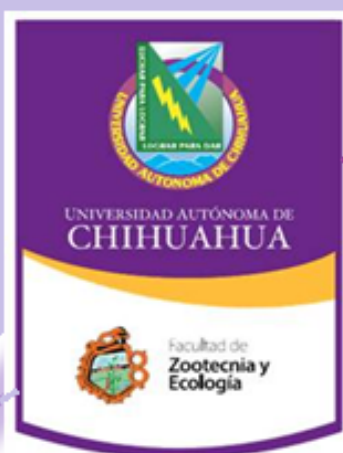


Universidad Autónoma de Chihuahua

Facultad de Zootecnia y Ecología

Código: INF 8.3 IZSP 21	Página 1 de 51
Fecha de Emisión: Enero 2009	Fecha de Revisión: 09/05/2011
	Nº de Revisión: 2
Elaboró:	Coordinación de Área
Aprobó:	Secretaría Administrativa

MANUAL DE LABORATORIO DE NUTRICION ANIMAL



MANUAL DE LABORATORIO DE NUTRICION ANIMAL

ELABORADO POR:

M.C. CELIA HOLGUÍN LICÓN

FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGIA, UACH.

ENERO 2009

INDICE

TIPOS DE ANÁLISIS	4
DESVENTAJAS	5
IMPORTANCIA DE LA CUANTIFICACION DE CARBOHIDRATOS	8
VAN- SOEST	8
CUESTIONARIO	11
PROCEDIMIENTO:	13
Peso del crisol	13
DETERMINACION DE CALCIO POR ABSORCIÓN ATOMICA	20
CALCULOS	20
REACTIVOS	21
MATERIAL	21
PROCEDIMIENTO:	21
ABREVIATURAS	22
REACTIVOS	28
DESTILACION	29
CALCULOS	29
DATOS	29
CUESTIONARIO	30
PRINCIPIO:	33
PROCEDIMIENTO:	33
Peso del crisol	34
CUESTIONARIO	34
REACTIVOS:	36
PROCEDIMIENTO:	36
DATOS	37
FRACCIONAMIENTO DE LA FIBRA DETERGENTE ACIDA	39
REACTIVOS:	39
PROCEDIMIENTO:	39
APARATOS:	42
CALCULOS	43
BIBLIOGRAFIA	51

ANALISIS QUIMICO DE LOS ALIMENTOS

La importancia que tiene el laboratorio en la evaluación de los alimentos es que haciendo uso de las técnicas de análisis apropiadas podemos determinar la cantidad que los animales requieren de un determinado ingrediente, pagar por los nutrimentos que compramos, evitar la compra de alimentos contaminados o adulterados, etc., y en fin, hacer que la empresa pecuaria de que se trate sea rentable.

Por lo tanto el conocimiento de la composición química de los alimentos nos permite su utilización en una forma racional, se pueden evitar deficiencias o excesos de nutrimentos perjudiciales.

El análisis de alimentos es entonces indispensable para establecer programas de alimentación de animales que sean adecuados tanto para los animales como para el hombre que los alimenta.

TIPOS DE ANÁLISIS

- 1) GENERALES: Se aplican a cualquier tipo de alimento, el más usado es el análisis proximal.
- 2) ESPECIFICO: Se aplican a determinado tipo de alimento o para cuantificar cierto tipo de componente.

ANALISIS PROXIMAL O DE WEENDE:

Podría definirse como un **“ESQUEMA DE ANÁLISIS QUÍMICO”** mediante el cual se determina la composición de un alimento en término de sus principales grupos de nutrientes.

El análisis proximal consiste de las siguientes determinaciones: Humedad, Materia mineral o Cenizas, Extracto etéreo o Grasa, Proteína Cruda, Fibra Cruda, y Extracto libre de Nitrógeno.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE METODO PROXIMAL

VENTAJAS

- 1) Determina todas las fracciones que constituyen un alimento.
- 2) Aunque sus resultados son aproximados, nos proporciona una estimación rápida del valor nutricional del alimento.
- 3) Es una herramienta que nos permite decidir de manera rápida sobre la aceptación o rechazo de cualquier insumo que sea comercializado.

DESVENTAJAS

- 1) Es un método empírico, incluye muchos errores.
- 2) Debe tenerse mucho cuidado de llevar a cabo el procedimiento como se indica ya que alterando tiempos o concentraciones se incrementarán los errores.

PRINCIPIOS EN QUE SE BASA EL ANALISIS PROXIMAL

1) HUMEDAD

Se basa en la pérdida de peso que sufre una cantidad conocida de alimento cuando se seca en una estufa a 100 ° C, por lo que se atribuye esta pérdida de peso al agua contenida en el alimento.

El agua contenida en los alimentos diluye los nutrientes sólidos y los hace más susceptibles de sufrir fenómenos de descomposición por enzimas tisulares, bacterianas o de hongos.

Los errores implicados en esta determinación son que ciertos materiales como ensilajes a esta temperatura pierden material volátil por lo que el resultado se ve sobrestimado.

2) MATERIA MINERAL O CENIZA

Su determinación se basa en la cantidad de residuo que queda después de la incineración o combustión total del material orgánico a 550 - 600 ° C.

Esta determinación no nos indica que minerales la componen y en qué proporción se encuentran, sin embargo, es el punto de partida en la determinación de minerales específicos.

Su valor puede verse sobrestimado en algunos alimentos en los que el carbón proveniente del material orgánico forma carbonatos unidos a cualquier mineral.

3) PROTEÍNA CRUDA

Los métodos se basan en la determinación del contenido de nitrógeno de la muestra, suponiendo que todo el nitrógeno está en forma de proteína.

Cuando el nitrógeno proviene de otras fuentes como urea o aminos y amidas el método de Kjeldahl sobrestimaré el contenido de proteína.

4) EXTRACTO ETÉREO O GRASA

Su cuantificación se basa en la solubilidad que poseen este tipo de compuestos en solventes orgánicos como cloroformo, éter etílico y otros.

Por este método se extraen también otras sustancias solubles en estos disolventes como ceras y pigmentos como clorofila.

5) FIBRA CRUDA

Se basa en la cuantificación del residuo que queda después de someter una cantidad de muestra desengrasada a una digestión ácida seguida de una alcalina.

La combinación de las dos digestiones disuelve hasta el 80 % de la hemicelulosa, del 20-50 % de la celulosa y del 50-90 % de la lignina presente en la muestra por lo que se subestima el contenido de la fibra cruda.

En los alimentos vegetales, los carbohidratos forman parte de dos fracciones:

- Carbohidratos que forman parte de la pared celular que le confieren una estructura a la planta tales como celulosa, hemicelulosa y lignina.

- Carbohidratos cuya función es proporcionar energía para realizar las funciones vitales del metabolismo, tales como almidón, glucosa y otros, todos están encerrados en la pared celular.

IMPORTANCIA DE LA CUANTIFICACION DE CARBOHIDRATOS

La celulosa y hemicelulosa representan una fuente de almacenamiento energético para los animales rumiantes por lo que su contenido en el alimento toma un papel importante para la dieta.

La disponibilidad de esta fuente se ve limitada por el contenido de lignina presente en el alimento ya que la lignina aumenta conforme aumenta la madurez del forraje disminuyendo de esta manera la disponibilidad de la celulosa y hemicelulosa.

Debido a la importancia que representan los carbohidratos se utiliza el método de **VAN-SOEST** para determinar mas específicamente cada uno de estos componentes.

VAN- SOEST

Estas fracciones se separan haciendo digestiones con soluciones detergentes a pH neutro que solubilizan el contenido celular y la pectina, quedando la “FIBRA DETERGENTE NEUTRO” que representa el contenido de Celulosa, Hemicelulosa, Lignina y Residuo mineral (Sílica).

Una digestión con un detergente ácido elimina la Hemicelulosa dando un residuo denominado “ FIBRA DETERGENTE ÁCIDO “ cuyo valor representa el contenido de Celulosa, Lignina y Residuo mineral.

La oxidación de la celulosa con ácido sulfúrico al 72 % nos permite calcular el valor de la Celulosa.

Una incineración posterior elimina la Lignina, quedando solo el residuo mineral (Silica), por diferencias se calcula cada una.

6) EXTRACTO LIBRE DE NITRÓGENO

Esta fracción está constituida por Almidones, Azúcares solubles, Pectinas, Ácidos orgánicos, Mucílagos y también incluye cantidades variables de Celulosas y Ligninas.

Este valor se estima restando de 100 los porcentajes de Humedad, Ceniza, Extracto Etéreo, Proteína Cruda y Fibra Cruda.

Este valor arrastra todos los errores de cada una de las determinaciones del Proximal.

DETERMINACION DE HUMEDAD Y MATERIA SECA

Este método determina la humedad contenida en los alimentos.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Pesar un crisol de porcelana previamente tarado (peso constante).
- 2.- Agregar de 1 a 2 g de muestra, anote el peso del crisol con muestra..
- 3.- Ponga el crisol con la muestra a secar en una estufa a 110 ° C, durante 12 horas.
- 4.- Sacar el crisol de la estufa y colocarlo en un desecador durante 20 min. para que se enfríe.
- 5.- Pesar el crisol.
- 6.- Calcular el contenido de Humedad y Materia seca de la muestra.

CÁLCULOS

DATOS

Peso del crisol

Peso del crisol con muestra

Peso del crisol después de la estufa

PESO HUMEDO = (PESO DEL CRISOL+ MUESTRA) - (PESO DEL CRISOL)

PESO SECO = (PESO DESPUÉS DE ESTUFA) - (PESO DEL CRISOL)

$$\% \text{ HUMEDAD} = \frac{\text{PESO HUMEDO} - \text{PESO SECO}}{\text{PESO HUMEDO}} \times 100$$

$$\% \text{ MATERIA SECA} = 100 - \% \text{ HUMEDAD}$$

CUESTIONARIO

1.- Que importancia tiene la determinación del contenido de humedad en un alimento.

2.- En que afecta un contenido alto de humedad en un alimento.

3.- Que errores puede haber en la determinación de humedad por este método.

A.O.A.C., 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists 13th Washington, D.C., U.S.A.

FECHA_____

[illegible]

DETERMINACION DE MATERIA MINERAL Y MATERIA ORGANICA

Este método cuantifica la materia mineral total de un alimento.

PROCEDIMIENTO:

1. Se pesan aproximadamente un gramo de muestra en un crisol de porcelana previamente tarado (peso constante).
2. Calcinar la muestra en una mufla durante 3 horas a 600 ° C.
3. Apagar la mufla y dejar enfriar hasta 200 ° C, sacar el crisol a un desecador, dejar enfriar durante 30 min. y pesar.
4. Calcular el porcentaje de Cenizas y Materia orgánica de la muestra en base seca.

CALCULOS:

DATOS

Peso del crisol

Peso del crisol después de la estufa

Peso del crisol después de la mufla

PESO SECO = (PESO DESPUES DE LA ESTUFA) - (PESO CRISOL)

$$\% \text{ CENIZA b.s.} = \frac{(\text{PESO DESPUES DE MUFLA}) - (\text{PESO CRISOL})}{\text{PESO SECO}} \times 100$$

% MATERIA ORGÁNICA = 100 - % CENIZA b.s.

CUESTIONARIO:

- 1.- Porqué es importante la determinación de cenizas en un alimento.

- 2.- Que errores puede haber en la determinación de cenizas por este método.

A.O.A.C., 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists 13th Washington, D.C., U.S.A.

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE ZOOTECNIA
LABORATORIO DE INVESTIGACION**

FECHA _____

CENIZA

A	B	C	D	E	F
MUESTRA	PESO CRISOL	PESO CRISOL + CENIZA	PESO MUESTRA B.S.	% CENIZA = (C - B)/D X100	% MATERIA ORGANICA =100 - E

DETERMINACION DE FOSFORO

PRINCIPIO:

Este método determina el fósforo de rocas fosfóricas, Harina de hueso, fosfatos de sodio, de calcio, alimentos concentrados, etc.

REACTIVOS

- 1) Solución de Molibdo-Vanadato: Disolver 40 gramos de Molibdato de Amonio en 400 ml de agua destilada caliente, dejar enfriar.
- 2) Disolver 2 gramos de Metavanadato de Amonio en 250 ml de agua caliente, dejar enfriar y añadir 450 ml de Acido Perclórico al 70%.
- 3) Añadir gradualmente y con agitación constante la solución de Molibdato sobre la de Vanadato y finalmente diluir a 2 litros.
- 4) Solución estándar de fósforo; Disolver 8.788g de KH_2PO_4 en agua y diluir a un litro.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Pesar 2 gramos de muestra e incinerar a 600°C durante 3 horas.
- 2) Enfriar, y añadir 40 ml de HCl (1-3), y 4 gotas de ácido nítrico concentrado y calentar a ebullición.
- 3) Enfriar, y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, aforar con agua hasta la marca.
- 4) Transferir una alícuota del filtrado a un matraz volumétrico de 50 ml.
- 5) Añadir 20 ml de la solución de Molibdo-Vanadato, aforar con agua a 100 ml y homogeneizar.

6) Dejar reposar 10 minutos y determinar la Densidad Optica a 400 nm en el Espectrofotómetro.

7) Poner un blanco y un estándar.

CALCULOS

DATOS

Peso de muestra seca

Dilución

Alicuota

Absorbancia de la muestra

Absorbancia del patrón

Concentración del patrón en mg%

$$\text{mg \% P} = \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia patrón}} \times \text{Concentración del patrón en mg\%}$$

$$\text{\% P b.s.} = \frac{\text{mg \% P}}{\text{mg muestra seca}} \times \text{Dilución}$$

Edmond C.R., 1969, Anal. Chem., 41: 1326

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE ZOOTECNIA
LABORATORIO DE INVESTIGACION**

FECHA _____

DETERMINACION DE FOSFORO

MUESTRA	PESO MUESTRA SECA	ALICUOTA	DILUCION FINAL	ABS. MUES.	ABS. PATRON	mg % P	% P

$$\text{mg\% P} = \frac{\text{ABS. MUESTRA} \times \text{CONC. PATRON en mg\%}}{\text{ABSORBANCIA DE PATRON}}$$

$$\text{\% P} = \frac{\text{mg \% P} \times \text{DILUCION}}{\text{mg de muestra seca}}$$

DETERMINACION DE CALCIO POR ABSORCION ATOMICA

PRINCIPIO:

Se basa en la producción de átomos de una muestra líquida los cuáles absorben la luz generada por una lámpara de cátodo hueco, midiendo su absorbancia.

MATERIAL Y EQUIPO:

Aparato de absorción atómica

matraces aforados

Pipetas volumétricas

REACTIVOS:

Solución de lantano de 10,000 p.p.m.

Patrones de Calcio

PROCEDIMIENTO :

- 1) De la solución que contiene los minerales tomar una alícuota dependiendo del tipo de muestra y aforar a un volumen determinado con lantano.
- 2) Calentar la lámpara de Calcio del aparato de Absorción Atómica y ajustar la longitud de onda necesaria.
- 3) Ajustar el aparato a cero con el blanco (Lantano).
- 4) Leer los patrones en absorbancia, y después las muestras.

A.O.A.C., 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists 13th Washington, D.C., U.S.A.

DETERMINACION DE CALCIO POR ABSORCIÓN ATOMICA

Muestra	Peso Seco mg	1ª Dilución	2ª Dilución	Dilución final	Absorb. De muestra	% Calcio b.s.

CALCULOS

$$\text{mg \% Ca} = \frac{\text{Absorbancia muestra} \times \text{Conc. Patrón en mg\%}}{\text{Absorbancia patrón}}$$

$$\text{\% Ca base seca} = \frac{\text{mg\% Ca} \times \text{Dilución final}}{\text{mg muestra seca}}$$

DETERMINACION DE EXTRACTO ETereo O GRASA CRUDA

METODO SOXHLET

PRINCIPIO:

Este método cuantifica las sustancias extraíbles en solventes orgánicos como el éter de petróleo, éter etílico, hexano.

REACTIVOS

Éter de petróleo, éter etílico anhidro o hexano.

MATERIAL

Aparato Soxhlet

Vaso para extracción de grasa Soxhlet

Dedal

Papel filtro

Balanza

PROCEDIMIENTO:

1. Se pesan 2 gramos de muestra en un papel filtro; anote el peso del papel filtro y el peso del papel con muestra.
2. Doble el papel con la muestra y póngalo en un dedal, anote el número del dedal.
3. Pese un vaso de extracción de grasa soxhlet previamente tarado (peso constante).
4. Arme el aparato Soxhlet, agregue el éter de petróleo y colóquelo en la placa.
5. Abra el agua de la llave para que circule el agua por el aparato y encienda el aparato en alto.

6. Cuando empiece a hervir bájele a 5 y cuente de 4 a 5 horas dependiendo del tipo de muestra.

7. Recupere el éter y evapore el éter residual en una estufa a 100 ° C.

8. Enfriar y pesar.

CALCULOS

DATOS

Peso del papel filtro

Peso del papel filtro con muestra

Peso del vaso

Peso del vaso con extracto

Peso de muestra = (peso del papel con muestra - peso del papel)

$$\% \text{ EXTRACTO ÉTEREO b.h.} = \frac{(\text{peso del vaso con extracto}) - (\text{peso del vaso})}{\text{peso de muestra húmeda}} \times 100$$

$$\% \text{ EXTRACTO ÉTEREO b.s.} = \frac{\% \text{ E.E. b.h.}}{\% \text{ M. S.}} \times 100$$

ABREVIATURAS

b.h. base húmeda

b.s. base seca

M.S. materia seca

CUESTIONARIO:

1.- Que otras sustancias aparte de las grasas y aceites se extraen con este disolvente.

2.- Esas sustancias pueden ocasionar un error en esta determinación.

A.O.A.C., 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists 13th Washington, D.C., U.S.A.

FECHA _____

[illegible]

DETERMINACION DE FIBRA CRUDA

METODO DE TECATOR

PRINCIPIO:

Este método cuantifica las sustancias resistentes a la digestión ácida y alcalina de la muestra.

REACTIVOS Y EQUIPO:

1. Solución de ácido Sulfúrico al 1.25%: ponga 13.4 ml de ácido sulfúrico concentrado en un matraz aforado de 2litros y disuelva con agua destilada hasta el aforo.
2. Solución de Hidróxido de sodio al 1.25%: pese 25 gramos de hidróxido de sodio y diluya a 2 litros con agua destilada.
3. Alcohol octílico o Decalin.
4. Aparato de digestión tecator.

PROCEDIMIENTO:

1. Pese con exactitud un crisol tecator previamente tarado, anote el peso y el número del crisol.
2. Agregue aproximadamente 0.2 gramos de muestra desgrasada y anote el peso del crisol más muestra.
3. Coloque los crisoles en el aparato tecator.
4. Agregue 20 ml de solución de ácido sulfúrico al 1.25% y unas gotas de octanol como antiespumante.
5. Ponga a calentar y cuando empiece a hervir baje la temperatura y cuente media hora, cuando se termine el tiempo de digestión drenar la solución y lavar el crisol con agua destilada hasta eliminar el medio ácido.

6. Después se hace una segunda digestión agregando 20 ml de una solución de hidróxido de sodio al 1.25%, y se deja en digestión 30 minutos.
7. Terminada la digestión se vuelve a lavar el crisol con agua destilada, se saca y se pone en una estufa a secar 12 horas.
8. Se saca de la estufa a un desecador, se deja enfriar y se pesa.
9. Se pone el crisol en la mufla a 400 ° C por 4 horas, se enfría y se pesa.

DATOS

Peso del crisol

Peso del crisol con muestra

Peso del crisol después de la estufa

Peso del crisol después de la mufla

CALCULOS

PESO DE MUESTRA = Peso del crisol con muestra – Peso del crisol solo

$$\% \text{ FIBRA CRUDA b.s.} = \frac{(\text{Peso del crisol mufla} - \text{Peso crisol estufa}) \times 100}{\text{Peso de muestra}}$$

A.O.A.C., 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists 13th Washington, D.C., U.S.A.

FIBRA CRUDA EN TECATOR

A	B	C	D	E	F	G	H
MUESTRA	PESO CRISOL	PESO CRISOL + MUESTRA	PESO MUESTRA =(C - B)	PESO CRISOL ESTUFA	PESO CRISOL MUFLA	% FIBRA CRUDA B.H. = (E - F)/D X 100	MEDIA

PESO DE MUESTRA = Peso del crisol con muestra – Peso del crisol solo

% FIBRA CRUDA b.s. =
$$\frac{\text{Peso del crisol mufla} - \text{Peso crisol estufa}}{\text{Peso de muestra}} \times 100$$

DETERMINACION DE PROTEINA CRUDA

METODO MICROKJELDAHL

Este método determina el nitrógeno total, en forma de amonio, de los alimentos sin diferenciar si proviene de proteínas o de otra fuente proteica.

REACTIVOS

- 1.- Acido sulfúrico conc.
- 2.- Mezcla reactiva de Selenio
- 3.- Hidróxido de Sodio al 50 %
- 4.- Acido Bórico al 4 %
- 5.- Acido Sulfúrico 0.05 N valorado
- 6.- Solución indicadora de Rojo de Metilo- Verde de Bromocresol

PROCEDIMIENTO

DIGESTION

1. Pesar 0.2 gramos de muestra en un papel largo para depositar la muestra hasta el fondo del tubo de digestión.
2. Agregar 0.6 gramos de mezcla reactiva de selenio y 3 mililitros de ácido sulfúrico concentrado.
3. Poner los tubos en el aparato de digestión cuando se haya alcanzado la temperatura de 450°C y taparlos con las campanas de vidrio.
4. Abrir la llave del agua y encender el extractor.
5. Poner a digerir 20 min.
6. Dejar enfriar con el extractor prendido durante 15 minutos y después colocar la tapa para que se enfríen otros 15 minutos.

7. Sacarlos del digestor, enfriar otros 10 minutos más y agregar 20 ml de agua destilada.

DESTILACION

1. Preparar el vaso para recolectar el destilado con 10 mls de Acido Bórico al 4% y 5 gotas de indicador.
2. Prepare el destilador, abra la llave del agua para que pase por el condensador.
3. Coloque el vaso en el tubo recolector.
4. Poner la muestra digerida en el destilador.
5. Agregar 10 ml de Hidróxido de Sodio al 50 %.
6. Ponga el tiempo de destilación en el botón del aparato.
7. Destilar 40 mls.
8. Titule con Acido Sulfúrico valorado.

CALCULOS

DATOS

Peso del papel con muestra

Peso del papel

Mililitros de Acido Sulfúrico gastados para titular

Normalidad del Acido Sulfúrico

% Materia Seca de la muestra

$$\text{PESO DE MUESTRA} = (\text{PESO PAPEL CON MUESTRA}) - (\text{PESO DEL PAPEL})$$

$$\% \text{ NITRÓGENO b.h.} = \frac{1.4 \times \text{MLS GASTADOS} \times \text{NORMALIDAD}}{\text{PESO DE MUESTRA HUMEDA}}$$

$$\% \text{ PROTEINA b.h.} = \frac{\% \text{ NITROGENO b.h.} \times 6.25}{\% \text{ M.S.}}$$

$$\% \text{ PROTEINA b.s.} = \frac{\% \text{ PROTEINA b.h.} \times 100}{\% \text{ M.S.}}$$

$$\% \text{ PROTEINA b.s.} = \frac{\% \text{ PROTEINA b.h.} \times 100}{\% \text{ M.S.}}$$

CUESTIONARIO

1.- Cuál es la reacción que ocurre en la digestión y en la destilación.

2.- De que otras fuentes puede contener nitrógeno la muestra.

3.- Porqué sobrestima el contenido de proteína este método.

A.O.A.C., 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists 13th Washington, D.C., U.S.A.

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE ZOOTECNIA
LABORATORIO DE INVESTIGACION**

FECHA _____

PROTEINA CRUDA

A	B	C	D	E	F	G	H
MUESTRA	PESO PAPEL	PESO PAPEL + MUESTRA	PESO MUESTRA B.H. = (C - B)	MLS. GASTADOS	NORM. ACIDO	% NITROGEN = (1.4XEXF)/D	% PROTEINA B.H. = G X 6.25

EXTRACTO LIBRE DE NITROGENO

Este valor se estima por diferencia restando de 100 los porcentajes de ceniza, grasa, proteína cruda, fibra cruda, todas en base seca.

Esta fracción está constituida por almidones, azúcares solubles, pectinas, ácidos orgánicos, mucílagos y también incluye cantidades variables de celulosas y ligninas.

Esta forma de calcular los glúcidos aprovechables, es sumamente deficiente ya que adiciona las deficiencias de las otras determinaciones.

EXTRACTO LIBRE DE NITROGENO

$$\% \text{ E.L.N} = 100 - (\% \text{ceniza} + \% \text{extracto etéreo} + \% \text{proteína cruda} + \% \text{fibra cruda})$$

% Ceniza en base seca	% Extracto etéreo en base seca	% Proteína cruda en base seca	% Fibra cruda en base seca	% E.L.N

A.O.A.C., 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists 13th Washington, D.C., U.S.A.

DETERMINACION DE PAREDES CELULARES (FIBRA NEUTRO DETERGENTE) Y CONTENIDO CELULAR METODO DE TECATOR

PRINCIPIO:

El procedimiento neutro detergente para determinar los componentes de la pared celular es un método rápido para fibra total en alimentos fibrosos vegetales.

REACTIVOS:

1. Solución neutro detergente: agregue 30 gramos de Sulfato Lauril Sódico; 18.61 g de etileno-diamino-tetraacetato-disódico-dihidrogenado, dehidratado; 6.81 g de Borato de Sodio decahidratado; 4.56 g de Fosfato disódico hidrogenado anhidro y 10 mls de éter monoetílico del etilen glicol en un litro de agua destilada. Agítese hasta disolverlo y controle el pH para que se mantenga entre 6.9 y 7.
2. Acetona
3. Sulfito de sodio anhidro al 10 %: disuelva 10 gramos de sulfito de sodio en 100 ml de agua destilada.

PROCEDIMIENTO:

1. Pese un crisol tecator previamente tarado, anote el peso y número del crisol.
2. Pese aproximadamente 0.2 g de muestra en el crisol, anote peso de crisol más muestra.
3. Agregue en el orden señalado los siguientes reactivos: 20 ml de Solución Neutro Detergente y 0.5 ml de Sulfito de Sodio al 10%.

4. Ponga el crisol en el aparato tecedor, se pone a calentar en alto y cuando empiece a hervir, se le baja la temperatura y se le cuenta 1 hora.
5. Ponga a calentar agua destilada para filtrar la muestra.
6. Terminada la digestión, drene el líquido y lave con agua destilada.
7. Agregue un chorro de acetona a la muestra.
8. Ponga en la estufa el crisol para secar durante 12 horas.
9. Saque el crisol de la estufa y pese.
10. Ponga el crisol en la mufla para incinerar la muestra y poder lavarlo.

CALCULOS

DATOS

Peso del crisol

Peso del crisol más muestra

Peso del crisol con fibra después de la estufa

% Materia Seca de la muestra

CUESTIONARIO

- 1.- De que está constituida la fibra de las paredes celulares:

Van Soest, P.J., 1963, J. Assoc. Official Agr. Chem, 46 (5): 829.

PESO MUESTRA = (peso del crisol con muestra) - (peso del crisol)

% PARED CELULAR b.h. =
$$\frac{(\text{ PESO CRISOL CON FIBRA}) - (\text{ PESO DEL CRISOL})}{\text{ PESO DE MUESTRA}} \times 100$$

% PARED CELULAR b.s. =
$$\frac{\% \text{ PARED CELULAR b.h.}}{\% \text{ M.S.}} \times 100$$

% CONTENIDO CELULAR b.s. = 100 - % PARED CELULAR b.s.

**FIBRA DETERGENTE NEUTRO
METODO TECATOR**

A	B	C	D	E	F	G
MUESTRA	PESO CRISOL	PESO CRISOL + MUESTRA	PESO MUESTRA = (C – B) B.H.	PESO CRISOL ESTUFA	% FDN B.H.. =(E-B)/D X 100	%FDN = (F/M.S.) X 100

DETERMINACION DE FIBRA ACIDO-DETERGENTE

METODO TECATOR

PRINCIPIO:

Este procedimiento permite una rápida determinación de la lignocelulosa en los alimentos. Sin embargo, en esta fracción también aparece el Silicio.

REACTIVOS:

1. Solución Ácido Detergente: Adicionar 20g de Bromuro de Cetyltrimetil Amonio, en un litro de solución 1N de H_2SO_4 .
2. Solución 1N de H_2SO_4 : agregar 49.04 g de Ácido Sulfúrico conc. por litro de agua destilada.
3. Acetona, grado reactivo.
4. Hexano, grado reactivo.

PROCEDIMIENTO:

1. Pese un crisol tecator previamente tarado; anote el peso y número del crisol.
2. Pese aproximadamente 0.2 g de muestra en el crisol, anote peso de crisol más muestra.
3. Agregue 10 ml de Solución Ácido Detergente y unas gotas de octanol.
4. Ponga el crisol en el aparato tecator, caliente en alto y cuando empiece a hervir, se le baja la temperatura y le cuenta 1 hora.
5. Ponga a calentar agua destilada para filtrar la muestra.
6. Terminada la digestión, drene el líquido y lave con agua destilada.
7. Lave con acetona hasta que desaparezca el color, desintegrando cualquier grumo que se haya formado para que el disolvente entre en contacto con todas las partículas de fibra.

8. Lave la muestra con hexano.
9. Ponga a secar en la estufa a 110 ° C durante toda la noche.
10. Saque el crisol de la estufa a un desecador, deje enfriar y pese.
11. Guarde el crisol para fraccionar la fibra.

CALCULOS

DATOS

Peso del crisol

Peso del crisol con muestra

Peso del crisol con fibra (después de la estufa)

% Materia Seca

PESO MUESTRA = (Peso del crisol con muestra - Peso del crisol)

$$\% \text{ FAD b.h.} = \frac{(\text{Peso crisol con fibra}) - (\text{Peso crisol})}{\text{Peso de muestra húmeda}} \times 100$$

$$\% \text{ FDA b.s.} = \frac{\% \text{ FAD b.h.}}{\% \text{ M.S.}} \times 100$$

Van Soest, P.J., and R.H. Wine, 1968, J.Assoc. off Anal. Chem., 51: 780.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE ZOOTECNIA
LABORATORIO DE INVESTIGACION

FECHA_____

FIBRA DETERGENTE ACIDO METODO TECATOR

[illegible]

FRACCIONAMIENTO DE LA FIBRA DETERGENTE ACIDA

REACTIVOS:

1.- Ácido Sulfúrico al 72%.

PROCEDIMIENTO:

1. Poner el crisol que contiene la fibra detergente ácido en digestión con ácido sulfúrico al 72% durante 3 horas, agregando ácido cuando se drene agitando para disolver los grumos y que estén en contacto con el ácido.
2. Lavar con agua destilada caliente hasta que quede neutra la muestra.
3. Poner en la estufa a secar toda la noche.
4. Pesar y poner en la mufla a 450 ° C por 4 horas.
5. Pesar y lavar el crisol.

CALCULOS

DATOS

Peso de muestra

% M.S.

Peso del crisol

Peso del crisol con fibra

Peso del crisol con lignina y silica (Después de la digestión con H₂ SO₄ al 72%)

Peso del crisol con silica (Después de la mufla)

$$\text{PESO SECO} = \frac{\text{Peso húmedo}}{\% \text{ M.S.}} \times 100$$

$$\% \text{CELULOSA b.h.} = \frac{(\text{Peso crisol con fibra}) - (\text{Peso crisol con lignina y silica})}{\text{Peso de muestra}} \times 100$$

$$\% \text{ CELULOSA b.s.} = \frac{\% \text{ CELULOSA b.h.}}{\% \text{ M.S.}} \times 100$$

$$\% \text{ LIGNINA b.h.} = \frac{(\text{Peso crisol con lignina y silica}) - (\text{Peso de crisol con silica})}{\text{Peso de muestra}} \times 100$$

$$\% \text{ LIGNINA b.s.} = \frac{\% \text{ LIGNINA b.h.}}{\% \text{ M.S.}} \times 100$$

$$\% \text{ SILICA b.h.} = \frac{(\text{Peso crisol con silica}) - (\text{Peso del crisol})}{\text{Peso de muestra}} \times 100$$

$$\% \text{ SILICA b.s.} = \frac{\% \text{ SILICA b.h.}}{\% \text{ M.S.-}} \times 100$$

Van Soest, P.J., and R.H. Wine, 1968, J.Assoc. off Anal. Chem., 51: 780.

FECHA _____

[illegible]

DETERMINACION DE ENERGIA BRUTA

PRINCIPIO:

Con este método se determina el calor de combustión total de un alimento, dicha combustión se lleva a cabo bajo una atmósfera rica en oxígeno y el calor producido se mide en un galvanómetro.

APARATOS:

- 1) Calorímetro con bomba de oxígeno.
- 2) Tanque de Oxígeno.
- 3) Cápsula de ignición.
- 4) Hilo para fusión.

PROCEDIMIENTO:

1. Moler la muestra en un molino de cuchillas con criba de 1mm.
2. Pesar la cápsula de ignición y agregar 0.4 g de muestra.
3. Aplanar la muestra en la cápsula y pesar la cápsula con la muestra.
4. Cortar 5 cm de hilo para fusión y colocarlo en el alambre del aparato.
5. Colocar la cápsula en el aparato de Calorimetría y cerrar la bomba.
6. Prender el aparato y colocar los alambres de ignición.
7. Ajustar el galvanómetro a cero, inyectar 25 atmósferas de oxígeno.
8. Apretar el botón de ignición y leer la lectura.
9. Sacar el gas de la bomba.
10. Lavar el recipiente de la bomba.
11. Calcular la energía bruta.

CALCULOS

Peso de muestra = Peso de cápsula con muestra - Peso de cápsula sola

$$\text{Kcal/g} = \frac{(\text{Lectura} - 0.8) (0.4215)}{\text{gramos de muestra}}$$

NOTA: Los resultados se pueden expresar como Kcal/g, Cal/g, Kcal/Kg, o Cal/Kg.

DIGESTIBILIDAD DE FORRAJES POR EL METODO

PEPSINA-CELULASA

(Aufrere, 1982; modificada por Murillo, O.M. y Ruiz B.O. 1998)

PRINCIPIO

Se degrada la materia seca y la materia orgánica de los forrajes por dos fases enzimáticas: La primera fase es con Pepsina ácida y la segunda fase es con una solución de Celulasa en solución Buffer.

MATERIAL

- 1) Estufa incubadora con regulador de temperatura
- 2) Balanza analítica
- 3) Potenciómetro
- 4) Agitador magnético
- 5) Equipo de vacío
- 6) Crisoles de filtro poroso de porosidad 40-60
- 7) Mufla
- 8) Estufa de aire forzado

REACTIVOS

- 1) Celulasa Onozuka R-10 (Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd)
- 2) Pepsina (Sigma, Chemical., Ltd; poder digestivo 1: 10000)
- 3) Acetato de Sodio
- 4) Agua desionizada
- 5) Acido Clorhídrico

6) Acido Acético

PROCEDIMIENTO:

- 1) Poner los crisoles de filtro poroso a peso constante por 24 horas.
- 2) Sacar de la estufa los crisoles y enfriar en un desecador.
- 3) Pesar los crisoles y agregar 0.3 g de muestra de forraje y hacer una muestra estándar de digestibilidad conocida.
- 4) Preparar la solución de Pepsina en Acido Clorhídrico 1N: en un matraz aforado de 1 litro poner 83.30 ml de ácido clorhídrico conc. Y 91.70 ml de agua desionizada, pesar 2 g de Pepsina y disolverla en el ácido.
- 5) Agregar 30 ml de la solución de Pepsina, a cada crisol, y tapar el crisol con tapón de hule en la parte inferior y superior del crisol.
- 6) Colocar los crisoles en la incubadora a 40 ° C por 24 horas.
- 7) Agitar los crisoles dos veces durante las 24 horas.
- 8) Después de las 24 horas filtrar los crisoles con agua caliente a 90 ° C para que se elimine toda la solución de pepsina.
- 9) Preparar la solución de Ceulasa: Disolver 4.102 g de Acetato de Sodio en 1 litro de agua desionizada , regular el pH de la solución a 4.6 agregando ácido acético hasta obtener el pH deseado. Sí el pH es inferior a 4.6 eliminar la solución y preparar otra de nuevo, se pesa 1.5 g de Celulasa y se disuelve en la solución Buffer.
- 10) Agregar 30 ml de la solución a cada crisol y tapar.
- 11) Poner los crisoles en la incubadora a 40 ° C durante 24 horas y agitar dos veces durante ese período.

- 12) Sacar los crisoles de la incubadora y adicionar 0.5 ml de ácido acético a cada crisol con el fin de detener la actividad enzimática.
- 13) Filtrar y enjuagar con agua caliente a 90 ° C.
- 14) Poner los crisoles en la estufa a 100 ° C durante 24 horas.
- 15) Pesar los crisoles y colocarlos en la mufla a 520 ° C durante 90 minutos (hora y media).
- 16) Sacar de la mufla y pesar.

% DIGESTIBILIDAD materia seca

$$= \frac{\text{Materia seca inicial} - \text{Materia seca residual}}{\text{Materia seca inicial}}$$

% DIGESTIBILIDAD materia orgánica

$$= \frac{\text{Materia orgánica inicial} - \text{Materia orgánica residual}}{\text{Materia orgánica inicial}}$$

DATOS NECESARIOS:

% MATERIA SECA =

% CENIZA =

% MATERIA ORGANICA =

DETERMINACION DE DIGESTIBILIDAD ENZIMÁTICA

Muestra	Peso Crisol	Peso Crisol + Muestra	Peso Crisol estufa	Peso Crisol Mufla	% Dig. de M.S.	% Dig de M.O.

NORMAS HIGIENICAS Y DE SEGURIDAD

1. El uso de bata es obligatorio.
2. Antes de empezar el trabajo en el laboratorio tienes que familiarizarte con los elementos de seguridad disponibles.
3. Es necesario localizar las salidas principales y de emergencia por si se diese el caso de una evacuación por fuego o por cualquier otro incidente, así como conocer la localización exacta de extintores, duchas de seguridad y duchas de ojos.
4. Es obligatorio usar gafas de seguridad siempre que se esté en el laboratorio.
5. No usar lentes de contacto en el laboratorio, ya que en caso de accidente las salpicaduras de productos químicos o sus vapores pueden pasar detrás de las lentes y provocar lesiones en los ojos antes de poder retirar las lentes. En estos casos es recomendable el uso de gafas graduadas o de gafas de seguridad cerradas.
6. Sí un producto químico te salpica los ojos, utiliza inmediatamente una ducha de ojos y lava completamente el ojo afectado durante 15 minutos sin interrupción. Actúa siempre con urgencia, en menos de 10 segundos. No dirijas una corriente de alta presión de agua de un grifo directamente al ojo porque podrías lesionarlo. Informa al encargado del laboratorio de lo que ha sucedido y si es necesario pide asistencia médica.
7. El uso de bata (preferentemente de algodón) es obligatorio, ya que por mucho cuidado que se tenga al trabajar, las salpicaduras de productos químicos son inevitables.

8. Así mismo se recomienda llevar zapatos cerrados y no sandalias.
9. No comer ni beber en el laboratorio, ya que hay la posibilidad de que los alimentos o bebidas se hayan contaminado con productos químicos.
10. Los recipientes del laboratorio nunca deben utilizarse para el consumo y conservación de alimentos y bebidas; tampoco las neveras u otras instalaciones destinadas al empleo en los laboratorios.
11. Lavarse siempre las manos después de hacer cualquier análisis y antes de salir del laboratorio.
12. Procure quitarse la bata hasta que salga del laboratorio.
13. Está prohibido fumar en el laboratorio por razones higiénicas y de seguridad.
14. No inhales, pruebes o huelas productos químicos si no estás debidamente informado.
15. Cerrar herméticamente los frascos de productos químicos después de utilizarlos.
16. Para pipetear los líquidos utilice siempre una bombilla pipeteadora, no absorber directamente con la boca.
17. Cuando caliente tubos de ensaye hágalo siempre en la parte superior del líquido y con agitación suave, nunca por el fondo del tubo, y debe estar inclinado y no apuntar hacia ninguna persona.
18. No deben transportarse innecesariamente los reactivos de un sitio para otro del laboratorio. Si tuviese que hacerlo, tenga cuidado con las botellas, las cuales deben ser siempre transportadas cogiéndolas por el fondo, nunca por la boca de la botella.

- 19.El área de trabajo tiene que mantenerse siempre limpia y ordenada, sin libros, abrigos, bolsas, productos químicos vertidos.
- 20.La conducta en el laboratorio debe ser seria, sin bromas, sin correr, jugar, empujar, gritar, etc.
- 21.No se puede hacer ningún experimento no autorizado.
- 22.No utilices nunca un equipo o aparato sin conocer perfectamente su funcionamiento.
- 23.No utilices material de cristal en mal estado ya que aumenta el riesgo de accidentes.
- 24.El material y los aparatos utilizados tienen que dejarse siempre limpios y en perfecto estado de uso.
- 25.Todos los productos químicos tienen que ser manejados con mucho cuidado.
- 26.No inhales los vapores de productos químicos y trabaja siempre en vitrinas extractoras, especialmente cuando manipules productos tóxicos, irritantes, corrosivos o lacrimógenos.

BIBLIOGRAFIA

- ❖ Q.FB. M.S.C. Irma Tejada de Hdez, Manual de Laboratorio para Análisis de Ingredientes Utilizados en la Alimentación Animal, Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México, A.C., México, 1985.

- ❖ A.O.A.C., 1980. Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists, 13Th, Washington, D.C., U.S.A.