

DESCRIPCIÓN Y DISCUSIÓN ACERCA DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE FIBRA Y DEL VALOR NUTRICIONAL DE FORRAJES Y ALIMENTOS PARA ANIMALES

DESCRIPTION AND DISCUSSION ABOUT THE METHODS OF ANALYSIS OF FIBER AND OF THE NUTRITIONAL VALUE OF FORAGES AND FOODS FOR ANIMALS

Freimar SEGURA S.¹, Rosario ECHEVERRI F.¹, Arley C. PATIÑO LL.¹ y Amanda I. MEJÍA G.^{1*}

Recibido: Noviembre 11 de 2006 Aceptado: Mayo 15 de 2007

RESUMEN

Es necesario contar con un mayor volumen de forrajes de adecuado valor nutricional mejorando así la cadena agroalimentaria y disminuyendo el uso extensivo de la tierra en cultivos para ganadería. Una alternativa la constituyen los procesos biotecnológicos con pastos mejorados por fermentaciones con hongos basidiomicetos, pero determinar el cambio en los componentes del forraje con el proceso de fermentación y su relación con el valor nutricional es complicado. Existen numerosas publicaciones sobre técnicas para evaluar componentes de un forraje; el sistema detergente es el más utilizado, aunque existen métodos más modernos. La accesibilidad y los costos de estos métodos son factores limitantes para muchos laboratorios. Algunos de ellos no están reconocidos como métodos oficiales de análisis. En este artículo se describe y discute especialmente el sistema detergente para evaluar el valor nutricional de alimentos para rumiantes, y las dificultades de interpretación. Se concluye que en el análisis de forrajes sometidos a procesos de biodegradación, los valores de lignina y celulosa por el sistema van Soest encontrados entre blancos y muestras, no corresponden al contenido total de lignina o celulosa de la muestra biodegradada. Se deben utilizar otros métodos más precisos como la espectroscopia IRTF (Infrarrojo con Transformada de Fourier) o la NIRs (Infrarrojo cercano) para caracterizar estas muestras.

Palabras clave: Fibra, análisis de los alimentos, esquema Van Soest, sistema de análisis Weende.

ABSTRACT

In order to improve the agroalimentary chain and to diminish the extensive use of land to grow crops for cattle raising, there is a need for greater availability of forages with adequate nutritional value. Biotechnological processes to improve grass by fermentation with basidiomycetes, are an alternative. However, it is difficult to determine the changes that take place in forage with the fermentation process. There are many reports on techniques to evaluate forage components. Of them, the detergent system is the most frequently used but more modern methods are also available. Accesibility and costs of the latter are limiting factors for many laboratories and some of the newer methods have not yet been officially approved. We describe and discuss the detergent system to evaluate the nutritional value of foods for ruminants, and the difficulties of its interpretation. In the analysis of forages exposed to biodegradation processes, we concluded that values of lignin and cellulose (van Soest system) found in blanks and specimens do not correspond to the real contents of these substances in the biodegraded specimen. More precise methods should be used such as IRTF spectroscopy (infrared with transformed of Fourier) or near infrared (NIRS) to characterize these specimens.

Keywords: Fiber, food analysis, van Soest scheme, Weende system of analysis.

1 Grupo Biodegradación y Bioconversión de Polímeros –BIOPOLIMER, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. A.A. 1226. Medellín, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: amejia@quimbaya.udea.edu.co

INTRODUCCIÓN

Los métodos analíticos son muy importantes en investigaciones en nutrición puesto que constituyen la base para la interpretación de datos y, en consecuencia, existen numerosas publicaciones con información disponible sobre técnicas para evaluar componentes de un forraje. Pero aparece una gran dificultad para seleccionar el método más adecuado, porque define la capacidad de un método, tanto desde el punto de vista analítico como de la interpretación de los resultados es tarea complicada, por tanto, la determinación del valor nutricional depende básicamente de la necesidad del investigador y del producto analizado según su composición teórica. Sin métodos confiables o significativos en la valoración nutricional se restringen muchos avances científicos. También, porque aunque es posible analizar la composición química de tejidos individuales de plantas, los requerimientos necesarios para su aislamiento limitan su uso solamente al desarrollo de investigaciones donde se justifica separarlos, porque consumen mucho tiempo y dinero.

El término fibra dietaria en nutrición humana se refiere a los componentes de los alimentos derivados de plantas que no son digeribles por los sistemas enzimáticos de los mamíferos (1) y no es el objeto de este artículo. En forrajes, normalmente en alimentación para ganado, fibra se refiere a las paredes celulares de las plantas (2,3,4,5), y está bien establecido que la rata de degradación ruminal de diferentes sustratos depende de la composición de la pared celular de la planta (5). La fibra es importante en ambos casos porque representa la porción orgánica de los alimentos que es más difícil de digerir; las fracciones de alimentos que no son fibras son fáciles y casi completamente digeridas por la mayoría de las especies animales.

La fibra está constituida por celulosa, lignina, hemicelulosa, pectina, inulina, agar, quitina, gomas y silicatos; inclusive algunos autores incluyen como parte de la fibra algunos compuestos fenólicos, el ácido fítico y otros compuestos antinutricionales presentes en muy pequeñas cantidades en los alimentos (5,6). A la celulosa y a la hemicelulosa les corresponden los mayores porcentajes en la constitución de la fibra, las siguen la lignina y las pectinas que poseen en algunos alimentos porcentajes relativamente altos. El resto de los componentes no tienen especial importancia nutricional y no representan cuantitativamente cifras elevadas (6,7).

Es necesario contar con ensayos rápidos y simples para determinar el contenido total de fibra insoluble en los alimentos para animales, pero con esta composición tan compleja, es una tarea difícil (8).

En este artículo de reflexión se describen y discuten los métodos analíticos conocidos por la comunidad científica para evaluar el valor nutricional de forrajes y alimentos para rumiantes, así como las dificultades de interpretación de los mismos en los desarrollos experimentales. Es el resultado de la revisión bibliográfica y la experimentación efectuadas durante el trabajo de grado para optar al título de magíster en Ciencias Farmacéuticas, de dos estudiantes del grupo de investigación BIOPOLIMER, de la facultad de Química Farmacéutica, en el marco del proyecto de investigación: Estudio del mejoramiento nutricional de un forraje tocoso (pasto *king grass*), al utilizarlo como sustrato en la fermentación en estado sólido con varias especies de basidiomicetos, financiada por la red Alfa Caribiotec, la Universidad del Antioquia y el Sena.

COMPOSICIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA FIBRA

La pared primaria -P- de un tejido de una planta se observa en la figura 1. Está compuesta de fibrillas de celulosa, hemicelulosa y proteína con grandes cantidades de pectina formando una matriz viscosa que consolida toda la pared. A la izquierda en la figura 1, se muestra la relación entre células contiguas, en el centro se muestra una vista de un corte de las capas de la pared celular y a la derecha un esquema de la relación de lignina, hemicelulosa y celulosa en la pared secundaria. El diámetro de cada célula es aproximadamente de 25 μm .

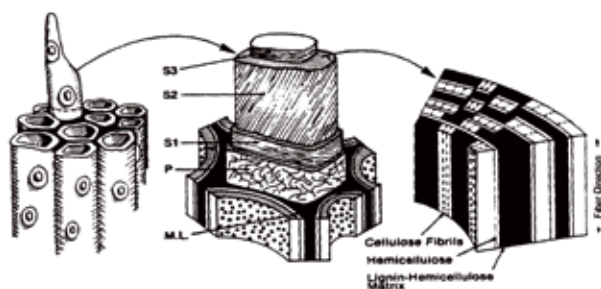


Figura 1. Ilustración esquemática de la arquitectura molecular de un tejido de una planta (forraje). S1, S2 y S3 son capas de la pared celular secundaria. P = pared primaria; M. L. = lamela media (12).

La composición molecular varía entre tipos de células, tejidos y especies de plantas; una aproximación de peso seco podría ser 30% de celulosa, 25% de hemicelulosa, 35% de pectina y un 10% de proteína (9). Los componentes proteicos de la pared celular primaria son glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, llamadas extensinas, que están involucradas en la arquitectura de la pared celular y en la resistencia de la planta a enfermedades (10,11).

La morfología básica de las paredes celulares de las plantas está determinada por la celulosa (9), polímero lineal de unidades de celobiosa anhidra (dímero de D-glucosa), formada por polimerización de moléculas de D-glucosa unidas en la posición β -1,4-enlace glicosídico, formando cadenas lineales planas que se unen entre sí, por puentes de hidrógeno y fuerzas de van Der Waals, dando lugar a microfibrillas (9,12,13,14) de gran estabilidad y baja digestibilidad en monogástricos puesto que su hidrólisis se da principalmente por acción de celulasas procedentes de los microorganismos ruminales.

La pared de la matriz que rodea la pared primaria está compuesta por hemicelulosa, proteína y pectina. Las hemicelulosas son mezclas de polímeros de diferentes polisacáridos neutros y ácidos. Estos se adhieren a la superficie de las microfibrillas de celulosa por puentes de hidrógeno a través de los grupos OH de los azúcares y mejoran la resistencia de la pared celular. Los polisacáridos pécticos están covalentemente unidos a las hemicelulosas. Cuando algunos tipos de células maduran, una pared secundaria se deposita entre la pared primaria haciéndola más densa porque tiene menos agua unida (2,12). Las hemicelulosas son heteropolisacáridos formados por monómeros de carbohidratos como hexosas (D-glucosa, D-manosa, D-galactosa), pentosas (D-xilosa, L-arabinosa), deoxixosas (L-ramnosa), y ácidos urónicos (D-ácido glucurónico, 4-O-metil-D-ácido glucurónico) (14). Por ser altamente ramificadas y poseer tantos grupos polares en los diversos azúcares, las hemicelulosas son fácilmente solubles en agua (6,13). Algunos investigadores han propuesto que las hemicelulosas, en asociación con la celulosa, influyen en la organización de la lignina (12).

La lignina es un polímero que se diferencia notablemente de las otras macromoléculas constituyentes de la pared celular; es un polímero aromá-

tico tridimensional que rodea las microfibrillas de celulosa y a la hemicelulosa, con algunas uniones covalentes a la hemicelulosa (9,15). Es poco sensible al agua; es una red polimérica heterogénea, amorfa, ópticamente inactiva y altamente ramificada. La unidad básica estructural de la lignina es un fenilpropano. Las sustituciones sobre los anillos aromáticos de los monómeros y la proporción de estos precursores varían dependiendo del origen botánico y determinan el tipo de lignina. Las ligninas de monocotiledóneas, como cereales y pastos, están compuestas por unidades de coniferil alcohol, y trans-sinapil alcohol y por eso se conocen como "guayacil-siringil ligninas" aunque también contienen ciertas cantidades de ρ -coumaril alcohol que es un precursor del ρ -hidroxifenil (13,16).

Todos los pastos tienen ligninas que están acetiladas por ácido ρ -coumárico en la posición γ de las cadenas laterales de lignina, principalmente sobre las unidades de siringil; y también incorporan ferulatos que se entrecruzan con la lignina y con carbohidratos y tienen un impacto negativo en la disponibilidad de los polisacáridos para su utilización, por ejemplo, por microorganismos ruminales de animales rumiantes (17).

La lignina es completamente indigerible tanto para monogástricos como para poligástricos, y su determinación sirve para predecir la digestibilidad en materia seca y energía de un alimento (6), porque se encuentra envolviendo a la celulosa y hemicelulosa y restringe al acceso a estos carbohidratos, que sí pueden ser digeribles (14).

Como resultado de esta complejidad, el análisis de fibra puede proporcionar sólo datos de una composición promedio de las paredes celulares en un alimento y no puede informarnos la influencia de tipos individuales de tejidos sobre el desempeño rumiante. Los mamíferos no poseen las enzimas para hidrolizar el enlace predominante β 1-4 de los polisacáridos que se encuentra normalmente en las paredes de las plantas y dependen de microorganismos en el tracto gastrointestinal para fermentar estos polisacáridos a nutrientes absorbibles. Los rumiantes son herbívoros más especializados en utilizar esta relación simbiótica para explotar las paredes celulares de las plantas como fuente de nutrientes (18).

MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA DETERMINAR EL VALOR NUTRICIONAL DE ALIMENTOS PARA ANIMALES

Uno de los sistemas de análisis de alimentos más importantes en investigación sobre nutrición de rumiantes (y cada vez más en investigación no rumiante) es el sistema análisis Fibra Detergente (19).

La historia de la fibra detergente

El pobre estado del análisis de alimentos para animales en los años 60, desencadenó el programa de investigación de Peter van Soest, en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, el cual condujo al sistema detergente de análisis de alimentos. Van Soest logró convencer a la comunidad científica de reemplazar el sistema Weende o de análisis proximal (20) por su sistema detergente. Reemplazando fibra cruda (CF) y extracto libre de nitrógeno por solubles en detergente neutro (NDS), fibra detergente ácida (ADF), fibra detergente neutra (NDF) (las siglas se deben a su nombre en inglés) y lignina, fue posible explicar respuestas nutricionales en términos de digestibilidad y consumo de alimentos (19).

NDS constituye las fracciones completamente digeribles de carbohidratos y proteínas, así como lípidos y algunas cenizas; mientras que NDF representa la fibra estructural, la cual es sólo parcialmente digerible, y lignina es la fracción de NDF completamente indigerible.

El método para ADF dado a conocer en 1963 (21, 22) fue la primera publicación que realmente describía el sistema de análisis detergente. ADF rápidamente reemplazó a CF en muchos laboratorios porque era un método más simple y daba valores similares en muchos forrajes. El procedimiento ADF fue aprobado por la Association of Official Analytical Chemist (AOAC) y no fue difícil estandarizarlo en los laboratorios. ADF aísla principalmente celulosa y lignina, pero no hemicelulosa, lo que lo hace inadecuado para medir la fibra estructural total. Cuando el procedimiento de análisis NDF fue publicado por primera vez en 1968 (23), ADF se hizo menos interesante para la formulación de alimentos y su uso empezó a disminuir lentamente, aunque todavía es utilizado. Hoy en día el principal uso de ADF es preparar un residuo bajo en proteína para el posterior análisis de lignina.

La publicación de Goering y van Soest en 1970 (24) fue la primera descripción detallada del método NDF para uso en el laboratorio. Unos diez años después salió a la luz otra publicación (25), donde fueron introducidas una serie de variantes para el análisis NDF incluyendo el uso de amilasa, y diez años después, una tercera publicación (26) presentó cambios adicionales, pero no recomendaba un solo método para todas las muestras de alimentos (19). La dificultad en la extracción y el lavado de los residuos fibrosos en algunos materiales y la variedad de modificaciones sobre el método NDF dieron la percepción de que NDF es difícil de medir con precisión. A pesar de todo, NDF ha reemplazado enormemente a CF entre los científicos, pero CF de ningún modo es un método obsoleto; como NDF no era un método gubernamentalmente aprobado, CF continuó siendo usado en muchos países.

En los años 80, David Mertens (estudiante del doctorado dirigido por van Soest) inició esfuerzos para estandarizar el análisis NDF en los laboratorios de USA; él afirmaba que la única forma de reducir el error en los laboratorios era esencialmente prescribir un único método analítico para todo tipo de alimentos (19), porque ya para la época se habían propuesto modificaciones para extender su aplicación a granos, concentrados para animales y alimentos para consumo humano (26, 27, 28, 29, 30), muchas de las cuales fueron realizadas sin pruebas de desigualdad para determinar su conveniencia para todas las matrices de alimentos o aplicación práctica como métodos de rutina, lo que condujo a métodos para análisis de fibra que aunque diferían entre sí, todos ellos se llamaban NDF (8). Los esfuerzos de Mertens dieron como resultado algunas recomendaciones y finalmente, después de un largo proceso, salió una publicación de aprobación del método NDF por la AOAC en el 2002 con el uso de amilasa (aNDF) (8, 31). Sin embargo, esta publicación describe simplemente algunas variantes del procedimiento NDF, con o sin el uso de una amilasa estable al calor y con o sin la expresión de NDF sobre una base libre de cenizas. Se describe entonces que el almidón no es completamente removido en NDF, se recomienda el uso de amilasas (8); también que se puede utilizar sulfito de sodio para eliminar material proteínico de los residuos de fibra, pero se debe tener cuidado si se va a usar conjuntamente con amilasas (8). El AOAC Oficial Method 2002.04 establece que el análisis detergente neutro y a-amilasa se utiliza para disolver proteínas,

lípidos, azúcares, almidones y pectinas fácilmente digeribles en los alimentos, dejando un residuo fibroso que consiste principalmente en componentes de la pared celular de las plantas (celulosa, hemicelulosa y lignina) y nitrógeno indigerible en productos para animales (31).

Resumiendo se puede decir que aunque es poco probable que todos los científicos se adhieran rigurosamente a los protocolos de Mertens, revistas como *Animal Feed Science and Technology* (3, 4, 5) recomiendan el uso del artículo de Mertens como la principal referencia para el análisis NDF; para el análisis ADF se recomienda usar el ma-

nual de la AOAC; y para lignina los análisis más comunes sobre los residuos ADF son el método directo con ácido sulfúrico y el método indirecto con permanganato (las mejores referencias sobre estos métodos están en (28)). En la Tabla 1 se presentan los usos y limitaciones para algunos de los principales métodos de análisis de fibra y paredes celulares usados para determinar la calidad de los forrajes y en nutrición animal. Cada método tiene sus propias fortalezas y debilidades. La elección de uno determinado depende los objetivos del proyecto de investigación o de las necesidades del usuario.

Tabla 1. Usos y limitaciones de algunos de los principales métodos de análisis de fibra y paredes celulares usados para determinar la calidad de los forrajes y en nutrición animal.

Método de análisis	Fracción de forraje medida	Limitaciones del método	Descripción
Fibra cruda (CF)	<p>Porción de pared celular de la planta que sobrevive a la digestión rigurosa en solución ácida y alcalina (14).</p> <p>Se recupera celulosa y lignina en mayor proporción (19).</p>	<p>Se remueven muchos polisacáridos no celulósicos y lignina (2).</p> <p>Se elimina la hemicelulosa (14).</p> <p>Subestima el contenido total de la pared celular de la planta de un forraje y recupera sólo una porción de los polisacáridos de la pared y la lignina (18).</p>	<p>El sistema de análisis proximal o sistema Weende, en el cual la concentración de la fibra es medida como fibra cruda (CF), es el método más antiguo todavía en uso (desde 1859) (20). Es un método gravimétrico. Bajo este esquema una muestra es secuencialmente colocada en reflujo en base diluida, seguido por ácido diluido. El residuo resultante se conoce originalmente como la porción indigerible del forraje; en la actualidad se sabe que está compuesto principalmente por celulosa y proporciones variables de polisacáridos no celulósicos y de lignina. Continúa siendo usado hoy día porque es un método oficial de la AOAC para el análisis de alimentos (2,14).</p>
Fibra detergente neutra (NDF)	<p>Fracción del alimento incompletamente digerible, recuperación casi completa de paredes celulares de pastos.</p>	<p>Pectinas casi completamente removidas; la remoción de proteína y almidón puede ser un problema.</p> <p>NDF es considerada como la fracción entera de fibra del forraje, pero también subestima la concentración de la pared celular porque muchas de las sustancias pécticas en la pared son solubilizadas (18).</p> <p>NDF hace una pobre estimación de la concentración de la pared celular para las leguminosas ricas en pectinas. Las proteínas que se dañan por calentamiento en alimentos procesados o calentados también son retenidas en NDF, sobreestimando el contenido de fibra.</p> <p>Estas limitaciones del NDF son un problema si se está interesado en la pared celular de la planta como estructura biológica, pero van Soest (18) señala que estas inconsistencias no son de interés si la fibra está definida como la fracción del alimento incompletamente digerible.</p>	<p>En nutrición ruminal el método de la fibra detergente neutra (NDF) desarrollado por van Soest ha remplazado enormemente al CF (22). NDF; así como CF, usa extracciones químicas (con una solución detergente neutra bajo reflujo) seguido por determinación gravimétrica del residuo de fibra).</p> <p>Aunque se ha usado ampliamente, el método NDF para el análisis de fibra de alimentos para rumiantes, no era un método oficial de la AOAC.</p> <p>La hidrólisis de NDF con ácido trifluoroacético puede ser usada para determinar los azúcares hemicelulósicos (1).</p> <p>La AOAC aprobó en 2002 el método aNDF, una variante al método NDF, que utiliza α-amilasa para disminuir algunas interferencias (31).</p>

Método de análisis	Fracción de forraje medida	Limitaciones del método	Descripción
Fibra ácido detergente (ADF)	<p>Porción de pared celular de la planta, recuperación completa de celulosa.</p> <p>Fibra detergente ácida (ADF), es una porción de las fibras de las plantas (21). ADF incluye la celulosa y la lignina de las paredes celulares y cantidades variables de xilanos y otros componentes.</p>	Una porción significativa de la lignina es solubilizada.	Método de análisis aprobado por la AOAC. Una variación común del método ADF es usar NDF como pretratamiento (25).
Fibra dietaria (DF)	<p>Completa recuperación de los polímeros de las paredes celulares.</p> <p>A diferencia de NDF y de CF, el método de DF retiene todos los componentes de la pared celular.</p>	La remoción de almidón y proteína puede ser un problema en alimentos concentrados y procesados. La remoción incompleta de estas sustancias puede resultar en el DF, sobreestimando la concentración de la pared celular.	El procedimiento de fibra dietaria de Prosky (DF) es el tercer método gravimétrico de importancia usado para medir la concentración de fibra (método oficial de la AOAC) (45). Utiliza una serie de pretratamientos enzimáticos y químicos seguidos por precipitación en etanol al 80% para aislar el residuo fibroso.
Fibra dietaria Uppsala	Recuperación total de la pared celular y composición de la pared celular.	Complejidad del método.	Similar al método de DF de Prosky, pero tiene la ventaja agregada de proporcionar datos composicionales; también ha recibido aprobación de la AOAC (46). Después del pretratamiento para remover componentes que no son de pared, los polisacáridos de la pared celular son hidrolizados con ácido sulfúrico y los componentes azúcares neutros son identificados y cuantificados por cromatografía (generalmente cromatografía de gases). Los azúcares ácidos de la pared celular, y los ácidos galacturónico y glucurónico, son medidos colorimétricamente en el hidrolizado.
Crampton-Maynard	Celulosa	Contaminación con pequeñas cantidades de xilanos.	El método Crampton-Maynard proporciona una mejor medida de la celulosa en los forrajes (47).
ADF menos ADL	Celulosa	<p>Limitaciones de los métodos de ADF y ADL.</p> <p>Las concentraciones de celulosa son sobreestimadas porque en ADF hay xilanos presentes en cantidad variable y subestimados por contaminación con proteínas que han sido dañadas térmicamente presentes en ADL.</p>	Existen muchos métodos analíticos para la medida de componentes específicos de la pared celular. En nutrición de rumiantes, las concentraciones de celulosa son normalmente estimadas como ADF menos lignina ácido detergente sulfúrica (ADL) (25).
NDF menos ADF	Hemicelulosa	<p>Limitaciones de los métodos de NDF y ADF.</p> <p>Estimados de hemicelulosa basados en NDF sobreestimados por proteínas no extraídas en NDF, y subestimados por xilanos residuales en ADF.</p>	La concentración de celulosa es normalmente estimada como NDF menos ADF (25).
Lignina ácido detergente (ADL)	Lignina	Solubilización de la lignina en el paso de ADF, especialmente en pastos.	ADL mide el residuo remanente después de hidrólisis ácida; es el método más común para determinar lignina en nutrición de rumiantes, pero cada vez existe más evidencia de que el subestimado del valor de la lignina debido a la solubilización de algunas ligninas en el paso anterior de ADF (48).

Método de análisis	Fracción de forraje medida	Limitaciones del método	Descripción
Lignina Klason	Lignina	Posible contaminación con proteínas y carbohidratos.	Es el residuo que permanece después de la hidrólisis ácida. La concentración de fibra es calculada como la suma de todos los componentes individuales. Lignina por Klason es el método más antiguo para lignina y ha sido considerado inapropiado para forrajes debido a la contaminación por proteínas. Resultados recientes muestran que esta consideración es innecesaria y puede ser el mejor método disponible para estimar el contenido de lignina (49).
Lignina por permanganato, clorito de sodio o acetil bromuro	Lignina	Estos métodos oxidativos son susceptibles a la solubilización incompleta de la lignina o a interferencias por otros componentes de la pared celular que se pueden solubilizar.	Solubilizan la lignina y miden la lignina por pérdida de peso o por espectrofotometría (23,50,51).

Caracterización de forrajes sometidos a procesos de biodegradación ligninolítica

El bajo “valor nutricional” de algunos forrajes se debe principalmente a la baja disponibilidad de los carbohidratos (no a su concentración) porque algunos, como el pasto *King grass* (32, 33), poseen un alto contenido de ellos, pero normalmente se encuentran paquetes de lignina envolviendo los carbohidratos como la hemicelulosa y celulosa y de esta manera impidiendo el acceso a ellos en el proceso de digestión de los rumiantes. Si se logra disminuir el contenido de lignina con respecto al de los carbohidratos, se facilitaría el acceso y asimilación de éstos. (34, 35, 36).

Los organismos de la naturaleza que han demostrado ser los más eficientes degradadores de la lignina son los hongos basidiomicetos de la podredumbre blanca de la madera, gracias a sus complejos sistemas enzimáticos (37, 38, 39, 40, 41, 42). Estos hongos, a su vez, también son capaces de degradar los carbohidratos disponibles en los residuos vegetales (43) y, por lo tanto, el método analítico que se use debe ser capaz de determinar qué componentes de la pared celular están descomponiendo. El sistema análisis Fibra detergente no es aconsejable porque tiene muchas limitaciones que conducen a sobreestimaciones o subestimaciones. El análisis de forrajes a los cuales se les quiere determinar cambios en su composición al ser tratados con hongos basidiomicetos que cambian la composición y la estructura de la lignina (44), se convierte entonces en el problema que se debe resolver.

Una de las principales limitaciones para el análisis de ADL de estos forrajes biodegradados es que

en una etapa, específicamente al analizar ADF, una parte considerable de lignina es solubilizada, especialmente en pastos; no se conoce a qué estructuras corresponde exactamente esa parte de lignina soluble, ni si las estructuras de lignina que quedan después del proceso de degradación son más o menos solubles que las estructuras de lignina que existen en el pasto sin biodegradar (en la biodegradación se dan cambios estructurales en la lignina).

Por lo tanto, las diferencias entre los valores de lignina encontrados entre blancos y muestras analizadas por el esquema van Soest, no corresponderán realmente al contenido total de lignina del pasto biodegradado. También al calcular celulosa como ADF-ADL se corre el riesgo de sobreestimar los valores porque se puede solubilizar en mayor proporción parte de la lignina producto del tratamiento con los hongos que la lignina del pasto sin tratar, dando como resultado valores más bajos de ADL y, por lo tanto, valores más altos de celulosa.

Lo anterior sugiere que se deben utilizar otros métodos de análisis más precisos, como por ejemplo, análisis de Infrarrojo con Transformada de Fourier (IR-TF) (52) y análisis de las áreas de algunas bandas características de la lignina con respecto a bandas características de carbohidratos o infrarrojo cercano (NIRS) (53). El principal objetivo del análisis espectroscópico IR es la determinación de los grupos funcionales químicos presentes en la muestra.

Diversos grupos funcionales químicos absorben en frecuencias características de la radiación IR y por medio de la utilización de varios accesorios para el muestreo. Los espectrómetros IR pueden

aceptar una amplia gama de tipos de muestra tales como gases, líquidos, y sólidos. Así, la espectroscopia IR es una herramienta importante y popular para la aclaración estructural y la identificación de un compuesto. Presenta varias ventajas sobre otros métodos más tradicionales, entre las cuales se destaca el hecho de que las muestras no necesitan mucha preparación (algunos mg son suficientes) y no es un análisis destructivo.

Los cambios en la química de la madera, o de residuos lignocelulósicos resultantes de la degradación con hongos, han sido estudiados directamente en análisis gravimétricos (43, 54, 55, 56), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (IR-TF) (56, 57, 58, 59, 60, 61, 62), espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) (63, 64, 65, 66), microscopía (67, 68), entre otros métodos.

Los métodos gravimétricos demandan una gran cantidad de tiempo y de reactivos, preparación de la muestra, cantidades relativamente altas de muestra y, además, los resultados obtenidos se ven afectados por muchas variables que analizamos aquí y algunas veces no reflejan las proporciones reales de los constituyentes de interés. Por esas razones, aunque la IR-TF es una técnica estrictamente limitada para proporcionar datos cuantitativos absolutos sobre los constituyentes de una muestra, está especialmente indicada para comparación entre espectros de muestras tratadas y de control incluidas dentro de un mismo experimento (60, 69).

CONCLUSIONES

Aunque en sí mismo el análisis de alimentos es un asunto extremadamente importante para las investigaciones sobre nutrición animal, desafortunadamente las investigaciones en este campo son con frecuencia poco valoradas y es raro que se destaquen publicaciones en nutrición animal sobre las técnicas y metodologías. Es común que estudiantes graduados desarrollen métodos analíticos o modificaciones en sus investigaciones de tesis, pero estos procedimientos, por lo general, se encuentran muy resumidos y subsumidos en otras publicaciones (19).

Existen métodos modernos para analizar la fibra y sus componentes, pero la accesibilidad a ellos y sus costos son factores limitantes para muchos laboratorios, en especial en países en desarrollo, impidiendo su implementación como métodos de análisis rutinarios. Además, algunos de ellos

no están reconocidos como métodos oficiales de análisis y por esta razón se sigue utilizando ampliamente el sistema análisis detergente, que aunque no determine exactamente la composición real de los diferentes componentes de las paredes celulares, se utiliza como punto de partida para predecir la digestibilidad o para calcular los componentes que lleva una formulación.

IR-TF y NIRs son técnicas muy utilizadas para estudiar la química de los residuos lignocelulósicos, ya que se requiere mínima preparación de la muestra, son necesarias muy pequeñas cantidades de muestra para el análisis (unos pocos miligramos) (52) y el tiempo de análisis es muy corto. Un simple cambio en la composición del sustrato se puede reflejar en un patrón complejo de cambios en diferentes regiones del perfil IR-TF ó de NIRs que de esta manera permiten reconocer patrones de la degradación de la madera de una forma más simple (60, 69).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Antioquia, a la RED ALFA CARIBIOTEC, al SENA y al programa de Gestión Tecnológica de la Vicerrectoría de Extensión de la Universidad de Antioquia, por la financiación de la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Slavin J. Impact of the Proposed Definition of Dietary Fiber on Nutrient Databases. *J Food Compos Anal* 2003;16(3): 287-291
2. Jung Hans-Joachim G. Analysis of Forage Fiber and Cell Walls in Ruminant Nutrition. *J Nutrition* 1997; 127 (5) : 810S-813S
3. Casler M.D, Jung H-Jg. Relationships of Fibre, Lignin and Phenolic to *in vitro* Fibre Digestibility in Three Perennial Grasses. *Animal Feed Science and Technology* 2006;125 (1,2):251-161
4. Lund P, Weisbjerg TH. Digestible NDF is Selectively Retained in the Rumen of Dairy Cows Compared to Indigestible NDF. *Animal Feed Sciences and Technology*. 2007;134(1,2):1-17
5. Sveinbjornsson J, Murphy M, Udén P. Effect of the proportions of neutral detergent fibre and starch, and their degradation rates, on *in vitro* ruminal fermentation. *Animal Feed Sciences and Technology*. 2006;130(3,4):172-190
6. Machado O. Valor nutricional de los alimentos - Elementos de Evaluación y Factores de Calidad. 1ª ed. Medellín: Universidad de Antioquia; 1997
7. Rojas E. La fibra dietética. En: Rojas Hidalgo E (ed.). Los carbohidratos en nutrición humana. Madrid: Grupo Aula Médica; 1994
8. Mertens DR. Gravimetric Determination of Amylase-treated Neutral Detergent Fiber in Feeds with Refluxing in beakers or Crucibles: Collaborative Study. *J AOAC* 2002; 85(6):1217-1240.
9. Gadd GM. Fungi in Bioremediation. Cambridge: British Mycological Society; 2001. p. 1-20
10. Brownleader MD, Byron O, Rowe A, Trevan M, Welham K, Dey PM. Investigations into the Molecular Size and Shape of Tomato Extensin. *Biochem J* 1996; 320(2): 577-583.

11. Dey P, Brownleader M, Pantelides A, Trevan M, Smith J, Saddler G. Extensin from Suspension-cultured Potato Cells: a Hydroxyproline-rich Glycoprotein, devoid of Agglutinin Activity. *Planta* 1997; 202(2): 179-187
12. Kirk TK, Cullen D. Chapter 9: Enzymology and Molecular Genetics of Wood Degradation by White-Rot Fungi. En: Young RA, Akhtar M. Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. Toronto: John Wiley & Sons; 1998. p. 273-307.
13. HUT - Helsinki University of Technology. Forest Products Chemistry. Chemistry of Cellulose Making: Module II - Basics of Wood Chemistry; 2004.
14. Cho S, DeVries JW, Prosky L. Dietary Fiber Analysis and Applications. Gaithersburg, MD: AOAC; 1997.
15. Hatakka A. Biodegradation of lignin. En: Hofrichter M, Steinbüchel A (eds.). Biopolymers, vol. 1 - Lignin, Humic Substances and Coal. Weinheim: Wiley-VCH; 2001. p.129-180
16. Brunow G. Methods to Reveal the Structure of Lignin. En: Hofrichter M, Steinbüchel A. (eds.), Biopolymers, vol. 1 - Lignin, Humic Substances and Coal. Weinheim: Wiley-VCH; 2001. p.89-116
17. Ralph J. Lignin Structure: Recent Developments. US Dairy Forage Research Center, USDA - Agricultural Research Service; 1999.
18. Van Soest PJ. Nutritional Ecology of the Ruminant, 2^a ed. Ithaca, NY: Cornell University Press; 1994.
19. Uden P, Robinson PH, Wiseman J. Editorial: Use of Detergent System Terminology and Criteria for Submission of Manuscripts on New, Revised, Analytical Methods as well as Descriptive Information on Feed Analysis and/or Variability. *Animal Feed Science and Technology* 2005; 118 (3-4): 181-186.
20. Henneberg W, Stohmann F. On the Maintenance Feeding of One-year Old Cattle. (Ueber das Erhaltungsfutter volljähriger Rindviehs.) *J Landwirtsch* 1859; 3:485-551
21. Van Soest PJ. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. I. Preparation of Fiber Residues of Low Nitrogen Content. *J Assoc Off Anal Chem* 1963a; (46).
22. Van Soest PJ. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. II. A Rapid Method for the Determination of Fiber and Lignin. *J Assoc Off Anal Chem* 1963b; (46).
23. Van Soest PJ, Wine RH. Determination of Lignin and Cellulose in Acid Detergent Fiber with Permanganate. *J Assoc Off Ana. Chem* 1968; 51: 780-785
24. Goering MK, Van Soest PJ. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications). *Agricultural Handbook n° 379*. Washington D.C.; Agricultural Research Services, USDA; 1970.
25. Van Soest PJ, Robertson JB. Systems of Analysis for Evaluating Fibrous Feeds. En: Pigden WJ, Balch CC, Graham M. (eds.) Standardization of Analytical Methodology in Feeds. Ottawa: International Research Development Center; 1980. p. 49-60.
26. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J Dairy Sci* 1991; 74:3583-3597.
27. Van Soest PJ, Wine RH.. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feed. IV. The Determination of Plant Cell Wall Constituents. *J Assoc Off Anal Chem* 1967; 50:55
28. Robertson JB, Van Soest PJ.. The Detergent System of Analysis and its Application to Human Foods. En: James WPT, Theander O (Eds) *The Analysis of Dietary Fiber in Foods*. New York: Marcel Dekker; 1981. p. 123-158.
29. Van Soest PJ, Robertson JB. Analysis of Forages and Fibrous Foods: a Laboratory Manual. New York: Cornell University; 1987.
30. Jeraci JL, Van Soest PJ. Improved Methods for Analysis and Biological Characterization of Fiber. En: Furda I, Brine CJ (eds.), *New Developments in Dietary Fiber*. New York: Plenum Press; 1990. p. 245-263
31. AOAC Official Method 2002.04. Amylase-Treated Neutral Detergent Fiber in Feeds. En: AOAC Official Methods of Analysis. 15 ed. Arlington, VA: Assoc Offic Anal Chem 2002. / Mertens DR. Gravimetric Determination of Amylase-treated Neutral Detergent Fiber in Feeds with Refluxing in Beakers or Crucibles: Collaborative Study. *J AOAC Int* 2002; 85(6):1217-1240.
32. Bodgan AV. *Tropical Pasture and Fooder Plants (Grasses and Legumes)* London, New York: Longman; 1977.
33. Hernández R., Hernández N. y Gómez A. Evaluación zonal de pastos tropicales introducidos en Cuba. *Pastos y forrajes*. La Habana, Cuba; 1989.
34. Agosin E Monties B, Odier E. Structural Changes in Wheat Straw Components during Decay by Lignin-degrading White-rot Fungi in Relation to Improvement of Digestibility for Ruminants. *J Sci Food Agric* 1985; 36(10):925-935.
35. Akin DE, Hartley RD. UV absorption microspectrophotometry and digestibility of cell types of Bermuda grass internodes at different stages of maturity. *J Sci Food Agric* 1992; 59(4):437-447.
36. Akin DE, Sethuraman A, Morrison III WH, Martin SA, Eriksson KE. Microbial Delignification with White Rot Fungi Improves Forage Digestibility. *App Environ Microbiol* 1993; 59(12):4274-4282
37. Bennet JW, Wunch KG, Faison BD. Use of Fungi Biodegradation. En: Hurst Ch J. *Manual of Environmental Microbiology*. 2^a ed. Washington: ASM Press; 2002.
38. Akin DE, Rigsby LI, Sethuraman A, Morrison 3rd WH, Gamble GR, Eriksson KE. Alterations in Structure, Chemistry and Biodegradability of Grass Lignocellulose Treated with the White Rot Fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61(4): 1591-1598.
39. Blanchette RA. Screening Wood Decayed by White Rot Fungi for Preferential Lignin Degradation. *Appl Environ Microbiol* 1984; 48(3): 647-653.
40. Boyle CD, Kropp BR, Reid ID. Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58(10):3217-3224.
41. Eriksson KE. Microbial Delignification-basics, Potentials and Applications. *FEMS Symp* 1988; 43:285-301.
42. Eriksson K-E, Blanchette RA, Ander P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. New York: Springer-Verlag; 1990.
43. Blanchette RA. Degradation of the Lignocellulose Complex in Wood. *Can J Botany* 1995; 73(1): S999-S1010.
44. Blanchette RA, Otjen L, Effland MJ, Eslyn WE. Changes in Structural and Chemical Components of Wood Delignified by Fungi. *Wood Sci Technol* 1985; 19(1): 35-46
45. Prosky L, Asp N-G, Furda I, DeBreis JW, Schweizer TF, Harland BF. Determination of Total Dietary Fiber in Foods, Food Products and Total Diets: Interlaboratory Study. *J Assoc Off Anal Chem* 1984; 67: 1044-1052.
46. Theander O, Aman P, Westerlund E, Andersson R, Pettersson D. Total Dietary Fiber Determined as Neutral Sugar Residues, Uronic Acid Residues and Klason Lignin (the Uppsala Method): Collaborative Study. *J Assoc Off Anal Chem* 1995; 78(4):1030-1044.
47. Morrison IM Hemicellulosic Contamination of Acid Detergent Residues and their Replacement by Cellulosic Residues in Cell Wall Analysis. *J Sci Food Agric* 1980; 31(7): 639-645.
48. Lowry JB, Conlan LL, Schlink AC, McSweeney CS. Acid Detergent Dispersible Lignin in Tropical Grasses. *J Sci Food Agric* 1994; 65(1): 41-50.
49. Hatfield RD, Jung HG, Ralph J, Buxton DR, Weimer PJ. A Comparison of the Insoluble Residues Produced by the Klason Lignin and Acid Detergent Lignin Procedures. *J Sci Food Agric* 1994; 65(1): 51-58.
50. Collings GF, Yokoyama MT, Bergen WG. Lignin Determined by Oxidation with Sodium Chlorite and a Comparison with Permanganate Lignin. *J Dairy Sci* 1978; 61: 1156-1160.

51. Morrison IM. A Semi-micro Method for the Determination of Lignin and its Use in Predicting the Digestibility of Forage Crops. *J Sci Food Agric* 1972; 23(4): 455-463.
52. Pandey KK, Pitman AJ. FTIR Studies of the Changes in Wood Following Decay by Brown-rot and White-rot Fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2003; 52(3): 151-160.
53. Martin GC, Shenk JS, Barton FE. Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality. Washington, D.C.:USDA Agric. Handbook no. 643. 1985. p. 96.
54. Worrall JJ, Anagnost SE, Zabel RA, Comparison of Wood Decay among Diverse Lignicolous Fungi. *Mycologia* 1997; 89: 199-219.
55. Enoki A, Tanaka H, Fuse G. Degradation of Lignin-related Compounds, Pure Cellulose and Wood Components by White-rot and Brown-rot Fungi. *Holzforchung* 1998; 42: 85-93.
56. Pérez V, Troya MT, Martínez AT, González-VFJ, Arias E, González AE. *In vitro* Decay of *Aextoxicon punctatum* and *Fagus sylvatica* Woods by White and Brown Rot Fungi. *Wood Sci Tech* 1993; 27(4): 295-307.
57. Faix O, Bremer J, Schmidt O, Stevanovic T. Monitoring of Chemical Changes in White-rot Degraded Beech Wood by Pyrolysis-gas Chromatography and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J Anal Appl Pyrol* 1991; 21(1,2): 147-162.
58. Korner S, Pecina H, Wienhaus O, 1990. Investigations on the Identification of the Beginning Brown-rot Fungus Infestation of Wood by means of IR Spectroscopy. *Holz als Roh- und Werkstoff* 1990; 48: 413-416.
59. Korner I, Faix O, Wienhaus O. Attempt to Determine Brown-rot Breakdown of Scots Pine Wood with the Aid of FTIR Spectroscopy. *Holz als Roh- und Werkstoff* 1992; 50(9): 363-367.
60. Dorado J, Almendros G, Field JA, Sierra AR. Infrared Spectroscopy Analysis of Hemp (*Cannabis sativa*) after Selective Delignification by *Bjerkandera sp* at Different Nitrogen Levels. *Enzym Microb Tech* 2001; 28(6): 550-559
61. Ferraz AU, Baeza J, Rodríguez J, Freer J. Estimating the Chemical Composition of Biodegraded Pine and Eucalyptus Wood by DRIFT Spectroscopy and Multivariate Analysis. *Bioresource Technology* 2000; 74(3): 201-212.
62. Rodríguez J, Faix O, Pereira H. Determination of Lignin Content of Eucalyptus Globulus Wood using FTIR Spectroscopy. *Holzforchung* 1998; 52: 46-50.
63. Davis MF, Schroeder HA, Maciel GE. Solid State ¹³C nuclear Magnetic Resonance Studies of Wood Decay. II White Rot Decay of Paper Birch. *Holzforchung* 1994a; 48: 186-192.
64. Davis MF, Schroeder HA, Maciel GE. Solid State ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Studies of Wood Decay. III Decay of Colorado Blue Spruce and Paper Birch by *Postia Placenta*. *Holzforchung* 1994b; 48: 301-307
65. Kim YS, Newman RH, 1995. Solid State ¹³C NMR Study of Wood Degraded by the Brown Rot Fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Holzforchung* 1995; 49: 109-114.
66. Gilardi G, Abis L and Cass AEG. Carbon-13 CP/MAS Solid-State NMR and FT-IR Spectroscopy of Wood Cell Wall Biodegradation. *Enz Microb Technol* 1995; 17(3): 268-275.
67. Daniel G. Use of Electron Microscopy for Aiding our Understanding of Wood Biodegradation. *FEMS Microbiol Rev* 1994; 13(2,3): 199-233.
68. Anagnost SE. Light Microscopic Diagnosis of Wood Decay. *IAWA J* 1998; 19(2): 141-167.
69. González-Martín I, Álvarez-García N, Hernández-Andaluz JL. Instantaneous Determination of Crude Proteins, Fat and Fibre in Animal Feeds Using Near Infrared Reflectance Spectroscopy Technology and a Remote Reflectance Fibre-optic Probe. *Animal Feed Science and Technology* 2006;128(1,2):165-171.



CIDUA
Centro de Información y Documentación
de Medicamentos, Alimentos, Cosméticos y Productos
Naturales de la Universidad de Antioquia

Teléfono 210 54 55
cidua@farmacia.udea.edu.co

Consúltenos sobre:

Medicamentos: Absorción, distribución, metabolismo y excreción; contraindicaciones y precauciones; interacciones con otros medicamentos y/o alimentos; mecanismo de acción; presentación comercial y forma farmacéutica; reacciones adversas y efectos secundarios; vías de administración; riesgos en el embarazo; normatividad vigente.

Alimentos: Normatividad vigente; composición natural; aditivos y conservantes para resaltar o mejorar las condiciones de forma, presentación y durabilidad; procesos a que son sometidos; avances tecnológicos; técnicas de manipulación; enfermedades transmitidas por alimentos; análisis fisicoquímico y control microbiológico; materiales de empaque.

Cosméticos: Control fisicoquímico y microbiológico; materias primas; producto terminado; normatividad vigente.

Productos Naturales: Plantas medicinales y tóxicas; normatividad sobre productos homeopáticos y fitoterapéuticos.

Está siendo renovada tecnológicamente con el apoyo de la vicerrectoría de extensión.

Atención personalizada en el bloque 02-123, de lunes a viernes en horario de 8 a.m. a 6 p.m.