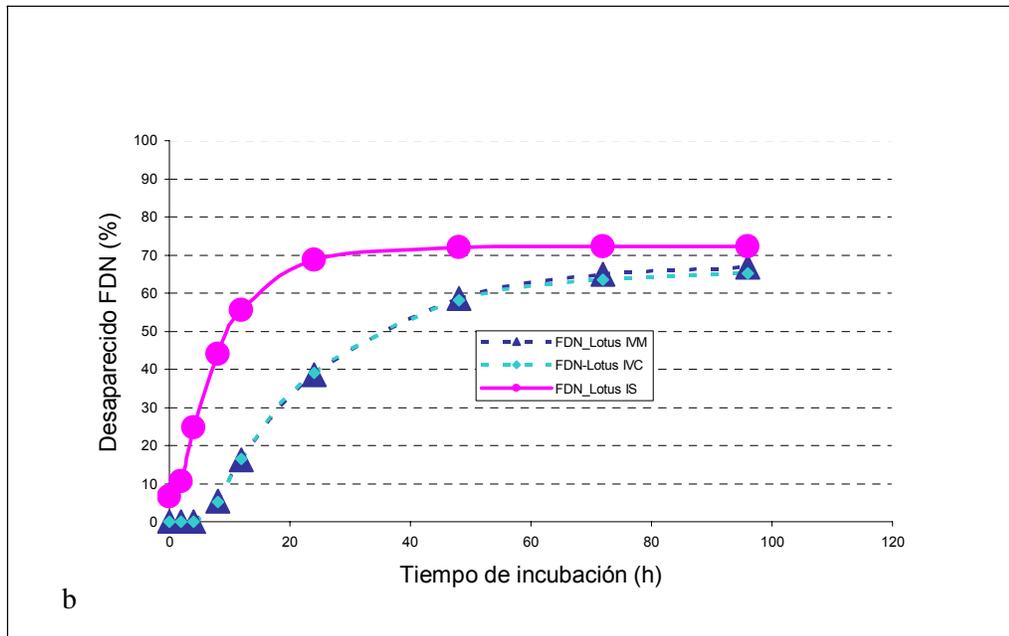
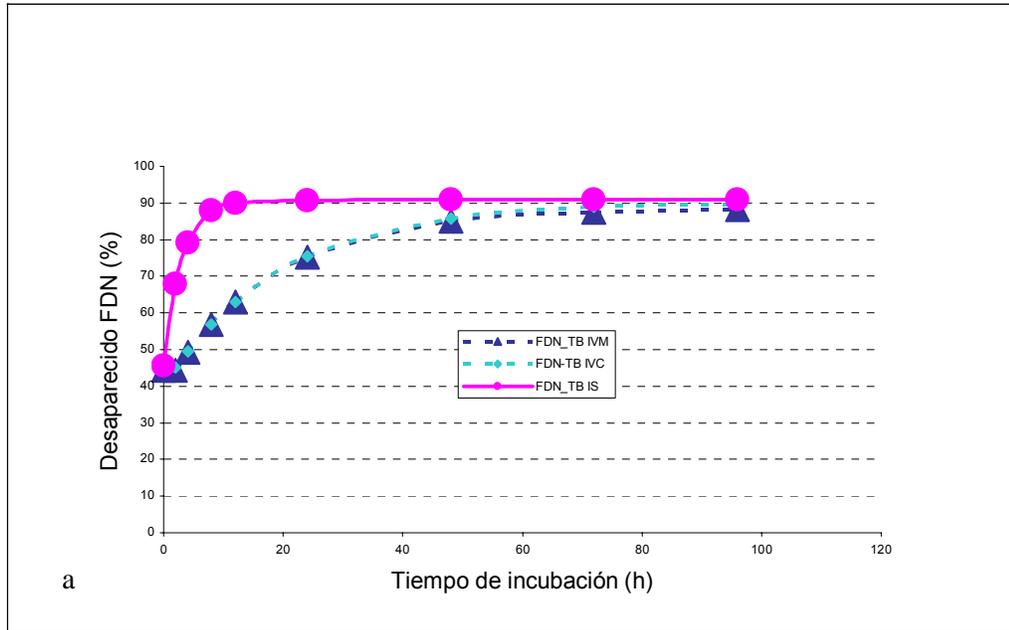


Figura 5. Degradabilidad de la FDN de trébol blanco (a) y lotus (b) para las diferentes metodologías (FDN: fibra detergente neutro; IS: in situ; IVA: in vitro Ankom; IVAm: in vitro Ankom modificado)

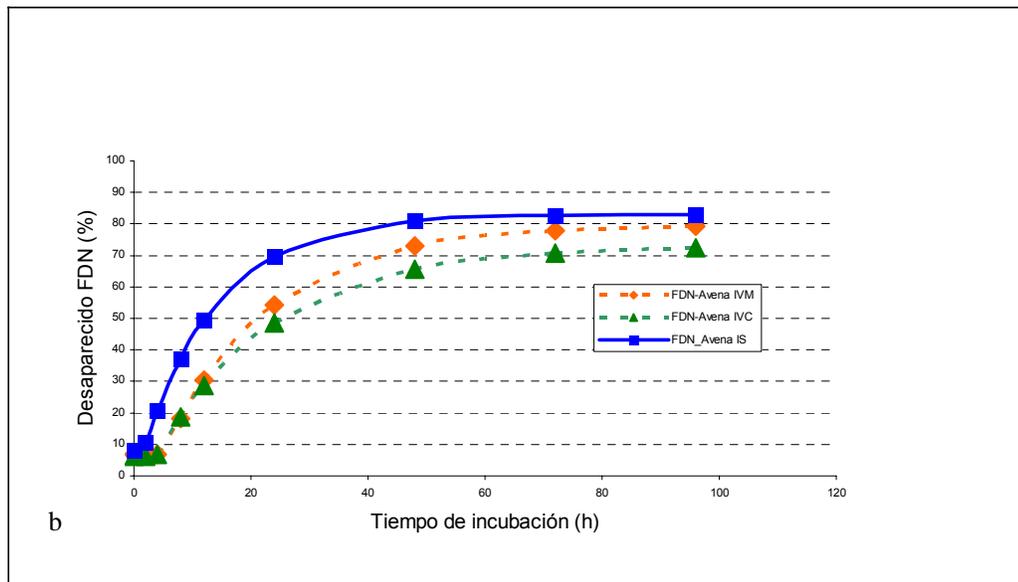
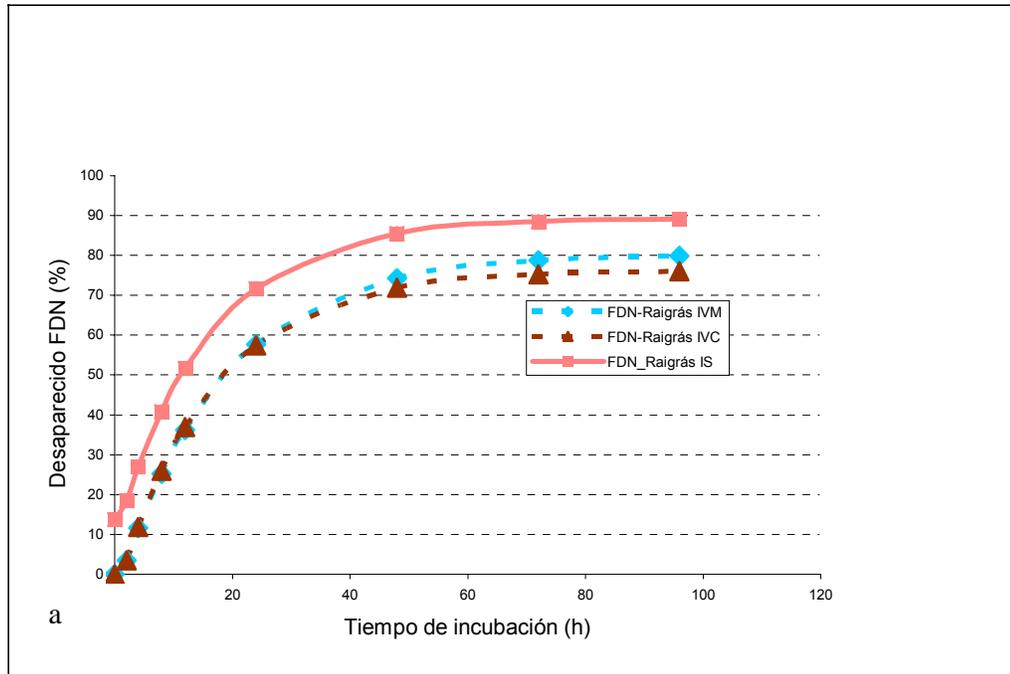


Figura 6. Degradabilidad de la FDN de raigrás (a) y avena (b) para las diferentes metodologías (FDN: fibra detergente neutro; IS: in situ; IVA: in vitro Ankom; IVAm: in vitro Ankom modificado)

Se observaron mayores ($P < 0.05$) duraciones de los tiempos lag con las técnicas *in vitro* en lotus (6 horas) y avena (4 horas) que con *IS* (1,5 h). Para trébol blanco ninguna metodología determinó un tiempo lag diferente ($P \leq .05$) de 0 h y en raigrás las estimaciones fueron similares ($P > 0.05$) y en el entorno de 1 h.

4. Cinética de degradación de los forrajes secos

4.1. Cinética de la degradación *in situ* de la MS

Las curvas de degradación de la MS del heno de alfalfa y la paja de cebada así como los parámetros de la cinética de degradación se presentan en la Figura 7a y en el Cuadro III.

El heno de alfalfa presentó un valor de fracción soluble de 19 %, 44 % para la fracción potencialmente degradable y una tasa de degradación de la fracción potencialmente degradable de 8.1 %/h (Cuadro III).

La paja de cebada presentó 10% de fracción “a”, 48% de fracción “b” y una lenta tasa de degradación “c” (2.3%/h).

En ambos forrajes, los modelos ajustaron sin tiempo lag.

4.2. Comparación de las cinéticas *in situ* e *in vitro* de la MS

En el heno de alfalfa y en la paja de cebada, los valores de la fracción soluble (18 y 9.5 %, respectivamente) y fracción potencialmente degradable (44 y 52 %, respectivamente) generados a partir de las metodologías *in situ* e *in vitro* no fueron diferentes ($P < 0.05$) (Cuadro IV) (Figura 8)

Se detectaron diferencias en las tasas de la degradación del heno de alfalfa estimadas por los diferentes métodos, siendo similares ($P > 0.05$) los valores de “c” en los métodos *IS* (8.1%/h) e *IVA* (6.6%/h) y mayores ($P < 0.05$) que los estimados por *IVAm* (4.7%). En la paja de cebada los valores de las tasas fueron similares ($P > 0.05$) para las metodologías *IS*, *IVA* e *IVAm* (2.3, 1.3 y 1.4 %/h, respectivamente) (Cuadro IV).

En referencia al tiempo lag, en el heno de alfalfa no se identificaron en ninguna de las metodologías. En la paja de cebada, con la metodología *IS* no se estimaron tiempo lag, mientras que con *IVA* e *IVAm* se estimaron tiempos lag similares ($P > 0.05$) y de 6.5 y 7.5 horas de duración para *IVA* e *IVAm*, respectivamente (Cuadro IV).

4.3. Cinética de la degradabilidad *in situ* de la FDN

La cinética de la degradación *in situ* de la pared celular del heno de alfalfa y la paja de cebada así como los parámetros que describen la cinética se presentan en la Figura 7b y en el Cuadro V.

Cuadro IV. Parámetros* de degradabilidad de la MS de los distintos alimentos para los diferentes métodos**.

Alimentos	a (%)	ES	b (%)	ES	c (%/h)	ES	L (h)	ES	R ²
Pasturas									
Trébol Blanco									
IS	45,6 ^a	0,33	45,2 ^a	0,39	34,1 ^a	1,54	S/L	-	0,94
IVA	44,4 ^a	0,84	45,8 ^a	1,01	5,1 ^b	0,26	1,6 ^a	0,40	0,96
IVAm	44,4 ^a	0,86	44,3 ^a	0,88	5,4 ^b	0,24	1,7 ^a	0,40	0,94
Lotus									
IS	41,1 ^a	0,4	43,5 ^a	0,60	14,7 ^a	0,95	1 ^b	0,38	0,97
IVA	40,8 ^a	0,41	41,3 ^a	0,72	5,1 ^b	0,53	5,6 ^a	0,57	0,98
IVAm	40,8 ^a	0,42	41,1 ^a	0,93	5,3 ^b	0,60	5,7 ^a	0,57	0,98
Avena									
IS	35,7 ^a	0,69	50,1 ^a	1,10	7,9 ^a	0,46	S/L	-	0,97
IVA	37,8 ^a	0,36	41,9 ^c	1,12	8,4 ^a	0,81	6,3 ^a	0,23	0,96
IVAm	37,8 ^a	0,33	46,1 ^b	0,54	7,1 ^a	0,59	6,2 ^a	0,22	0,96
Raigrás									
IS	38,4 ^a	0,50	52,6 ^a	0,68	7,4 ^{ab}	0,41	0 ^b	0,27	0,98
IVA	35,0 ^a	1,10	40,9 ^b	1,22	9,5 ^a	1,06	1,2 ^a	0,32	0,95
IVAm	35,0 ^a	0,66	51,2 ^a	0,81	6,3 ^b	0,37	1,0 ^a	0,23	0,97
Forrajes secos									
Alfalfa, heno									
IS	18,8 ^a	0,24	44,2 ^a	0,62	8,1 ^a	0,57	0	0,34	0,97
IVA	17,3 ^a	0,65	42,7 ^a	0,74	6,6 ^a	0,49	S/L	-	0,97
IVAm	18,5 ^a	0,71	45,7 ^a	0,86	4,7 ^b	0,36	S/L	-	0,97
Cebada, paja									
IS	9,6 ^a	0,15	47,8 ^a	3,01	2,3 ^a	0,31	0 ^b	0,39	0,98
IVA	9,4 ^a	0,47	50,1 ^a	12,77	1,3 ^a	0,61	6,5 ^a	1,35	0,94
IVAm	9,4 ^a	0,49	56,8 ^a	8,11	1,4 ^a	0,40	7,5 ^a	0,87	0,95
Subproductos									
Farelo de cervecería									
IS	14,3 ^b	0,19	53,1 ^a	0,74	7,3 ^a	0,38	S/L	-	0,95
IVA	19,7 ^a	0,67	45,8 ^b	1,76	2,1 ^b	0,22	S/L	-	0,96
IVAm	20,0 ^a	0,76	69,3 ^a	8,50	1,2 ^b	0,25	S/L	-	0,96
Citrus, pulpa									
IS	38,2 ^a	0,33	57,6 ^a	0,37	34,9 ^a	2,98	S/L	-	0,91
IVA	38,6 ^a	1,09	55,2 ^a	1,11	6,0 ^b	0,33	S/L	-	0,88
IVAm	38,5 ^a	1,08	55,1 ^a	1,11	6,1 ^b	0,36	S/L	-	0,88
Subproductos									
Trigo, grano									
IS	22,5 ^a	0,73	70,7 ^a	0,77	55,5 ^a	2,10	S/L	-	0,95
IVA	24,1 ^a	0,77	68,0 ^a	0,81	20,1 ^b	0,56	S/L	-	0,98
Sorgo, grano									
IS	24,9 ^a	0,47	63,8 ^a	0,66	3,5 ^a	0,19	S/L	-	0,97
IVAm	24,4 ^a	0,48	62,9 ^a	1,08	3,1 ^a	0,19	5,5	0,48	0,99

*parámetros: a: fracción soluble; b: fracción potencialmente degradable; c: tasa de degradación de la fracción b y L: tiempo lag. S/L: modelo que no incluyó lag.

**IS, IVA e IVAm: métodos in situ, in vitro tecnología Ankom e in vitro tecnología Ankom modificado

R²: coeficiente de determinación, ES: error estándar

^{a,b}: en cada grupo de alimentos, valores con letras diferentes en las columnas difieren (P<0.05)

Cuadro V. Parámetros* de degradabilidad *in situ* de la FDN de los distintos alimentos.

Alimentos	a (%)	ES	b (%)	ES	c (%/h)	ES	L (h)	ES	R ²
Pasturas									
Trébol Blanco	12,07 ^a	0,42	70,5 ^b	0,68	21,26 ^a	0,96	S/L	-	0,97
Lotus	6,62 ^b	0,61	65,5 ^c	1,06	13,1 ^b	0,69	1,51 ^a	0,16	0,98
Avena	8,18 ^b	2,04	74,8 ^{ab}	2,33	7,7 ^b	0,41	1,59 ^a	0,38	0,98
Raigrás	13,7 ^a	0,81	75,6 ^a	1,03	6,3 ^b	0,34	0,96 ^a	0,31	0,98
Forrajes secos									
Alfalfa, heno	5,6 ^a	0,33	49,0 ^a	0,84	6,0 ^a	0,48	0 ^a	0,38	0,97
Cebada, paja	5,3 ^a	0,12	54,4 ^a	2,63	2,2 ^b	0,24	1,69 ^a	0,28	0,97
Subproductos Agroindustriales									
Farelo de cervecería	9,8 ^b	0,28	56,4 ^b	0,89	5,07 ^b	0,40	S/L	-	0,95
Citrus, pulpa	22,4 ^a	0,40	66,3 ^a	0,59	33,0 ^a	3,14	S/L	-	0,88
Granos									
Trigo, grano	23,2 ^a	0,37	37,8 ^a	-	s/a	-	s/a	-	s/a
Sorgo, grano	9,51 ^b	0,90	38,1 ^a	1,16	13,7	1,05	S/L	-	0,84

*parámetros: a: fracción soluble; b: fracción potencialmente degradable; c: tasa de degradación de la fracción b y

L: tiempo lag.

S/L: modelo que no incluyó lag

R²: coeficiente de determinación; ES: error estándar

s/a: el modelo no se ajustó a los valores

^{a,b}: en cada grupo de alimentos, valores con letras diferentes en las columnas difieren (P<0.05)

Cuadro VI. Parámetros* de degradabilidad de la FDN de los distintos alimentos para los diferentes métodos**.

Alimentos	a (%)	ES	b (%)	ES	C (%/h)	ES	L (h)	ES	R ²
Trébol Blanco									
IS	12,07 ^a	0,42	70,5 ^b	0,68	21,26 ^a	0,96	S/L	-	0,97
IVA	0 ^b	0,02	79,6 ^a	1,50	4,32 ^b	0,33	0	0,30	0,96
IVAm	0 ^b	0,02	77,7 ^a	0,51	4,55 ^b	0,29	0	0,29	0,96
Lotus									
IS	6,62 ^a	0,61	65,5 ^a	1,06	13,1 ^a	0,69	1,51 ^b	0,16	0,98
IVA	0 ^b	0,02	65,8 ^a	1,02	5,12 ^b	0,52	6,4 ^a	0,51	0,98
IVAm	0 ^b	0,02	67,8 ^a	1,88	4,77 ^b	0,55	6,28 ^a	0,54	0,98
Avena									
IS	8,18 ^a	2,04	74,8 ^a	2,33	7,7 ^a	0,41	1,59 ^b	0,38	0,98
IVA	6,26 ^a	0,72	66,8 ^a	2,21	5,0 ^b	0,47	3,84 ^a	0,4	0,95
IVAm	6,67 ^a	0,52	73,0 ^a	1,01	5,53 ^b	0,57	4,89 ^a	0,38	0,97
Raigrás									
IS	13,7 ^a	0,81	75,6 ^b	1,03	6,3 ^a	0,34	0,96 ^a	0,31	0,98
IVA	0 ^b	0,01	76,2 ^{ab}	1,65	6,1 ^a	0,39	1,24 ^a	0,11	0,95
IVAm	0 ^b	0,01	80,3 ^a	0,73	5,55 ^a	0,29	1,19 ^a	0,11	0,97
Forrajes secos									
Alfalfa, heno									
IS	5,6 ^a	0,33	49,0 ^a	0,84	6,0 ^a	0,48	0	0,38	0,97
IVA	0 ^b	0,02	43,6 ^b	0,77	6,4 ^a	0,44	S/L	-	0,96
IVAm	0 ^b	0,02	49,0 ^a	0,85	4,8 ^a	0,35	S/L	-	0,96
Cebada, paja									
IS	5,3 ^a	0,12	54,4 ^a	2,63	2,2 ^a	0,24	1,69	0,28	0,97
IVA	0 ^b	0,12	48,6 ^a	3,44	1,4 ^b	0,12	S/L	-	0,97
IVAm	0 ^b	0,12	s/a	-	s/a	-	s/a	-	-
Subproductos									
Farelo de cervecería									
IS	9,8 ^a	0,28	56,4 ^a	0,89	5,07 ^a	0,40	S/L	-	0,95
IVA	10,0 ^a	0,48	52,3 ^a	2,97	1,69 ^b	0,20	S/L	-	0,96
IVAm	10,2 ^a	0,48	69,3 ^a	10,33	1,18 ^b	0,26	S/L	-	0,97
Citrus, pulpa									
IS	22,4 ^a	0,40	66,3 ^a	0,59	33,0 ^a	3,14	S/L	-	0,88
IVA	18,5 ^b	1,06	69,1 ^a	1,20	4,3 ^b	0,29	S/L	-	0,87
IVAm	18,7 ^b	1,02	70,7 ^a	1,34	4,0 ^b	0,29	S/L	-	0,88
Subproductos									
Trigo, grano									
IS	23,2 ^b	0,37	37,8 ^a	-	s/a	-	s/a	-	-
IVA	25,9 ^a	0,66	23,4 ^b	1,37	13,25	3,69	6,4	0,67	0,80
Sorgo, grano									
IS	9,51 ^a	0,90	38,1 ^a	1,16	13,7 ^a	1,05	S/L	-	0,84
IVAm	1,61 ^b	0,55	34,3 ^a	1,21	5,0 ^b	0,48	S/L	-	0,85

* parámetros: a: fracción soluble; b: fracción potencialmente degradable; c: tasa de degradación de la fracción b

L: tiempo lag.

s/a: sin ajuste, el modelo no se ajustó a los valores.

R²: coeficiente de determinación

ES: error estándar

^{a,b}: en cada grupo de alimentos, valores con letras diferentes en las columnas difieren (P<0.05)

S/L: modelo que no incluyó lag debido a la observación de los datos realizada previamente

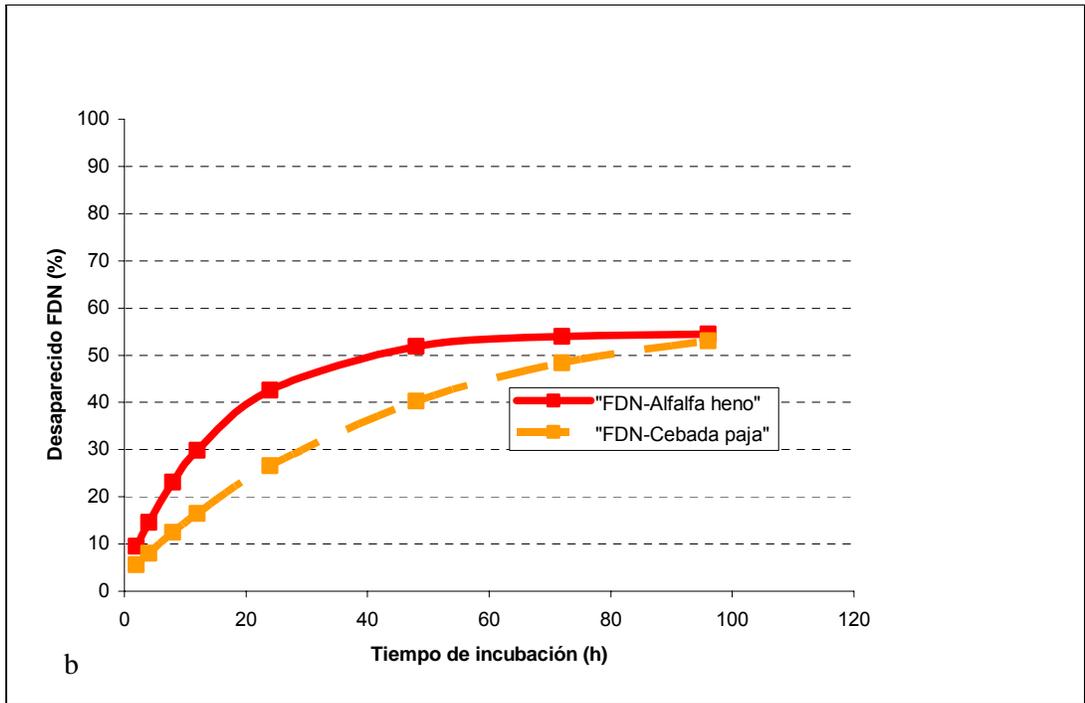
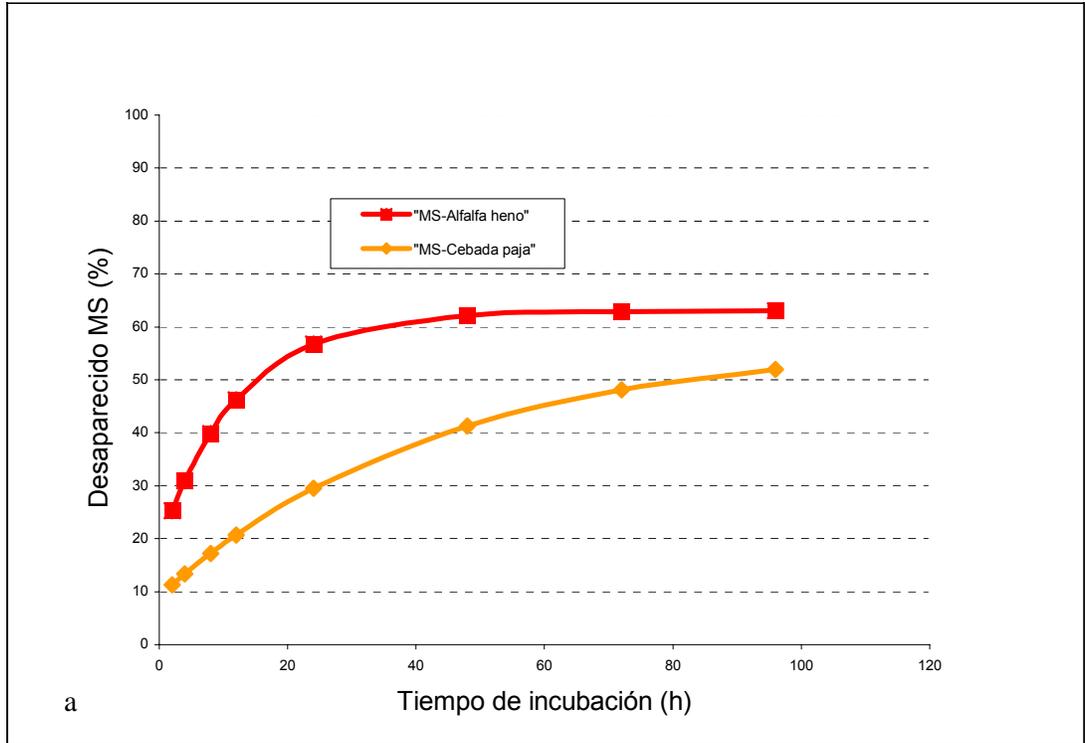


Figura 7. Degradabilidad in situ de la MS de forrajes secos de paja de cebada y heno de alfalfa (a) y degradabilidad in situ de la FDN de forrajes secos (b) (MS: materia seca; FDN: fibra detergente neutro)

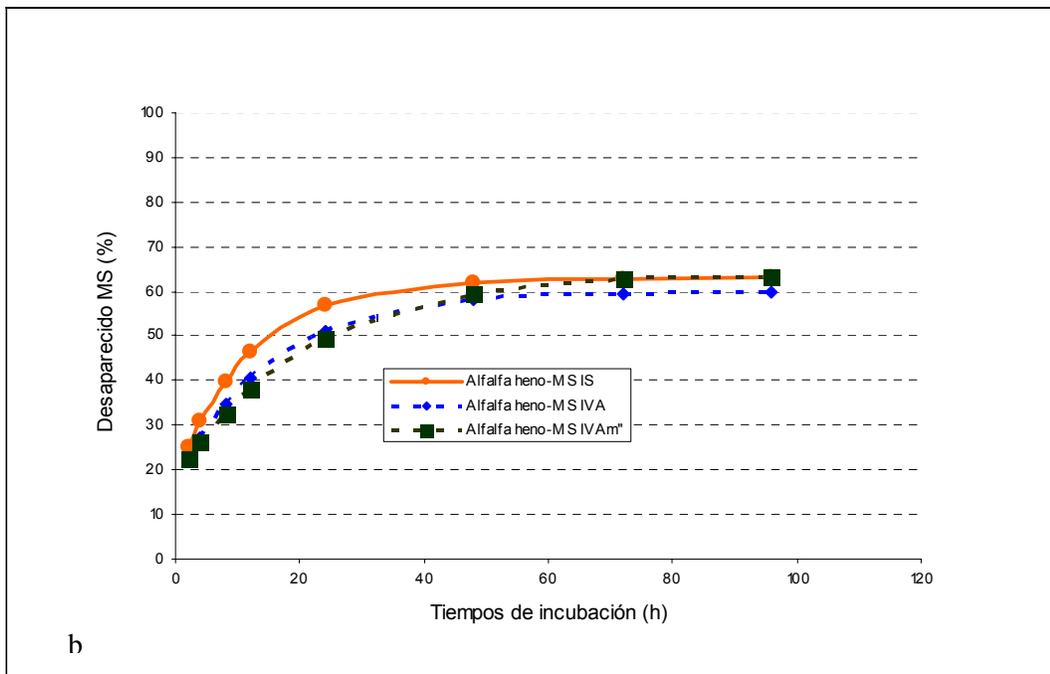
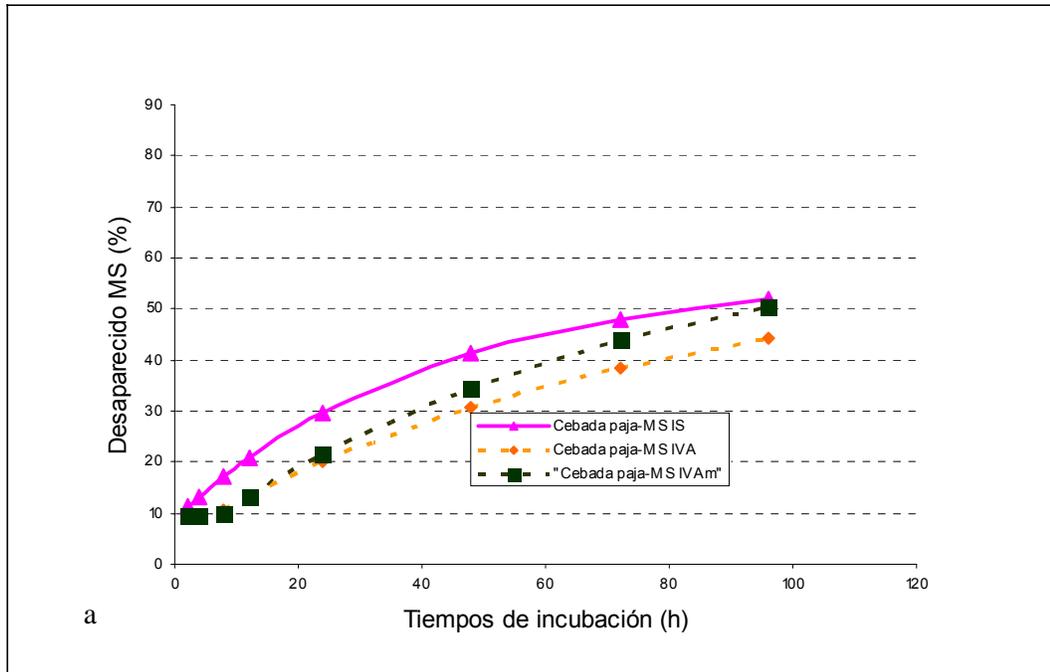


Figura 8. Degradabilidad de la MS de paja de cebada (a) y de heno de alfalfa (b) para las diferentes metodologías (MS: materia seca; IS: in situ; IVA: in vitro Ankom; IVAm: in vitro Ankom modificado)

La pared celular del heno de alfalfa presentó una fracción soluble de 6%, una fracción potencialmente degradable de 49% y una tasa de degradación de 6%/h (Cuadro V)

Los parámetros que describen la cinética de la FDN de la paja de cebada fueron 5% para la fracción “a”, 54 % para la “b” y 2.2 %/h para la tasa de desaparición (Cuadro V).

En el heno de alfalfa no se estimó tiempo lag, mientras que en la paja de cebada se estimó un lag de 1.7 horas (Cuadro V).

4.4. Comparación de las cinéticas *in situ* e *in vitro* de la FDN

En el heno de alfalfa y en la paja de cebada, las fracciones solubles estimadas por la metodología *in situ* (6 y 5%, respectivamente) fueron mayores ($P<0.05$) que las estimadas por los métodos *in vitro* (las cuales no difirieron del valor 0) (Cuadro VI).

Las fracciones potencialmente degradables fueron estimadas diferentemente según el método considerado. En el heno de alfalfa, la metodología *IS* y la *IVAm* generaron valores muy similares de “b” (49%), mientras que la estimación de el método *IVAm* fue menor ($P<0.05$) (44%) (Cuadro VI).

En la paja de cebada, las fracciones “b” no difirieron entre los métodos, sin embargo, la estimación de la fracción “b” por el método *IVA* mostró elevados errores estándar, mientras que en la estimación por *IVAm* el modelo no se ajustó a la cinética de degradación propuesta (Figura 9a).

La tasa de desaparición de la FDN del heno de alfalfa no difirió entre las distintas metodologías (6.0, 6.4 y 4.8 %/h para *IS*, *IVA* e *IVAm*, respectivamente); la paja de cebada presentó mayor ($P<0.05$) tasa generada por *IS* (2.2 %/h) que por *IVA* (1.4 %/h) no estimándose tiempo lag en ninguna de las metodologías (Cuadro VI) (Figura 9b).

5. Cinética de degradación de los subproductos agroindustriales

5.1. Cinética de la degradación *in situ* de la MS

Los parámetros de la cinética de degradación *in situ* y las curvas de desaparición de la MS para los subproductos agroindustriales se presentan en el Cuadro III y en la Figura 10, respectivamente.

El farelo de cervecería presentó una fracción “a” de 14% y una fracción “b” de 53%, siendo su tasa de desaparición de 7.3 %/h.

La pulpa de citrus evaluada por esta metodología presentó una fracción soluble de 38 %, una fracción potencialmente degradable de 58% y una tasa de desaparición de 35%/h.

En estos subproductos no se observaron tiempos de lag, por lo que el modelo ajustó sin la inclusión de este parámetro.

5.2. Comparación de las cinéticas *in situ* e *in vitro* de la MS

En el farello, las fracciones solubles fueron menores ($P < 0.05$) al estimarse por *IS* que cuando se estimaron por *IVA* o *IVAm* (14, 20 y 20 %, respectivamente). La fracción potencialmente degradable estimada por *IS* y por *IVAm* fueron similares entre sí y mayores ($P < 0.05$) que los estimados por *IVA* (53, 69 y 46%, respectivamente). Las tasas de desaparición de la MS fueron mayores ($P < 0.05$) cuando se estimaron por *IS* (7,3 %/h) que cuando se determinaron por *IVA* e *IVAm* (2,1 y 1,2 %/h, respectivamente), siendo estas dos últimas similares entre sí ($P > 0.05$) (Cuadro IV) (Figura 12).

La pulpa de citrus presentó valores similares ($P > 0.05$) de fracción soluble ($38,4 \pm 0,2$ %) y de fracción potencialmente degradable ($56 \pm 1,4$ %) entre las diferentes metodologías, mientras que fue marcadamente mayor ($P > 0.05$) la tasa de desaparición de la MS determinada por *IS* (35%/h) que las determinadas por los métodos *in vitro* (6,0 y 6,1 %/h, para *IVA* e *IVAm*, respectivamente) (Figura 12).

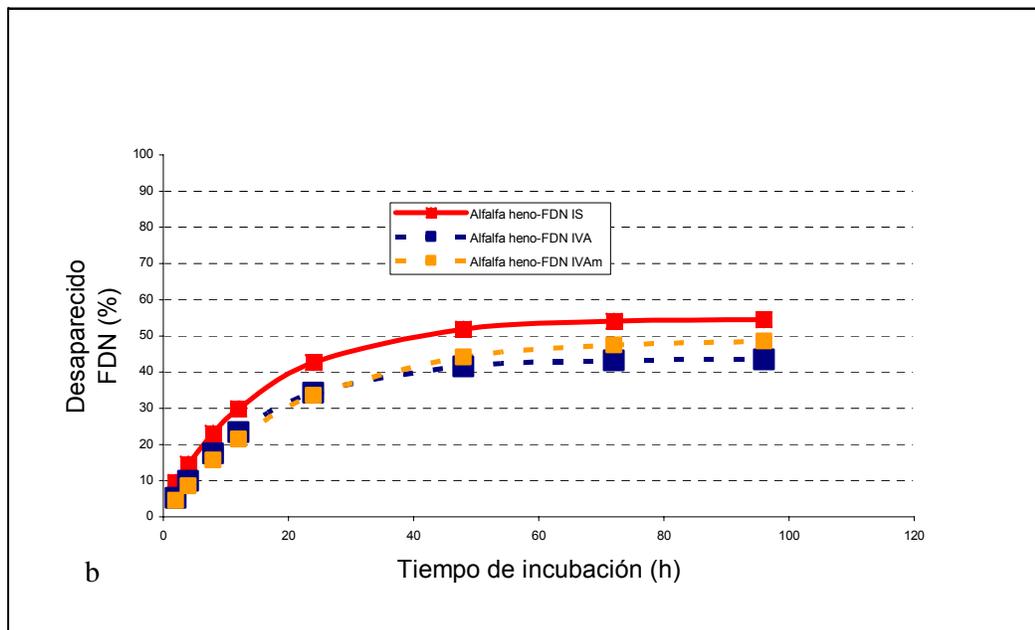
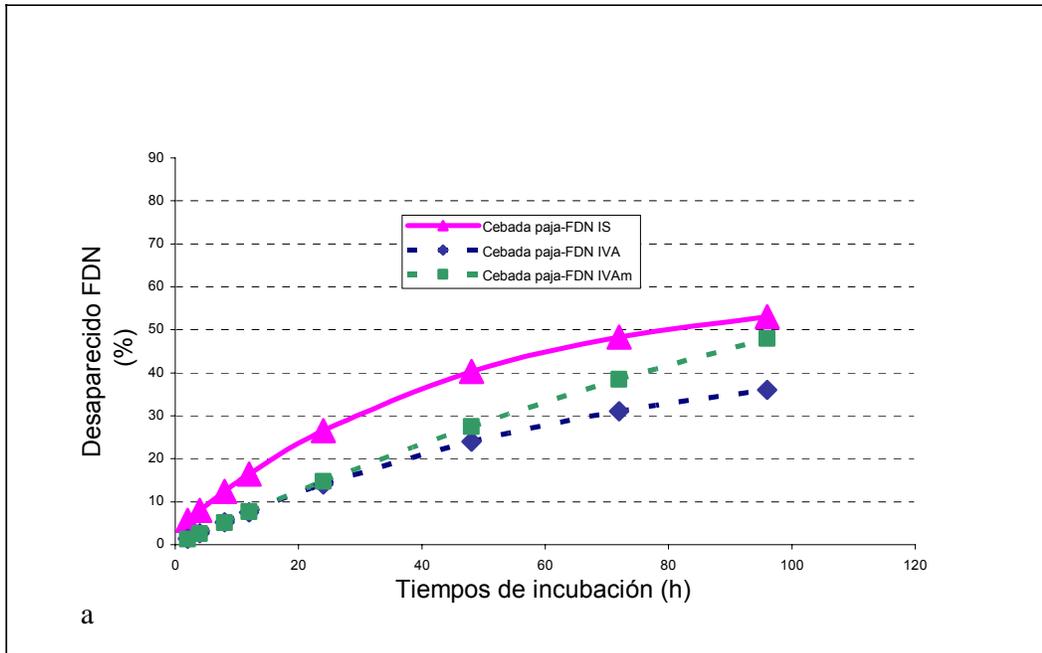


Figura 9. Degradabilidad de la FDN de paja de cebada (a) y heno de alfalfa (b) para las diferentes metodologías (FDN: fibra detergente neutro; IS: in situ; IVA: in vitro Ankom; IVAm: in vitro Ankom modificado)

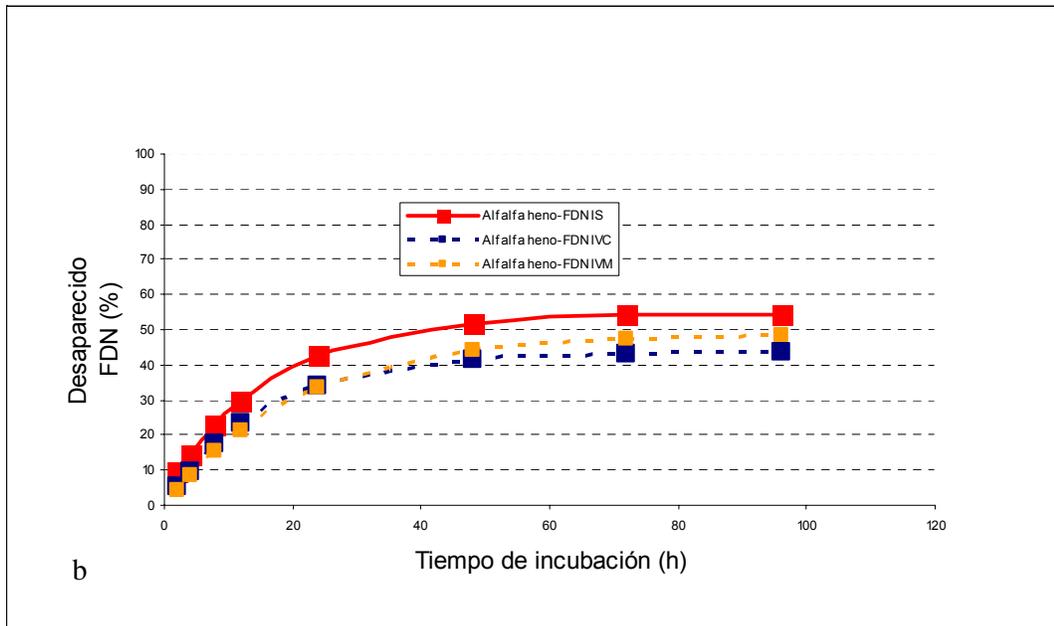
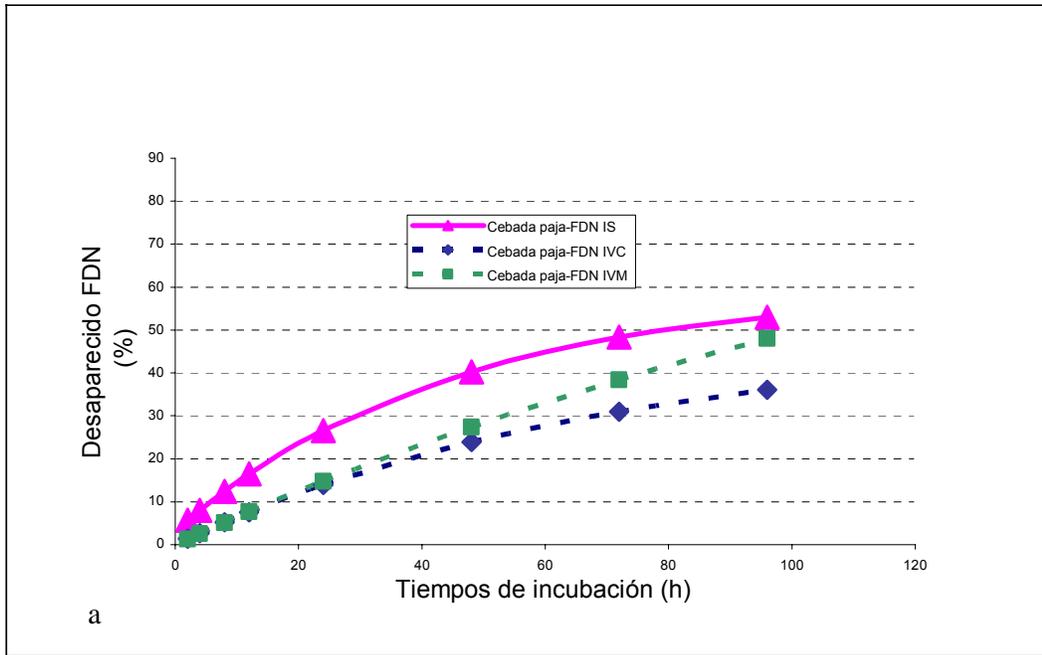


Figura 10 Degradabilidad de la FDN de paja de cebada (a) y heno de alfalfa (b) para las diferentes metodologías (FDN: fibra detergente neutro; IS: in situ; IVA: in vitro Ankom; IVAm: in vitro Ankom modificado)

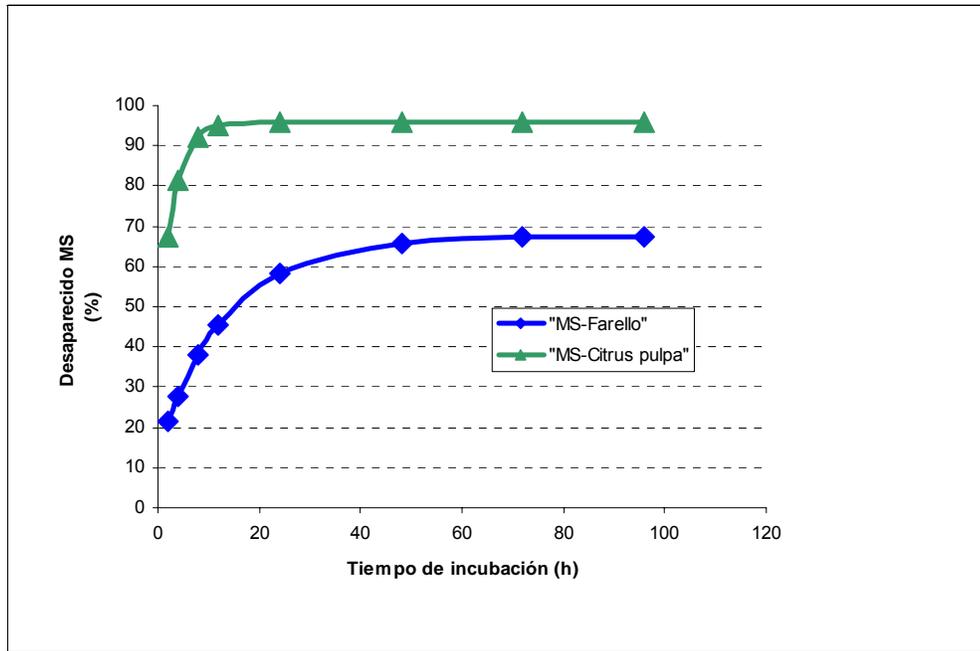


Figura 10. Degradabilidad in situ de la MS del farelo de cervecería y de la pulpa de citrus (MS: materia seca)

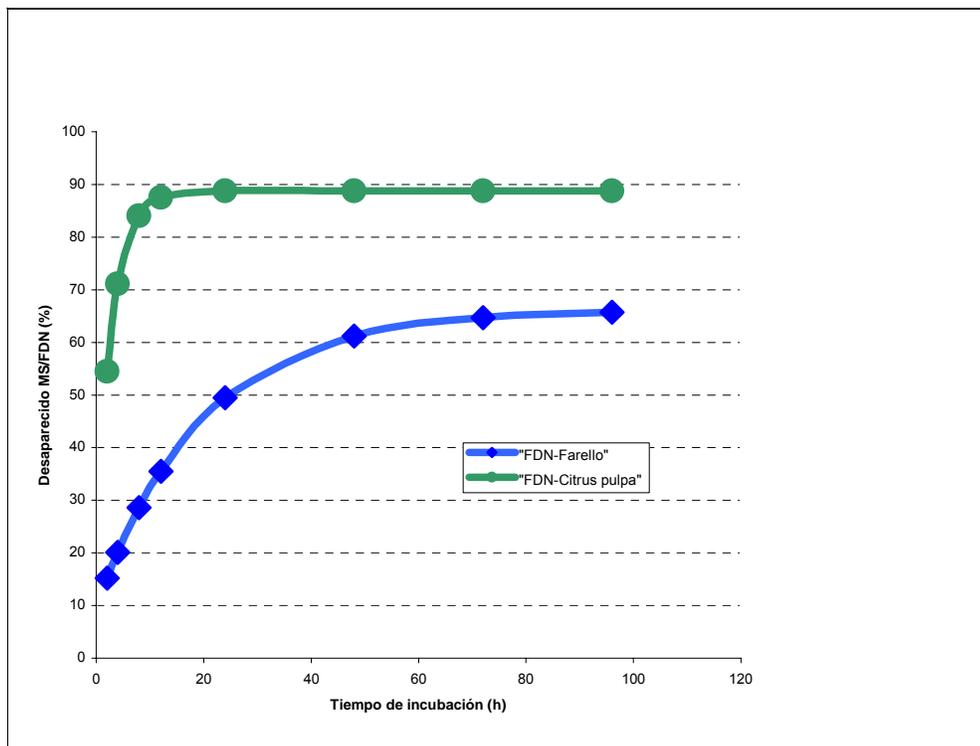


Figura 11. Degradabilidad in situ de la FDN del farelo de cervecería y de la pulpa de citrus (FDN: fibra detergente neutro)

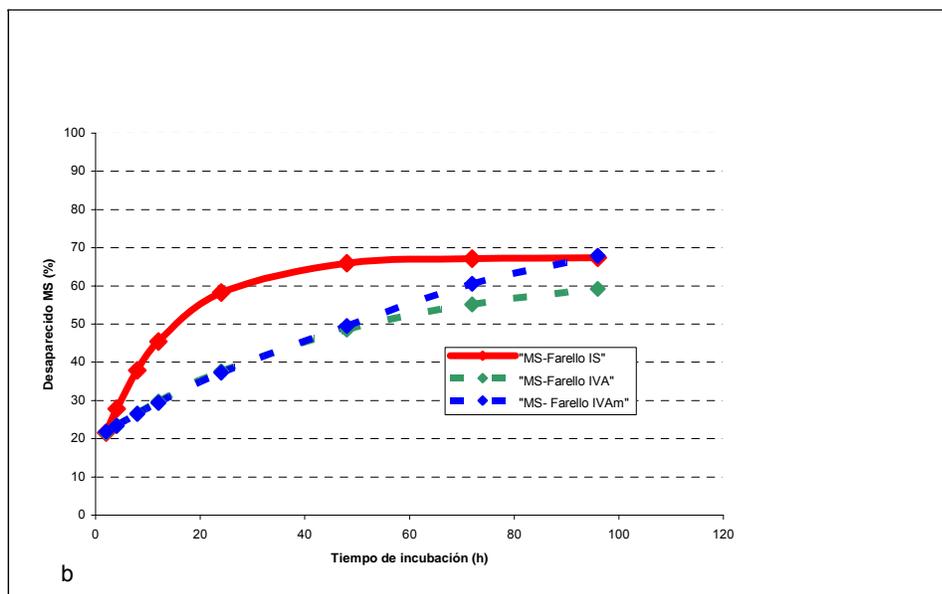
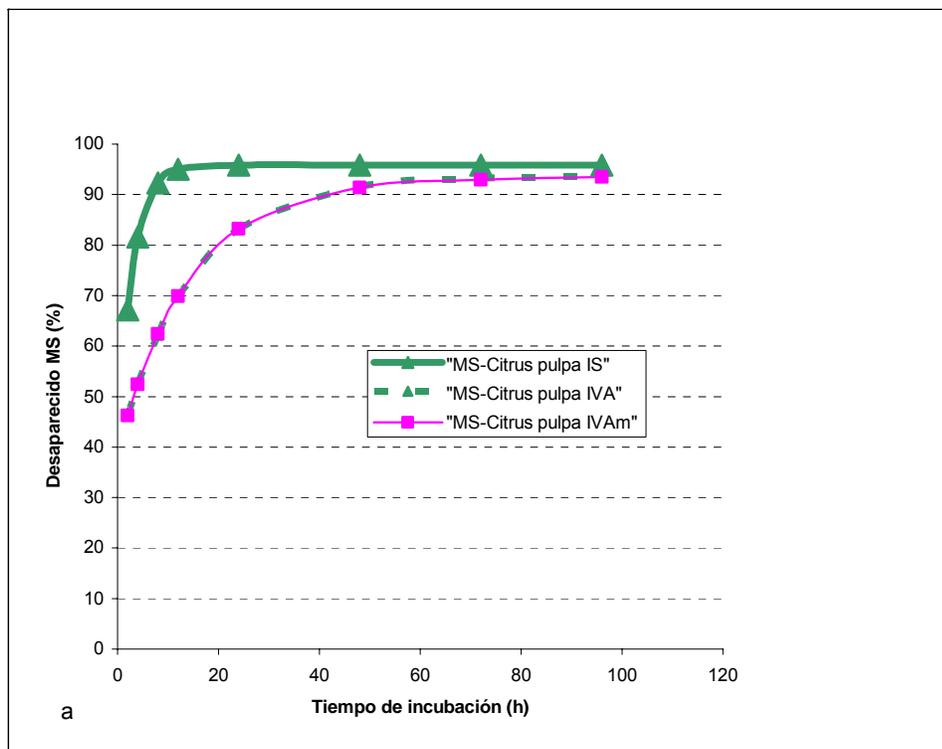


Figura.12 Degradabilidad de la MS de la pulpa de citrus (a) y del farelo de cervecería (b) para las diferentes metodologías (MS: materia seca; IS: in situ; IVA: in vitro Ankom; IVAm: in vitro Ankom modificado)

En los valores iniciales de la fermentación de estos dos subproductos agroindustriales no se observaron retrasos en la digestión por lo que en ninguna de las metodologías se incluyó el tiempo lag.

5.3. Cinética de la degradación *in situ* de la FDN

La pared celular del farello de cervecería presentó una fracción soluble de 10 % y una fracción potencialmente degradable de 56 % siendo la tasa de degradación de la pared celular 5,1 %/h (Cuadro V y Figura 11).

El valor de la fracción soluble de la pared de la pulpa de citrus fue 22%, la fracción potencialmente degradable 89% y la tasa de desaparición fue 33%/h (Cuadro V y Figura 11).

5.4. Comparación de las cinéticas *in situ* e *in vitro* de la FDN

En el farello de cervecería, la fracción soluble de la pared celular ($10,0 \pm 0,2$ %) y la potencialmente degradable ($59,3 \pm -8,9$ %) fueron estimadas de forma similar ($P > 0.05$) por las distintas metodologías, mientras que la tasa de desaparición de la FDN resultó diferente ($P < 0.05$) entre la metodología *IS* y las *in vitro* (5.1, 1.7 y 1.2 %/h para *IS*, *IVA* e *IVAm*, respectivamente), siendo estas últimas dos tasas similares entre sí ($P > 0.05$) (Cuadro VI y Figura 13a)

En la pulpa de citrus, la fracción potencialmente degradable de la FDN fue estimada de manera similar por las diferentes metodologías ($68,7 \pm 2,2$ %) mientras que las fracciones "a" y "c" de la FDN fueron mayores ($P < 0.05$) en la estimación *IS* (22% y 33%/h) que en *IVA* (18,5% y 4,3 %/h) y que en *IVAm* (18,7 % y 4,0%/h) (Cuadro VI y Figura 13b).

Al igual que en la comparación de la MS, los valores iniciales de las fermentaciones de las paredes celulares de estos dos subproductos agroindustriales no mostraron retrasos en la digestión de la pared celular, por lo que en ninguna de las metodologías, el modelo se incluyó el tiempo lag (Cuadro VI)

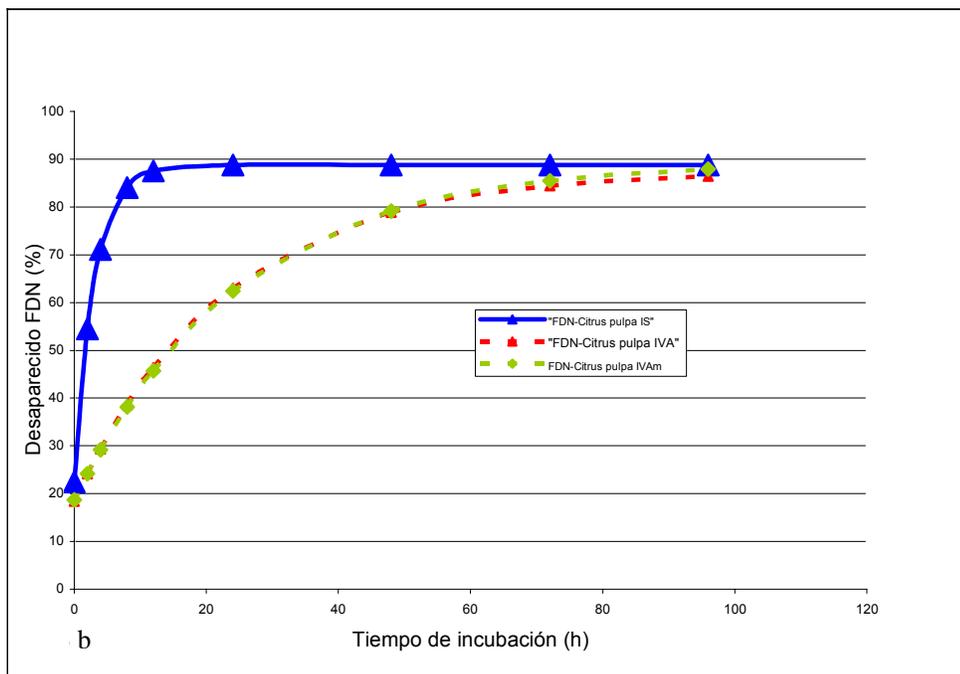
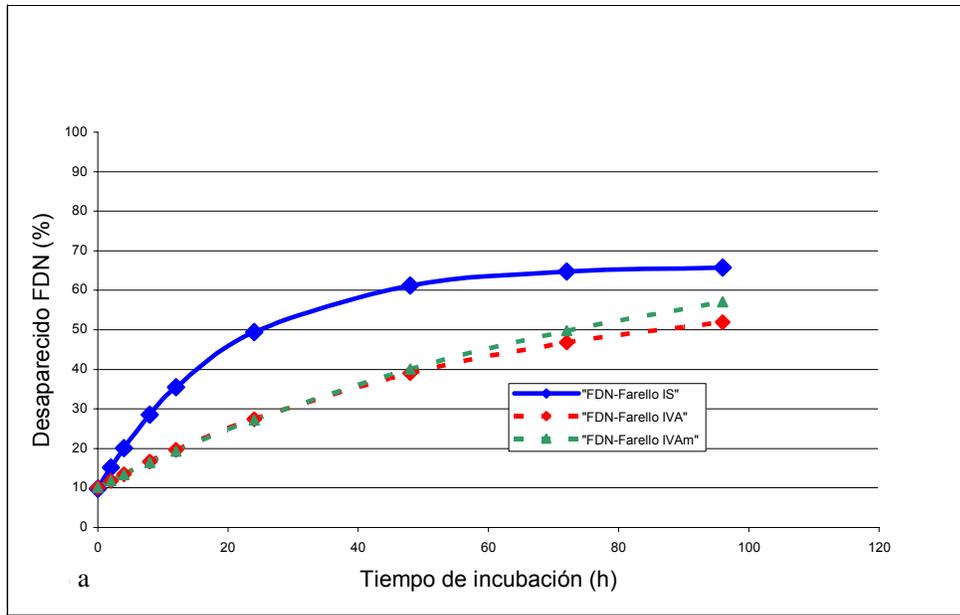


Fig. 13. Degradabilidad de la FDN del farelo de cervecera (a) y la pulpa de citrus (b) para las diferentes metodologías (FN: fibra detergente neutro; IS: in situ; IVA: in vitro Ankom; IVAm: in vitro ankom modificado)

□

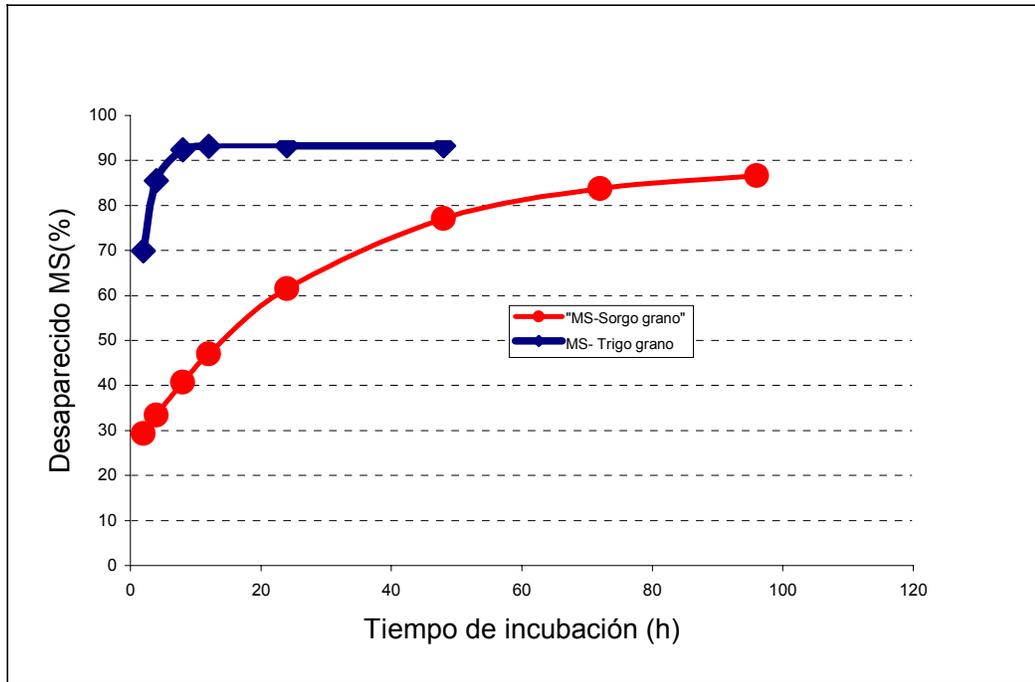


Figura 14. Degradabilidad in situ de la MS de los granos de trigo y sorgo

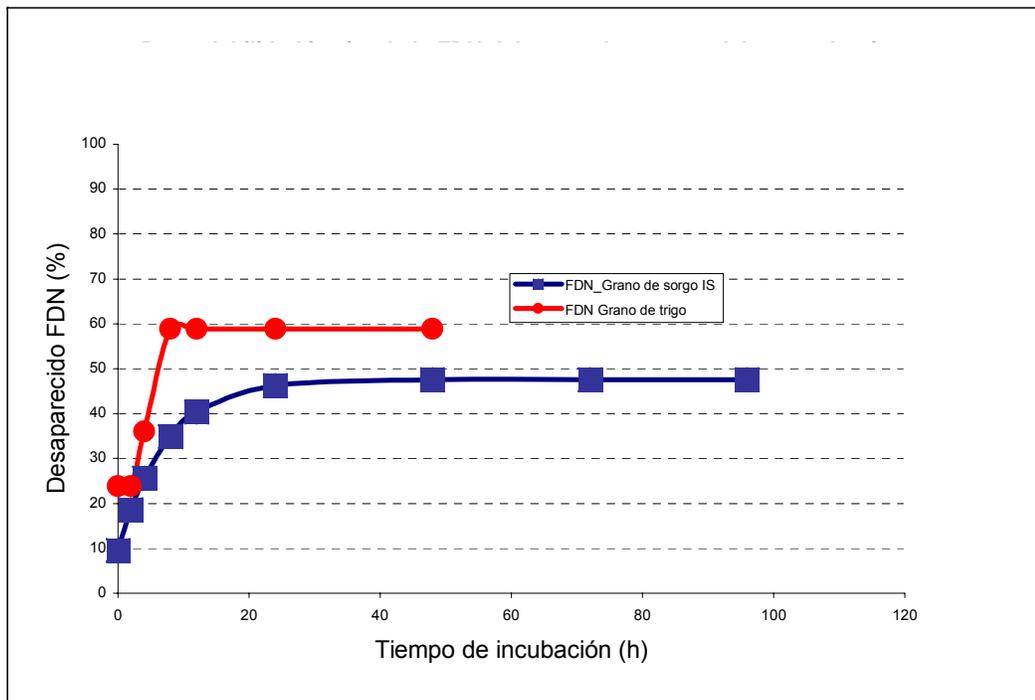


Figura 15. Degradabilidad in situ de la FDN de los granos de trigo y sorgo

6. Cinética de degradación de los granos de cereales

6.1. Cinética de la degradación *in situ* de la MS

Las cinéticas de degradabilidad *in situ* de la MS de los granos de trigo y sorgo se presentan en la Figura 14 y los parámetros de la cinética en el Cuadro III. Las fracciones solubles de los granos de trigo (23%) y de sorgo (24%) fueron similares ($P > 0.05$) mientras que la fracción “b” del trigo y la tasa de degradación de esta fracción fueron mayores ($P < 0.05$) para el trigo (93 % y 55%/h, respectivamente) en comparación con la fracción potencialmente degradable y la tasa de desaparición del grano de sorgo (89% y 3.5 %/h, respectivamente) (Cuadro III).

6.2. Comparación de las cinéticas de la MS *in situ* e *in vitro*

En el grano de trigo, se compara la cinética de degradación de la metodología de referencia con el método *IVA*, ya que este grano no se incubó más allá de las 48 horas. La fracción “a” y la potencialmente degradable no se diferenciaron ($P > 0.05$) entre los métodos, mientras que la tasa varió marcadamente entre el método *IS* (55%/h) y el *IVA* (20%/h). En ninguna de las metodologías el modelo estimó un tiempo lag (Cuadro IV, Figura 16a).

En el grano de sorgo, la comparación posible fue entre el método *IS* y el *IVAm*. Los parámetros “a”, “b” y “c” estimados por ambas metodologías no difirieron ($P < 0.05$). Un tiempo lag de 5,5 horas fue estimado cuando se realizó la metodología *IVAm* mientras que en la metodología *IS* el modelo no incluyó tiempo lag. (Cuadro IV, Figura 16b)

6.3. Cinética de la degradación *in situ* de la FDN

El modelo empleado para describir la degradación de la pared celular no se ajustó a la cinética de desaparición de la FDN del grano de trigo debido fundamentalmente a la variación en los porcentajes de FDN desaparecidos a las 4 y 8 horas entre los distintos capones. La observación de los porcentajes de FDN desaparecidos a lo largo de los tiempos de incubación muestra una fase 2 horas como tiempo de retraso en el inicio de la digestión y una desaparición creciente hasta las 8 horas; a partir de ese tiempo de incubación el % de desaparición de la FDN se estabiliza en un 60%. El crecimiento observado es de forma lineal pudiéndose calcular una tasa constante de 4,7 %/h (Figura 15).

La fracción soluble de la pared celular del grano de sorgo fue menor ($P < 0.05$) que la del trigo (9.5 y 23.2 %, respectivamente). La fracción potencialmente degradable del sorgo fue 38.1% y la tasa de degradación de 13, 7 %/h, no observándose retrasos en el inicio de la degradación de la pared celular en este grano (Cuadro V, Figura 15).

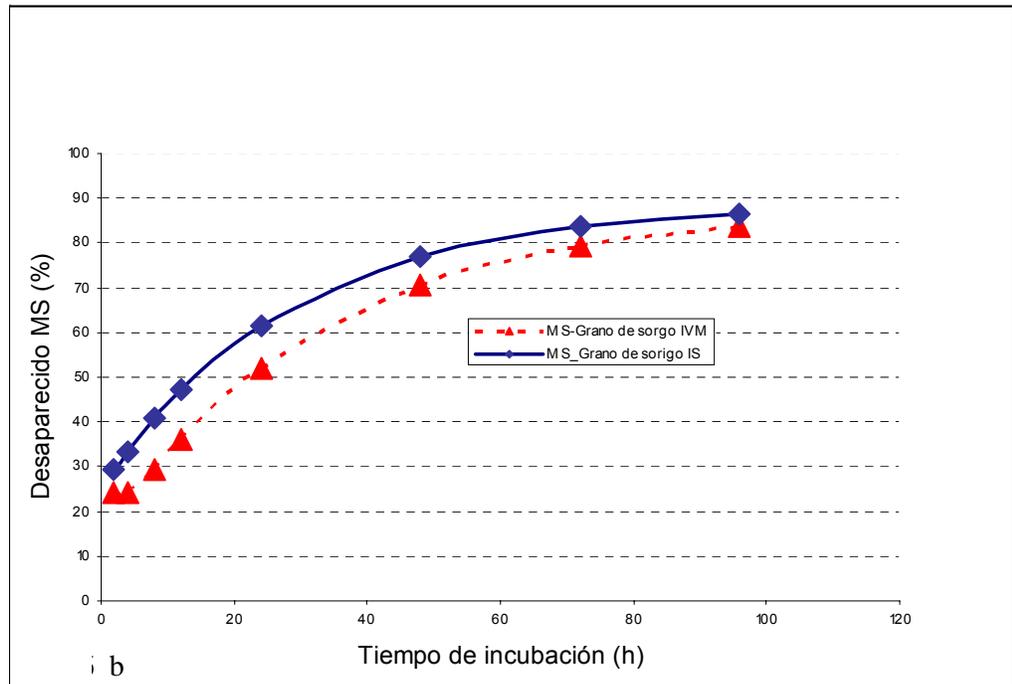
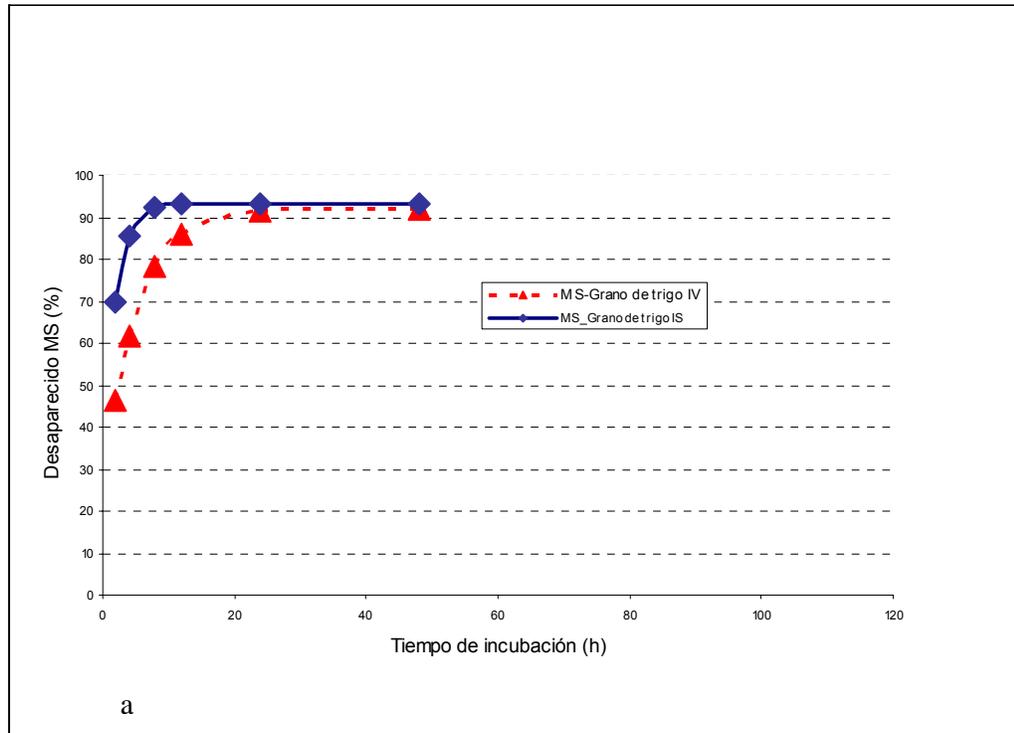


Fig 16. Degradabilidad de la MS del grano de trigo (16 a) y del grano del sorgo (16 b) para las diferentes metodologías (MS: materia seca; IS: in situ; IVA: in vitro Ankom; IVAm: in vitro Ankom modificado)

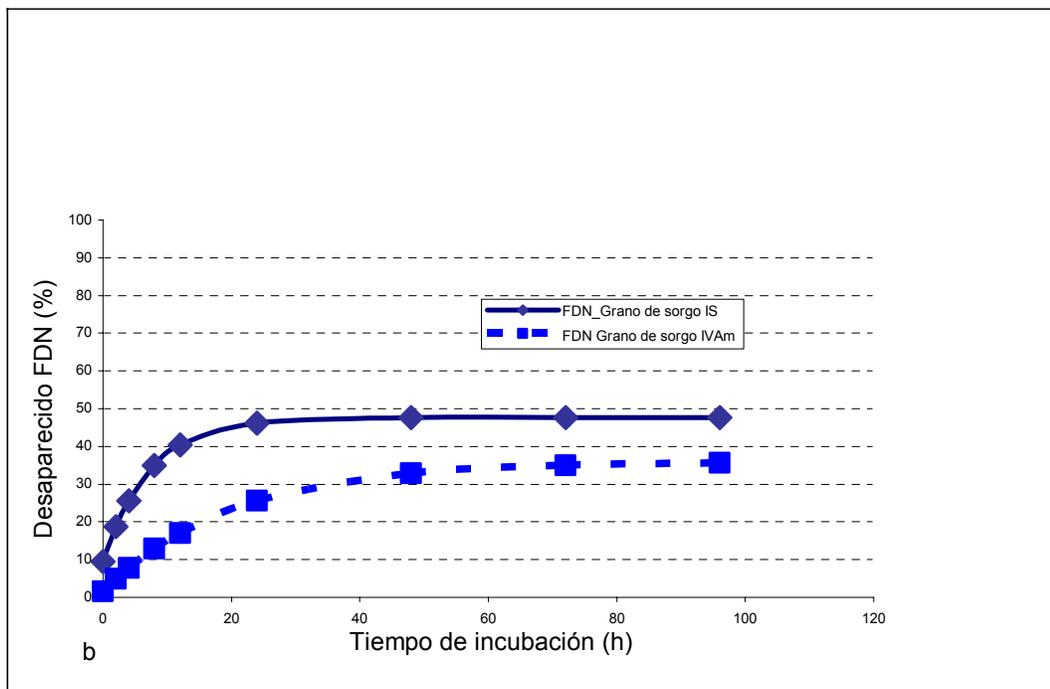
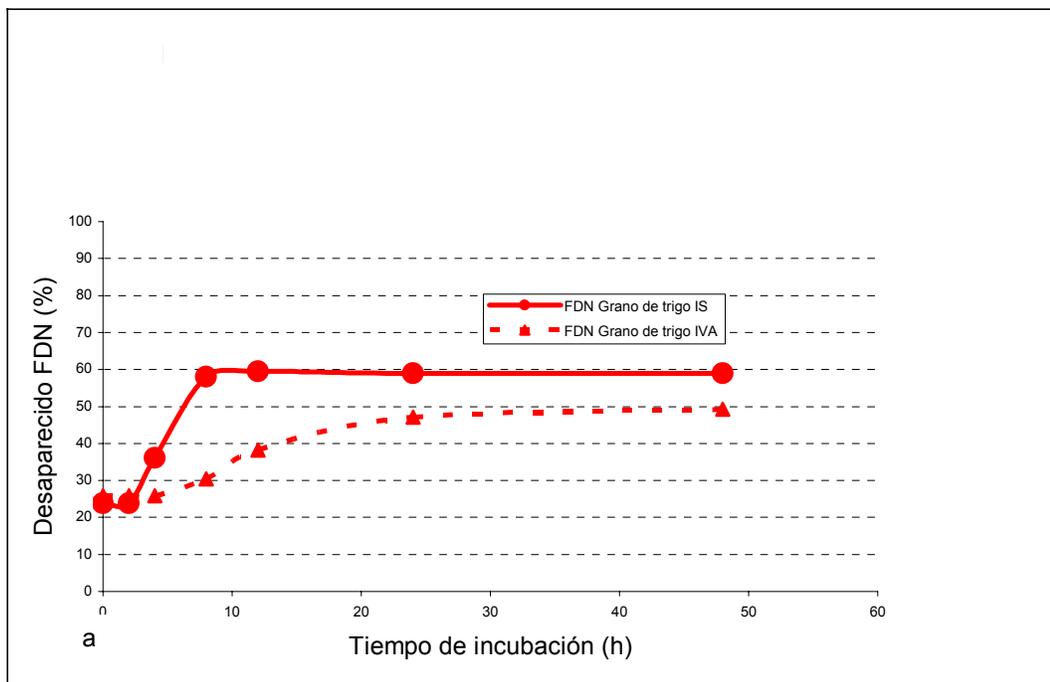


Figura 17. Degradabilidad de la FDN de los granos de trigo (a) y sorgo (b) para las diferentes metodologías (FDN: fibra detrgente neutro; IS: in situ; IVA: in vitro Ankom; IVAm: in vitro Ankom modificado)

6.4. Comparación de las cinéticas *in situ* e *in vitro* de la FDN

La cinética de fermentación del grano de trigo estimada por la metodología *IS* no fue comparable con el modelo *IVA*. Con esta última metodología, el

modelo ajustó a los datos obtenidos, resultando un valor de la fracción soluble de la FDN de 26 %, una fracción potencialmente degradable de 23%, una tasa de desaparición de 13.2 %/h y un lag de 6 h (Cuadro VI, Figura 17a).

La degradabilidad de la pared celular del grano de sorgo determinada por la metodología *IVAm* presentó un valor menor ($P < 0.05$) y cercano a 0 de fracción soluble de pared celular, menor ($P < 0.05$) valor de tasa de desaparición (13.7 vs. 5 %/h), similares ($P > 0.05$) valores de “b” que los determinados por el método *IS* y un lag de 5.5 horas (Cuadro VI, Figura 17b)

7. Degradabilidades efectivas de los alimentos

7.1. Degradabilidades efectivas in situ de la MS y FDN

Las degradabilidades efectivas de la MS (DE_{MS}) y de la FDN (DE_{FDN}) calculadas a partir de los parámetros de la cinética ruminal obtenidos con la metodología *IS* fueron diferentes para los diversos alimentos (Cuadro VII).

La pulpa de citrus y grano de trigo presentaron los mayores valores de DE_{MS} y similares entre sí ($P > 0.05$), mientras que la paja de cebada presentó el menor valor de DE_{MS} . Las cuatro pasturas evaluadas no presentaron diferencias ($P > 0.05$) entre ellas y fueron mayores ($P > 0.05$) que farello, heno de alfalfa y grano de sorgo (Cuadro VII).

La pulpa de citrus presentó el mayor ($P > 0.05$) valor de DE_{FDN} mientras que la paja de cebada el menor ($P < 0.05$); las pasturas avena, raigrás y lotus presentaron valores similares entre sí pero menores al trébol blanco ($P < 0.05$); el heno de alfalfa, grano de sorgo y la pastura de avena no difirieron entre sí en los valores de DE_{FDN} ($P < 0.05$) pero fueron menores que las otras pasturas (Cuadro VII).

Cuadro VII. Degradabilidades efectivas* de la MS y de la FDN.

Alimentos	DE_{MS} (%)		DE_{FDN} (%)	
Trébol Blanco	84,04	b	67,05	b
Lotus	71,98	b	47,65	c
Avena	64,17	b	46,40	cd
Raigrás	67,47	b	50,25	c
Alfalfa, heno	44,22	c	30,10	d
Cebada, paja	22,83	d	18,49	e
Farellero de cervecería	43,47	c	35,63	d
Citrus, pulpa	87,37	a	78,50	a
Trigo, grano	86,29	a	s/d	
Sorgo, grano	48,44	c	36,01	d

DE_{MS/FDN}: degradabilidad efectiva de la MS/FDN, calculadas para una tasa de pasaje (*k_p*): 6%/h.

^{a,b,c} Letras diferentes en columnas difieren ($P < 0.05$)

7.2. Comparación entre métodos de DE de la MS y la FDN de todos los alimentos

En las pasturas, el heno de alfalfa, subproductos agroindustriales y granos de cereales, las DE_{MS} del método *IS* fueron mayores ($P < 0.05$) que las DE_{MS} estimadas por *IVA*. En la paja de cebada, no se registran diferencias en las DE_{MS} estimadas por las dos metodologías.

En todos los alimentos, con excepción de la pulpa de citrus en que las DE_{FDN} fueron similares ($P < 0.05$), las DE_{FDN} del método *IS* fueron mayores ($P < 0.05$) que las DE_{FDN} de los métodos *in vitro*. La modificación del método no alteró los valores de DE_{MS} ni de DE_{FDN} con respecto al *IVA* (Cuadro VIII).

Cuadro VIII. Degradabilidades efectivas de la MS y de la FDN para los diferentes métodos.

Alimentos	Método ¹	Degradabilidades efectivas $K_p = 6\%/h$	
		DE_{MS}	DE_{FDN}
Pasturas			
Trébol Blanco	<i>IS</i>	84,04 ^a	67,05 ^a
	<i>IVA</i>	64,42 ^b	33,32 ^b
	<i>IVAm</i>	64,34 ^b	33,51 ^b
Lotus	<i>IS</i>	71,98 ^a	47,65 ^a
	<i>IVA</i>	56,84 ^b	20,64 ^b
	<i>IVAm</i>	57,05 ^b	20,60 ^b
Avena	<i>IS</i>	64,17 ^a	46,40 ^a
	<i>IVA</i>	58,06 ^b	30,38 ^b
	<i>IVAm</i>	58,57 ^{ab}	32,78 ^b
Raigrás	<i>IS</i>	67,47 ^a	50,25 ^a
	<i>IVA</i>	59,21 ^{ab}	35,66 ^b
	<i>IVAm</i>	60,46 ^b	35,93 ^b
Forrajes secos			
Heno alfalfa	<i>IS</i>	44,22 ^a	30,10 ^a
	<i>IVA</i>	39,67 ^{ab}	22,50 ^b
	<i>IVAm</i>	38,62 ^b	21,78 ^b
Cebada, paja	<i>IS</i>	22,83 ^a	18,49 ^a
	<i>IVA</i>	16,78 ^a	9,19 ^b
	<i>IVAm</i>	18,03 ^a	s/d
Subproductos			
Agroindustriales			
Farelo de cervecería	<i>IS</i>	43,47 ^a	35,63 ^a
	<i>IVA</i>	31,57 ^b	21,49 ^b
	<i>IVAm</i>	31,55 ^b	21,59 ^b
Citrus, pulpa	<i>IS</i>	87,37 ^a	78,50 ^a
	<i>IVA</i>	66,17 ^b	47,35 ^b
	<i>IVAm</i>	66,28 ^b	46,98 ^b
Granos			
Trigo, grano	<i>IS</i>	86,29 ^a	s/d ^a
	<i>IVA</i>	76,47 ^b	36,89 ^b
Sorgo, grano	<i>IS</i>	48,44 ^a	36,01 ^a
	<i>IVAm</i>	42,55 ^b	17,20 ^b

Métodos: *IS*: in situ, *IVA*: in vitro tecnología Ankom; *IVAm*: in vitro tecnología Ankom modificado; K_p : tasa de pasaje: 6 %/h asumida para el cálculo de las DE_{MS} .
^{a,b}: valores con letras diferentes en las columnas difieren ($P < 0.05$)

DISCUSION

1. Cinética de degradación in situ

Las cinéticas de degradación obtenidas por el método de referencia *in situ* para la MS y FDN de diferentes pasturas y forrajes, estuvieron acordes, en términos generales, con lo reportado por la literatura (Elizalde et al., 1999; Hoffman et al., 1993; Van Vuuren et al., 1991; Bargo et al., 2001; Bargo, 2000; Richardson et al., 2003; Dewhurst et al., 1995; Martin et al., 2001; Bruno Soares et al., 2000; Andres et al., 2005) (Cuadro IX y Cuadro X).

Las pasturas leguminosas y las gramíneas estudiadas presentaron parámetros de las cinéticas de la MS y de la FDN que se encuentran dentro de los rangos publicados, con excepción de las elevadas tasas de desaparición del trébol blanco (35 y 21%/h para MS y FDN, respectivamente). El estado fenológico, la alta proporción de hojas estimadas por observación y la baja concentración de MS de esta pastura pueden explicar el valor de esta tasa de desaparición. En relación a la degradabilidad de la MS, en general, las leguminosas presentaron mayor fracción soluble, menor fracción potencialmente degradable y mayores tasas de desaparición que las gramíneas, lo que está acorde con los datos promedios publicados por la literatura, 39.5 (± 4.7)%, 41.4 (± 3.7)% y 10.8 (± 4.3) %/h fracciones "a", "b" y "c" en leguminosas vs. 31.6 (± 11.5)%, 54.7 (± 9.6) % y 6.2 (± 1.3) %/h en gramíneas.

En referencia a la cinética de la pared celular de las pasturas, en este estudio, se observaron bajos valores de fracción soluble de la FDN en todas las pasturas (5.3 a 13.7%), presentando las dos leguminosas menor fracción "b" y mayor tasa de degradación que las dos gramíneas evaluadas. La información publicada por otros autores (Elizalde et al., 1992; Van Vuuren et al., 1992; Hoffman et al., 1993; Bargo et al., 2001; Bargo, 2000; Andres et al., 2005) también reportan bajos valores de la fracción "a" en general para las pasturas (de 0 a 16%) y valores mayores de fracción "b" de leguminosas frente a gramíneas; las tasas de degradación variaron desde valores muy bajos en pasturas naturales de 1.4%/h a valores de 15%/h para una pastura de lotus.

La paja de cebada presentó características de fermentación ruminal de la MS y de la FDN similares a las publicadas por otros autores (Varel et al., 1995; Bruno-Soares et al., 2000), observándose bajos valores de fracción soluble y de tasas de desaparición de la MS. El heno de alfalfa de este estudio presentó características de cinética de degradación de la MS similares a las obtenidas por Alves et al., (2001) y la tasa de desaparición de la FDN es coincidente con los valores reportados por NRC (2000) (Cuadro X).

La existencia de un tiempo de retraso en la digestión de la pared es característica, en general de pasturas y forrajes. En este estudio, el tiempo lag varió entre 0 y 1.7 horas, mientras que hay reportes en la literatura hasta 4.3 horas de duración de tiempo lag (Cuadro X).

La información de degradabilidad *IS* de la MS de los subproductos agroindustriales evaluados presenta similitud con la reportada por otros autores (DePeters et al., 1999; Promptok y Wanapat, 2003; Pereira y Gonzalez, 2004; Cuadro XI). La MS de farelo de cervecería, en este estudio, presentó similar fracción soluble y potencialmente degradable pero mayor tasa de degradación (5.1 vs. 3.1) con respecto a la reportada por Promptok y Wanapat (2003); mientras que el valor de la tasa de degradación de la FDN es coincidente con el valor reportado (kd: 6%/h) por NRC (2000).

Los parámetros “a” y “b” de la degradabilidad de la MS de la pulpa de citrus son similares a los reportados por otros autores (Dewhurst et al., 1995; DePeters et al., 1999; Pereira y Gonzalez, 2004; Cuadro XI) mientras que no se han reportado tasas de desaparición de la MS y la FDN tan elevadas como las obtenidas en este estudio (35 y 33%/h). Sin embargo, de Smet et al (1995) presentan las curvas de degradación de la MS de pulpa de remolacha (con características químicas similares a la pulpa de citrus), las cuales son muy similares a las obtenidas en este trabajo. Brown and Johnson, (1991) reportaron valores de digestibilidad *IV* a las 96 horas de la FDN de 76 % y una tasa de digestión de 11,4%, mientras que DePeters et al (1997) reportaron valores estimados *in sacco* de 22,7 % de fracción degradable de la FDN y de 9,1 %/h de tasa de degradación. Los componentes de la pulpa de citrus varían entre las industrias debido a diferentes contenido de semillas y jugos, especie cítrica y tipos de procesamientos a los que se somete este subproducto, esto puede explicar diferencias en las tasas de desaparición de la MS y de la FDN de distintas pulpas de citrus (Bampidis y Robinson, 2006).

Las diferencias en degradabilidad de la MS entre los dos granos estudiados están, en general, de acuerdo con la literatura (Herrera-Saldana, 1990, Arieli et al., 1995; Dewhurst et al., 1995; Bargo, 2002; Richardson et al., 2003). El grano de trigo es el grano de mayor degradabilidad potencial y con mayor tasa de desaparición de MS, mientras que el sorgo se ubica en los de menor degradabilidad potencial y tasa de degradación. Las características de los almidones, de las proteínas y de las paredes celulares de las células del endospermo así como de las cubiertas externas de las distintas variedades e híbridos de los granos pueden explicar estas diferencias. La curva de degradación de la MS *IS* del grano de trigo obtenida en este estudio presenta características muy similares a la reportada por de Smet et al (1995), donde se observan valores de fracción soluble de MS de 20% y valores de degradación a las 12 horas de 90% de MS. Muy pocas estimaciones de tasas de degradación de paredes celulares de los granos de trigo y sorgo están disponibles para su comparación, pero, en general, las paredes celulares de estos granos presentan alto contenido en hemicelulosas, especialmente en pentosanas, que son poco digestibles (Sauvant y Michalet-Doreau, 1989), a su vez el contenido de taninos del sorgo utilizado en este estudio puede interferir con la degradación de la pared celular al inhibir las celulasas ruminales (Van Soest, 1994).

Cuadro IX. Parámetros de degradabilidad in situ de MS de pasturas y forrajes.

Pastura/forraje	Animal	a (%)	b (%)	c (%/h)	DE (%)	L(h)	Referencia	
(Rangos de valores/valores)								
Pasturas								
Alfalfa	Distintos estados de madurez	29 - 36	39 - 48	11.4 - 17.6	58 - 77 (Kp=6%/h)	-	Elizalde et al., 1999	
Bromus	Distintos estados de madurez	19 - 24	43 - 64	5.6 - 11.5	40 - 66 (Kp=6%/h)	-	Elizalde et al., 1999	
Festuca	Distintos estados de madurez	23 - 41	40 - 58	2.7 - 8.6	38 - 66 (Kp=6%/h)	-	Elizalde et al., 1999	
Alfalfa	Distintos estados de madurez	33 - 47	33 - 37	13.0 - 16.0	55 - 73 (Kp=6%/h)	-	Hoffman et al 1993	
Lotus	Distintos estados de madurez	34 - 49	33 - 38	15.0 - 20.0	58 - 77 (Kp=6%/h)	-	Hoffman et al 1993	
Trébol rojo	Distintos estados de madurez	36 - 44	41 - 46	13.0 - 18.0	64 - 78 (Kp=6%/h)	-	Hoffman et al 1993	
Bromus	Distintos estados de madurez	26 - 33	49 - 52	3.0 - 6.0	41 - 62 (Kp=6%/h)	-	Hoffman et al 1993	
Raigrás Perenne	Distinta fertilización N	9 - 21	68 - 86	4.7 - 10.1	48 - 65	-	Van Vuuren et al, 1991	
Raigrás Perenne	Distinta fertilización N y distintas Estaciones	34 - 46	49 - 58	6.1 - 6.9	60 - 73	-	Van Vuuren et al, 1992	
Raigrás Perenne	Distintas estaciones	34 - 43	53 - 62	5.1 - 5.9	62 - 68	-	Van Vuuren et al, 1993	
Alfalfa	Distintos años, distintas estaciones	Vacas	37 - 40	34 - 48	8.5 - 12	57 - 67 (Kp=6%/h)	-	Marichal et al (inéditos)
Avena	Invierno, distintos años	Vacas	40	50	6.2	65 (Kp=6%/h)	-	Marichal et al (inéditos)
Lotus	Distintos años, distintas estaciones	Vacas	29 - 42	33 - 49	7.3 - 10.4	49 - 72 (Kp=6%/h)	-	Marichal et al (inéditos)
Trébol rojo	Distintos años, distintas estaciones	Vacas	34 - 40	41 - 50	3.3 - 6.6	60 - 65 (Kp=6%/h)	-	Marichal et al (inéditos)
Raigrás	Invierno, distintos años	Vacas	54	42	7.2	76 (Kp=6%/h)	-	Marichal et al (inéditos)
Avena	Invierno	Vacas	57,3	33,3	7.78	75 (Kp=7%/h)	-	Bargo et al., 2001
Pastura	Mezcla de gramíneas (50% bromus)	Vacas	24	57	6.8	-	2.2	Bargo, 2002
Pastura	Bermuda. Para pastoreo o heno	Novillos	18 - 29	17 - 37	3.5 - 4.8	31 - 46 (Kp=3.5%/h)	0-3.5	Scarborough et al 2001
Forrajes secos								
Paja de cereal	Trigo	Capones	7.6*	60.5*	2.6*	-	-	Richardson et al., 2003
Paja de cereal	Trigo	Vacas	0	54.9	2.7	-	-	Dewhurst et al., 1995
Heno gramínea	93 % heno dactylis glomerata	Vacas	19.2	60.1	5.9	43	3.8	Martin et al., 2001
Heno leguminosa	Alfalfa		31.9	50.6	6.4	60 (Kp=5%/h)		Alves et al., 2001
Rastrojos leguminosas	2 Variedades (11% PC, 64.5 % FDN)	Capones	18 - 20	36 - 41	3.8 - 4.8	-	1.5-2	Bruno Soares et al. 2000

a, b, c parámetros de degradabilidad de la MS (a: fracción soluble, b: fracción potencialmente degradable, c: tasa de degradación)

DE: Degradabilidad efectiva de la MS

** Parametros de degradabilidad de la MO*

Cuadro X. Parámetros de degradabilidad in situ de la FDN de pasturas y forrajes

Pastura/forraje	Animal	a (%)	b (%)	c (%/h)	L (h)	DE (%)	Referencia	
Pasturas								
Alfalfa	Distintos estados fenológicos	6 - 16	41 - 50	7 - 11	-	29 - 48 (Kp=6%/h)	Hoffman et al 1993	
Lotus	Distintos estados fenológicos	0 - 8	43 - 56	8 - 15	-	25 - 46 (Kp=6%/h)	Hoffman et al 1993	
Trébol Rojo	Distintos estados fenológicos	0 - 7	28 - 53	3 - 8	-	19 - 23 (Kp=6%/h)	Hoffman et al 1993	
Bromus	Distintos estados fenológicos	1 - 2	63 - 81	3 - 6	-	21 - 42 (Kp=6%/h)	Hoffman et al 1993	
Raigrás Perenne	Distintas fertilización N y distintas Estaciones	0	90- 94	4 - 7	-	41- 49	Van Vuuren et al, 1992	
Raigrás Perenne	Distintas estaciones	0	90 - 94	4 - 5	-	41- 44	Van Vuuren et al, 1993	
Avena	Invierno	0	82.46	5.2	0	-	Bargo et al., 2001	
Avena	Invierno	Vacas y novillos	0	68.3	4.4	1.4	28.9 (Kp=4%/h)	Elizalde et al., 1992
Pastura	Mezcla de gramíneas (50% bromus)	Vacas	9		5.5	4.3	-	Bargo 2002
Praderas Naturales	62 muestras de forraje de diversa composición botánica y estados Fenológicos	Vacas	0 - 9	51- 84	1.4 - 10.3	0 - 3.4	-	Andrés et al.,2005
Heno leguminosa	Alfalfa	Vacas	4.1	71.7	4.0	-		Alves et al., 2001
Heno leguminosa	Alfalfa (20% PC y 52 % FDN)	Vacas	-	41.3	10.0	0.1		Varel et al 1995
		Vaquillonas	-	42.4	6.9	0.4		
Heno gramínea	Bromus (8.2 %PC y 82.6 % FDN)	Vacas	-	69.7	3.8	1.8		Varel et al 1995
		Vaquillonas	-	68.5	3.5	2.7		
			4.5 -					
Rastrojos de leguminosas	2 Variedades (11% PC, 64.5 % FDN)		7	40 - 43	28 - 3.6	0 - 3.0		Bruno Soares et al. 2000

a, b, c parámetros de degradabilidad de la FDN (a: fracción soluble, b: fracción potencialmente degradable, c:tasa de degradación)

DE: Degradabilidad efectiva de la FDN

Cuadro XI. Parámetros de degradabilidad in situ de la MS de algunos subproductos y concentrados energéticos

Alimento	Animal	a (%)	b (%)	c (%/h)	DE (%)	kp(%/h)	Referencia	
(Rangos/valores)								
Subproductos agroindustriales								
Farelo	Deshidratado	Vacas	10.9	51.9	3.1	30.8	5	Promkot y Wanapat, 2003
Citrus pulpa	Deshidratada	Capones	-	-	-	55.0 *	5	Marichal y Bayardo, 1994
Citrus pulpa	Fresca	Vacas	-	-	-	75 *	6.5	Tagari et al, 1995
Citrus pulpa	Deshidratada	Vacas	-	-	-	62- 80	-	De Martins et al., 1999
Citrus pulpa	Deshidratada	Capones	44 -46	53-54	6.4 - 7.5	80- 82	3.5	Pereira y Gonzalez, 2004
Citrus pulpa	Deshidratada	Vacas	36	64	8.2	-	-	DePeters et al, 1997
Citrus pulpa		Vacas	33.5	63.6	7.6	-	-	Dewhurst et al., 1995
Concentrados								
Trigo grano		Novillos	61.1	-	12.4	-	-	Herrera-Saldana et al., 1990
Sorgo grano		Novillos	1.5	-	3.7	-	-	Herrera-Saldana et al., 1990
Cebada, grano		Novillos	47	-	8.5	-	-	Herrera-Saldana et al., 1990
Cebada, grano		Capones	48.9*	42.4*	21.3*	-	-	Richardson et al., 2003
Trigo grano		Vacas	42.6	51.1	17.26	-	-	Dewhurst et al., 1995
Concentrado	Base de maíz (15 % FDN, 15% PC)	Vacas	27,8	62,3	7.4	-	-	Bargo, 2002
Trigo grano		Vaca	94 (a + b)**		28.6	92.1	6.5	Arieli et al., 1995
Sorgo grano		Vaca	88 (a + b)**		8.4	79.5	6.5	Arieli et al., 1995
Cebada grano		Vaca	89.5 (a + b)**		17.8	84.4	6.5	Arieli et al., 1995
Maíz grano		Vaca	92.7 (a + b)**		11.5	83.5	6.5	Arieli et al., 1995

a, b, c parámetros de degradabilidad de la MS (a: fracción soluble, b: fracción potencialmente degradable, c: tasa de degradación)

DE: Degradabilidad efectiva de la MS

** Parametros de degradabilidad de la MO*

*** Degradabilidad potencial: a+b*

2. Comparación de las cinéticas estimadas por las diferentes metodologías

Para el conjunto de los alimentos evaluados, en el Cuadro XII y XIII se presenta el N° de alimentos en que la estimación de los parámetros de la degradación de la MS y la FDN obtenidos con las metodologías *IV* fue similar, mayor o menor que la estimación de los parámetros realizada por la metodología *IS*, respectivamente.

Cuadro XII. Distribución del total de alimentos según los valores de cada parámetro de la cinética de la MS estimado por las metodologías *IV* (similar, mayor o menor con respecto a la metodología *IS*)

Parámetro*	N° alimentos		
	<i>IS = IV</i>	<i>IS > IV</i>	<i>IS < IV</i>
a	9		1
b (IVA)	6	3	
(IVAm)	8	1	
c	3	7	
L	4		6

*parámetros: a: fracción soluble; b: fracción potencialmente degradable; c: tasa de degradación de la fracción b; L: tiempo lag.
IS: in situ; IV: in vitro; IVA: in vitro Ankom; IVAm: in vitro Ankom modificado

Cuadro XIII. Distribución del total de alimentos según los valores de cada parámetro de la cinética de la FDN estimado por las metodologías *IV* (similar, mayor o menor con respecto a la metodología *IS*).

Parámetros*	N° alimentos		
	<i>IS = IV</i>	<i>IS > IV</i>	<i>IS < IV</i>
a	2	7	1
b (IVA)	6	2	1
(IVAm)	6		2
c	2	7	
L	3	1	2

*parámetros: a: fracción soluble; b: fracción potencialmente degradable; c: tasa de degradación de la fracción b; L: tiempo lag.
IS: in situ; IV: in vitro; IVA: in vitro Ankom; IVAm: in vitro Ankom modificado

Considerando todos los alimentos evaluados, los valores de la fracción “a” de la MS fueron similares ($P > 0.05$) entre las distintas metodologías. Esto era lo esperado ya que, en ambos métodos, el procedimiento de determinación de los tiempos cero, con los que el modelo estimó la fracción “a”, fue realizado en forma simultánea, con similar relación de masa de muestra a superficie de bolsa y similar tamaño de poro promedio de las mismas. El único alimento en que se registró diferencias ($P < 0.05$) fue el farelo de cervecera, en que la estimación de la fracción “a” fue menor *IS* que *IV*, sin encontrarse explicación al respecto.

Los valores de la fracción “a” de la FDN, en cambio, presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los métodos *in situ* e *in vitro*. Los valores de “a”

para la pared celular estimados en la metodología *IS* fueron superiores a los estimados por la metodología *in vitro* en todos los alimentos con excepción del farelo de cervecería, en que fueron similares ($P > 0.05$). Esto podría explicarse por pérdidas de partículas a través de los poros de las bolsas de nylon debido a que, en la metodología *IS*, el tramado de la tela de las bolsas era más heterogéneo que la tela de las bolsas utilizadas *IV* y la relación volumen de muestra a volumen de bolsa era menor que en las *IV*. El valor esperado para la fracción “a” de la pared celular es un valor cercano a cero; la metodología *in vitro* estimó fracciones en el entorno de cero en trébol blanco, lotus, raigrás, heno de alfalfa y paja de cebada, no ocurriendo lo mismo para los restantes alimentos. La presencia de fracción soluble de la FDN en las metodologías *in vitro* se explicaría también por pérdidas de partículas, debido a que los alimentos que presentaron fracción “a” mayor que cero podrían contener, luego de la molienda, partículas de mayor finura y perderse a través de los poros de la bolsa.

La similitud de los valores de la fracción “a” de la MS explica la alta correlación encontrada en este parámetro ($r = 0.98$), mientras que el grado de asociación entre la fracción “a” de la FDN estimada *IS* y la estimada *in vitro* resultó en un valor menor ($r = 0.72$) (Cuadro XIV).

La fracción potencialmente degradable o fracción “b” de la MS presentó diferencias ($P < 0.05$) en las estimaciones por los métodos *IS* e *IVA*. Los valores de la fracción “b” estimados por *IS* fueron similares a los estimados por *IVA* en seis de los nueve alimentos evaluados, siendo mayores, para la metodología *IS* que para la *IVA*, en los tres restantes (avena, raigrás y farelo de cervecería). Esto posiblemente se deba a alteraciones en las condiciones *in vitro* durante la fermentación. Los incrementos en los porcentajes de la MS desaparecida a medida que transcurre el tiempo de fermentación no son similares entre las metodologías *in situ* e *in vitro*; las diferencias mayores ocurren en los tiempos tempranos de la incubación (entre las 4 y 12 horas) y ésta diferencia, en promedio entre todos los alimentos, alcanza un valor de 40%; mientras que, en los tiempos finales de la fermentación, las diferencias se minimizan (1-3%) (Anexo 1)

La mayor diferencia en los porcentajes de MS desaparecidas entre los métodos *in situ* e *in vitro* (expresada como la resta entre el % de MS desaparecida *IS* y el % de MS desaparecida *in vitro* a las 2, 4 y 8 horas de incubación estuvo asociada ($P < .05$) negativamente con el contenido de FDN (%) a través de las siguientes ecuaciones:

Diferencia en % MS desaparecido a las 2 h (*in situ* - *in vitro*):

$$Y = 23,6 (4,75) - 0,32 (0,09) (\text{FDN}\%) \quad R^2 = 0.53$$

Diferencia en % MS desaparecido a las 4 h (*in situ* - *in vitro*):

$$Y = 29,3 (5,6) - 0,35 (0,11) (\text{FDN}\%) \quad R^2 = 0.56$$

Diferencia en % MS desaparecido a las 8 h (in situ - in vitro):

$$Y = 25,5 (6,27) - 0,23 (0,13) X \quad R^2=0.91$$

El contenido porcentual de la FDN de los alimentos explicó más del 50% de la variación de las diferencias en el porcentaje de MS desaparecido entre los métodos en las 2 y 4 horas, mientras que a las 8 horas la diferencia entre los métodos estuvo explicada fundamentalmente por el contenido de pared celular. A menor contenido de FDN de los alimentos, mayores fueron las diferencias en el porcentaje de la MS desaparecida entre los métodos *in situ* e *in vitro*.

Dewhurst et al. (1995) encontraron, para un amplio rango de alimentos, que las mayores discrepancias entre los métodos *in situ* y el *in vitro* de Tilley y Terry se manifestaban también en los tiempos cortos de incubación y estuvieron asociados negativamente con el contenido de fibra detergente ácido. En este estudio, la relación encontrada fue con el contenido de FDN.

El pasaje de las condiciones in vivo de los microorganismos ruminales a las condiciones *in vitro*, así como el procedimiento de la extracción de licor y la preparación del medio *in vitro* puede influir sobre la actividad microbiana, retrasando o alterando la degradación de los alimentos. El pH de los fluidos ruminales que se extrajeron de los capones para las distintas corridas de la metodología *in vitro* fue de 7,2 (DE: 0,08), mientras que el pH de las mezclas (buffer más fluido ruminal) introducidas en los frascos incubadores del Daisy^{II} fue de 7,06 (DE: 0,09). A si mismo, el pH tuvo un valor promedio de 6,82 (DE: 0,09) en las 2 y 4 horas de incubación, no habiendo elementos para pensar que la diferencia en las desapariciones de sustrato en los tiempos tempranos sean debidas a un pH inadecuado para la fermentación. La actividad microbiana del inóculo no se midió; el muestreo del licor fue realizado inmediatamente antes de la alimentación en la mañana sin haber tenido acceso al agua, pero la última comida del día anterior distaba 15 horas del momento de la extracción, pudiendo existir limitaciones en nutrientes específicos en el inóculo que hayan limitado el crecimiento microbiano. Así mismo, el buffer utilizado contenía solo urea como fuente nitrogenada no incluyendo fuentes de aminoácidos. Mandebvu et al (2001) encontraron mayores digestibilidades verdaderas de la MS y de la FDN en los tiempos largos de incubación cuando la fuente nitrogenada agregada a la solución buffer fue la tripticasa que contenía mayor contenido de N total y de N amino frente a otra de menor contenido.

Las proporciones de inóculo con respecto al buffer (400ml de fluido ruminal: 1600 ml de solución buffer; 20:80 % de inóculo a solución buffer, respectivamente) utilizadas en este trabajo fueron adecuadas, así como las condiciones de anaerobiosis, CO₂ y temperaturas (Mould et al., 2005) y posiblemente no hayan afectado la actividad microbiana.

La metodología *IVAm* modificó los valores de la fracción “b”, con respecto a la metodología *IVA* en 3 de los alimentos evaluados (avena, raigrás y farelo)

resultando en valores similares al *IS*, en 2 de ellos (raigrás y fabelle). Esto puede deberse a diferencias en la actividad microbiana en las últimas fases de la incubación, pudiendo ser efectos del pH, de agotamiento de nutrientes para los microorganismos o de acumulación de productos finales de la degradación. Los valores de pH promedio para todas las corridas registrados en las últimas etapas de fermentación (72 y 96 h) fueron mayores ($P < 0.05$) en el método *IVAm* que en el *IVA*, registrándose algunos valores de pH (6.4) que podrían comprometer la actividad celulolítica.

La fracción “b” de la FDN también fue estimada diferente ($P < 0.05$) por los distintos métodos. Los valores de la fracción “b” estimados por *IS* fueron diferentes a los estimados por *IVA* en 3 de los alimentos evaluados. En trébol blanco, el valor de fracción “b” estimado por *IS* fue menor, debido posiblemente a pérdidas de partículas, pues las cantidades totales de FDN degradada alcanzaron valores similares entre las dos metodologías evaluadas. En el heno de alfalfa y en el grano de trigo, la fracción estimada por *IS* fue mayor que la estimada por *IVA*, posiblemente debido a diferencias durante la fermentación temprana de la pared celular. Solo dos alimentos (trébol blanco y raigrás) presentaron diferencias, con respecto al *IS*, en la estimación de la fracción “b” cuando se utilizó la metodología *IVAm*. Las estimaciones de la metodología *IVAm* fueron mayores que las de *IS*, por las mismas razones. Las diferencias porcentuales entre los métodos *in situ* e *in vitro* fueron mayores en los tiempos cortos de incubación alcanzando un valor promedio para todos los alimentos evaluados de 160%, llegando a las 96 horas de incubación con diferencias porcentuales de 5 y 20 % (Anexo 2). Las diferentes estimaciones de la fracción “b” de los dos métodos *in vitro* pueden ser explicadas, por los mismos factores que modificaron la fracción de la MS y, en el caso particular del grano de trigo, pueden haber influido la cantidad de muestras de alimentos almidonosos incubada en el mismo frasco de digestión e ir en desmedro de la degradación de las paredes celulares modificando los valores de pH (Mertens y Loften, 1980).

Los coeficientes de correlación entre los parámetros “b” de la degradación de la MS tuvieron un valor de de 0.87 y de 0.7 para *IVA* y *IVAm*, respectivamente, mientras que para FDN estos fueron más altos ($r = 0.92$ y $r = 0.87$ para *IVAm* e *IVA*, respectivamente) (Cuadro XII y Cuadro XIII)

Las tasas de desaparición estimadas por los distintos métodos fueron diferentes tanto para la MS como para la FDN.

Los valores de la fracción “c” de la MS estimados por *IS* fueron superiores en 7 de los alimentos evaluados, siendo similares en los tres restantes (tanto para *IVA* como para *IVAm*), también en 7 de los alimentos evaluados, los valores de la fracción “c” de la FDN estimado por *IS* fueron superiores tanto para *IVA* como para *IVAm*, siendo similares en los 2 restantes. La explicación de la diferencia entre los métodos *in situ* e *in vitro* en el valor de esta tasa se encuentra en diferencias en la actividad de la fermentación en los tiempos tempranos. Los mismos factores que explicarían las diferencias en las fracciones “b” posiblemente estén incidiendo en el valor de la tasa de degradación. Las correlaciones entre las tasas de desaparición de la MS

obtenidas por las metodologías *IS* e *IVA* y las generadas por *IS* e *IVAm* presentaron valores de $r = 0.42$ y $r = 0.69$, respectivamente, mientras que no existió correlación entre las tasas de degradación de la pared entre los métodos *IS* y los *in vitro* ($r = 0.14$ y $r = 0.07$ para *IVA* e *IVAm*, respectivamente) (Cuadro XIV y Cuadro XV).

La metodología *IS* no generó tiempos lag en la degradación de la MS en ninguno de los alimentos, con excepción del Lotus (en el que fue de 1 hora) mientras que en la degradación de la FDN, solo en 4 de los alimentos evaluados generó un valor de lag que estuvo en el entorno de 1 hora; en contraposición, las metodologías *in vitro* generaron tiempos lag en 6 de los 10 y en 4 de los 10 alimentos para la MS y FDN, respectivamente; siendo en promedio para la FDN, 2,5 horas mayor el tiempo lag en los alimentos evaluados con las metodología *in vitro* que en los evaluados por la *IS*. Una mayor duración de los tiempos lag en las metodologías *in vitro* ha sido documentado también por otros autores (Mertens y Loften, 1980; Varel y Kreikemeier, 1995).

Cuadro XIV: Ecuaciones de regresión entre parámetros de la degradabilidad de la MS estimados por *IS* y estimados por *IVA* o *IVAm*

Y : Fracción estimada IS	Y = b X (DE) + a (DE)	X: Fracción estimada: in vitro, IVA o IVAm	R	Significancia
"a"	1.04 (0.07) X - 1.48 (2.19)	"a" <i>in vitro</i>	0.98	P<0.01
"b"	0.5 (0.19) X + 24.3 (10.2)	" b" <i>IVAm</i>	0.70	P<0.01
"b"	0.84 (0.18) X + 11.5 (8.7)	"b" <i>IVA</i>	0.87	P<0.01
"c"	2.26 (0.89) X + 2.97 (7.9)	"c" <i>IVAm</i>	0.42	NS
"c"	2.64 (1.96) X + 1.45 (9.7)	"c" <i>IVA</i>	0.69	NS

*Parámetros de la degradabilidad de la FDN: "a": fracción soluble, "b": fracción insoluble potencialmente degradable, "c": tasa de degradación; (DE): valores entre paréntesis de desvío estándar; IVA, IVAm: métodos *in vitro* sistema tecnología Ankom y método *in vitro* sistema tecnología Ankom modificado, respectivamente; r: coeficiente de correlación

Cuadro XV. Ecuaciones de regresión entre parámetros* de la degradabilidad de la FDN estimados por *IS* y estimados por *IVA* o *IVAm*

Y : Fracción estimada por <i>IS</i>	Y = b (Ds) X + a (Ds)	X: Fracción estimada por <i>in vitro</i> , <i>IVA</i> o <i>IVAm</i>	r	Significancia
"a"	0.59 (0.13) X + 7.94(1.41)	"a" <i>in vitro</i>	0.72	P<0.01
"b"	0.82 (0.07) X + 9.6 (4.5)	"b" <i>IVAm</i>	0.92	P<0.01
"b"	0.84 (0.18) X + 11.5 (8.7)	"b" <i>IVA</i>	0.87	P<0.01
"c"	0.89 (1.27) X + 7.97 (10,5)	"c" <i>IVA</i>	0.14	NS
"c"	-0.06 (3.7) X + 14,8 (17)	"c" <i>IVAm</i>	0.007	NS

*Parámetros de la degradabilidad de la FDN: "a": fracción soluble, "b": fracción insoluble potencialmente degradable, "c": tasa de degradación; (Ds): valores entre paréntesis de desvío estándar; *IS*, *IVA*, *IVAm*: métodos *in situ*, *in vitro* sistema tecnología Ankom y método *in vitro* sistema tecnología Ankom modificado, respectivamente; r: coeficiente de correlación.

3. Comparación de las DE de la MS y de la FDN estimadas por las diferentes metodologías

Las DE_{MS} estimadas por la metodología *in situ* fueron, en general, superiores (P<0.05) a las estimadas por los métodos *in vitro* (con excepción de la paja de cebada), los valores promedios fueron 23.5 % (±11.2) superiores en *IVA*, y 20.6 % (± 9.1) en *IVAm*, mientras que las DE_{MS} estimadas entre los dos métodos *in vitro* no difirieron (P<0.05) (Cuadro VIII, Figura 18).

Las DE_{FDN} determinadas por la metodología *IS* fueron en promedio 70 % (± 34) superiores (P<0.05) a las determinadas *in vitro* (Figura 19), no existiendo diferencias entre los métodos *in vitro*.

Las DE_{MS} y las DE_{FDN} obtenidas *in situ* y las DE_{MS} y las DE_{FDN} obtenidas por *IVA* o *IVAm* estuvieron altamente correlacionadas (P<0.01) (Cuadro XVI).

Cuadro XVI. Ecuaciones de regresión entre las degradabilidades efectivas de la MS y de la FDN determinadas *IS* y las determinadas por los métodos *IVA* o *IVAm*.

Y: DE <i>IS</i>	Y = b (Ds) X + a (Ds)	X: DE <i>IV</i>	r	Significancia
DE _{MS}	1,15 (0, 10) X + 3,64 (5,9)	DE _{MS} <i>IVA</i>	0,97	P<0.01
DE _{MS}	1,22 (0.12) X - 0,28 (6)	DE _{MS} <i>IVAm</i>	0,97	P<0.01
DE _{FDN}	1,51 (0.4) X + 5,3 (12,6)	DE _{FDN} <i>IVA</i>	0.86	P<0.01
DE _{FDN}	1,4 (0.3) X + 8,6 (10,2)	DE _{FDN} <i>VAm</i>	0.86	P<0.01

DE: degradabilidades efectivas de la MS y de la FDN asumiendo una tasa de pasaje (kp) de 6%/h. (Ds): valores entre paréntesis de desvío estándar

Otros autores (Graham y Aman, 1984; Varel y Kreikemer, 1995; Dewhurst et al, 1995, Scholljederes et al, 2002) también han encontrado que las estimaciones de degradabilidad o digestibilidad de la MS y/o FDN determinadas *in situ* fueron mayores que las determinadas en condiciones *in vitro*. Varel y Kreikemer (1995) encontraron que las estimaciones de degradabilidad de extractos de FDN de henos de alfalfa y bromus *in situ* presentaron menor tiempo lag (3.5 horas menos) y mayores degradabilidades potencial (6%) y tasa de degradación (3%) que con la metodología *in vitro* Tilley y Terry (1963). Dewhurst et al., (1995) encontraron valores de fermentabilidad de la MO estimados por la técnica *in situ* en los distintos tiempos de fermentación eran consistentemente mayores que los obtenidos por el *in vitro* (Tilley y Terry, 1963), siendo marcadamente mayor para los alimentos con altos contenidos de almidón (grano de trigo, papa dulce y germen de maíz). Sin embargo, Robinson et al., (1999) reportaron subestimaciones de 5% de la digestión *in situ* de la FDN a las 48 horas para pasturas (alfalfa, sudangrás, planta entera de maíz, avena y trigo) comparando con la digestión de la FDN a las 48 horas en sistema Daisy, mientras que Spanghero et al., (2003) presentaron un valor de 63.5 % de digestibilidad de la FDN a las 48 h en henos determinada por el sistema *in vitro* Ankom frente a 53.5% % de degradabilidad efectiva de la FDN estimada por la metodología *in situ*.

Las tres metodologías rankearon los alimentos de forma similar, según su DE_{MS} , las pasturas de lotus, raigrás y avena aunque presentaron diferente ordenamiento entre ellas, el valor de DE_{MS} de estas pasturas no difiere ($P < 0.05$) (Cuadro XVII)

Cuadro XVII. Ranking de los alimentos según las DE_{MS} para los diferentes métodos*

Ranking de los alimentos según DE_{MS} (kp: 6%/h)					
Método <i>IS</i>	DE_{MS}	Método <i>IVA</i>	DE_{MS}	Método <i>IVAm</i>	DE_{MS}
Citrus, pulpa	87,4	Trigo, grano	76,5	Trigo, grano	s/d
Trigo, grano	86,3	Citrus, pulpa	66,2	Citrus, pulpa	66,3
Trébol Blanco	84,0	Trébol Blanco	64,4	Trébol Blanco	64,3
Lotus	72,0	Raigrás	59,2	Avena	60,5
Raigrás	67,5	Avena	58,1	Raigrás	58,1
Avena	64,2	Lotus	56,8	Lotus	57,0
Sorgo, grano	48,4	Sorgo, grano	s/d	Sorgo, grano	42,5
Heno alfalfa	44,2	Heno alfalfa	39,7	Heno alfalfa	38,6
Farelo de cerv.	43,5	Farelo de cerv.	31,6	Farelo de cerv.	31,6
Cebada, paja	22,8	Cebada, paja	16,8	Cebada, paja	18,0

**IS*, *IVA* e *IVAm*: métodos *in situ*, *in vitro* tecnología Ankom e *in vitro* tecnología Ankom modificado. DE_{MS} : degradabilidad efectiva de la MS
Kp: tasa de pasaje asumida para el cálculo de DE_{MS}

Cuando se ordenan los alimentos según los valores de DE_{FDN} el ordenamiento según la metodología *IS* es diferente que en las metodologías *in vitro*, no registrándose diferencias entre el *IVA* e *IVAm* (Cuadro XVIII). Las DE_{FDN} de la pulpa de citrus, el grano de trigo y la paja estuvieron ubicadas

en 1º, 2º y último lugar respectivamente en las 3 metodologías. Las pasturas de raigrás y trébol blanco siempre se ubicaron en 3er lugar para los 3 métodos, si bien el orden entre ellas es diferente entre *IS* y los *in vitro*. Los demás alimentos (lotus, avena, grano de sorgo, farello de cervecería y heno de alfalfa) no mantuvieron un orden relacionado a su agrupamiento.

Cuadro XVIII. Ranking de los alimentos según las DE_{FDN} para los diferentes métodos*

Ranking de los alimentos según DE_{FDN} (kp: 6%/h)					
Método <i>IS</i>	DE_{FDN}	Método <i>IVA</i>	DE_{FDN}	Método <i>IVAm</i>	DE_{FDN}
Citrus, pulpa	78,50	Citrus, pulpa	47,35	Citrus, pulpa	46,98
Trigo, grano	s/d	Trigo, grano	36,89	Trigo, grano	s/d
Trébol Blanco	67,05	Raigrás	35,66	Raigrás	35,93
Raigrás	50,25	Trébol Blanco	33,32	Trébol Blanco	33,51
Lotus	47,65	Avena	30,38	Avena	32,78
Avena	46,40	Heno alfalfa	22,50	Heno alfalfa	21,78
Sorgo, grano	36,01	Farelllo de cerv.	21,49	Farelllo de cerv.	21,59
Farelllo de cerv.	35,63	Lotus	20,64	Lotus	20,60
Heno alfalfa	30,10	Sorgo, grano	s/d	Sorgo, grano	17,20
Cebada, paja	18,49	Cebada, paja	9,19	Cebada, paja	s/d

**IS*, *IVA* e *IVAm*: métodos *in situ*, *in vitro* tecnología Ankom e *in vitro* tecnología Ankom modificado. DE_{FDN} : Degradabilidad efectiva de la FDN asumiendo una tasa de pasaje (kp) de 6%/h para su cálculo.

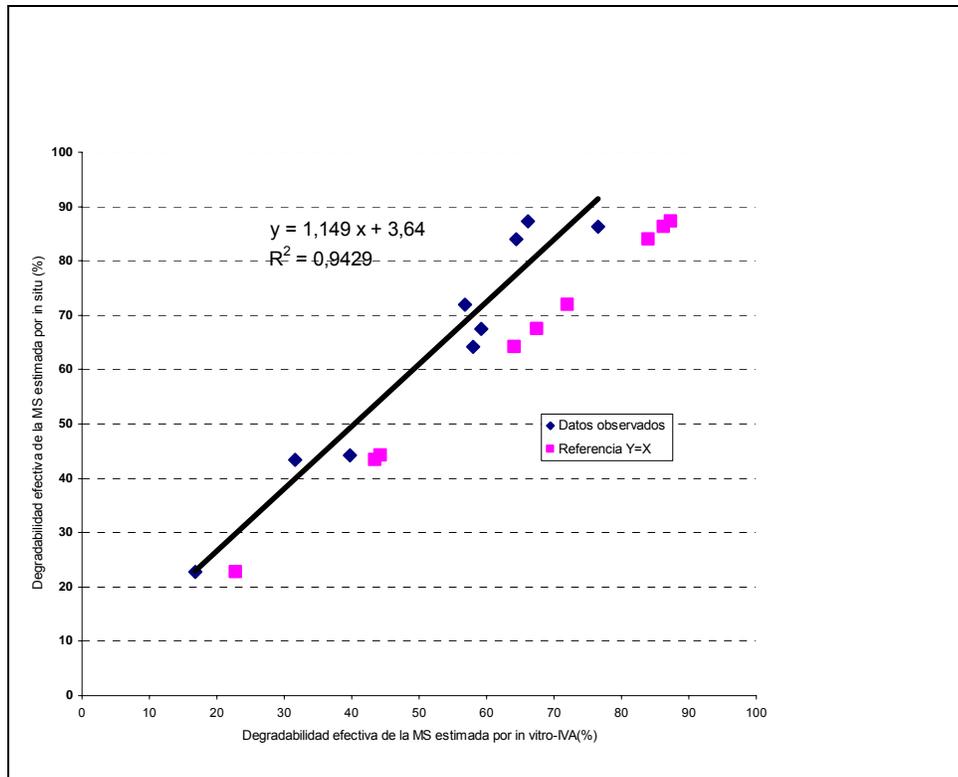


Figura 18. Relación entre la degradabilidad efectiva de la MS determinada por el método IS y la determinada por el método IVA.

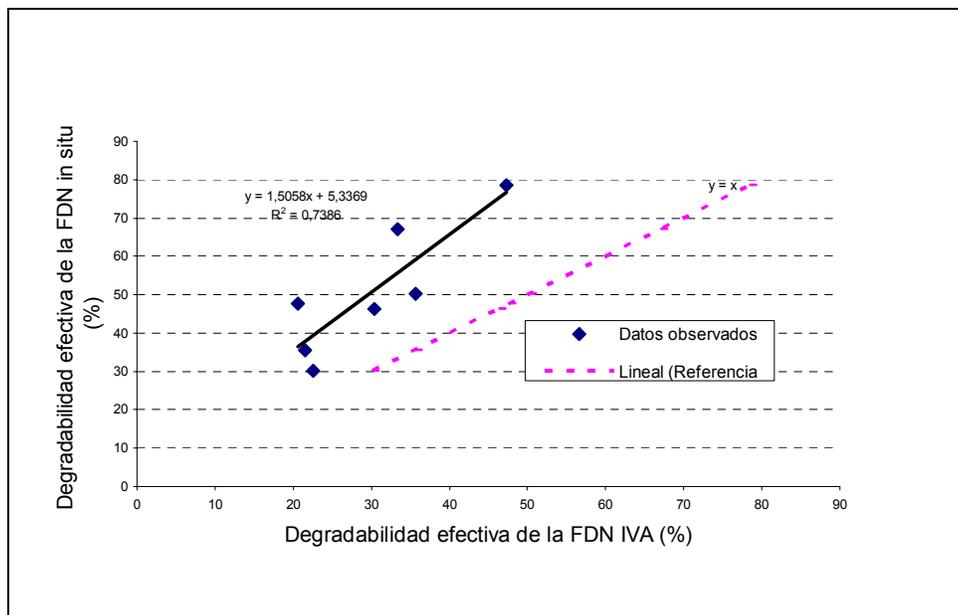


Figura 19. Relación entre la degradabilidad efectiva de la FDN determinada por el método IS y la determinada por el método IVA

CONCLUSIONES

Las cinéticas de degradación de la MS y de la FDN de los alimentos estudiados estimadas a través de los métodos *in vitro* (IVA e IVAm) presentaron diferencias, con respecto a las obtenidas con la metodología *in situ* de referencia, siendo las diferencias de mayor magnitud en la FDN que en la MS.

Las diferencias entre los métodos se manifiestan, más que nada, en las fases tempranas de fermentación, teniendo un gran impacto en las tasas de degradación de la MS y la FDN y en los tiempos lag de la pared celular.

Existió una alta correlación entre las degradabilidades efectivas de la MS de la metodología *in situ* y de las *in vitro*, determinando un ranking similar de los alimentos, de acuerdo a las degradabilidades efectivas de la MS.

En los métodos *in vitro* se debería investigar los factores que inciden en las condiciones experimentales (actividad microbiana, interacción sustrato/inóculo, interacción entre distintos sustratos/inóculo, tiempo de acostumbamiento del inóculo a las condiciones *in vitro*, entre otros), durante las fases iniciales de la fermentación.

El cambio de la solución y licor ruminal a las 48 horas (IVAm) no modificó sustancialmente los resultados.

Anexo 1. Relación entre los % de MS desaparecidos estimados por los métodos *IS* e *IVA* (% de MS desaparecido *IS* / % de MS desaparecido *IVA*) para los diferentes tiempos de incubación.

Tiempo (h)	2	4	8	12	24	48	72	96
Trébol Blanco	1,52	1,60	1,53	1,41	1,19	1,05	1,02	1,01
Lotus	1,20	1,41	1,49	1,46	1,29	1,11	1,05	1,03
Raigrás	1,19	1,16	1,13	1,13	1,15	1,19	1,20	1,20
Avena	1,14	1,31	1,37	1,25	1,22	1,10	1,09	1,09
Alfalfa, heno	1,12	1,14	1,15	1,14	1,11	1,07	1,06	1,05
Cebada, paja	1,20	1,41	1,64	1,59	1,49	1,35	1,25	1,17
Farelo	1,00	1,19	1,42	1,53	1,55	1,36	1,22	1,14
Citrus, pulpa	1,45	1,56	1,48	1,36	1,15	1,05	1,03	1,03
Trigo, grano	1,50	1,39	1,18	1,08	1,02	1,01		
Promedio	1,26	1,35	1,38	1,33	1,24	1,14	1,11	1,09

Anexo 2. Relación entre los % de FDN desaparecidos estimados por los métodos *IS* e *IVA* (% de FDN desaparecido *IS* / % de FDN desaparecido *IVA*) para los diferentes tiempos de incubación.

Tiempo (h)	2	4	8	12	24	48	72	96
T Blanco	6,61	4,49	3,10	2,44	1,61	1,19	1,09	1,05
Lotus	10,6:0	24,8:0	8,50	3,38	1,76	1,24	1,13	1,11
Raigrás	5,34	2,26	1,57	1,40	1,25	1,19	1,18	1,17
Avena	1,67	3,07	1,99	1,73	1,43	1,23	1,17	1,15
Alfalfa, heno	1,80	1,48	1,32	1,28	1,25	1,25	1,25	1,25
Cebada, paja	4,17	2,99	2,39	2,17	1,90	1,30	1,56	1,47
Farelo	1,29	1,50	1,72	1,81	1,80	1,57	1,38	1,26
Citrus	2,26	2,42	2,18	1,89	1,41	1,13	1,05	1,03
Trigo, grano	0,92	1,39	1,94	1,54	1,25	1,20		
Sorgo, grano	3,83	3,28	2,71	2,36	1,81	1,45	1,36	1,34
Promedio	3,10	2,54	2,74	2,00	1,55	1,27	1,24	1,20

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adesogan, A.T. (2002). (en línea). What are feeds worth? A critical evaluation of selected nutritive value methods. Proceedings 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, pp 33-47. Consultado en: setiembre 2005. Disponible en: <http://www.animal.ufl.edu/dairy/2002ruminantconference/adesogan.pdf>
2. AFRC. (1993). Energy and protein requirements of ruminants. An advisory manual prepared by the AFRC Technical committee on Responses to Nutrients. CAB International, Wallingford, UK. 158p.
3. Alves, G., Cabreira, C; Nunes, E; Tadeu Dos Santos,G; Dias, G; Cecato, U. 2001 (en línea). Estudo da cinética de degradacao ruminal dos fenos de alfafa e de tifton-85 e da silagem de milho. Consultado en febrero 2006. Disponible en: <http://www.nupel.uem.br/publicacoes/pira-2001/pirac-897.pdf>
4. Andres, S., Giraldez, F. J; Gonzalez, J.S; Pelaez, R; Prieto, N; Calleja, A. (2005). Aust. J. Agr. Res. 56: 187 – 193.
5. Ankom technology Fairport, NY. USA.(en línea). Consultado en mayo 2002. Disponible en: http://www.ankom.com/09_procedures/Daisy%20method.pdf
6. AOAC. (1990) .Official Methods of Analysis (15th.Ed) Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA, USA.
7. Arieli, A.I., Bruckental, O; Kedar; Sklan, D. (1995). In sacco disappearance of starch nitrogen and fat in processed grains. Anim. Feed Sci. Technol. 51: 287–295.
8. Bampidis, V.A., Robinson, P.H. (2006). Citrus by-products as ruminant feeds: A review. Anim. Feed Sci. Technol. (artículo en prensa, j.anifeedsci.2005.12.002.ANIFEE-11428; N° of pages 43).
9. Bargo, F., Rearte, D; Santini, F; Muller, L. (2001). Ruminant digestion by dairy cows grazing winter oats pasture supplemented with different levels and sources of protein. J. Dairy Sci. 84: 2260-227.
10. Bargo, F. (2002). Feeding systems combining pasture with concentrate and total mixed rations for high producing dairy cows. Thesis PhD. The Pennsylvania State University. The Graduate School. College of Agricultural Sci.
11. Beever, D.E., Mould, F.L. (2000). Forage evaluation for efficient ruminant livestock production. In: Forage Evaluation in Ruminant

Nutrition D. I. Givens, E. Owen, R. F. E. Oxford and H. M. Omed (eds).
CABI Publishing, Wallingford, UK. 15- 42 pp.

12. Bruno-Soares, A.M., Abreu, J.M; Guedes, C; Dias da Silva, A. (2000). Chemical composition, DM, and NDF degradation kinetics in rumen of seven legume straw. *Anim. Feed Sci. Technol.* 83:75-80.
13. Czerkawski, J.W. (1986). An introduction to rumen studies. Pergamon Press. New York, NY. 236 p.
14. De Martins, A.S., Zeoula, L.M. do Prado; Martins, I.N; Loyola, E. (1999). Ruminal in situ degradability of dry matter and crude protein of corn and sorghum silages and some concentrate feeds. *Rev. Bras. Zootec.* 18: 1109-1117.
15. De Smet, A.M., De Boever, J.L; De Brabander, D; Vanacker, J; Boucqué, Ch. (1995). Investigation of dry matter degradation and acidotic effect of some feedstuffs by means of in sacco and in vitro incubations. *Anim. Feed Sci. Technol.* 51: 297-315.
16. Dhanoa, M.S. (1988). On the analysis of dacron bag data for low degradability feeds. *Grass and Forage Sci.* 43:441- 443.
17. Dewhurst. R.J., Hepper, D; Webster, A. (1995). Comparison of in sacco and in vitro techniques for estimating the rate and extent of rumen fermentation of a range of dietary ingredients. *Anim. Feed Sci. Technol.* 51: 211-229.
18. Elizalde, J., Merchen, R; Faulkner, D. (1999). In situ dry matter and crude protein degradation of fresh forages during the spring growth. *J. Dairy Sci.* 82: 1978 -1990.
19. Emanuele, S.M., Staples, C.R; Wilcox, C.J. (1991). Extent and site of mineral release from six forage species incubated in mobile Dacron bags. *J. Anim. Sci.* 69: 801-810.
20. France, J., Theodorou, M.K; Lowman, R.S; Beever, D. (2000). Feed evaluation for animal production. *In Feeding systems and feed evaluation models.* M. K. Theodorou and J France (eds),. CABI Publishing, London. 1-9 pp.
21. Grant, R.J., Mertens, D. (1992). Impact of in vitro fermentation techniques upon kinetics of fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 75: 1263-1272.
22. Goering, H.K., Van Soest, J.P. (1970). Forage Fiber Analysis. ARS-USDA Agric. Handbook N° 379. ARS, USDA, Washington, D.C.

23. Hacker, J.B. (1982). Nutritional limits to animal production from pastures. International Symposium on Nutritional Limits to Animal Production from Pastures J. B. Hacker. (Ed).Queensland. CAB. 536 p
24. Hatfield, R.D., Jung, H.G; J. Ralph, J; Buxton, D; Weimer, P.(1994). A comparison of the insolubles residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. J. Sci. Food Agr. 65:51.
25. Herrera-Saldana, R.E., Huber, J.E; Poore, H. (1990). Dry matter, crude protein and starch degradability of five cereal grains. J. Dairy Sci. 73:2386-2393.
26. Hoffman, P.S., Sievert, J; Shaver, R; Welch, D; Combs, D.K. (1993). In situ dry matter, protein, and fiber digestion of perennial forages. J. Dairy Sci. 76: 2632 - 2643.
27. Hvelplund, T., Weisbjerg, M.R. (2000). In situ techniques for the estimation of protein degradability. *In* Forage evaluation in Ruminant Nutrition. D. I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford and H. M. Omed (eds). CABI Publishing, London. 233-258 pp.
28. Huntington, J., Givens, D. (1995). The in situ technique for studying the rumen degradation of feeds: A review of the procedure. Nutrition Abstracts and Reviews (Series B) 65: 65-93.
29. Hvelplund, T., Andrieu, J; Weisbejerg, M.R; Vermorel. M (1995). Prediction of the energy and protein value of forages in ruminants. *In* Recent developments in nutrition of herbivores. Proceeding of the IVth International Symposium on the Nutrition of Herbivores M. Journet, E. Grenet, M. H. Farce, M. Theriez, C. Demarquilly (eds)...INRA. Editions. Paris. 205-227 pp.
30. Jarrige, R. (1989). Ruminant nutrition: recommended allowances and feed tables. INRA. Paris. 389 p.
31. Jung, H.G., Allen, M.S. (1995). Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. J. Anim. Sci. 73:2774.
32. Lopez, S., Dijkstra, J; France, J. (2000). Prediction of energy supply in ruminants *In* Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. D. I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford and H. M. Omed (eds). CABI Publishing, London. 63-94. pp
33. Mandebvu, P., Klingener, J.L; LaCoss, D.D; Ballard, C.S; Sniffen, C.J; Kramer, S.R. (2001). Effects of source and level of nitrogen, and changing buffer/ruminal fluid at 48 h on in vitro digestion of feedstuffs. Anim. Feed Sci. Technol. 93: 43-54.

34. Marichal, M de J., P. Bayardo. (1994). Degradability of malt sprouts, brewer's grain, sorghum grain and citrus pulp. *J. Anim. Sci.* 72 (Suppl. 1), 135 (Abstract)
35. McQueen, R and J.W. Nicholson. (1979). Modification of the neutral-detergent fiber procedure for cereals and vegetables by using α -Amylase. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62 (3).
36. Mertens, D. R. (1993). Rate and extent of digestion. In: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. Forbes J. M and France J. (eds). CAB International University Press. Cambridge. UK. 13-51 pp.
37. Mieres, J. M. (2004). Guía de alimentación de rumiantes. Serie Técnica INIA. Montevideo. Uruguay. 81 p
38. Mould, F and H. Nordheim. (1998). Dry matter and neutral-detergent fibre degradation profiles of roughages obtained using the Ankom in vitro system. *In: In vitro techniques for measuring nutrient supply to ruminants.* E. R. Deaville, E. Owen, A. T. Adesogan, C. Rymer, J. A. Huntington and T. L. Lawrence (Eds). BSAS Occasional Publication N°. 22. 247-248 pp.
39. Mould, F. L., K. E. Kliem, R. Morgan and R. M. Mauricio. (2005a). In vitro microbial inoculum: A review of its function and properties. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 31- 50.
40. Mould, F. L., K. E. Kliem and E. Krystallidou. (2005b). A review and simplification of the in vitro incubation medium. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 155-172.
41. Nocek, J. E. and J. B. Russel. (1988). Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *J. Dairy Sci.* 71: 2070-2107
42. Nocek, J.E., Tamminga, S. (1991). Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* 74:3598-3629.
43. National Research Council Nutrients Requirement of Dairy Cattle. (2001). 7th revised edition. National Academy Press. Washington. D. C., USA. 381 p.
44. National Research Council. Nutrients Requirements of Beef Cattle. (2000). 7th revised edition. National Academy Press. Washington. D. C., USA. 232 p.

45. Noziere, P and Michalet Doreau. B. (2000). In sacco methods. In Farm Animal Metabolism and Nutrition. J.P.F D' Mello (eds),. CAB International, Wallingford UK. 233-254 pp.
46. Orskov, E.R., McDonald. I (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J. Agric. Sci. Camb. 92. 499:503.
47. Orskov, E.R., DeB Hovell, F.D; Mould, F. (1980). The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. Trop. Anim. Prod. 5:195-213.
48. Orskov, E.R. (2000). The in situ technique for the estimation of forage degradability in ruminants. *In Forage evaluation in Ruminant Nutrition*. D.I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford and H. M. Omed (eds). CABI Publishing, Wallingford, UK. 175-188 pp.
49. Pereira, M.N., Armentano, L.E (2000). Partial replacement of forage with non-forage fiber sources in lactating cow diets. II Digestion and rumen function. J. Dairy Sci. 83: 2876-2887.
50. Pollard G.V., Wilson, K.F; Bramble, T.C; Richardson, C.R (2006). Comparison of in vitro and in situ methods for measuring dry matter disappearance of ruminant fiber sources. J. Anim. Sci. Vol 80, Suppl. 1/J. Dairy Sci. vol 85, Suppl. 1
51. Restrepo, R, R. L. Belyea and M. Ellersieck. (1998). (en línea). Dry matter digestibility of selected feedstuffs by in vitro, in situ and Rusitec. UMC Animal Sciences Departmental Report. 124-130 (on line).
52. Richardson, J.M; Wilkinson, R.G; Sinclair, L.A. (2003). Synchrony of nutrient supply to the rumen and dietary energy sources and their effects on the growth and metabolism of lambs. J. Anim. Sci. 81: 1332-1347.
53. Robinson, P.H; Campbell Mathews, M; Fadel, J.G. (1999). Influence of storage time and temperature on in vitro digestion of neutral fibre at 48 hs and comparison to 48 hs in sacco neutral detergent fibre digestion. Anim. Feed Sci. Technol. 80: 257-266.
54. SAS Institute. (2000). SAS User's Guide: Statistics, Version 8.2 Ed.2000. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
55. Silva, A. T and E. R. Orskov. (1988). Fiber degradation in the rumens of animals receiving hay, untreated or ammonia-treated straw. Anim. Feed Sci. Technol. 19; 277-287.
56. Scarbrough, D. A., W. K. Coblenz, K. P. Coffey, J. E. Turner, G. V. Davis, D. W. Kellongs and D. H. Hellwing. (2001). Effects of calendar

date and summer management on the in situ dry matter and fiber degradation of stockpiled forage from bermudagrass pastures. *J. Anim. Sci.* 79: 3158 – 3169.

57. Scholljederes, E. J., V. Nayigihugu, B. W. Hess y P. A. Ludden. (2002) (en línea). A comparison of techniques for estimating forage digestion. Consultado en marzo 2003. Disponible en: www.asas.org/western/02proc/20569-1.doc.
58. Sniffen, C.F., J.D.O'Connor, P.J.Van Soest, D.G.Fox, and J.B.Russell. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* 70 (11): 3562-3577.
59. Spanghero, M, S. Boccalon, L. Gracco and L. Gruber. (2003). NDF degradability of hays measured in situ and in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 104: 201-208.
60. Steel, R.G & Torrie, J. H. (1960). *Principles and Procedures of Statistics*, McGraw-Hill book Co., Ltd., Toronto, Ontario, Canada. 479 p.
61. Stensing T, M. R. Weisbjerg and T. Hvelopund. (1994). Estimation of ruminal digestibility of NDF from in sacco degradation and rumen fractional rate. *Acta. Agric. Scand.* 44: 96-109.
62. Tagari, H., Arieli, A. Mabjeesh, S. Bruckental, I. Zamwell, S. Aharoni, Y. (1995). Assessment of duodenal amino acid profile in dairy cows by the in situ method. *Livest. Prod. Sci.* 42, 13- 22.
63. Tamminga, S. Williams, B.A.(1998). *In vitro* techniques as tools to predict nutrient supply in ruminants. *In vitro* techniques for measuring nutrient supply to ruminants. E. R. Deaville, E. Owen, A. T. Adesogan, C. Rymer, J. A. Huntington and T. L. Lawrence (Eds). BSAS Occasional Publication N°. 22. 2-11 pp.
64. Tamminga, S; V. M. Van Straalen; A. P. Subnel; R. G. Meijer; A. Steg; C. J. Wever and M. C. Blok. (1994). The Dutch protein evaluation system: the DVE/OEB- system. *Livest. Prod. Sci.* 40: 139:155.
65. Tilley, J. M. A and Terry, R. A. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society.* 18: 104-111.
66. Van Barneveld, S.L. (1999). Chemical and physical characteristics of grains related to variability in energy and amino acid availability in ruminants: review. *Austr. J. Agr. Res.* 50:651-666.

67. Van der Honing and Steg, (1990). Comparison of energy evaluation system of feeds for Ruminants. In Feedstuff Evaluation. J. Wiseman and D. J. Cole (eds). Butterworths. London. 1-20 pp.
68. Van Soest, P.J. (1994). Ruminant Ecology of the Ruminant. Cornell University. New York. 374 pp.
69. Van Soest, P.J., Roberston, J.B; Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J.Dairy Sci. 74(5):3583-3597.
70. Van Vuuren, A.M., Tamminga, S; Ketelaar, R.S. (1991). In sacco degradation of organic matter and crude protein of fresh grass (*Lolium perenne*) in the rumen of grazing cows. J. Agric. Sci. 116: 429-436.
71. Varel, V. H and K. Kreikemeier (1995). Comparison of in vitro and in situ digestibility methods. J. Anim. Sci. 73: 578-582.
72. Vogel, K, J. F. Pedersen, S. D Masterson and J. Toy. (1999). Evaluation of a filter bag systema for NDF, ADF, and IVDMD forage analysis. Crop Science 39:276-279.
73. Wilman, D; G. R, Foulkes and D. I. Givens. (1996). A comparison of four methods of estimating the rate and extent of cell wall degradation in grass silages. Anim. Feed Sci. and Technol. 63: 99-109.
74. Wilman, D and A. Adesogan. (2000). A comparison of filter bag method with conventional tube methods of determining the in vitro digestibility of forages. Anim. Feed Sci. and Technol. 84: 33-47.
75. Williams. B. A. (2000). Cumulative gas-production techniques for forage evaluation *In* Forage evaluation in Ruminant Nutrition. D I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford and H. M. Omed (eds). CABI Publishing, London. 189 - 213 pp.