



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias Agrarias

Escuela de Agronomía

Efectos de los métodos de congelado y secado sobre características espectrales (NIRS) y composición nutricional de forrajes frescos

Tesis presentada como parte de
los requisitos para optar al grado
de Licenciado en Agronomía.

Marjorie Astrid de Pablo Bakx

Valdivia Chile 2002

PROFESOR PATROCINANTE:

Daniel Alomar C.
Ing. Agr., Mg. Sci.

PROFESORES INFORMANTES:

Oscar Balocchi L.
Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.

Luis Latrille L.
Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a todas las personas que de una u otra forma colaboraron con la realización de mi tesis:

A mi profesor patrocinante, Sr. Daniel Alomar, por su constante apoyo y excelente disposición durante el desarrollo de este trabajo.

A mis profesores colaboradores, Sres. Luis Latrille y Oscar Balocchi, por los consejos brindados y la rápida corrección del escrito.

Al personal del Laboratorio de Nutrición del Instituto de Producción Animal. Un agradecimiento especial a la Sra. Rita Fuchslocher, por su ayuda incondicional y el agrado de haber podido compartir con ella. También agradezco a Leonie, Ximena, Susana, Felix y Raúl, por haber amenizado mis horas de trabajo.

Al Sr. Adolfo Estai, por la rapidez y prolijidad en la corrección de forma del escrito.

A mi esposo, Sergio Berndt, por su ayuda en la toma de muestras y valiosos consejos durante el desarrollo del escrito.

A Sergio y Melanie, con Amor.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Valor nutritivo de la pradera	3
2.2	Determinación analítica del contenido de nutrientes	5
2.2.1	Variables nutricionales	6
2.2.1.1	Materia seca	6
2.2.1.2	Cenizas totales	6
2.2.1.3	Proteína cruda	7
2.2.1.4	Proteína soluble	7
2.2.1.5	Fibra cruda	8
2.2.1.6	Fibra detergente neutro	8
2.2.1.7	Nitrógeno insoluble en la fibra detergente neutro	9
2.2.1.8	Fibra detergente ácido	9
2.3	Procesamiento de muestras	9
2.3.1	Congelamiento	10
2.3.2	Secado	11
2.4	Espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS)	15
2.4.1	Bases del método	16
2.4.2	Instrumentación NIRS	17
2.4.3	Colección de los espectros	18
2.4.4	Tratamiento de los espectros	18
2.4.5	Métodos de regresión	19

Capítulo		Página
3	MATERIAL Y METODO	20
3.1	Ubicación del estudio	20
3.2	Muestras de forrajes frescos	20
3.3	Procesamiento de las muestras	20
3.4	Congelamiento de las muestras	21
3.5	Secado de las muestras	21
3.6	Identificación de los tratamientos	22
3.7	Colección de espectros	22
3.8	Determinación de la composición nutricional	23
3.9	Análisis de datos	24
3.9.1	Análisis espectral	24
3.9.2	Análisis estadístico	24
4	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	27
4.1	Valoración nutritiva de los forrajes frescos según el tratamiento	27
4.1.1	Materia seca	28
4.1.1.1	Análisis de varianza	28
4.1.1.2	Interacción	29
4.1.2	Cenizas totales	29
4.1.2.1	Análisis de varianza	29
4.1.2.2	Interacción	30
4.1.3	Proteína cruda	31
4.1.3.1	Análisis de varianza	31
4.1.3.2	Interacción	32
4.1.4	Proteína soluble	33
4.1.4.1	Análisis de varianza	33
4.1.4.2	Interacción	34
4.1.5	Fibra cruda	35

Capítulo	Página	
4.1.5.1	Análisis de varianza	35
4.1.5.2	Interacción	36
4.1.6	Fibra detergente neutro	37
4.1.6.1	Análisis de varianza	37
4.1.6.2	Interacción	39
4.1.7	Nitrógeno insoluble en la fibra detergente neutro	40
4.1.7.1	Análisis de varianza	40
4.1.7.2	Interacción	43
4.1.8	Fibra detergente ácido	43
4.1.8.1	Análisis de varianza	43
4.1.8.2	Interacción	45
4.1.9	Valor D	45
4.1.9.1	Análisis de varianza	45
4.1.9.2	Interacción	47
4.2.1	Componentes principales (CP)	47
4.2.1.1	Congelamiento con nitrógeno líquido y liofilización por 52 horas (tratamiento 1)	48
4.2.1.2	Congelamiento con nitrógeno líquido y horno a 60°C por 48 horas (tratamiento 2)	49
4.2.1.3	Congelamiento a -20°C y liofilización por 52 horas (tratamiento 3)	50
4.2.1.4	Congelamiento a -20°C y horno a 60°C por 48 horas (tratamiento 4)	51
4.2.1.5	Congelamiento a -20°C y horno a 60°C por 30 horas (tratamiento 5)	52
4.2.1.6	Congelamiento a -20°C y horno a 70°C por 24 horas (tratamiento 6)	53

Capítulo		Página
4.2.1.7	Congelamiento a -20°C y horno a 100°C por 13 horas (tratamiento 7)	54
4.2.2	Agrupación de los espectros de muestras secadas por horno o liofilizador	54
5	CONCLUSIONES	57
6	RESUMEN	60
	SUMMARY	62
7	BIBLIOGRAFIA	64
	ANEXOS	70

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Metodología de análisis empleada por el Laboratorio de Nutrición	23
2	Criterio de bloqueo para las muestras	25
3	Promedios nutricionales estadísticos para cada tratamiento	27
4	Valores promedios mínimos cuadrados de MS (%) para las variables secado y congelado	29
5	Valores promedios mínimos cuadrados de CT (%) para las variables secado y congelado	31
6	Valores promedios mínimos cuadrados de PC (%) para las variables secado y congelado	33
7	Valores promedios mínimos cuadrados de PS (%) para las variables secado y congelado	35
8	Valores promedios mínimos cuadrados de FC (%) para las variables secado y congelado	37
9	Valores promedios mínimos cuadrados de FDN (%) para las variables secado y congelado	40
10	Valores promedios mínimos cuadrados de FDNIN (%) para las variables secado y congelado	43
11	Valores promedios mínimos cuadrados de FDA (%) para las variables secado y congelado	45
12	Valores promedios mínimos cuadrados de VD (%) para las variables secado y congelado	47

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Comparación de promedios mínimos cuadrados de MS para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística	28
2	Comparación de promedios mínimos cuadrados de CT para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística	30
3	Comparación de promedios mínimos cuadrados de PC para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística	32
4	Comparación de promedios mínimos cuadrados de PS para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística	34
5	Comparación de promedios mínimos cuadrados de FC para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística	36
6	Comparación de promedios mínimos cuadrados de FDN para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística	38
7	Comparación de promedios mínimos cuadrados de FDNIN para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística	41
8	Comparación de promedios mínimos cuadrados de FDA para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística	44
9	Comparación de promedios mínimos cuadrados de VD para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística	46
10	Agrupación espectral del tratamiento 1 según los componentes principales	48
11	Agrupación espectral del tratamiento 2 según los componentes principales	49

Figura		Página
12	Agrupación espectral del tratamiento 3 según los componentes principales	50
13	Agrupación espectral del tratamiento 4 según los componentes principales	51
14	Agrupación espectral del tratamiento 5 según los componentes principales	52
15	Agrupación espectral del tratamiento 6 según los componentes principales	53
16	Agrupación espectral del tratamiento 7 según los componentes principales	54
17	Agrupación de los espectros de muestras secadas por horno o liofilizador	55

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Características de las muestras	71
2	Composición nutricional de las muestras forrajeras según el Tratamiento utilizado	74

1. INTRODUCCION

En la zona sur la tasa de crecimiento de las praderas es marcadamente estacional, ofreciendo sus mayores producciones en primavera y otoño, y presentando severas bajas en invierno y verano. La pradera también se caracteriza por manifestar una gran variación en su valor nutritivo a través del año, por lo tanto es importante conocer su composición química para poder balancear de mejor manera las raciones administradas al ganado.

El congelado de la muestra es fundamental para su conservación, e idealmente debe realizarse en forma rápida para evitar posibles daños a nivel de la célula vegetal. Esta situación es relevante, especialmente si se tiene en cuenta que en la mayoría de los laboratorios comerciales las muestras que ingresan deben conservarse por un cierto período de tiempo, dada la imposibilidad de analizarlas inmediatamente.

El secado de muestras de forraje es importante para poder desarrollar los análisis químicos de laboratorio tendientes a determinar su composición nutricional. El procedimiento analítico de rutina consiste en secar las muestras a 60°C por 48 horas en un horno de convección de aire forzado. De este modo, se logra detener la acción de los microorganismos y la actividad enzimática, y por lo tanto se preserva la muestra por un mayor tiempo.

Para la elección de un método de secado es fundamental tener en consideración el tipo de muestra utilizada, para evitar temperaturas demasiado altas o tiempos muy prolongados que puedan afectar su composición química.

Dada la importancia que la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) ha cobrado en los últimos años, es relevante poder contar con una metodología que permita comparar visualmente los métodos de congelado y secado a través de los espectros que ellos generan.

Considerando los antecedentes previamente señalados, se plantea la siguiente hipótesis:

- Existen diferencias en la composición nutricional y en los espectros de muestras de forraje al someterlas a distintos métodos de congelado y secado.

El presente estudio se plantea con los siguientes objetivos:

- Determinar si existen diferencias entre los tratamientos que involucran la combinación de un método de congelado con uno de secado.
- Analizar el efecto del método de congelado (congelador a -20°C o nitrógeno líquido) sobre la composición química de forrajes frescos.
- Evaluar el efecto del método de secado (liofilizador u horno) sobre la composición química de forrajes frescos.
- Estudiar la interacción entre el método de secado y de congelado.
- Comparar visualmente las características espectrales, de muestras congeladas y secadas, de acuerdo a los métodos mencionados anteriormente.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Valor nutritivo de la pradera.

El valor nutritivo de una pradera está dado por su composición botánica y por el estado fenológico en que ella se encuentre (CUEVAS *et al.*, 1982 y ALOMAR, 1996).

RUIZ (1996), señala que el estado fenológico al momento del corte, las especies o variedades que constituyen la pradera, la fertilización y la época del año influyen sobre el valor nutricional de las praderas. A su vez, la época del año determina la composición botánica, la relación tallo/hoja y la humedad del suelo.

CUEVAS *et al.* (1982), indican que las praderas de la zona sur presentan una gran variabilidad y dinamismo a lo largo del año, manifestando cambios importantes en su composición nutricional. Es así como en primavera tienden a ser de alta calidad, con un elevado contenido de proteína y un bajo nivel de fibra, y en verano la calidad se deteriora aumentando la fibra y disminuyendo el contenido de proteína.

Según RUIZ (1996), al avanzar la madurez del forraje disminuye el consumo y digestibilidad de la materia seca como también el contenido de energía, proteína y minerales. Sin embargo, aumenta el porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina, lo cual deja de manifiesto que disminuye el valor nutritivo de éste. Una buena pradera se caracteriza por presentar una gran diversidad de

especies con un alto valor nutritivo. El estado de desarrollo o madurez del forraje determina dicho valor nutritivo.

CUEVAS et al. (1982) y RIVEROS (1989) determinaron que las diferentes especies forrajeras de praderas permanentes presentan variaciones similares en el contenido de proteína a través del año. También observaron que el contenido de proteína se incrementa desde marzo hasta agosto, presentando los mayores valores proteicos en la época invernal. Posteriormente, el contenido proteico declina en forma paulatina hasta obtener los valores más bajos en enero y febrero. Por su parte Teillery (1974), citado por BECERRA (1990), observó que en los meses de primavera, con el comienzo del desarrollo de la pradera, se registran los más altos porcentajes de proteína, alcanzándose a mediados de noviembre los mayores valores promedios.

ALOMAR (1996), señala que en las especies forrajeras los incrementos de rendimiento de materia seca, con el avance del estado de desarrollo, son acompañados por una disminución en el contenido de proteína, de energía metabolizable y digestibilidad, y un incremento en la fibra detergente neutro.

La experiencia realizada por CUEVAS et al. (1982), sobre una pradera permanente de la provincia de Valdivia, determinó que las variaciones en el contenido de pared celular a lo largo del año fueron similares para las distintas especies presentes en ella. El menor contenido de pared celular se obtuvo a fines de invierno, incrementando su valor con el avance de la primavera, hasta alcanzar su máximo en verano. Esto concuerda con lo observado por RIVEROS (1989), donde los valores más altos de FDN se observaron en verano y otoño, y los más bajos en primavera.

SANCHEZ (1984) y ALOMAR (1996), indican que durante el proceso de maduración de la planta ocurren cambios dinámicos donde los carbohidratos

solubles se transforman en estructurales. La composición de la pared celular, determinada por el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina, condiciona la disponibilidad de energía, ya que a medida que la planta madura se produce una dilución en la energía aprovechable (el contenido de energía metabolizable se correlaciona negativamente con la FDN).

RIVEROS (1989), registró cambios decrecientes en la digestibilidad a medida que las plantas maduran. Esto está estrechamente relacionado con el aumento del contenido de celulosa, dejando de manifiesto que la época más crítica, con la menor digestibilidad, es el período estival. Del mismo modo, Langer (1981), citado por BECERRA (1990), trabajó con ballica perenne, determinando que la máxima digestibilidad se produce a principios de primavera, para luego decaer gradualmente hasta alcanzar su nivel más bajo en el mes de enero, coincidiendo con el máximo desarrollo de la fibra. Luego, a medida que se deprime el nivel de fibra, nuevamente aumenta la digestibilidad.

2.2 Determinación analítica del contenido de nutrientes.

En el año 1859, en la Estación Experimental de Weende, en Alemania, se creó un esquema para el análisis de la composición de los alimentos. El esquema de Weende para el Análisis Proximal es un conjunto de métodos analíticos destinados a la descripción rutinaria de alimentos. Las diferentes fracciones que se obtienen en dicho análisis incluyen materia seca, proteína cruda, extracto etéreo, cenizas totales, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno (TYLER, 1964; BATEMAN, 1970; CHURCH y POND, 1977; BONDI, 1988 y POND *et al.*, 1995). El sistema Weende está diseñado para simular el proceso digestivo. Una digestión ácida es seguida por una digestión alcalina (BATEMAN, 1970).

Una característica relativamente común a los métodos químicos es que frecuentemente se trata de una degradación intensa de los alimentos con reactivos tales como ácidos o bases concentrados, extracción con disolventes concentrados u otros tratamientos (CHURCH y POND, 1977).

2.2.1 Variables nutricionales. En las últimas décadas se ha producido un rápido progreso en las ciencias de la nutrición, debido a los grandes esfuerzos en investigación realizados para ampliar dicha área de estudio. La expansión de los conocimientos y un adecuado entendimiento de las necesidades de nutrición y del metabolismo de los nutrientes son en parte posibles, debido a los métodos de laboratorio que evalúan cuantitativamente el contenido de nutrientes de los alimentos (POND et al., 1995).

2.2.1.1 Materia seca. CHURCH y POND (1977) y POND et al. (1995), afirman que el análisis de materia seca es el más realizado en los laboratorios de nutrición, debido a que los distintos alimentos pueden poseer un contenido de agua bastante variable, el cual es necesario conocer para poder comparar los datos analíticos de alimentos diferentes.

El método más corriente para determinar la materia seca es el de la eliminación del agua libre por medio de calor, seguida por la determinación del peso del residuo. Normalmente la muestra es colocada en un horno a 100-105°C por tiempos que no sean muy prolongados (BATEMAN, 1970).

2.2.1.2 Cenizas totales. El contenido de ceniza de una muestra se determina por ignición a 500-600°C. A esta temperatura desaparecen los compuestos orgánicos, quedando únicamente los inorgánicos capaces de resistir tan altas temperaturas. Nutricionalmente el valor de las cenizas tiene poca importancia, aunque valores excesivamente altos pueden indicar una contaminación con

tierra o dilución de los alimentos con sustancias tales como sal o piedra caliza (CHURCH y POND, 1977; BONDI, 1988 y POND et al., 1995).

2.2.1.3 Proteína cruda. Según BATEMAN (1970); CHURCH y POND (1977) y BONDI (1988), la proteína cruda se determina a partir del contenido de nitrógeno total de la muestra. Las proteínas contienen aproximadamente un 16% de nitrógeno, por lo tanto el contenido de proteína cruda se calcula multiplicando la cifra de nitrógeno por 6,25. Para determinar la proteína cruda se utiliza el método "Kjeldahl". El material que va a ser analizado es digerido primeramente con H_2SO_4 concentrado, que transforma el nitrógeno en NH_4SO_4 . Posteriormente se enfría esta mezcla, se diluye con agua y se neutraliza con NaOH, que pone el nitrógeno en forma de amonio ionizado, luego se destila la muestra y el destilado se titula con ácido.

El análisis de la proteína cruda no establece distinciones entre diferentes formas de nitrógeno. Es por ello que desde un punto de vista nutricional, los datos obtenidos son aplicables a los rumiantes que son capaces de utilizar eficientemente casi todas las formas de nitrógeno. Sin embargo, este análisis es de poca importancia para animales monogástricos tales como cerdos y aves, que no utilizan eficazmente compuestos de nitrógeno no proteico, como por ejemplo amidas, sales de amonio y urea (POND et al., 1995).

2.2.1.4 Proteína soluble. Según LICITRA et al. (1996), la proteína soluble se define como la proteína verdadera que es soluble en un tampón al pH ruminal. Esta definición difiere de otras en donde los componentes del nitrógeno no proteico están excluidos desde la fracción. El nitrógeno insoluble total, en combinación con una medida de nitrógeno no proteico, permite estimar la proteína soluble por diferencia. Es así como la proteína cruda soluble es un concepto simplificado que envuelve la mayor parte del nitrógeno soluble que se

degrada rápidamente en el rumen y por lo tanto reduce la proteína que pasa por el tracto digestivo.

2.2.1.5 Fibra cruda. BONDI (1988), explica que en el método de Weende, los carbohidratos se dividen en dos fracciones: la fibra cruda, la cual es escasamente soluble, y los extractos libres de nitrógeno, que se caracterizan por ser solubles.

El método de laboratorio para determinar la fibra cruda es tedioso y poco repetible. Se determina a partir de una muestra sometida a extracción con éter, se hierve en ácido diluido, después en una base diluida, se filtra y el residuo insoluble se deseca y se quema en la mufla. La diferencia de peso antes y después de quemar es la fracción correspondiente a la fibra cruda. La fibra cruda representa primordialmente a los carbohidratos estructurales de las plantas, tales como celulosa y hemicelulosa, aunque también contiene algo de lignina (altamente indigestible). Su valor para animales monogástricos es muy variable y escaso, aunque éste tampoco es constante para los rumiantes. Los rumiantes en general aprovechan mejor los alimentos fibrosos que los monogástricos (POND et al., 1995).

2.2.1.6 Fibra detergente neutro. VAN SOEST et al. (1991) y VAN SOEST (1994), indican que la fibra detergente neutro contiene los principales componentes de la pared celular como son celulosa, hemicelulosa y lignina. Sin embargo, puede también contener componentes secundarios de la pared celular tales como fracciones de proteína, nitrógeno, minerales y cutina. La fibra detergente neutro es solo parcialmente digestible por algunas especies, pero puede ser usada por los rumiantes, quienes dependen de la digestión microbiana para la utilización de los componentes más fibrosos de las plantas.

Para la determinación de la fibra detergente neutro, las muestras se hierven por 1 hora en una solución que contiene lauril sulfato de sodio. Este detergente extrae lípidos, azúcares, ácidos orgánicos y otros materiales solubles en agua tales como pectinas, nitrógeno no proteico, proteína soluble y fracciones de silica y taninos. El material no soluble corresponde a la fibra detergente neutro (GOERING y VAN SOEST, 1972; VAN SOEST *et al.*, 1991 y VAN SOEST, 1994).

2.2.1.7 Nitrógeno insoluble en la fibra detergente neutro. Según LICITRA *et al.* (1996), el nitrógeno asociado con la fibra detergente neutro corresponde normalmente a bandas de proteínas de la pared celular. La solución de proteína insoluble en detergente neutro, pero soluble en detergente ácido, es digestible pero poco degradable. Generalmente la proteína asociada a la pared celular está extensamente ligada a los carbohidratos hemicelulósicos (glucoproteínas).

2.2.1.8 Fibra detergente ácido. La fibra detergente ácido se determina hirviendo las muestras por una hora en una solución de bromuro trimetilamonio en H_2SO_4 . El procedimiento de fibra detergente ácido proporciona un método rápido para determinación de lignocelulosa en los alimentos. Los componentes solubles en detergente ácido son las proteínas de la pared celular hemicelulósica. El residuo insoluble corresponde a celulosa, lignina, nitrógeno lignificado (nitrógeno indigestible), cutina, sílica, y algunas pectinas (GOERING y VAN SOEST, 1972; VAN SOEST *et al.*, 1991 y VAN SOEST, 1994).

2.3 Procesamiento de muestras.

Según CHURCH y POND (1977), el adecuado procesamiento de una muestra vegetal a nivel de laboratorio debe seguir una serie de pasos y procedimientos, los cuales son determinantes para obtener un adecuado resultado analítico.

2.3.1 Congelamiento. Según DESROSIER y DESROSIER (1977), en condiciones normales la temperatura del agua debe descender bajo 0°C antes de que se formen cristales de hielo. Los cristales de hielo grandes se producen cuando la formación es lenta, por el contrario cuando el agua se congela rápidamente se producen cristales de hielo de textura fina. Cuando un cristal de textura fina es parcialmente derretido y luego recongelado, más aún, si el proceso se repite varias veces, el cristal de hielo cambia su forma desde pequeño a grande. Generalmente cuando el cristal de hielo crece perjudica la calidad del alimento.

Para asegurar la masa coloidal protoplasmática original, la tasa de congelamiento debe ser tal que permita la formación uniforme de cristales de hielo por todos los tejidos. Si el producto se congela lentamente, permitiendo que los cristales crezcan, al descongelarse no se logra volver al estado coloidal original. Lo contrario ocurre cuando el congelamiento es rápido y seguido de un descongelamiento inmediato (DESROSIER y DESROSIER, 1977).

Si los tejidos de las plantas son congelados a temperaturas inferiores a -7°C el crecimiento microbial se detiene. Sin embargo, algunas reacciones bioquímicas pueden continuar a temperaturas por debajo de -18°C. Algunos investigadores han demostrado que el congelamiento de material vegetal se asocia con precipitación de proteínas. Trastornos en las membranas celulares, causados por la formación de cristales de hielo y recristalización de hielo durante el congelamiento, producen que las enzimas de organelos como lisosomas y mitocondrias se liberen al interior de la célula, destruyendo sus componentes. Al parecer, la acumulación de fibra en las muestras congeladas es debida en mayor proporción al descongelamiento que al congelamiento del material (O'NEIL y ALLEN, 1993).

2.3.2 Secado. Según POND *et al.* (1995), la determinación de la materia seca es el análisis más frecuente en los laboratorios de nutrición animal.

Durante el secado de forraje fresco ocurren ciertos procesos tales como pérdida de agua, respiración, pérdidas de sustancias orgánicas volátiles y descomposición de proteínas. La pérdida de agua es necesaria, sin embargo los otros procesos no son deseables y deben ser llevados al mínimo (DEINUM y MAASSEN, 1994).

El propósito del secado es detener la respiración de las plantas y la actividad enzimática. Posterior a la recolección de muestras, y también durante el secado, la respiración continúa. Esta respiración de los tejidos de las plantas está determinada por el consumo de oxígeno, azúcares y otras sustancias, generándose dióxido de carbono, agua y calor. La respiración está relacionada con la interacción entre temperatura y humedad contenida en la muestra (O'NEIL y ALLEN, 1993 y DEINUM y MAASSEN, 1994).

La actividad enzimática de las plantas eventualmente se detiene cuando el contenido de humedad de los tejidos es reducido durante el secado. La respiración se detiene cuando el contenido de humedad varía entre un 60 y 80% de materia seca. Como resultado del consumo de azúcares solubles y otros substratos por la respiración de las plantas, los componentes no respirables de las plantas, como fibra y cenizas, se concentran (O'NEIL y ALLEN, 1993 y DEINUM y MAASSEN, 1994).

Los diferentes métodos de secado pueden provocar pérdidas de compuestos volátiles. La mayoría de los tejidos vegetales frescos poseen dichos compuestos volátiles, aunque en muchos casos su cantidad es lo suficientemente baja como para despreciarlos. Sin embargo, ciertos vegetales contienen grandes cantidades de algunos de estos compuestos, por ejemplo

aceites esenciales, terpenos y otros, que pueden perderse durante la desecación y generar así resultados erróneos con los métodos corrientes. Los ensilados y otros productos fermentados pueden contener grandes cantidades de compuestos que se evaporan con facilidad, tales como ácidos grasos volátiles (acético, propiónico, butírico) y amoníaco. Además, a temperaturas superiores a 70°C muchas proteínas se insolubilizan y algunos azúcares pueden llegar a descomponerse (CHURCH y POND, 1977 y DEINUM y MAASSEN, 1994).

Según BATEMAN (1970), las muestras deben ser secadas a temperaturas que aseguren una deshidratación rápida, para prevenir las pérdidas por acción enzimática y respiración celular. La temperatura, sin embargo, no debe sobrepasar los 100°C puesto que la mayoría de los materiales biológicos contienen compuestos que se volatilizan sobre dicho valor.

El horno de secado ideal tiene una temperatura de admisión de 100°C, circulación eficiente, y capacidad para mantener una temperatura uniforme de 60°C, secando las muestras en 10 horas. Por otro lado, 10 horas es un tiempo prolongado que produce pérdidas enzimáticas, pero si el secado se hace más rápido se pierden materiales volátiles. Para evitar las pérdidas de sustancias volátiles durante la deshidratación de los alimentos, el contenido de humedad debería determinarse por desecación en estufa a 70°C, liofilización o destilación con tolueno (BONDI, 1988 y POND *et al.*, 1995).

Los métodos de secado pueden provocar descomposición de proteínas. Existen dos formas de condensación proteica producidas por el calor durante el secado. La primera es la reacción de Maillard donde se produce condensación de azúcares y aminoácidos, a altas temperaturas de secado, especialmente en productos húmedos. Esta reacción provoca una reducción de los contenidos de

azúcar y proteína verdadera, a la vez que incrementa los valores de pared celular. La tasa de formación de productos de Maillard declina con un alto contenido de materia seca, es por ello que la tasa de secado es importante para la cantidad total de productos formados durante el proceso de secado. La segunda forma de descomposición proteica es menos grave y consiste en desnaturalización de proteínas que son insolubles en detergente neutro, pero digestibles. Esta formación también es estimulada por calor excesivo (DEINUM y MAASSEN, 1994).

Según KING (1971); VAN ARSDEL (1973); BRAVERMAN (1980) y DEMAN (1980), la reacción de Maillard o condensación de los azúcares con los aminoácidos y proteínas, es un mecanismo que interviene en el pardeamiento no enzimático de los alimentos. Es una reacción deteriorativa que involucra el grupo carbonil de un azúcar reductor y el grupo amino de un aminoácido, péptido o proteína, y termina con la formación de polímeros nitrogenados pardos o melanoidina. La condensación de la melanoidina o reacción de Maillard es un pardeamiento de los alimentos que provoca características perjudiciales tales como deterioro del aroma, cambio en el color y sabor, además de pérdidas en el valor nutritivo del alimento. La reacción de Maillard tiende a ocurrir más rápidamente con un contenido intermedio de agua en el alimento, y por lo tanto la extensión con que esta reacción ocurre es una función variable de las condiciones de secado.

La velocidad y patrón de la reacción de Maillard está influenciada por la naturaleza del aminoácido, péptido o proteína, y por el tipo de carbohidrato. Esto significa que cada alimento puede mostrar un patrón de pardeamiento diferente. Generalmente la lisina es el aminoácido más reactivo porque posee un grupo amino libre. La lisina es un aminoácido esencial limitante en muchas proteínas de diferentes alimentos, esta destrucción es de vital importancia y puede resultar en una reducción sustancial del valor nutritivo de la proteína

total. Alimentos ricos en azúcares reductores son muy reactivos, y esto explica por qué la lisina de la leche es destruida más fácilmente, si se le compara con otros alimentos. Otros factores que influyen en la reacción de pardeamiento son temperatura, pH, nivel de humedad, oxígeno, metales, fosfatos, dióxido de azufre y otros agentes inhibidores (DEMAN, 1980).

Según DEINUM y MAASSEN (1994) y ALOMAR *et al.* (1999), el procedimiento frecuentemente recomendado de preparación de muestras para análisis químico es el secado a 65 -70°C en horno de convección forzada. En el caso de ensilajes, el secado al calor puede provocar pérdidas de sustancias volátiles, como ácidos grasos de cadena corta y alcoholes.

DEINUM y MAASSEN (1994) afirman que temperaturas elevadas pueden provocar pérdidas de carbohidratos solubles y formación de complejos carbohidrato-proteína indigestibles (productos de Maillard), lo que resulta en un incremento de paredes celulares y reducción de la digestibilidad. Sin embargo, a temperaturas más bajas, que fluctúen entre 65 - 70°C, se producen cambios mínimos.

El secado en horno a 30°C provoca pérdidas de carbohidratos solubles en agua, producto de la respiración. Estas pérdidas resultan en un elevado contenido de nitrógeno, cenizas y pared celular, y en una reducción de la digestibilidad *in vitro*. El secado a 30°C también produce descomposición de proteínas (DEINUM y MAASSEN, 1994).

Según DEINUM y MAASSEN (1994), el secado en horno a 50°C produce pérdidas menos severas que a 30°C, posiblemente debido al secado más rápido. El secado a 70°C da resultados similares a los obtenidos a 50°C, con algunas pérdidas de carbohidratos solubles en agua y un incremento adicional de nitrógeno insoluble en detergente neutro. Sin embargo, a 70°C la

digestibilidad de la pared celular es similar a la obtenida con liofilización. El secado a 100°C causa algunas pérdidas de azúcares e incrementa enormemente el nitrógeno insoluble en detergente neutro, además de reducir la digestibilidad de la pared celular y la digestibilidad *in vitro*.

La liofilización es un método de secado en frío, cuyo fundamento consiste en someter a presión reducida una solución congelada, con lo que el hielo sublima sin pasar por la fase líquida, es decir es una transformación directa de hielo en vapor, permitiendo un producto deshidratado de alta calidad. La gran ventaja que presenta este procedimiento es la de cortar el desarrollo microbiano, ya que el producto por deshidratar viene previamente congelado. Por otro lado, se evitan las alteraciones debido a temperaturas excesivas. También se reducen las pérdidas de compuestos volátiles, los cuales además son absorbidos por efecto de la consistencia esponjosa que adquiere el cuerpo en la desecación (PISTONO, 1955 y GREAVES, 1963).

2.4 Espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS).

NIRS es un método para analizar la calidad de alimentos intactos y productos agrícolas por la luz que ellos reflejan. Esta técnica permite predecir la composición nutricional de una muestra en base a la relación matemática, previamente establecida a través de un computador, entre las características de reflexión o transmisión de la luz infrarroja, y él o los parámetros que interesa predecir (Davies y Grant, 1987 citados por BEYER, 1997).

MURRAY (1993) y SHENK y WESTERHAUS (1994), señalan que la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano es una técnica que se ha desarrollado, a nivel mundial, en los últimos 30 años y se caracteriza por ser de bajo costo, rápida, precisa, segura desde el punto de vista ambiental y no destructiva, puesto que la muestra permanece intacta una vez analizada.

2.4.1 Bases del método. Cada molécula orgánica tiene un espectro propio y único, similar a una huella digital. El principio fundamental de esta tecnología es el uso de curvas características (espectros) de los materiales analizados, los cuales muestran picos situados en longitudes de onda correspondientes a bandas de absorción originadas a partir de diferentes componentes orgánicos presentes en las muestras. NIRS es una técnica de reflectancia difusa, que permite determinar la composición de los forrajes a través de mediciones de cambios espectrales causados por movimientos de distensión, rotación y vibratorios de los enlaces de hidrógeno presentes en los constituyentes moleculares. El espectro de una muestra obtenido con radiación infrarroja cercana es el resultado de la absorción de energía (luz) por parte de moléculas orgánicas, especialmente por las que tienen grandes cantidades de uniones del tipo C-H, N-H y O-H (Reeves, 1988; Brown *et al.*, 1990 y Appel, 1996, citados por SCHNEEBERGER, 1999).

MURRAY (1993), señala que al incidir la luz (L_i) sobre una muestra, una parte de los fotones son transmitidos (L_t) a través de la muestra, y otros fotones son reflejados (L_r) y/o absorbidos (L_a) por ciertos enlaces covalentes, que actúan como resortes oscilantes al acoplarse con la frecuencia (cm^{-1}) o longitud de onda (nm) exacta de la radiación. Por lo tanto, es posible describir la absorción por parte de una muestra a través del registro de la luz que es transmitida o reflejada en ella, es decir, $L_i = L_a + L_t + L_r$. Los equipos que trabajan en el modo de transmisión miden L_i , L_r y L_t , calculando L_a por diferencia, mientras que aquellos que lo hacen en reflexión utilizan una muestra lo suficientemente gruesa como para que la luz no la atraviese completamente, siendo L_t igual a cero, y calculando L_a por diferencia.

Las bandas de absorción en la región infrarrojo cercano del espectro electromagnético (800-2.500 nm), están relacionadas a las de la región infrarroja (2.500-25.000 nm), donde se producen las bandas de absorción

fundamentales por la vibración de los átomos en las moléculas constituyentes. Las bandas de absorción en la región del infrarrojo cercano corresponden a "ecos" o "rebotes" de esas absorciones fundamentales, consistentes en sobretonos armónicos de las bandas fundamentales de absorción y sus combinaciones, aproximadamente a un medio o un tercio de la longitud de onda en que ellas ocurren (COLEMAN y MURRAY, 1993).

2.4.2 Instrumentación NIRS. La instrumentación necesaria para análisis NIRS, requiere como mínimo de un instrumento espectroscópico que irradie la muestra, detecte la luz reflejada en ella y luego amplifique y transforme dicha señal electromagnética en señal digital; un computador que capte dicha señal; y programas, que con ayuda del computador, permitan recoger, almacenar y procesar la información espectral y de referencia (Clark *et al.*, 1991 y Goodchild y Treacher, 1993 citados por BEYER, 1997).

Según Norris (1989) y Clark *et al.* (1991), citados por ALOMAR y FUCHSLOCHER (1998), existen tres tipos de instrumentos: de filtros fijos o de interferencia, de filtros inclinables y monocromadores de barrido. Los instrumentos de filtros fijos, son filtros que al ser iluminados por una fuente emisora, solo dejan pasar una longitud de onda. Los equipos de filtros fijos, útiles para análisis de rutina de sustancias poco complejas, poseen entre 6 y 20 filtros montados en un dispositivo que permite cambiar la posición y generar una longitud de onda específica. Los instrumentos de filtros inclinables, poseen entre 3 y 7 filtros, montados en un eje que al girar provoca una inclinación del filtro, cambiando el ángulo de la luz incidente sobre él. Con este instrumento se pueden determinar muchas longitudes de onda y puede generar un rango de barrido continuo entre 1380 y 2380 nm. Los monocromadores de barrido son los equipos más versátiles y costosos, siendo la alternativa más apropiada para centros de investigación. Estos equipos, en lugar de filtros utilizan una especie de prisma, que provoca dispersión de la luz, lo que genera diferentes longitudes

de onda. Los modelos más sofisticados permiten irradiar las muestras en el rango de 400 a 2.500 nm, lo que comprende desde el espectro visible hasta el final del infrarrojo cercano.

2.4.3 Colección de los espectros. Existen dos formas comúnmente utilizadas para coleccionar los espectros o presentar las muestras al instrumento: las celdas circulares con ventana de cuarzo, que son apropiadas para muestras secas y relativamente homogéneas; y las cubetas rectangulares de mayor superficie para muestras frescas, generalmente más fibrosas y heterogéneas. Estas celdas o cubetas se insertan en un módulo específico que va adosado al instrumento, lo que permite irradiar la muestra dentro de la celda (MURRAY, 1993).

2.4.4 Tratamiento de los espectros. Los datos de reflectancia coleccionados por el equipo son digitalizados y almacenados como logaritmo de $1/R$ (absorbancia). Estos datos espectrales se pueden someter a transformaciones, lo que permite reducir el "ruido" producido por factores tales como el tamaño de partícula, y aislar la información espectral que se relaciona con los datos químicos. El tratamiento más común corresponde al cálculo de una primera o segunda diferenciación o pseudoderivada, lo que corresponde a una diferencia entre segmentos del espectro, que previamente se han suavizado o promediado. Este tratamiento permite reducir el efecto de las variaciones en el tamaño de partícula y además destaca ciertas características del espectro, es decir, enfatiza los cambios locales. Otros tratamientos que permiten eliminar "ruido", a través de "suavización" de los datos son: transformaciones de Fourier, la corrección de variación normal (SNV), la corrección de dispersión multiplicativa (MSC) y Detrend. También se utiliza un tratamiento de suavización que contempla "SNV" y "Detrend" (Davies y Grant, 1987 y Murray, 1988 citados por BEYER, 1997).

2.4.5 Métodos de regresión. El análisis de regresión se utiliza para predecir una variable en base a otra(s). Entre las técnicas de regresión disponibles están la regresión paso a paso, la de componentes principales y la de los cuadrados mínimos parciales (SHENK y WESTERHAUS, 1994).

El método de regresión de componentes principales se basa en una reducción de gran cantidad de puntos de datos altamente correlacionados, a un pequeño grupo de variables “sintéticas” e independientes entre sí llamadas componentes principales. Dichos componentes principales son combinaciones lineales de las variables originales, que reciben un cierto puntaje de acuerdo a su influencia en la variabilidad espectral (INFRASOFT INTERNATIONAL, 1995).

3. MATERIAL Y METODO

3.1 Ubicación del estudio.

El estudio se realizó en el Laboratorio de Nutrición del Instituto de Producción Animal, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, ubicado en la ciudad de Valdivia. Dicho laboratorio aportó la infraestructura e instrumental para el almacenamiento, manejo y determinación de las fracciones analíticas de las muestras, como también el equipo NIRS para coleccionar los espectros de ellas.

3.2 Muestras de forrajes frescos.

Se utilizaron 20 muestras, de aproximadamente 2,1 kg cada una, constituidas por praderas o cultivos forrajeros, recolectadas entre octubre del año 2000 y marzo del año 2001, en la Décima Región de Chile (la descripción de las muestras se presenta en el Anexo 1). Ellas se tomaron a través de un muestreo dirigido, de modo de abarcar el mayor rango de heterogeneidad posible. Cada muestra recién cortada fue colocada en bolsa plástica, la cual fue sellada y posteriormente transportada al Laboratorio de Nutrición del Instituto de Producción Animal para su procesamiento y análisis.

3.3 Procesamiento de las muestras.

Cada una de las muestras fue picada con tijera hasta un tamaño de 1 cm y homogeneizada manualmente. Luego se procedió a dividir las muestras en catorce submuestras, de 150 g cada una, lo más similares posible. Los

tratamientos fueron siete, realizándose las determinaciones en duplicado, es por ello que las muestras se subdividieron en catorce partes. Cada una de estas submuestras fueron colocadas en bolsas plásticas, con un código de ingreso para el control interno del laboratorio y con un número para la identificación de la muestra en el ensayo, luego de lo cual se congelaron.

3.4 Congelamiento de las muestras.

Una parte de las submuestras se congelaron directamente en un congelador a -20°C . El resto fueron congeladas con nitrógeno líquido, y para ello se utilizó cada vez una fuente plástica en cuyo interior se colocaba una rejilla metálica que contenía cada submuestra, la cual recibía aproximadamente medio litro de nitrógeno líquido. Inmediatamente se les colocaba en una bolsa plástica (para posteriormente ser secada en horno) o en un frasco de vidrio (para posteriormente ser liofilizada). Una vez congeladas con el nitrógeno líquido, se les guardaba dentro del congelador a -20°C , permaneciendo en él hasta el momento de su secado.

3.5 Secado de las muestras.

Una vez sacadas las bolsas del congelador, éstas permanecieron extendidas durante una hora y media en un mesón, de tal modo de permitir su descongelamiento y que alcanzaran la temperatura ambiente. Algunas submuestras se secaron mediante liofilización, colocándose el frasco congelado directamente en el aparato liofilizador, mientras que el resto se secó en un horno de convección de aire forzado, a diferentes temperaturas y diversos tiempos (60°C por 48 h, 60°C por 30 h, 70°C por 24 h y 100°C por 13 h).

Una vez secas las submuestras y determinada su materia seca parcial, se juntaron de a dos (submuestra y su respectivo duplicado) y se colocaron en

un molino Willey con tamiz de 1mm, permitiendo el molido de éstas. Las submuestras molidas se pusieron en pequeñas bolsas plásticas con su respectiva identificación y fueron llevadas en un desecador a la sala de la instrumentación NIRS, donde se les tomó su espectro. Posteriormente fueron almacenadas en una bodega hasta el momento en que se les realizó los análisis químicos.

3.6 Identificación de los tratamientos.

Las muestras se trataron por siete diferentes métodos o tratamientos, representados por combinaciones de dos métodos de congelado y cinco metodologías de secado. De este modo los tratamientos fueron los siguientes:

- 1) Congelamiento con nitrógeno líquido y liofilización por 52 horas.
- 2) Congelamiento con nitrógeno líquido y horno a 60°C por 48 horas.
- 3) Congelamiento a -20°C y liofilización por 52 horas.
- 4) Congelamiento a -20°C y secado en horno a 60°C por 48 horas.
- 5) Congelamiento a -20°C y secado en horno a 60°C por 30 horas.
- 6) Congelamiento a -20°C y secado en horno a 70°C por 24 horas.
- 7) Congelamiento a -20°C y secado en horno a 100°C por 13 horas.

3.7 Colección de espectros.

Con una espátula plástica se mezcló cada submuestra. Posteriormente éstas se colocaron dentro de celdas circulares de aluminio de 35 mm de diámetro, con ventanas de cuarzo, las que fueron previamente limpiadas con pinceles y toallas de papel. Luego se cerró cada celda con un cartón circular y con un tapón plástico, y se apretó la muestra de modo de lograr una compactación lo más uniforme posible. Se utilizó un equipo monocromador de barrido NIRSystems^(MR) 6500, con detector de reflectancia y equipado con un

módulo de rotación de las muestras. Cada una de las celdas se colocó en el módulo del instrumento, donde se les tomó varias lecturas que generaron un espectro promedio, el cual se almacenó en un archivo computacional.

3.8 Determinación de la composición nutricional.

En el Cuadro 1 se presenta la metodología de análisis químico utilizada por el Laboratorio de Nutrición para cada una de las submuestras.

CUADRO 1 Metodología de análisis empleada por el Laboratorio de Nutrición.

Parámetro	Unidad	Método	Referencia
Materia seca (MS)	%	Horno de ventilación forzada a 60°C por 48 h y estufa a 105°C por 12 h	ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC) (1996)
Cenizas totales (CT)	% de MS	Calcinación en mufla a 550-600°C por 5 h	AOAC (1996)
Proteína cruda (PC)	% de MS	Micro Kjeldahl (nitrógeno * 6,25)	BATEMAN (1970)
Proteína soluble (PS)	% de PC	Estimación de nitrógeno en el residuo por Kjeldahl (fracción insoluble). PS se calcula por diferencia de la PC total	LICITRA <i>et al.</i> (1996)
Fibra cruda (FC)	% de MS	Digestión ácida y alcalina	AOAC (1996)
Fibra detergente neutro (FDN)	% de MS	Digestión con detergente neutro	VAN SOEST <i>et al.</i> (1991)
Nitrógeno insoluble en la fibra detergente neutro (FDNIN)	% del nitrógeno total	Digestión con detergente neutro. Determinar nitrógeno en el residuo por Kjeldahl. Expresar FDNIN como % de nitrógeno total	LICITRA <i>et al.</i> (1996)
Fibra detergente ácido (FDA)	% de MS	Digestión con detergente ácido	AOAC (1996)
Valor "D" (VD)	% de MOD en MS	Digestibilidad <i>in vitro</i> con licor ruminal (Tilley y Terry, 1963 modificado)	GOERING y VAN SOEST (1972)

3.9 Análisis de datos.

Una vez obtenidos los espectros de las muestras se procedió a realizar el análisis espectral a través del programa computacional NIRS 3.0 de Infrasoftware International.

Los datos químicos determinados en el laboratorio fueron sometidos a un análisis estadístico utilizando el programa computacional SAS System for Windows v6.12.

3.9.1 Análisis espectral. El análisis espectral de las muestras se realizó empleando el método de “componentes principales”, el cual se basa en una reducción de gran cantidad de puntos de datos altamente correlacionados, generándose un pequeño grupo de variables “sintéticas” e independientes entre sí, llamadas componentes principales. Estas variables sintéticas son combinaciones lineales de las variables originales que reciben un cierto puntaje de acuerdo a su influencia en la variabilidad espectral (SHENK y WESTERHAUS, 1994).

Se procedió a determinar los componentes principales de los siete tratamientos antes mencionados. Luego se estimó visualmente, según las distancias y las agrupaciones espectrales, si existen o no diferencias entre dichos tratamientos.

3.9.2 Análisis estadístico. Se analizaron estadísticamente los efectos de los siete diferentes tratamientos, para determinar si existen diferencias entre ellos. Para esto se realizó un análisis de varianza en un modelo de bloques completos al azar.

El criterio de bloqueo consistió en agrupar las 20 muestras de acuerdo al tipo de pradera y a su estado fenológico, de tal modo de controlar las diferencias entre tipos de forrajes frescos. En el Cuadro 2 se presenta la agrupación de las muestras para la formación de los bloques.

CUADRO 2 Criterio de bloqueo para las muestras.

Grupos	Bloque	Muestras	Total muestras
Gramíneas vegetativo	1	1,2,3,7	4
Gramíneas reproductivo	2	4,11,12,13	4
Gramíneas madurez intermedia	3	5,6,10	3
Alfalfa estado vegetativo	4	8,9	2
Alfalfa estado reproductivo	5	15,16	2
Trébol rosado y blanco	6	14,19	2
Pradera mixta crecimiento otoño	7	17,18,20	3
Total muestras			20

El modelo matemático utilizado es el siguiente:

$$X_{jk} = \mu + \alpha_j + \beta_k + \varepsilon_{jk} \quad (3.1)$$

Siendo X_{jk} el valor experimental para el j -ésimo tratamiento y el K -ésimo bloque.

μ : Media global de la población.

α_j : Efecto del j -ésimo tratamiento.

β_k : Efecto del K -ésimo bloque (pradera).

ε_{jk} : Efecto debido al error o azar.

En el caso de existir diferencias entre los tratamientos se efectuó una comparación múltiple de promedios, realizando una prueba de Tukey o diferencia honestamente significativa.

También se analizaron estadísticamente los efectos de las interacciones entre los factores congelamiento y tipo de secado. Para ello se trabajó con los primeros cuatro tratamientos, donde se evaluaron dos tipos de congelamiento (nitrógeno líquido y congelador) y dos tipos de secado (en horno a 60°C por 48 horas y liofilización). Se realizó un experimento factorial de tipo 2*2 ordenado en bloques aleatorios. El modelo matemático empleado es el siguiente:

$$X_{ijk} = \mu + C_i + S_j + (CS)_{ij} + \beta_k + \varepsilon_{ijk} \quad (3.2)$$

Siendo X_{ijk} el valor experimental para una muestra del nivel i del factor congelamiento (C) y nivel j del factor secado (S), en cada k -ésimo bloque (pradera).

μ : Media global de la población.

C_i : Efecto del congelamiento en el nivel i .

S_j : Efecto del secado en el nivel j .

CS_{ij} : Efecto de la interacción entre los dos factores.

β_k : Efecto del K -ésimo bloque (pradera).

ε_{ijk} : Efecto debido al error o azar.

4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos en el análisis químico de siete tratamientos que involucran formas diferentes de congelamiento y secado de muestras de forrajes frescos (los resultados completos de dichos análisis se presentan en el Anexo 2). También se incluyen los espectros de dichas muestras, a través de los componentes principales.

4.1 Valoración nutritiva de los forrajes frescos según el tratamiento.

En el Cuadro 3 se presenta un resumen de los promedios mínimos cuadrados obtenidos por tratamiento de cada una de las variables nutricionales analizadas estadísticamente.

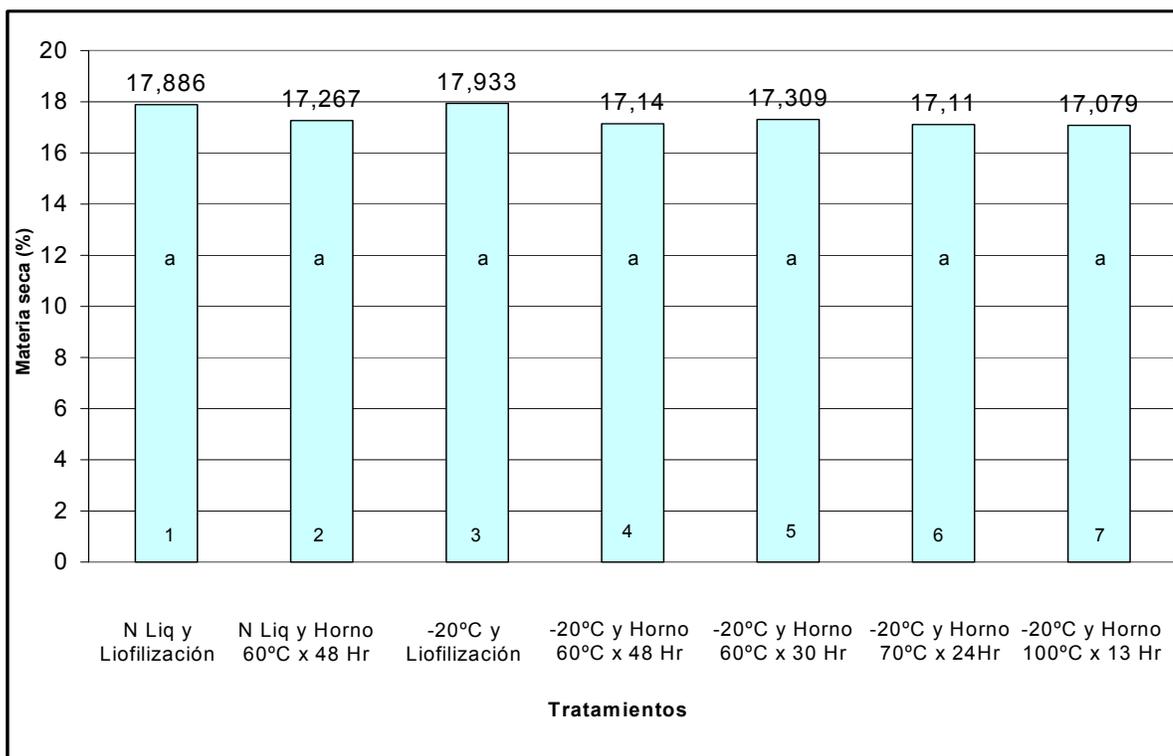
CUADRO 3 Promedios nutricionales estadísticos para cada tratamiento.

Fracción (%)	TRATAMIENTO							P*
	1	2	3	4	5	6	7	
MS	17,886	17,267	17,933	17,140	17,309	17,109	17,079	P>0,05
CT	8,845	8,827	8,962	8,801	8,798	8,820	8,738	P>0,05
PC	19,863	20,212	20,078	20,649	20,687	20,394	20,617	P>0,05
PS	9,706	7,216	10,496	7,517	7,470	7,000	6,343	P<0,01
FC	19,886	19,982	19,801	20,348	20,341	20,261	19,873	P>0,05
FDN	38,914	42,136	38,321	42,715	42,367	42,306	44,414	P<0,01
FDNIN	0,267	0,815	0,206	0,835	0,835	0,940	1,432	P<0,01
FDA	25,405	25,626	25,475	25,856	26,057	25,559	25,461	P>0,05
Valor D	74,762	73,408	74,801	73,252	72,800	73,030	73,004	P>0,05

* Probabilidad.

4.1.1 Materia seca. En el Cuadro 3 se observa que existe poca diferencia en cuanto a los valores obtenidos para la MS. Los tratamientos 1 y 3 presentan los valores más altos de MS, mientras que los cinco tratamientos restantes presentan valores menores muy similares entre ellos.

4.1.1.1 Análisis de varianza. El análisis de varianza completamente al azar con un diseño en bloques, demostró que no existe diferencia entre los tratamientos ($P = 0,8039$). Esta situación se visualiza en la Figura 1. Sin embargo, es importante la conveniencia de la formación de bloques, ya que sí hubo diferencia entre ellos.



Nota: letras iguales indican promedios estadísticamente iguales entre los tratamientos.

FIGURA 1 Comparación de promedios mínimos cuadrados de MS para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística.

4.1.1.2 Interacción. Para observar los efectos de la interacción entre el tipo de congelado y de secado, se trabajó solo con los cuatro primeros tratamientos, de manera de comparar dos tipos de congelamiento (nitrógeno líquido y congelador a -20°C) y dos tipos de secados (liofilización y secado en horno a 60°C por 48 h). El análisis de varianza de tipo factorial arrojó como resultado que no hay efecto debido al tipo de secado ($P=0,1805$) como tampoco debido al tipo de congelado ($P=0,9387$). Del mismo modo, no se observó un efecto debido a la interacción entre ambas variables ($P=0,8677$). En el Cuadro 4 se presentan los promedios mínimos cuadrados para las variables secado y congelado, junto a su significancia estadística.

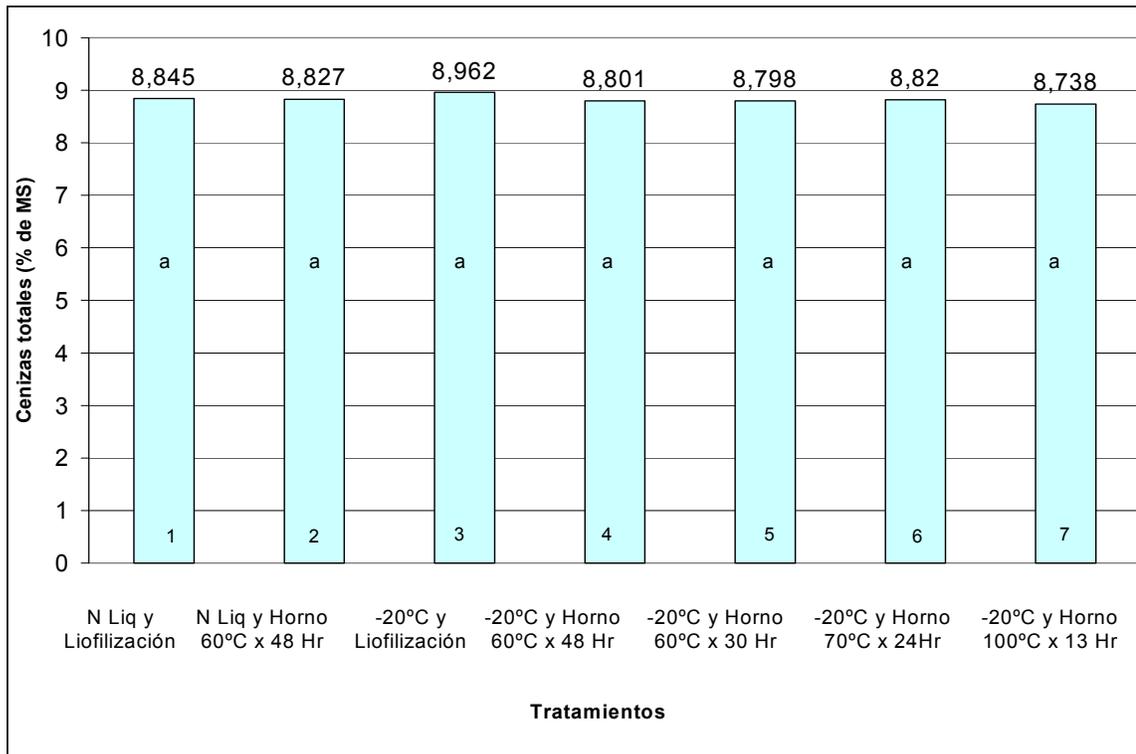
CUADRO 4 Valores promedios mínimos cuadrados de MS (%) para las variables secado y congelado.

	Nitrógeno líquido	Congelamiento a -20°C	Promedio secado
Liofilización	17,891 a	17,938 a	17,915 A
Horno a 60°C por 48 h	17,272 a	17,145 a	17,209 A
Promedio congelado	17,582 x	17,542 x	

Nota: letras iguales indican promedios estadísticamente iguales ($P>0,05$) entre los tratamientos (a,b) y métodos de secado (A,B) o congelado (x,y).

4.1.2 Cenizas totales. En el Cuadro 3 se puede apreciar que las CT son el componente nutricional menos afectado por el tipo de tratamiento empleado, ya que los valores obtenidos son muy similares entre los 7 tratamientos.

4.1.2.1 Análisis de varianza. El análisis de varianza demostró que no existe diferencia entre los tratamientos ($P = 0,9991$). En la Figura 2 se presentan los promedios mínimos cuadrados para las CT.



Nota: letras iguales indican promedios estadísticamente iguales entre los tratamientos.

FIGURA 2 Comparación de promedios mínimos cuadrados de CT para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística.

4.1.2.2 Interacción. El análisis de varianza en un diseño factorial determinó que no existen diferencias en los tratamientos de acuerdo al secado utilizado ($P=0,7506$), como tampoco debido al congelado empleado ($P=0,8727$). Del mismo modo, no se registro efecto debido a la interacción de las variables congelado-secado ($P=0,8008$). Los promedios mínimos cuadrados para las variables secado y congelado se presentan en el Cuadro 5.

CUADRO 5 Valores promedios mínimos cuadrados de CT (%) para las variables secado y congelado.

	Nitrógeno líquido	Congelamiento a -20°C	Promedio secado
Liofilización	8,856 a	8,973 a	8,917 A
Horno a 60°C por 48 h	8,838 a	8,812 a	8,825 A
Promedio congelado	8,847 x	8,893 x	

Nota: letras iguales indican promedios estadísticamente iguales ($P > 0,05$) entre los tratamientos (a,b) y métodos de secado (A,B) o congelado (x,y).

4.1.3 Proteína cruda. Según la información presentada en el Cuadro 3, los tratamientos 1 y 3 (que utilizan liofilización) presentan valores ligeramente inferiores a los cinco tratamientos restantes, sin embargo esta diferencia además de ser poco notorio, solo se presenta como una leve tendencia.

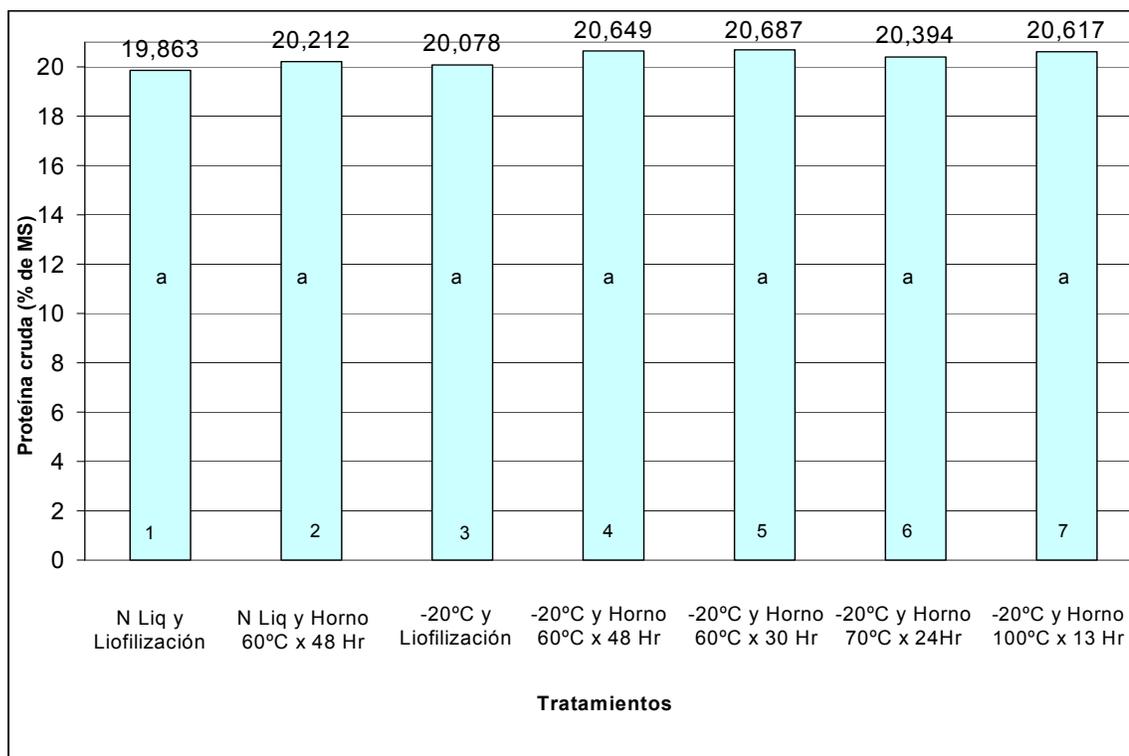
4.1.3.1 Análisis de varianza. El análisis de varianza arrojó como resultado que no existen diferencias entre los tratamientos en cuanto a la variable nutricional PC ($P = 0,8809$), lo cual se aprecia en la Figura 3.

Estudios realizados por DEINUM y MASSEN (1994), indican que con altas temperaturas de secado (mayores a 70°C) o por tiempos muy prolongados, algunos aminoácidos pueden dar origen a la formación de productos de Maillard (complejo proteína-carbohidrato) o a la denaturación de proteínas. Esto no necesariamente se asocia a una reducción del contenido de PC. Lo descrito concuerda con lo obtenido en el presente estudio, puesto que no se produjo una disminución en el contenido de PC debido al tratamiento empleado.

Contrario a lo anterior, STOCKEBRAND (2000) encontró diferencias en el contenido de PC de ensilajes, al aplicar sobre ellos dos tipos de secado

(liofilización y horno a 60°C). Esto se debe a que el contenido de PC puede disminuir como una respuesta a la pérdida de compuestos volátiles, tales como amonio o nitrógeno no proteico presentes en los ensilajes.

LOPEZ *et al.* (1995), en un ensayo donde utilizaron tanto forrajes frescos como ensilados, reportaron un incremento en el contenido de PC al aumentar la temperatura de secado.



Nota: letras iguales indican promedios estadísticamente iguales entre los tratamientos.

FIGURA 3 Comparación de promedios mínimos cuadrados de PC para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística.

4.1.3.2 Interacción. El análisis de varianza determinó que no existen diferencias en los tratamientos de acuerdo al secado utilizado ($P=0,3670$), como tampoco debido al congelado ($P=0,5221$). Del mismo modo, no hubo efectos debido a la

interacción de ambos ($P=0,8269$). En el Cuadro 6 se presentan los promedios mínimos cuadrados para las variables secado y congelado.

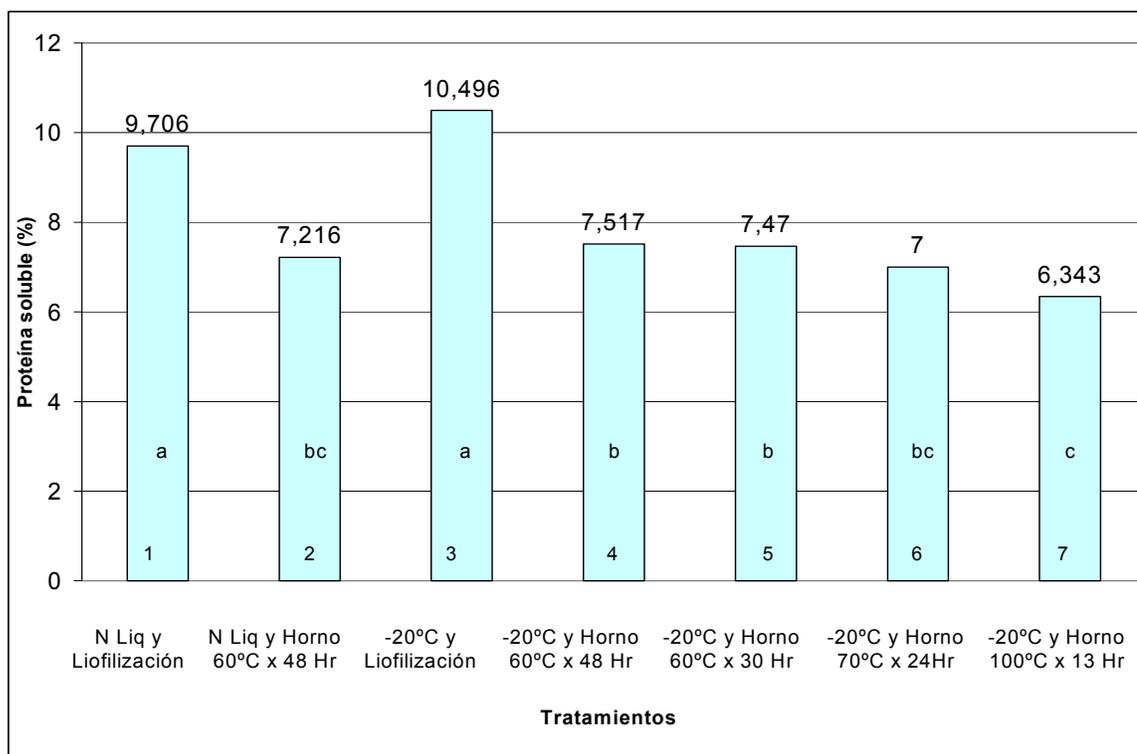
CUADRO 6 Valores promedios mínimos cuadrados de PC (%) para las variables secado y congelado.

	Nitrógeno líquido	Congelamiento a -20°C	Promedio secado
Liofilización	19,884 a	20,098 a	19,991 A
Horno a 60°C por 48 h	20,232 a	20,669 a	20,451 A
Promedio congelado	20,058 x	20,384 x	

Nota: letras iguales indican promedios estadísticamente iguales ($P>0,05$) entre los tratamientos (a,b) y métodos de secado (A,B) o congelado (x,y).

4.1.4 Proteína soluble. En el Cuadro 3 se puede observar una marcada diferencia entre los tratamientos para la variable nutricional PS. Los tratamientos 1 y 3 presentan los valores promedios más altos, mientras que el valor promedio más bajo ocurre en el tratamiento 7. Valores intermedios similares se presentan en los tratamientos 2, 4, 5 y 6.

4.1.4.1 Análisis de varianza. El análisis de varianza arrojó como resultado que existe diferencia entre los tratamientos en cuanto a la variable nutricional PS ($P=0,0001$). Del mismo modo, se pudo apreciar la conveniencia de la formación de bloques, al existir diferencia entre ellos. Al realizar una comparación entre promedios se concluyó que estadísticamente los tratamiento 1 y 3 son iguales entre sí. Los tratamientos 4 y 5 son iguales entre ellos y también iguales a los tratamientos 2 y 6. El tratamiento 7 es igual a los tratamientos 2 y 6, no así a los tratamientos 4 y 5, lo cual se visualiza en la Figura 4.



Nota: letras distintas indican promedios estadísticamente diferentes ($P < 0,01$) entre los tratamientos.

FIGURA 4 Comparación de promedios mínimos cuadrados de PS para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística.

LOPEZ *et al.* (1995), concluyen que al aumentar la temperatura de secado, decrece la solubilidad del nitrógeno. Este mismo efecto se encontró en el desarrollo del presente estudio, ya que los valores más altos de PS fueron para los tratamientos con baja temperatura (liofilización). Del mismo modo, a medida que se incrementó la temperatura, disminuyó el porcentaje de PS, encontrándose los valores más bajos a los 100°C.

4.1.4.2 Interacción. El análisis de varianza determinó que existen diferencias en los tratamientos de acuerdo al secado utilizado ($P = 0,0001$), sin embargo no se encontraron diferencias debido al congelado ($P = 0,1016$). Al evaluar la

interacción entre ambos factores no se encontró efecto entre ellos ($P=0,4599$). En el Cuadro 7 se presentan los promedios mínimos cuadrados para la PS.

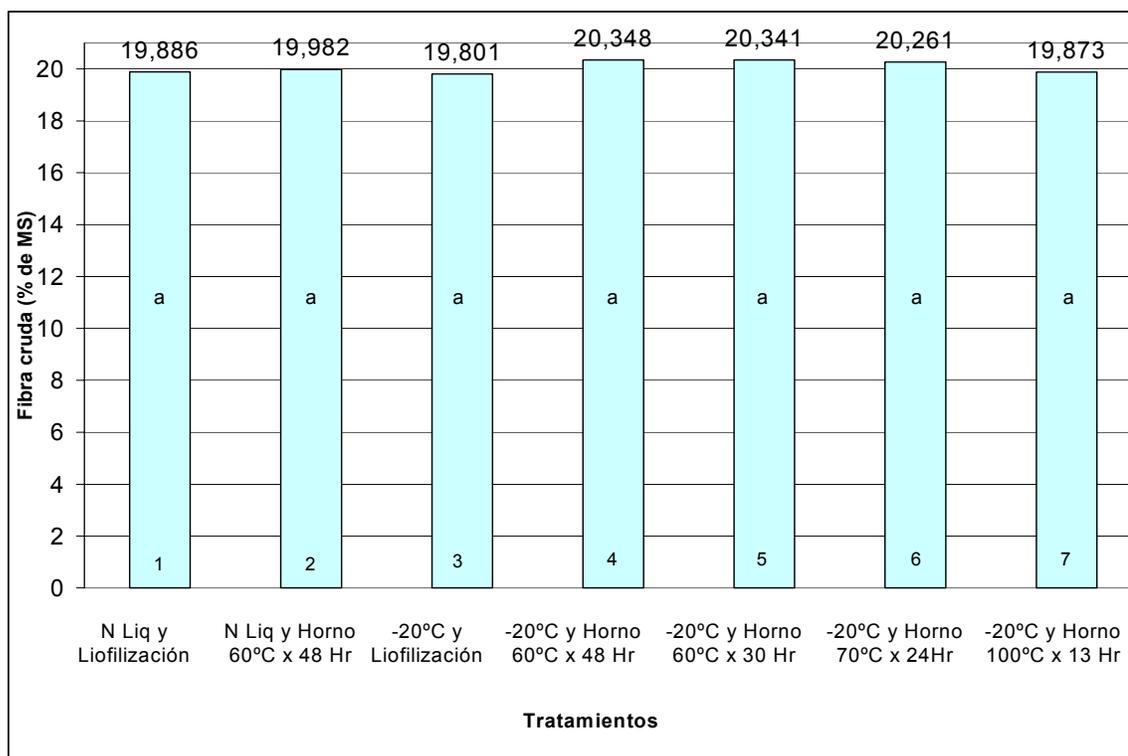
CUADRO 7 Valores promedios mínimos cuadrados de PS (%) para las variables secado y congelado.

	Nitrógeno líquido	Congelamiento a -20°C	Promedio secado
Liofilización	9,702 a	10,492 a	10,097 A
Horno a 60°C por 48 h	7,212 b	7,513 b	7,363 B
Promedio congelado	8,457 x	9,003 x	

Nota: letras distintas indican promedios estadísticamente diferentes ($P<0,01$) entre los tratamientos (a,b) y métodos de secado (A,B) o congelado (x,y).

4.1.5 Fibra cruda. Los valores para todos los tratamientos son muy similares entre sí, lo cual se visualiza en el Cuadro 3.

4.1.5.1 Análisis de varianza. El análisis de varianza arrojó como resultado que no existe diferencia entre los tratamientos en cuanto a FC ($P=0,8935$). En la Figura 5 se presentan los promedios mínimos cuadrados para cada uno de los tratamientos.



Nota: letras iguales indican promedios estadísticamente iguales entre los tratamientos.

FIGURA 5 Comparación de promedios mínimos cuadrados de FC para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística.

De la Figura 5 se desprende que no existe diferencia entre los siete tratamientos, sin embargo esto contrasta con lo encontrado por DEINUM y MASSEN (1994) quienes concluyeron que el secado con liofilización presenta un menor porcentaje de FC comparado con el secado en horno.

4.1.5.2 Interacción. El análisis de varianza determinó que no existen diferencias en los tratamientos de acuerdo al secado utilizado ($P=0,4106$), como tampoco debido al congelado ($P=0,7186$). Del mismo modo, no hubo efectos debido a la interacción de ambos ($P=0,5643$). En el Cuadro 8 se presentan los promedios mínimos cuadrados para las variables secado y congelado.

CUADRO 8 Valores promedios mínimos cuadrados de FC (%) para las variables secado y congelado.

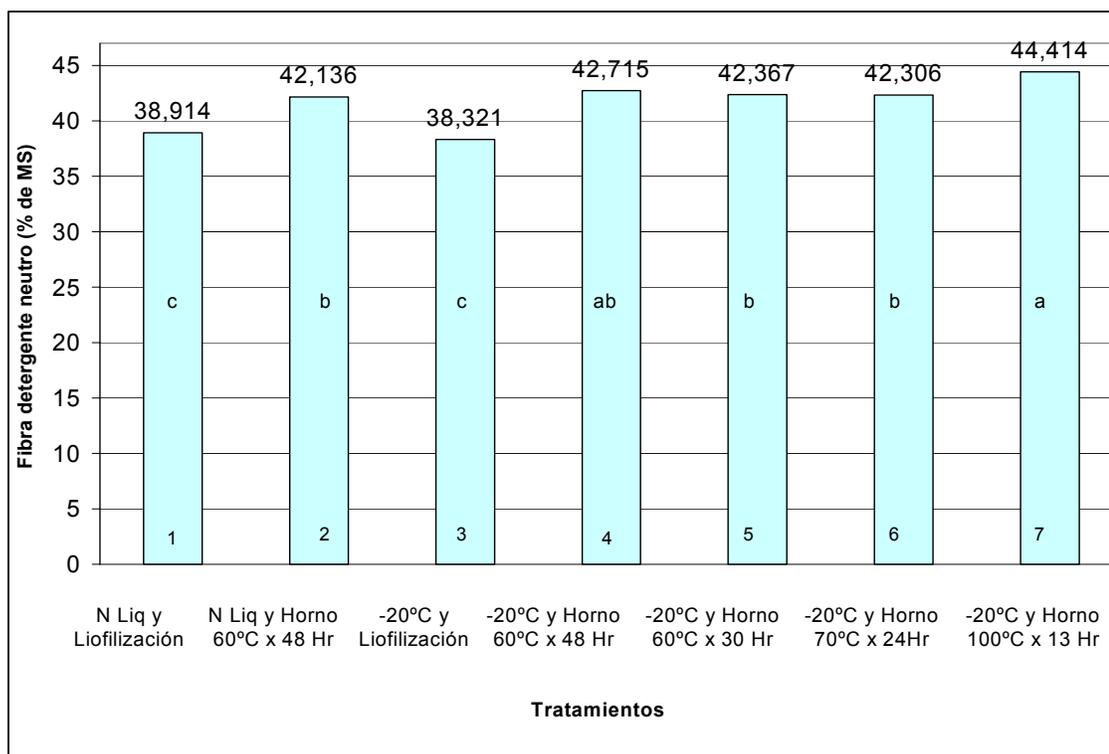
	Nitrógeno líquido	Congelamiento a -20°C	Promedio secado
Liofilización	19,859 a	19,775 a	19,817 A
Horno a 60°C por 48 h	19,956 a	20,321 a	20,139 A
Promedio congelado	19,908 x	20,048 x	

Nota: letras iguales indican promedios estadísticamente iguales ($P > 0,05$) entre los tratamientos (a,b) y métodos de secado (A,B) o congelado (x,y).

4.1.6 Fibra detergente neutro. En el Cuadro 3 podemos distinguir tres grupos en cuanto a la variable química FDN. El primer grupo corresponde a los tratamientos 1 y 3 (involucran liofilización), quienes presentan los valores más bajos de FDN. El segundo grupo está constituido por los tratamientos 2, 4, 5 y 6 (hornos con temperaturas de 60 y 70°C) quienes presentan valores intermedios de FDN. Por último tenemos el tratamiento 7 el cual se caracteriza por ser de alta temperatura (100°C) y poseer los valores más altos de FDN.

4.1.6.1 Análisis de varianza. El análisis de varianza determinó que existen diferencias entre los tratamientos en cuanto a la variable FDN ($P = 0,0001$). Al realizar una comparación entre promedios se concluyó que estadísticamente los tratamiento 1 y 3 son iguales entre sí. Los tratamientos 2, 5 y 6 son iguales entre ellos, pero también iguales estadísticamente al tratamiento 4. Del mismo modo, el tratamiento 4 es estadísticamente igual al tratamiento 7, hecho que se aprecia en la Figura 6.

Los resultados anteriores concuerdan con lo presentado por LOPEZ *et al.* (1995), quienes señalan que existe una tendencia a incrementar la concentración de FDN con el aumento de la temperatura de secado.



Nota: letras distintas indican promedios estadísticamente diferentes ($P < 0,01$) entre los tratamientos.

FIGURA 6 Comparación de promedios mínimos cuadrados de FDN para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística.

La Figura 6 permite concluir que a medida que aumenta la temperatura de secado, se incrementa el porcentaje de FDN. De este modo, con liofilización obtenemos los valores más bajos de FDN, los cuales se van incrementando hasta obtener valores mayores con el tratamiento que contempla horno a 100°C por 13 horas. También es posible observar una leve disminución de los valores de FDN a medida que disminuye el tiempo de secado en horno, sin embargo esto es solo una tendencia y no es estadísticamente significativo.

Lo anterior concuerda con lo señalado por ALOMAR *et al.* (1999), quienes afirman que al aumentar la temperatura o al prolongar los tiempos de

secado, algunos aminoácidos pueden dar origen a productos de Maillard (formación de complejo proteína-carbohidrato indigestible) o algunas proteínas pueden denaturarse y así reducir su solubilidad en detergente neutro, incrementando la FDN y eventualmente la fracción de FDA.

Los tratamientos con liofilización, además de ser menos perjudiciales por la baja temperatura de secado, se benefician porque las muestras una vez congeladas se colocan directo en el aparato liofilizador sin ser previamente descongeladas. O'NEILL y ALLEN (1993) demuestran que la acumulación de fibra en las muestras congeladas, se debe mayoritariamente al descongelamiento de ellas. De este modo, al descongelar las muestras, la fibra y fracción proteica insoluble aumentan.

Concordando con lo anterior, GRIGGS *et al.* (1999) señalan que en forrajes frescos descongelados por tres horas, se encontró altos niveles de FDN en los tejidos que habían sido congelados. Sin embargo, contrario a lo anterior, DEINUM y MAASSEN (1994), no encontraron cambios en el nivel de fibra debido al congelamiento y descongelamiento de las muestras.

4.1.6.2 Interacción. El análisis de varianza permite concluir que existen diferencias en los tratamientos de acuerdo al secado utilizado ($P=0,0001$). Sin embargo, no se encontraron diferencias debido al congelado ($P=0,9921$). Al realizar la interacción entre ambos factores no se encontró efecto entre ellos ($P=0,4244$). Esta situación se presenta en el Cuadro 9.

CUADRO 9 Valores promedios mínimos cuadrados de FDN (%) para las variables secado y congelado.

	Nitrógeno líquido	Congelamiento a -20°C	Promedio secado
Liofilización	38,891 b	38,298 b	38,595 B
Horno a 60°C por 48 h	42,113 a	42,692 a	42,403 A
Promedio congelado	40,502 x	40,495 x	

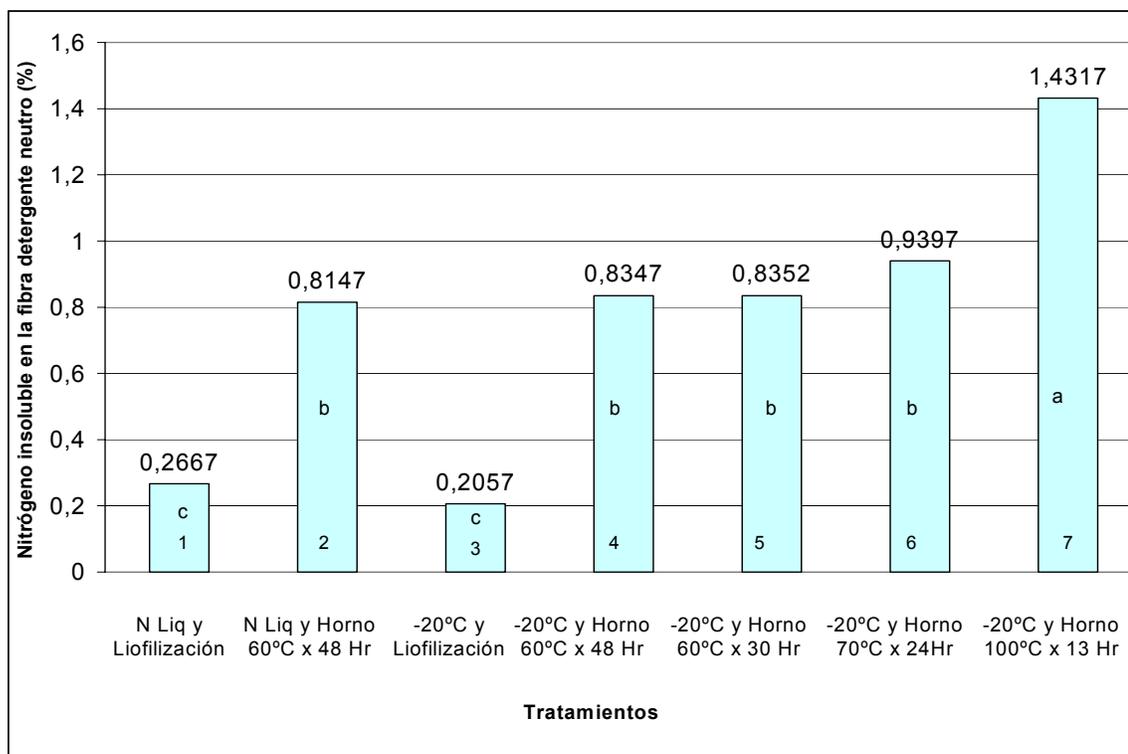
Nota: letras distintas indican promedios estadísticamente diferentes ($P < 0,01$) entre los tratamientos (a,b) y métodos de secado (A,B) o congelado (x,y).

4.1.7 Nitrógeno insoluble en la fibra detergente neutro. Sin duda, al observar el Cuadro 3 se pueden distinguir diferencias en el porcentaje de FDNIN entre los tratamientos. Se pueden apreciar tres grupos bien definidos. El primer grupo, corresponde a los tratamientos 1 y 3 (liofilización) quienes presentan los valores mas bajos de FDNIN. El tratamiento 7 (100°C), se encuentra en el extremo superior presentando un valor promedio muy alto. El tercer grupo corresponde a los tratamientos 2, 4, 5 y 6 (60 y 70°C), los cuales presentan valores medios de FDNIN.

4.1.7.1 Análisis de varianza. Al realizar un análisis de varianza se determinó que existen diferencias entre los tratamientos en cuanto a la variable FDNIN ($P = 0,0001$). En la Figura 7 se presentan los promedios mínimos cuadrados para cada uno de los tratamientos.

En la Figura 7 se puede observar que al realizar una comparación entre promedios, estadísticamente los tratamiento 1 y 3 son iguales entre sí, presentando los valores más bajos de FDNIN, correspondientes a 0,266 y 0,205 respectivamente. Los tratamientos 2, 4, 5 y 6 son estadísticamente iguales, presentando valores medios de FDNIN que van entre 0,814 y 0,93. El

tratamiento 7 es diferente a todos los demás tratamientos, presentando un valor muy alto, correspondiente a 1,431.



Nota: letras distintas indican promedios estadísticamente diferentes ($P < 0,01$) entre los tratamientos.

FIGURA 7 Comparación de promedios mínimos cuadrados de FDNIN para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística.

De la Figura 7 se concluye que a medida que aumenta la temperatura de secado, se incrementa el FDNIN. En este caso no es posible visualizar un efecto debido al tiempo de secado.

CONE *et al.* (1996) afirman que con temperaturas de secado superiores a 40°C, las proteínas pueden denaturarse cambiando sus propiedades. Sobre 70°C y en presencia de humedad, pueden ocurrir reacciones entre carbohidratos y proteínas (reacciones de Maillard), disminuyéndose la degradabilidad de la proteína. Es por ello que al aumentar la temperatura de

secado se incrementa el nitrógeno contenido en la FDN. Esto también concuerda con lo encontrado por LOPEZ et al. (1995), quienes trabajando con forrajes frescos, determinaron que el aumento en la temperatura de secado resulta en un significativo incremento en el nitrógeno no disponible insoluble, lo cual se debe a la formación de los productos de Maillard.

Jones y Bailey (1972), citados por DEINUM y MAASSEN (1994), encontraron que en forrajes la solubilidad del nitrógeno en detergente neutro fue menor después de un secado a 100°C que después de una liofilización. Del mismo modo DEINUM y MAASSEN (1994), determinaron que el nitrógeno insoluble presente en la fibra detergente neutro es menor con liofilización debido a la baja temperatura de secado, y que se va incrementando con el aumento de temperatura.

DEINUM y MAASSEN (1994), señalan que hay dos formas de condensación proteica afectadas por el aumento de temperatura durante el secado de muestras forrajeras. Una de ellas es la reacción de Maillard, la cual es indigestible, se forma a altas temperaturas de secado, especialmente en productos húmedos, reduciéndose el contenido de azúcares y proteína verdadera y aumentando los valores de pared celular debido a su insolubilidad en detergente ácido y neutro. Su tasa de formación disminuye al aumentar el contenido de MS, es por ello que la tasa de secado es importante, pues determina la cantidad formada de productos de Maillard. La segunda forma de condensación proteica es menos importante que la primera y corresponde a la denaturación de proteínas que son insolubles en detergente neutro.

DEINUM y MAASSEN (1994), encontraron que muestras previamente congeladas, y luego secadas a 70°C aumentaron su contenido de FDNIN comparado con muestras frescas secadas a 70°C, pero que no habían sido congeladas. Mac Rae et al. (1975), citados por DEINUM y MAASSEN (1994),

también determinaron que se reduce la solubilidad del nitrógeno después del congelamiento y deshielo.

4.1.7.2 Interacción. El análisis de varianza permitió concluir que existen diferencias en los tratamientos de acuerdo al secado utilizado ($P=0,0001$), sin embargo no se encontró diferencias debido al congelado ($P=0,6734$). No se encontró efecto debido a la interacción de ambos factores ($P=0,4059$). Lo anterior se presenta en el Cuadro 10.

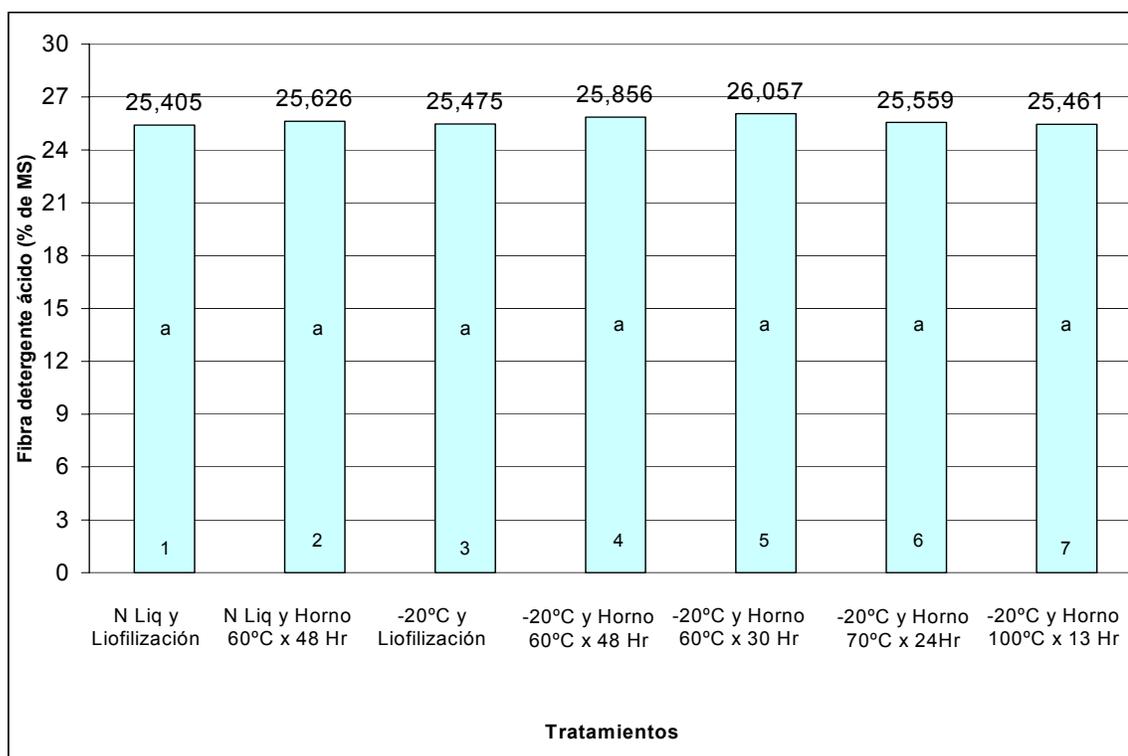
CUADRO 10 Valores promedios mínimos cuadrados de FDNIN (%) para las variables secado y congelado.

	Nitrógeno líquido	Congelamiento a -20°C	Promedio secado
Liofilización	0,269 b	0,208 b	0,239 B
Horno a 60°C por 48 h	0,817 a	0,837 a	0,827 A
Promedio congelado	0,543 x	0,523 x	

Nota: letras distintas indican promedios estadísticamente diferentes ($P<0,01$) entre los tratamientos (a,b) y métodos de secado (A,B) o congelado (x,y).

4.1.8 Fibra detergente ácido. Al observar los valores promedios de FDA en el Cuadro 3, se puede apreciar que los valores son muy similares entre sí.

4.1.8.1 Análisis de varianza. El análisis de varianza demostró que no existe diferencia entre los tratamientos ($P = 0,9718$). En la Figura 8 se muestran los promedios mínimos cuadrados para la FDA.



Nota: letras iguales indican promedios estadísticamente iguales entre los tratamientos.

FIGURA 8 Comparación de promedios mínimos cuadrados de FDA para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística.

De la Figura 8 se concluye que la FDA no fue afectada por la variación en la temperatura de secado. CONE *et al.* (1996), afirman que la FDA se incrementa en forrajes tiernos con el secado a altas temperaturas. Sin embargo, estos autores señalan que en forrajes maduros no hay variación en la FDA, indicando además que en dichos forrajes solo la PC y la FDN fueron influenciadas por un aumento en la temperatura de secado. En el presente ensayo se trabajó con forrajes en diferentes estados de madurez, lo cual podría explicar que no se detectaron efectos sobre esta variable.

Por otro lado STOCKEBRAND (2000), trabajando con forrajes ensilados, concluyó que no existe efecto de la temperatura de secado sobre la variable nutricional FDA, lo cual concuerda con lo analizado en la Figura 8.

4.1.8.2 Interacción. El análisis de varianza en un diseño factorial, determinó que no existen diferencias atribuibles al tipo de secado utilizado ($P=0,5743$), como tampoco debido al tipo de congelado ($P=0,7793$). Del mismo modo, no hubo una interacción significativa entre ambos ($P=0,8804$). En el Cuadro 11 se presentan los promedios mínimos cuadrados para las variables congelado y secado.

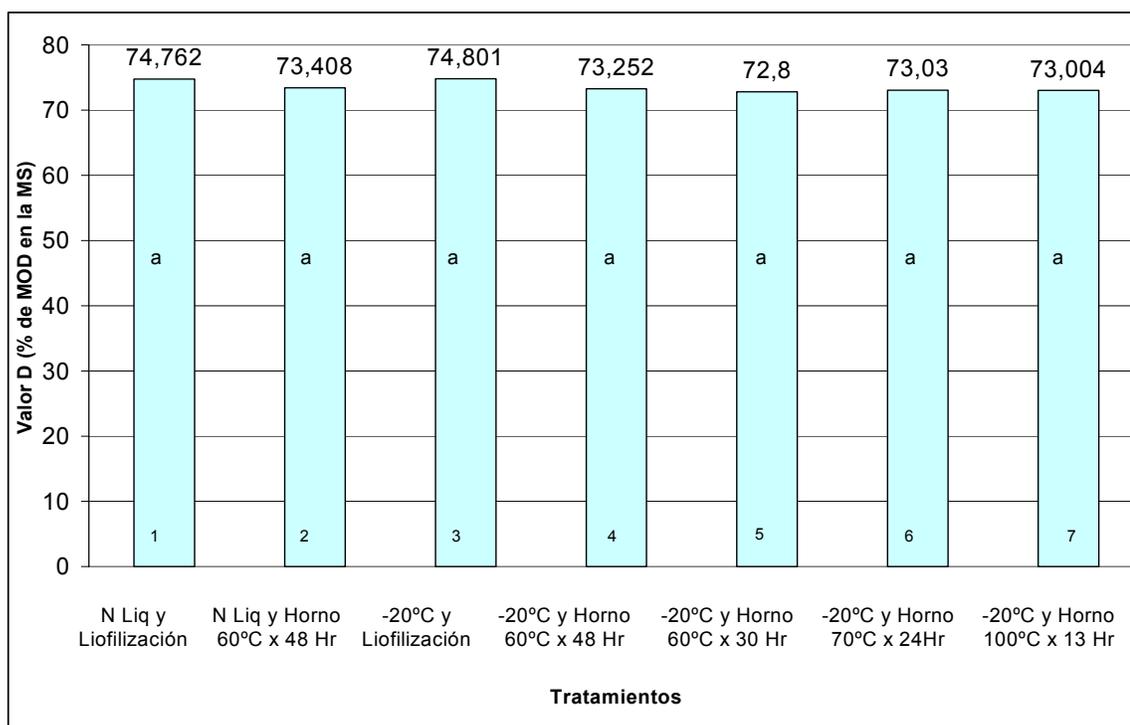
CUADRO 11 Valores promedios mínimos cuadrados de FDA (%) para las variables secado y congelado.

	Nitrógeno líquido	Congelamiento a -20°C	Promedio secado
Liofilización	25,349 a	25,419 a	25,384 A
Horno a 60°C por 48 h	25,570 a	25,800 a	25,685 A
Promedio congelado	25,460 x	25,610 x	

Nota: letras iguales indican promedios estadísticamente iguales ($P>0,05$) entre los tratamientos (a,b) y métodos de secado (A,B) o congelado (x,y).

4.1.9 Valor D. El VD corresponde al porcentaje de materia orgánica digestible en la materia seca. A pesar de observarse en el Cuadro 3 una cierta diferencia entre los tratamientos en cuanto a esta variable, esto es solo una tendencia y la diferencia promedio de los diferentes tratamientos es poco importante.

4.1.9.1 Análisis de varianza. El análisis de varianza demostró que no existe diferencia entre los tratamientos ($P = 0,1610$). En la Figura 9 se muestran los promedios mínimos cuadrados para el VD.



Nota: letras iguales indican promedios estadísticamente iguales entre los tratamientos.

FIGURA 9 Comparación de promedios mínimos cuadrados de VD para cada uno de los tratamientos, y su significancia estadística.

El análisis de los datos presentados en la Figura 9 indica que no hubo diferencia entre tratamientos, aunque los tratamientos que incluyen liofilización (1 y 3) tienden a presentar un mayor valor D. Esto concuerda con lo informado por STOCKEBRAND (2000), quien tampoco encontró diferencias en la energía metabolizable de ensilajes secados con diferentes temperaturas.

Del mismo modo, CONE *et al.* (1996), no encontraron diferencias significativas en la digestibilidad *in vitro* de muestras de maíz y forraje al aumentar la temperatura de secado, sin embargo encontraron una disminución en los componentes fenólicos y cantidad de azúcar.

4.1.9.2 Interacción. El análisis de varianza mostró que existen diferencias debido al método de secado utilizado ($P=0,0398$). No se encontraron diferencias por tipo de congelado ($P=0,9327$). Del mismo modo, no hubo efectos debido a la interacción de ambos factores ($P=0,8882$). En el Cuadro 12 se presentan los promedios mínimos cuadrados para las variables secado y congelado.

CUADRO 12 Valores promedios de VD (%) para las variables secado y congelado.

	Nitrógeno líquido	Congelamiento a -20°C	Promedio secado
Liofilización	74,769 a	74,808 a	74,789 A
Horno a 60°C por 48 h	73,415 b	73,258 b	73,337 B
Promedio congelado	74,092 x	74,033 x	

Nota: letras distintas indican promedios estadísticamente diferentes ($P<0,05$) entre los tratamientos (a,b) y métodos de secado (A,B) o congelado (x,y).

4.2.1 Componentes principales (CP). Los CP fueron calculados por el computador, ordenando las muestras de acuerdo a su “global H”, que es la distancia de Mahalanobis, calculada desde los puntajes de los CP. De este modo se estandarizó dividiendo dichos puntajes por sus valores promedios (SHENK y WESTERHAUS, 1994).

Se encontró que el 99,53% de la variación es explicada por los primeros 18 componentes principales. De este modo, el primer componente principal explica el 49,71% de la variación y los primeros cinco componentes principales el 95,35% de la varianza espectral. A continuación se presentan los espectros de las muestras según los componentes principales, destacándose su posición según el tratamiento.

4.2.1.1 Congelamiento con nitrógeno líquido y liofilización por 52 horas (tratamiento 1). En la Figura 10 se observa que este tratamiento se agrupa completamente en el cuadrante superior izquierdo. Los puntos están muy cerca unos de otros, evidenciándose una clara agrupación.

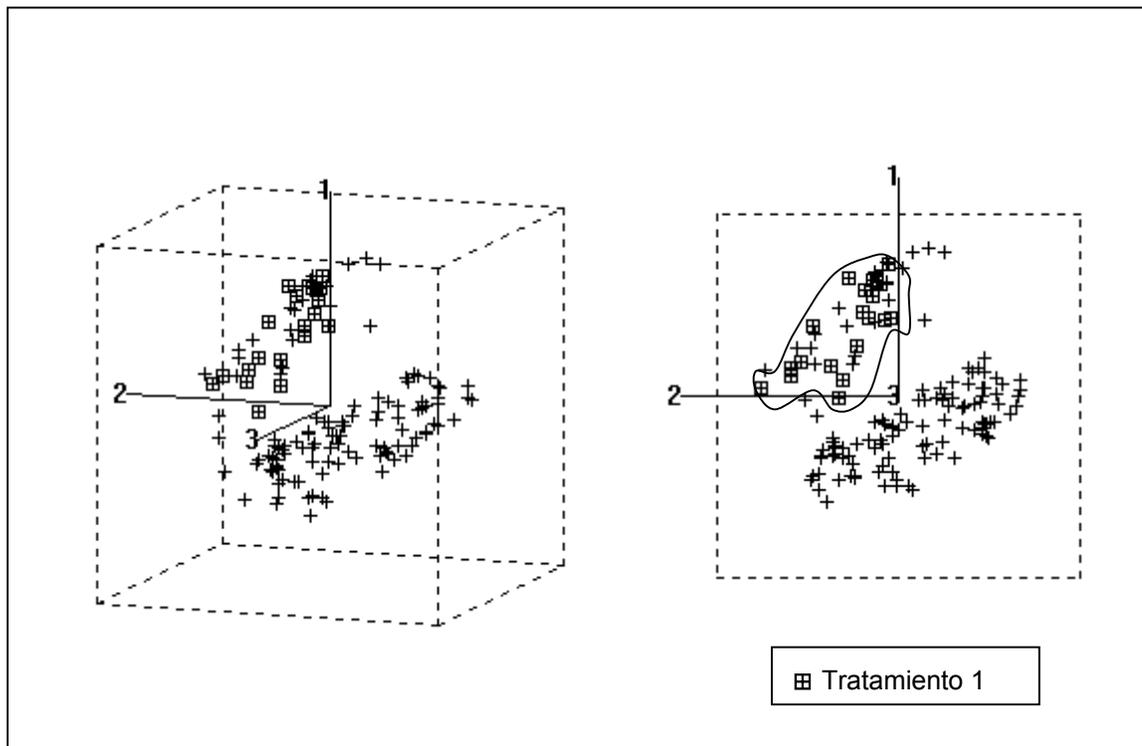


FIGURA 10 Agrupación espectral del tratamiento 1 según los componentes principales.

4.2.1.2 Congelamiento con nitrógeno líquido y horno a 60°C por 48 horas (tratamiento 2). Según la Figura 11 este tratamiento se agrupa en la parte inferior del cubo, ocupando tanto el cuadrante izquierdo como el derecho. Se puede apreciar un mayor esparcimiento de los puntos si se le compara con el tratamiento anterior. A pesar de existir una agrupación por tratamiento, éste se encuentra entremezclado con otros tratamientos en el espacio.

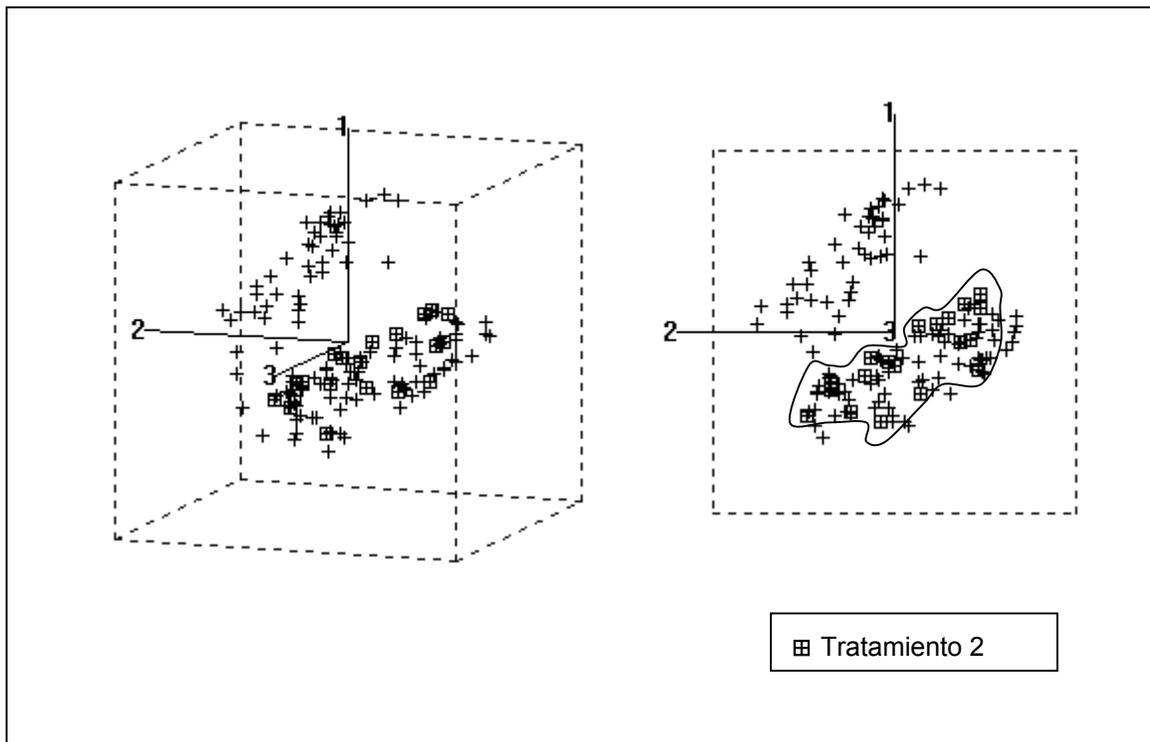


FIGURA 11 Agrupación espectral del tratamiento 2 según los componentes principales.

4.2.1.3 Congelamiento a -20°C y liofilización por 52 horas (tratamiento 3). Se observa en la Figura 12 una agrupación de los puntos en el cuadrante superior izquierdo (situación similar al tratamiento 1), sin embargo algunos puntos se ubican también en el cuadrante superior derecho. En todo caso los puntos se encuentran muy cercanos entre sí, determinando una buena agrupación de éste tratamiento.

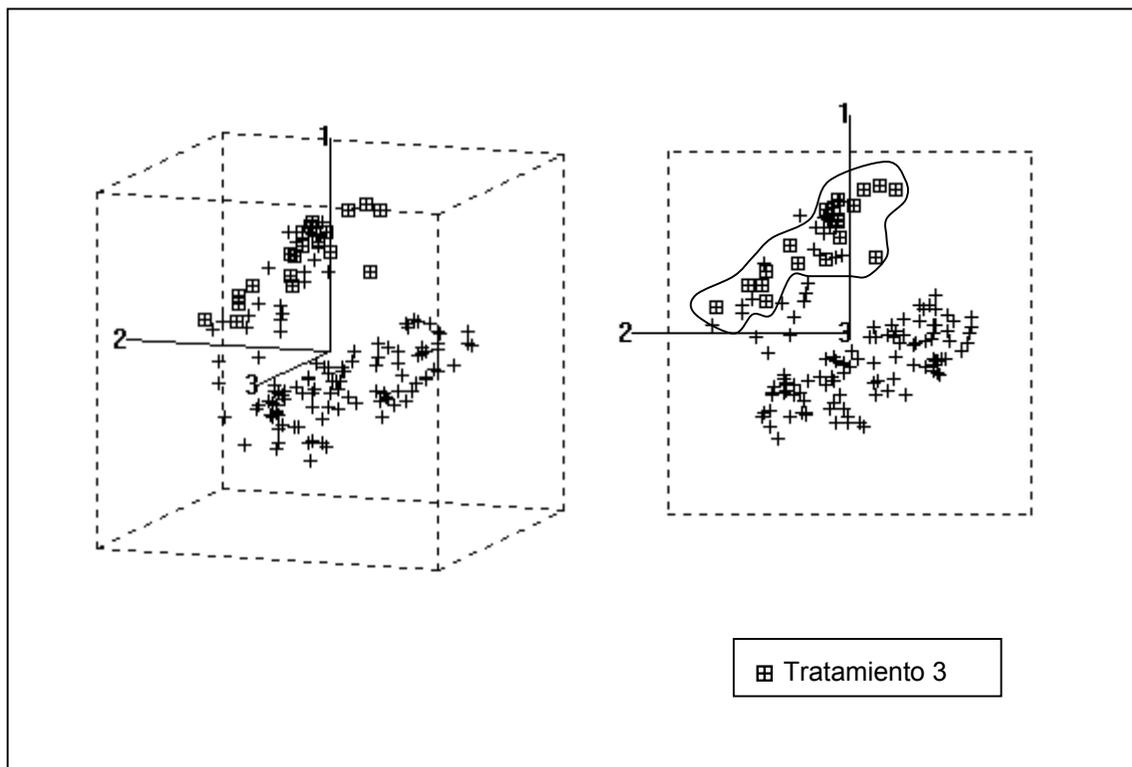


FIGURA 12 Agrupación espectral del tratamiento 3 según los componentes principales.

4.2.1.4 Congelamiento a -20°C y horno a 60°C por 48 horas (tratamiento 4). La Figura 13 muestra que los puntos que representan al tratamiento 4 están ubicados en los cuadrantes tanto izquierdo como derecho de la parte inferior del cubo. Dichos puntos, al igual que en el caso del tratamiento 2, se encuentran mezclados con otros tratamientos que contemplan secado en horno. Sin embargo, al igual que en los casos anteriores, podemos observar una agrupación de los puntos en un sector específico del cubo.

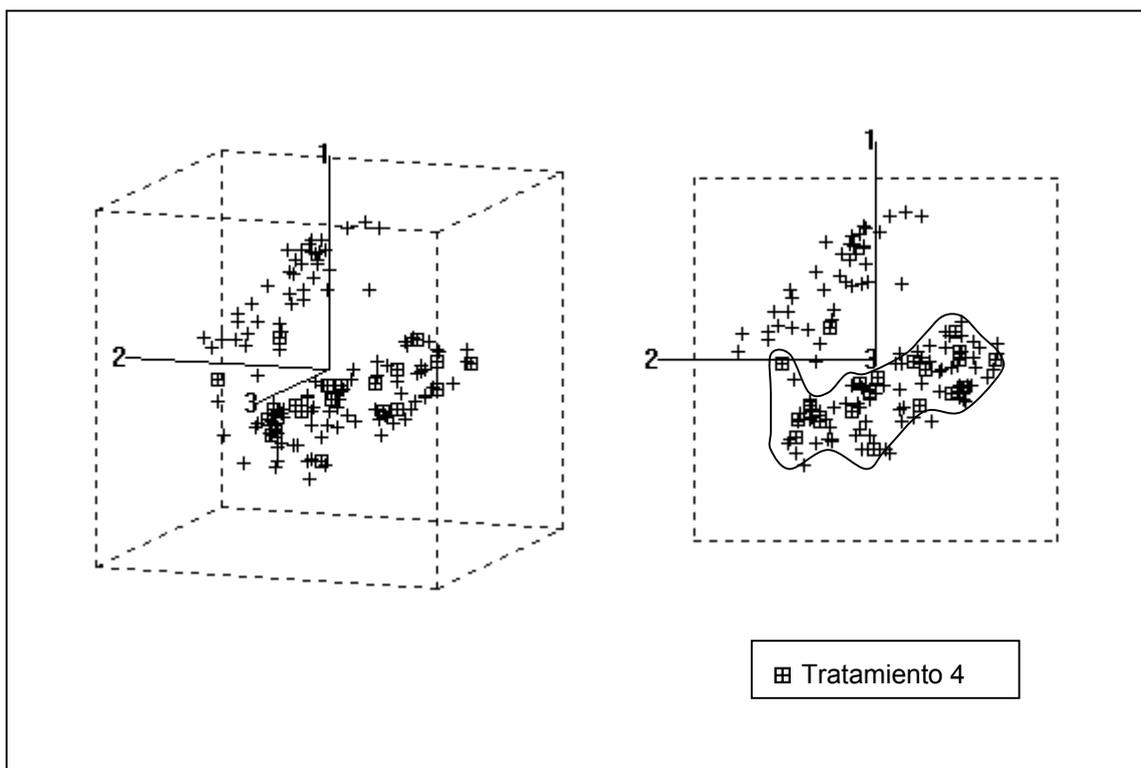


FIGURA 13 Agrupación espectral del tratamiento 4 según los componentes principales.

4.2.1.5 Congelamiento a -20°C y horno a 60°C por 30 horas (tratamiento 5). Al igual que en el caso anterior los puntos se ubican en los dos cuadrantes inferiores del cubo, mezclados con los correspondientes a tratamientos que conllevan secado en horno, lo cual se observa en la Figura 14. Como en los casos anteriores, se puede determinar una agrupación de dicho tratamiento dentro del cubo.

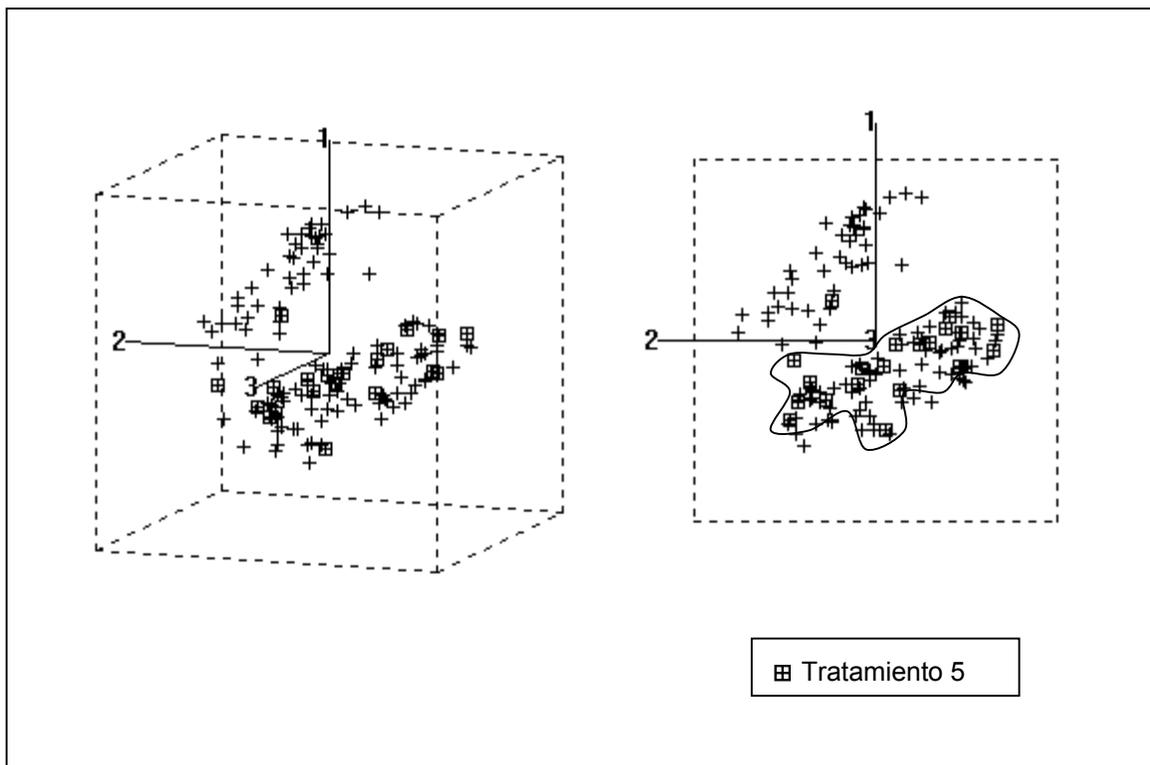


FIGURA 14 Agrupación espectral del tratamiento 5 según los componentes principales.

4.2.1.6 Congelamiento a -20°C y horno a 70°C por 24 horas (tratamiento 6). La ubicación de este tratamiento es muy similar a la del tratamiento anterior, situándose en la parte media inferior del cubo, combinándose con los otros tratamientos secados en horno, hecho que se observa en la Figura 15. Al igual que en los casos anteriores es posible determinar una agrupación dentro del espacio.

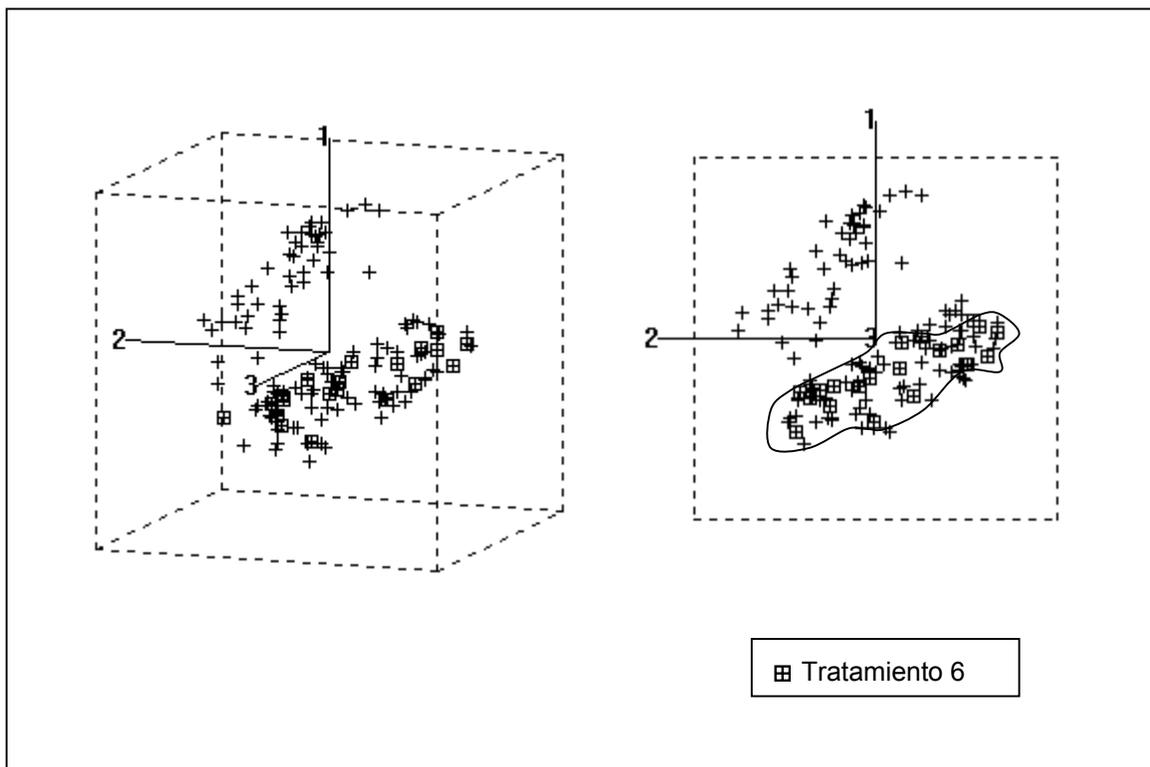


FIGURA 15 Agrupación espectral del tratamiento 6 según los componentes principales.

4.2.1.7 Congelamiento a -20°C y horno a 100°C por 13 horas (tratamiento 7). En la Figura 16 podemos observar que este grupo se ubica en la zona inferior del cubo (tanto en el cuadrante derecho como izquierdo), apreciándose un ordenamiento diferente al presentado por los otros tres tratamientos secados en horno. Este grupo no se mezcla demasiado con ellos, es decir, se agrupa con menos dispersión dentro del espacio. A pesar de que se ubica en el mismo sector de los secados en horno, dicho tratamiento se distancia levemente del resto, colocándose en el extremo inferior de este sector.

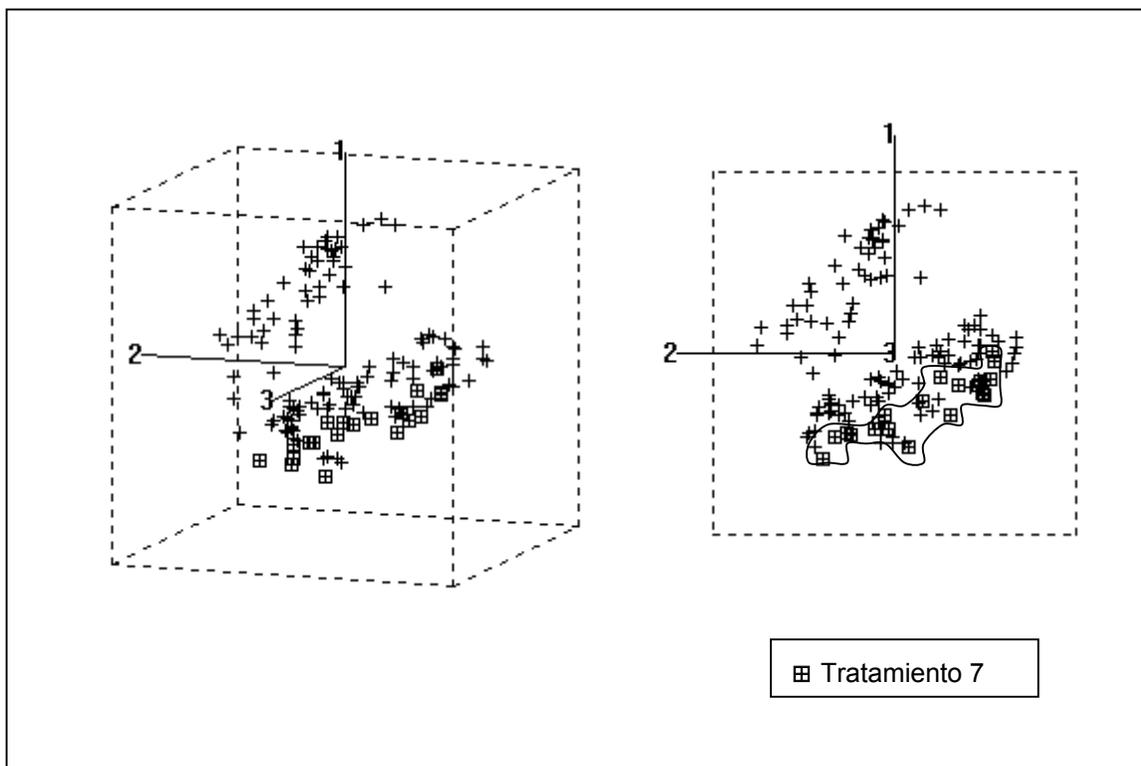


FIGURA 16 Agrupación espectral del tratamiento 7 según los componentes principales.

4.2.2 Agrupación de los espectros de muestras secadas por horno o liofilizador. Al analizar visualmente los puntos en el espacio es posible observar una clara división de éstos en dos grupos principales. Por un lado se tiene a los tratamientos 1 y 3, y por el otro a los tratamientos restantes. En la

mitad superior del cubo, especialmente en el cuadrante izquierdo, se encuentran los tratamientos que involucraron liofilización. En la mitad inferior del cubo, tanto en el cuadrante izquierdo como derecho se ubican los tratamientos que utilizaron secado mediante horno a diferentes temperaturas y tiempos. Por lo tanto, existe una clara separación entre secado por liofilización y secado por horno, situación que se presenta en la Figura 17.

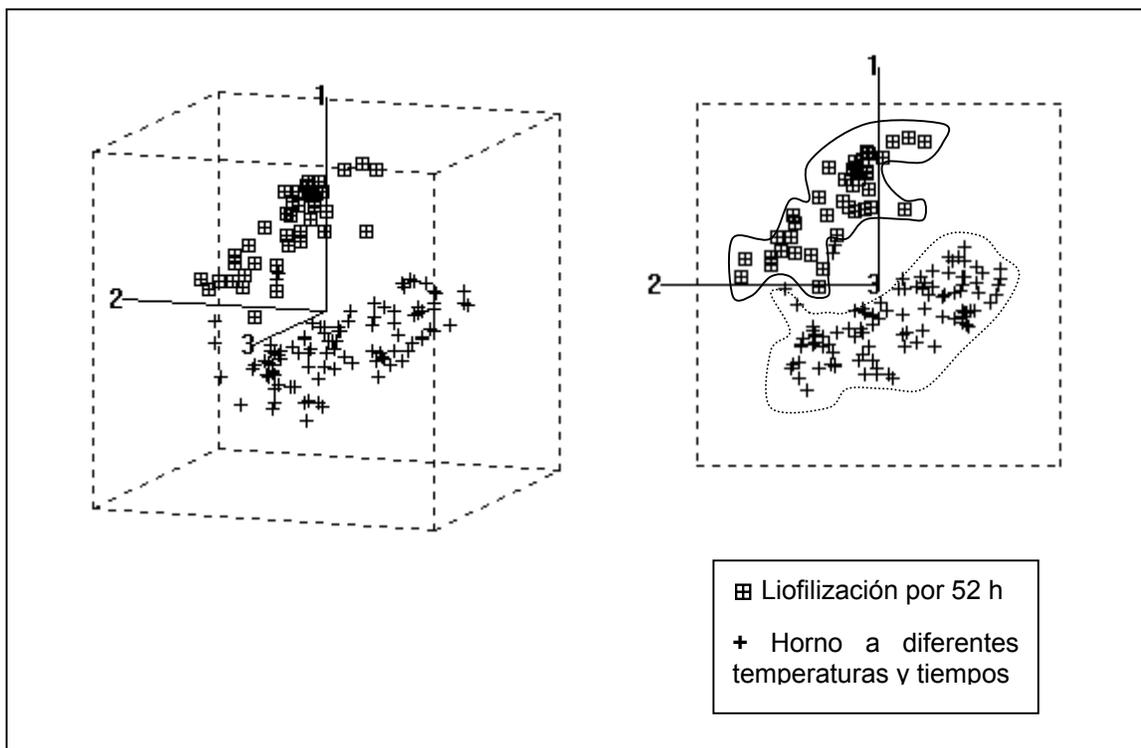


FIGURA 17 Agrupación de los espectros de muestras secadas por horno o liofilizador.

El primer componente principal tiene una gran importancia en la varianza espectral, cercana al 50%, ya que a través de su eje se ubican los dos grupos formados. El segundo componente principal también tiene importancia en la varianza, ya que explica un 29,3% de ésta. El tercer componente principal

es el responsable de un 8,05% de la variación espectral. Se explica el agrupamiento de las muestras según el método general de secado.

En cuanto al método de congelado, no es posible determinar ninguna agrupación debida a esta variable. Al comparar los tratamientos 1 y 3, en los cuales se utiliza liofilización, se observó que no hay separación entre ellos, agrupándose por poseer el mismo tipo de secado. Del mismo modo, al comparar los tratamientos 2 y 4, secados en horno a 60°C por 48 horas, pero con un diferente método de congelado (nitrógeno líquido y congelador a -20°C respectivamente), se pudo determinar que no se separan por método de congelado y sí se agrupan por tipo de secado. Por lo tanto prima la forma de secado por sobre la de congelado.

Dentro de los tratamientos donde se utilizó el secado en horno, no se visualizó diferencia al utilizar 60°C por 48 horas, 60°C por 30 horas o 70°C por 24 horas, puesto que estos tres tratamientos se encontraron ubicados en el mismo sector espacial, mezclados entre sí. Por otro lado se encuentra el secado en horno a 100°C por 13 horas, el cual, a pesar de situarse en el mismo sector del cubo, presentó una leve separación del resto colocándose hacia el borde inferior del grupo.

5. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio se plantean las siguientes conclusiones:

- En relación a los tratamientos empleados:
 - Se encontraron efectos significativos ($P < 0,01$) entre los tratamientos sobre los contenidos de PS, FDN y FDNIN.
 - En cuanto a la PS, los mayores valores se obtuvieron al secar las muestras mediante liofilización, ya sea congelando con N líquido o congelador a -20°C . Dentro de los tratamientos, el uso de congelador y secado en horno a 100°C por 13 horas presentó los menores valores de PS.
 - En la FDN los menores valores se obtuvieron al secar las muestras mediante liofilización, sin importar el congelado utilizado. El uso de congelador a -20°C y secado en horno, ya sea a 60°C por 48 horas o a 100°C por 13 horas, generaron los valores más altos para esta variable.
 - La FDNIN fue la variable composicional más afectada por el tipo de tratamiento. Los valores más bajos corresponden al secado por liofilización, ya sea con N líquido o congelador a -20°C , y los más altos al usar congelador y secado en horno a 100°C por 13 horas. Valores intermedios se obtuvieron al secar en horno a 60°C por 48 horas, 60°C por 30 horas y 70°C por 24 horas, sin importar el tipo de congelado empleado.

- En el presente estudio se determinó que los tratamientos más eficientes son los que incluyen la liofilización, ya que esta provoca menores daños en las muestras utilizadas. En el caso de no disponer de un liofilizador, es recomendable secar en horno a 60°C por 30 horas o a 70°C por 24 horas, ya que se disminuye el tiempo de secado comparado con el método tradicional de laboratorio que implica 60°C por 48 horas.

- En relación a los métodos de congelado:
 - No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre el uso de N líquido o congelador a -20°C. Por lo tanto, se recomienda utilizar el congelador a -20°C, puesto que genera similares resultados que el congelado con N líquido.

- En relación a los métodos de secado:
 - Se encontraron efectos significativos ($P < 0,05$) entre el uso de liofilización u horno a 60°C por 48 horas sobre los contenidos de PS, FDN, FDNIN y VD.

- En relación a los métodos de congelado y secado:
 - No se encontró interacción ($P > 0,05$) entre el método de congelado (N líquido o congelador a -20°C) y de secado (liofilización u horno a 60°C por 48 horas).

- En relación a los componentes principales y su agrupación espectral:
 - Al agrupar los tratamientos según el método de los componentes principales se observó una clara división en dos grupos definidos. En la parte superior

del cubo se ubicaron los tratamientos liofilizados y en la parte inferior los tratamientos secados mediante horno a diferentes temperaturas y tiempos.

- En la parte inferior del cubo, donde se ubicaron los espectros de las muestras secadas en horno, no se pudieron visualizar agrupaciones definidas dentro del grupo (los puntos están mezclados entre sí). Solo el tratamiento a 100°C por 13 horas se distanció levemente de los otros tres, ubicándose en el extremo inferior del grupo.

- El uso de NIRS, como herramienta tecnológica, fue de gran utilidad en el desarrollo del presente estudio, puesto que a través del método de los componentes principales se posibilitó la determinación de diferencias en los espectros de diversos tratamientos a través de la agrupación de ellos en el espacio. De este modo se pudo corroborar lo obtenido en los análisis químicos de laboratorio, ya que los espectros se dividieron en dos grupos definidos según el método de secado (liofilizado y horno), y a su vez las muestras que fueron secadas en horno a menores temperaturas se distanciaron específicamente de las secadas en horno a alta temperatura (100°C por 13 horas), situación que fue similar a lo obtenido mediante el análisis estadístico de los datos analíticos de laboratorio.

6. RESUMEN

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Nutrición del Instituto de Producción Animal de la Universidad Austral de Chile, donde se procesaron y analizaron veinte muestras de forrajes frescos recolectadas en la Décima Región, entre octubre del año 2000 y marzo del 2001, con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes métodos de congelado y secado sobre la composición nutricional de forrajes frescos, como también sobre sus características espectrales. Se usaron dos métodos de congelado (nitrógeno líquido y congelador a -20°C) y cinco métodos de secado (liofilización, horno a 60°C por 48 horas, horno a 60°C por 30 horas, horno a 70°C por 24 horas y horno a 100°C por 13 horas), que se combinaron en siete tratamientos. Mediante un análisis de varianza con diseño en bloques completamente al azar, se evaluó el efecto de los tratamientos sobre el contenido de materia seca (MS), cenizas totales (CT), proteína cruda (PC), proteína soluble (PS), fibra cruda (FC), fibra detergente neutro (FDN), nitrógeno insoluble en la fibra detergente neutro (FDNIN), fibra detergente ácido (FDA), y valor D (VD). Además, se realizó un análisis factorial de tipo 2×2 ordenado en bloques aleatorios para determinar los efectos de las interacciones entre congelamiento y secado, para lo cual se trabajó solo con cuatro de los tratamientos (combinación de nitrógeno líquido o congelador a -20°C con liofilizador u horno a 60°C por 48 horas).

Además, luego de secadas las muestras, se les tomó su espectro cercano al infrarrojo (NIR), en un monocromador NIRSystems 6500, con el propósito de calcular los componentes principales (CP) y estructurar un espacio espectral con cada muestra ubicada de acuerdo a los valores propios de sus

CP. Esto permitió determinar visualmente si existen o no diferencias entre los tratamientos según las agrupaciones espectrales.

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,01$) entre los tratamientos sobre las variables PS, FDN, FDNIN. El mayor valor de PS fue obtenido al liofilizar, ya sea con N líquido o congelador, mientras que el menor valor se obtuvo con el tratamiento que involucra congelador y horno a 100°C por 13 horas. En cuanto a la FDN, el liofilizado, sin importar el método de congelado, presentó los menores contenidos, por el contrario los mayores valores se presentaron en el tratamiento que incluye congelador y horno a 100°C por 13 horas. La FDNIN fue la variable más afectada por el tipo de tratamiento, obteniéndose valores reducidos en los tratamientos que incluyen liofilización (independiente del método de congelado), y el mayor valor en el tratamiento que incluye congelador y horno a 100°C por 13 horas. Para el caso de estas tres variables composicionales, el secado en horno, ya sea a 60°C por 48 horas, 60°C por 30 horas o 70°C por 24 horas, sin importar el congelado usado, produjo resultados deficientes, si se les compara con el secado mediante liofilización, pero superiores al secado en horno a mayor temperatura.

No se encontraron diferencias ($P > 0,05$) al usar N líquido en vez de congelador a -20°C , por lo tanto se recomienda este último por ser de menor costo y rápido uso. Existieron diferencias ($P < 0,05$) entre el uso de liofilización u horno a 60°C por 48 horas sobre los contenidos de PS, FDN, FDNIN y VD.

El método de los componentes principales permitió determinar visualmente diferencias entre los tratamientos. Se encontraron dos grupos separados entre sí. En la parte superior del espacio se ubicaron los tratamientos liofilizados y en la parte inferior los tratamientos secados mediante horno a diferentes temperaturas y tiempos. A su vez, el tratamiento de mayor temperatura se ubicó en un extremo del grupo de los secados en horno.

SUMMARY

The present study was carried out at the Nutrition Laboratory of the Institute of Animal Production of the Austral University of Chile, where twenty fresh samples of fresh forages collected in the Tenth Region between October, 2000 and March, 2001 were processed and analyzed. The main objective was to evaluate the effect of different freezing and drying methods upon the nutritional composition of fresh forages, as well of their spectral characteristics. Seven treatments consisting in a combination of freezing (liquid nitrogen and freezer at -20°C) and five drying methods (freeze drying, oven at 60°C for 48 hours, oven at 60°C for 30 hours, oven at 70°C for 24 hours and oven at 100°C for 13 hours). Effects of treatments on dry matter (DM) content; total ashes (TA), crude protein (CP), soluble protein (SP), crude fibre (CF), neutral detergent fibre (NDF), insoluble nitrogen in the NDF (NDFIN), acid detergent fibre (ADF) and "D value" (DV). Were assessed by an analysis of variance with complete randomized blocks. Besides, a type 2×2 factorial analysis was carried out by aleatory blocks to determine interaction between freezing and drying method was studied by a two way anova, including four of the treatments (liquid nitrogen or freezer at -20°C and freeze drying or oven at 60°C for 48 hours).

After the samples were dried (by any particular method), their NIR spectra were taken with a NIRSystems 6500 monochromator. Principal components (PC) were calculated and according to PC scores, samples were placed in a structured spectral space. This allowed to visually estimate if samples were clustered according to treatments.

Significant effects ($P < 0,01$) were found among treatments upon variables SP, NDF y NDFIN. A higher value of SP was obtained by freeze drying, either with liquid nitrogen or freezer, while a lower value was obtained with the treatment that included freezer and oven at 100°C for 13 hours. With respect to the NDF, freeze drying, irrespective of the freezing methods, presented the lowest contents, on the other hand the highest values are present in the treatment that included freezer and oven at 100°C for 13 hours. The NDFIN was the variable most affected by the type of treatment, with very low values in the treatments that included freeze drying, and the highest in the treatment that included freezer and oven at 100°C for 13 hours. For the case of these three compositional variables, the drying in oven whether at 60°C for 48 hours, 60°C for 30 hours or 70°C for 24 hours, no matter the freezing method, produced deficient results, when compared to freeze drying, but better than those obtained when drying in oven at higher temperatures.

It was not found any advantage ($P > 0,05$) upon using liquid nitrogen instead of freezing at -20°C , therefore it is recommended to use directly the freezing by being of smaller cost and of quick utilization. Significant effects were found ($P < 0,05$) between freeze drying and oven at 60°C for 48 hours upon compositional variables SP, NDF, NDFIN and DV.

The method of the principal components allowed to determine visually differences among treatments. Two defined groups were found. In the upper part of the space freeze drying treatments were located. In the lower part the treatments of drying by oven at different temperatures and times were placed. At the same time, the treatment of oven with greater temperature was located in an extreme of the group.

7. BIBLIOGRAFIA

- ALOMAR, D. 1996. Efecto del estado fenológico sobre la composición químico-nutricional de tres gramíneas forrajeras. *Agro Sur (Chile)* 24 (1): 14-22.
- ALOMAR, D. y FUCHSLOCHER, R. 1998. Fundamentos de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como método de análisis de forraje. *Agro Sur (Chile)* 26 (1): 88-104.
- ALOMAR, D.; FUCHSLOCHER, R. y STOCKEBRAND, S. 1999. Effects of oven or freeze-drying on chemical composition and NIR spectra of pasture silage. *Animal Feed Science and Technology* 80: 309-319.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). 1996. Official methods of analysis of AOAC International. 16^a ed. Washington, D. C., USA. p. irr.
- BATEMAN, J. 1970. *Nutrición animal: Manual de métodos analíticos*. Centro Regional de Ayuda Técnica, Agencia para el Desarrollo Internacional. México. 468 p.
- BECERRA, R. 1990. Efectos de la intensidad de pastoreo sobre la calidad y producción de una pradera permanente de la X Región. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 68 p.

- BEYER, E. 1997. Dinámica de degradación ruminal de la materia seca de ensilajes y su predicción por espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 118 p.
- BONDI, A. 1988. Nutrición animal. Acribia. Zaragoza, España. 546 p.
- BRAVERMAN, J. 1980. Introducción a la bioquímica de los alimentos. Omega. 3ª ed. Barcelona, España. 355 p.
- CHURCH, D. y POND, W. 1977. Bases científicas para la nutrición y alimentación de los animales domésticos. Acribia. Zaragoza, España. 462 p.
- COLEMAN, S. y MURRAY. I. 1993. The use of near-infrared reflectance spectroscopy to define nutrient digestion of hay by cattle. *Animal feed Science and Technology* 44: 237-249.
- CONE, J.; VAN GELDER, A. y MARVIN, H. 1996. Influence of drying method and ageing on chemical and physical properties and *in vitro* degradation characteristics of grass and maize samples. *Journal of Agricultural Science* 126: 7-14.
- CUEVAS, E.; BALOCCHI, O.; ANRIQUE, R. y JORQUERA, M. 1982. Valor nutritivo de las principales especies de una pradera permanente de la Décima Región. I: Proteína y pared celular. *Agro Sur (Chile)* 10 (2): 79-83.

- DEINUM, B. y MAASSEN, A. 1994. Effects of drying temperature on chemical composition and *in vitro* digestibility of forages. *Animal Feed Science and Technology* 46: 75-86.
- DESROSIER, J. y DESROSIER, N. 1977. The technology of food preservation. The Avi Publishing Company. 4^a ed. Westport, Connecticut, USA. 558 p.
- DEMAN, J. 1980. Principles of food chemistry. The Avi Publishing Company. 3^a ed. Westport, Connecticut, USA. 426 p.
- GOERING, H. K. y VAN SOEST, P. J. 1972. Análisis de fibra de forrajes. Traducido por Pezo, D. Universidad Nacional Agraria La Molina, Programa de Forrajes. Boletín nº 10. Lima, Perú. 41 p.
- GREAVES, R. 1963. General principles of freeze-drying. In: Cotson, S. y Smith, D. B. (eds.) *Freeze-drying of foodstuffs*. UK. pp: 1-6.
- GRIGGS, T.; LOBOS, K. y KINGERY, P. 1999. Digestibility analysis of undried, unground, and dry ground herbage by near-Infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science* 39: 1164-1170.
- INFRAISOFT INTERNATIONAL. 1995. Routine operation, calibration development and network system management manual. Infrasoftware International Inc. USA. 335 p.
- KING, J. 1971. *Freeze-drying of foods*. CRC Press. Cleveland, Ohio, USA. 86 p.
- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. y VAN SOEST, P. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 57: 347-358.

- LOPEZ, S.; HOVELL, F.; MANYUCHI, B. y SMART, R. 1995. Comparison of sample preparation methods for the determination of the rumen degradation characteristics of fresh and ensiled forages by the nylon bag technique. *Animal Science* 60: 439-450.
- MURRAY, 1993. Forage analysis by near infra-red reflectance spectroscopy. In: Davies, A.; Baker, R.; Grant, S. y Laidlaw, L. (eds.) *Sward Measurement Handbook*. 2ª ed. British Grassland Soc. 57 p.
- O'NEIL, K. y ALLEN, M. 1993. Effects of temperature and duration of sample storage before oven-drying on forage fiber analyses. *Journal of Dairy Science* 76 (2): 535-543.
- PISTONO, J. 1955. *Desección de los productos vegetales*. Reverté. Barcelona, España. 258 p.
- POND, W. G.; CHURCH, D. C. y POND, K. R. 1995. *Basic animal nutrition and feeding*. 4ª ed. Wiley. USA. 615 p.
- RIVEROS, E. 1989. Potencial productivo de una pradera naturalizada húmeda sometida a diferentes tipos de manejo. II: Composición botánica y calidad nutritiva. *Avances en Producción Animal* 14 (1-2): 63-77.
- RUIZ, I. 1996. La pradera como alimento para el ganado. In: Ruiz, I. (ed.) *Praderas para Chile*. 2ª ed. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Santiago, Chile. pp: 17-25.

- SANCHEZ, F. 1984. Prospección de la calidad del forraje que se ensila, características de su fermentación e implicancias nutritivas. Tesis Lic. Agr. Santiago. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía. 104 p.
- SCHNEEBERGER, X. 1999. Determinación del contenido de materia seca en ensilajes de pradera y fecas de bovinos, por distintos métodos analíticos, para la calibración de un equipo NIRS. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 70 p.
- SHENK, J. y WESTERHAUS, M. 1994. The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to forage analysis. In: Fahey, G.C. (ed.) Forage quality, evaluation, and utilization. National Conference of Forages Quality. Lincoln, NE, USA. pp. 406-449.
- STOCKEBRAND, S. 2000. Efecto del método de secado sobre la composición química de los ensilajes de pradera y la potencialidad del NIRS en su predicción. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 68 p.
- TYLER, C. 1964. Nutrición animal. 2ª ed. Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay. 255 p.
- VAN ARSDEL, W. 1973. Drying phenomena. In: Wallace, B.; Van Arsdel, W.; Copley, M. J. y Morgan, A. I. (eds.), Food dehydration. 2ª ed. The Avi Publishing Company. Westport, Connecticut, USA. 347 p.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B. y LEWIS, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74 (10): 3583-3597.

VAN SOEST, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2^a ed. Cornell University Press. USA. 476 p.

ANEXOS

ANEXO 1 Características de las muestras.

Muestra 1: Pradera constituida en su mayoría por ballica perenne (*Lolium perenne* L.) y en menor proporción por pasto miel (*Holcus lanatus* L.), pasto ovilla (*Dactylis glomerata* L.), trébol blanco (*Trifolium repens* L.) y bromo (*Bromus unioloides* L.). Tomada el 3 de octubre del 2000 en el predio Santa Rosa, de la Universidad Austral de Chile, de un potrero rezagado para ensilaje.

Muestra 2: Pradera constituida por ballica perenne, pasto miel y festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.). Tomada el 6 de octubre del 2000 en el predio Santa Rosa, de la Universidad Austral de Chile, en un potrero rezagado para ensilaje.

Muestra 3: Ballica perenne en estado de tallo elongado e inicio de bota. Tomada el 30 de octubre del 2000 en el predio Vista Alegre, de la Universidad Austral de Chile, en un potrero rezagado para ensilaje.

Muestra 4: Pasto miel en estado espigado. Tomada el 5 de noviembre del 2000 en el predio Vista Alegre, de la Universidad Austral de Chile.

Muestra 5: Pradera polifítica de más de 30 años, a inicios de estado reproductivo, constituida por las siguientes especies pratenses: ballica perenne, pasto miel, bromo, trébol blanco y pasto ovilla. Tomada el 20 de noviembre del 2000 en Purrunque, en el predio Oromo, de la Universidad de Chile.

Muestra 6: Pradera de ballica perenne en inicios de espigadura. Tomada el 20 de noviembre del 2000 en Purrunque, en el predio Oromo, de la Universidad de Chile.

(Continúa)

Continuación Anexo 1

<p><u>Muestra 7:</u> Ballica bianual (<i>Lolium multiflorum</i> Lam.) de primer año y fertilizada, en estado vegetativo. Tomada el 25 de noviembre del 2000, en el predio Punahue, de la Universidad Austral de Chile.</p>
<p><u>Muestra 8:</u> Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) de primer año, fertilizada, en estado vegetativo. Tomada el 25 de noviembre del 2000, en el predio Punahue, de la Universidad Austral de Chile.</p>
<p><u>Muestra 9:</u> Alfalfa de segundo año, en estado vegetativo. Tomada el 15 de diciembre del 2000, en INIA Remehue.</p>
<p><u>Muestra 10:</u> Cebada (<i>Hordeum vulgare</i> L.) en inicios de espiga. Tomada el 15 de diciembre del 2000, en INIA Remehue.</p>
<p><u>Muestra 11:</u> Pradera reproductiva, constituida por las siguientes especies: ballica perenne y bianual, pasto miel, pasto ovillo, bromo, chéptica (<i>Agrostis tenuis</i> Sibth.) y poa (<i>Poa annua</i> L.). Tomada el 22 de diciembre del 2000 en el predio Punahue, de la Universidad Austral de Chile, de un potrero rezagado para ensilaje.</p>
<p><u>Muestra 12:</u> Pasto ovillo y pasto oloroso (<i>Anthoxanthum odoratum</i> L.) en estado reproductivo. Tomada el 22 de diciembre del 2000 en el predio Punahue, de la Universidad Austral de Chile, de un potrero rezagado para ensilaje.</p>
<p><u>Muestra 13:</u> Avena (<i>Avena sativa</i> L.) con ballica perenne, en estado reproductivo con grano formado. Tomada el 29 de diciembre del 2000 en un predio ubicado en Lago Ranco, a 8 Km de Vivanco.</p>

(Continúa)

Continuación Anexo 1

<p><u>Muestra 14</u>: Potrero constituido por trébol rosado (<i>Trifolium pratense</i> L.) y trébol blanco, con escasa presencia de ballica perenne. El trébol se encontraba con flor formada. Tomada el 29 de diciembre del 2000 en un predio ubicado en Lago Ranco, a 8 Km de Vivanco.</p>
<p><u>Muestra 15</u>: Alfalfa de segundo año, en estado reproductivo. Tomada el 13 de marzo del 2001, en INIA Remehue.</p>
<p><u>Muestra 16</u>: Alfalfa en inicios de estado reproductivo. Tomada el 27 de marzo del 2001, en el predio Vista Alegre, de la Universidad Austral de Chile.</p>
<p><u>Muestra 17</u>: Pradera polifítica. Tomada el 17 de marzo del 2001, en el predio Punahue, de la Universidad Austral de Chile.</p>
<p><u>Muestra 18</u>: Pradera polifítica. Tomada el 17 de marzo del 2001, en el predio Punahue, de la Universidad Austral de Chile.</p>
<p><u>Muestra 19</u>: Trébol blanco y rosado, en floración. Tomada el 24 de marzo del 2001, en el predio Vista Alegre, de la Universidad Austral de Chile.</p>
<p><u>Muestra 20</u>: Pradera polifítica. Tomada el 24 de marzo del 2001, en el predio Vista Alegre, de la Universidad Austral de Chile.</p>

ANEXO 2 Composición nutricional de las muestras forrajeras según el tratamiento utilizado.

Materia seca.

MUESTRA	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	16,69	16,13	16,68	15,68	16,45	18,60	16,13
2	18,96	18,59	19,12	17,93	18,11	15,69	18,14
3	13,31	12,64	13,32	12,06	12,18	12,16	12,43
4	21,28	20,18	21,23	20,83	20,13	20,21	20,73
5	16,70	16,01	16,69	16,09	16,27	16,25	16,27
6	20,99	19,96	21,44	20,17	20,29	20,22	19,93
7	14,14	13,09	14,16	13,05	13,01	13,36	13,29
8	13,49	12,36	13,37	12,15	12,53	12,61	12,24
9	13,47	12,99	13,69	12,86	13,04	13,02	12,63
10	17,24	16,44	17,57	16,12	16,39	16,34	16,29
11	24,51	23,50	24,04	24,38	24,31	23,59	23,38
12	29,06	29,76	30,98	29,21	29,83	29,34	29,11
13	22,48	21,97	22,49	22,31	22,32	22,18	22,62
14	17,28	16,17	16,66	15,81	16,10	16,21	16,29
15	16,43	16,49	16,07	15,72	16,18	15,63	15,04
16	19,33	17,98	19,27	17,94	18,10	17,76	18,29
17	22,16	22,01	21,68	21,75	21,45	21,11	21,95
18	18,09	17,65	17,51	17,43	17,73	17,17	16,32
19	13,78	13,24	14,21	13,49	13,56	12,92	13,27
20	20,06	19,92	20,21	19,55	19,93	19,55	18,97
Promedio	18,473	17,854	18,520	17,727	17,896	17,696	17,666
Desviación Estándar	4,042	4,246	4,264	4,338	4,311	4,206	4,248

(Continúa)

Continuación Anexo 2

Cenizas totales.

MUESTRA	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	9,87	9,95	10,13	9,85	9,87	9,88	9,81
2	8,57	8,86	8,90	8,79	8,81	8,99	8,90
3	8,32	8,10	8,12	8,21	8,05	8,21	8,21
4	6,12	6,12	6,28	6,07	6,15	6,25	6,14
5	7,52	7,51	8,06	7,28	7,41	7,46	7,46
6	6,43	5,96	6,38	6,03	5,96	5,96	6,08
7	11,17	11,56	11,85	11,44	11,47	11,40	11,39
8	10,32	10,65	10,48	10,61	10,35	10,65	7,96
9	9,42	9,44	9,37	9,12	9,29	9,05	9,02
10	8,07	7,96	7,87	7,84	7,89	7,90	7,81
11	7,68	8,02	8,14	8,24	8,61	7,93	8,15
12	5,07	4,96	5,23	5,08	5,14	4,98	5,21
13	6,44	6,31	6,30	6,07	6,24	6,51	6,49
14	7,19	7,13	7,32	7,19	7,26	7,52	7,62
15	8,65	8,65	9,10	8,76	8,20	8,60	9,29
16	10,03	10,35	10,10	10,35	10,47	10,34	10,33
17	8,81	8,31	9,04	8,83	8,65	8,76	8,48
18	12,58	12,16	12,27	11,72	11,87	12,21	12,36
19	10,88	10,97	10,88	11,04	10,58	10,64	10,63
20	10,34	10,14	9,99	10,07	10,27	9,73	9,99
Promedio	8,674	8,656	8,791	8,630	8,627	8,649	8,567
Desviación Estándar	1,874	1,940	1,865	1,889	1,858	1,858	1,805

(Continúa)

Continuación Anexo 2

Proteína Cruda.

MUESTRA	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	20,03	22,00	19,00	22,61	22,60	22,43	22,35
2	16,23	17,28	14,93	17,61	17,85	17,61	17,48
3	20,63	21,05	19,24	22,34	21,33	21,81	22,70
4	10,67	11,19	10,34	10,89	10,65	11,10	10,67
5	11,77	12,25	12,25	12,85	12,99	12,98	12,89
6	10,26	9,74	10,19	10,28	9,53	9,91	10,19
7	21,92	24,11	23,33	24,09	24,15	23,88	24,08
8	28,84	29,06	28,84	29,28	29,74	29,65	27,88
9	35,26	35,46	35,66	35,72	36,03	35,86	35,69
10	11,56	11,36	12,47	11,48	12,15	11,59	12,28
11	14,17	14,48	15,13	14,85	15,14	14,34	15,17
12	11,05	10,96	11,28	10,82	11,12	10,97	10,66
13	11,75	11,50	11,19	11,16	11,43	11,48	11,95
14	19,49	19,25	20,31	19,54	20,01	19,29	20,01
15	22,83	22,97	24,00	24,81	22,00	23,33	25,19
16	24,97	25,37	25,96	25,16	25,75	24,68	24,84
17	16,63	16,71	18,03	17,06	17,37	17,29	17,18
18	17,93	18,32	17,92	17,64	18,34	18,26	18,68
19	24,80	24,86	24,96	25,48	27,02	25,69	25,40
20	20,36	20,20	20,41	23,19	22,42	19,62	20,94
Promedio	18,558	18,906	18,772	19,343	19,381	19,089	19,312
Desviación Estándar	6,567	6,724	6,708	6,906	6,929	6,788	6,684

(Continúa)

Continuación Anexo 2

Proteína soluble.

MUESTRA	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	9,86	5,99	9,95	6,61	6,32	5,39	4,96
2	8,59	5,15	7,90	4,77	5,14	4,66	4,30
3	11,22	5,94	10,99	7,79	6,25	6,44	5,40
4	5,28	3,71	5,96	3,58	3,57	3,29	2,94
5	5,41	3,97	6,82	3,83	4,01	4,18	3,96
6	5,46	3,84	5,62	4,30	3,73	3,97	3,49
7	13,51	7,72	14,66	7,84	7,89	7,69	5,79
8	13,03	12,21	16,62	13,45	12,67	12,03	9,42
9	18,48	15,39	19,28	16,10	16,62	15,63	14,17
10	5,60	4,14	5,95	4,53	5,01	4,42	3,95
11	5,31	4,89	8,12	5,90	6,01	5,29	4,60
12	4,14	3,93	5,66	4,50	4,05	3,24	2,66
13	6,71	5,01	5,93	4,53	4,39	4,16	3,61
14	7,07	5,45	8,38	5,86	6,23	5,45	5,34
15	12,87	9,46	14,32	10,32	9,68	9,25	8,35
16	13,61	10,77	13,49	10,39	10,50	9,28	7,69
17	6,97	4,87	8,07	4,55	4,58	4,51	3,98
18	6,57	4,19	7,73	3,91	4,57	4,46	3,98
19	11,30	8,32	10,89	9,09	9,51	8,43	10,62
20	9,87	6,11	10,31	5,23	5,41	4,97	4,39
Promedio	9,043	6,553	9,833	6,854	6,807	6,337	5,680
Desviación Estándar	3,752	3,109	3,877	3,362	3,329	3,115	2,868

(Continúa)

Continuación Anexo 2

Fibra Cruda.

MUESTRA	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	20,32	19,89	20,99	20,48	20,31	20,00	19,92
2	20,55	19,69	20,97	19,6	19,61	20,10	19,54
3	19,88	20,16	20,58	20,82	20,57	20,11	19,38
4	27,41	27,08	27,24	27,52	27,34	27,77	28,00
5	24,61	24,42	23,73	23,96	24,26	24,27	24,98
6	25,86	26,05	26,07	25,77	26,32	26,15	25,92
7	19,01	18,03	17,57	18,10	19,45	18,53	17,81
8	12,97	13,83	12,91	14,11	13,72	13,03	14,84
9	9,67	9,30	9,73	10,08	10,25	10,30	10,37
10	23,68	25,4	22,94	25,32	25,4	26,13	24,97
11	23,97	23,78	24,63	26,02	25,04	24,96	23,53
12	27,16	26,24	28,23	27,79	27,17	27,16	27,75
13	26,27	26,67	26,72	27,61	26,77	26,83	25,93
14	16,53	18,00	16,49	18,59	17,73	17,66	17,65
15	21,34	22,19	20,89	21,81	25,05	22,39	18,93
16	14,93	15,97	14,55	15,82	15,10	16,62	16,22
17	24,35	23,31	23,22	23,42	24,11	23,91	22,93
18	24,03	23,43	24,2	23,59	24,59	24,34	23,59
19	12,73	12,77	12,27	13,94	12,20	13,02	13,60
20	23,03	24,02	22,68	23,19	22,42	22,53	22,19
Promedio	20,915	21,012	20,831	21,377	21,371	21,291	20,903
Desviación Estándar	5,039	4,927	5,167	4,913	5,103	5,000	4,759

(Continúa)

Continuación Anexo 2

Fibra detergente neutro.

MUESTRA	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	45,28	48,37	45,51	50,02	49,52	49,27	52,05
2	43,81	46,34	43,54	47,24	47,55	48,03	48,2
3	38,82	42,56	43,03	45,65	44,94	44,96	48,98
4	57,90	58,67	58,67	59,31	58,32	57,65	59,75
5	51,22	53,60	49,46	54,21	53,94	53,67	55,62
6	53,49	55,67	53,04	54,88	55,50	55,17	55,52
7	41,91	43,77	37,43	44,54	44,07	43,89	48,43
8	19,68	25,15	19,80	23,58	22,07	21,82	29,03
9	15,6	18,67	16,22	18,69	18,52	17,26	21,76
10	47,2	51,21	46,45	51,66	52,11	52,73	52,71
11	51,29	52,11	50,85	54,07	52,85	54,93	55,62
12	56,17	57,52	56,85	58,96	58,90	58,42	60,21
13	54,08	56,45	53,73	57,73	56,99	54,92	56,65
14	29,78	36,71	30,23	36,94	35,24	38,65	39,11
15	36,34	39,15	33,83	33,53	37,60	35,80	33,89
16	23,28	26,24	23,21	27,55	26,31	26,1	29,04
17	51,73	53,26	46,99	54,16	54,28	53,63	53,85
18	50,26	55,27	48,87	56,17	56,52	55,59	56,92
19	22,89	28,06	22,62	30,84	29,45	30,69	35,04
20	47,91	54,30	46,45	54,92	53,01	53,29	56,26
Promedio	41,932	45,154	41,339	45,733	45,385	45,324	47,432
Desviación Estándar	12,736	11,961	12,496	12,350	12,435	12,351	11,410

(Continúa)

Continuación Anexo 2

Nitrógeno insoluble en la fibra detergente neutro.

MUESTRA	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	0,33	1,39	0,21	1,65	1,58	1,72	2,11
2	0,24	1,02	0,17	1,18	1,23	1,29	1,56
3	0,19	1,07	0,14	1,21	1,14	1,30	2,00
4	0,14	0,55	0,13	0,59	0,54	0,62	0,82
5	0,17	0,67	0,16	0,78	0,76	0,83	0,98
6	0,12	0,42	0,12	0,47	0,47	0,47	0,70
7	0,17	1,30	0,18	1,45	1,45	1,53	2,28
8	0,12	0,48	0,15	0,44	0,38	0,58	1,56
9	0,12	0,44	0,14	0,46	0,45	0,59	1,87
10	0,14	0,51	0,15	0,47	0,51	0,53	0,87
11	0,44	0,73	0,25	0,46	0,42	0,85	1,19
12	0,42	0,51	0,22	0,34	0,47	0,58	0,78
13	0,18	0,39	0,17	0,41	0,44	0,52	0,85
14	0,47	1,17	0,45	1,21	1,20	1,21	1,63
15	0,25	0,50	0,26	0,58	0,44	0,61	1,28
16	0,16	0,32	0,18	0,32	0,32	0,39	1,22
17	0,51	1,17	0,41	1,29	1,33	1,37	1,53
18	0,57	1,54	0,32	1,51	1,56	1,57	1,89
19	0,35	0,96	0,28	0,80	0,90	1,01	1,82
20	0,61	1,52	0,39	1,44	1,48	1,59	2,06
Promedio	0,285	0,833	0,224	0,853	0,854	0,958	1,450
Desviación Estándar	0,160	0,399	0,097	0,447	0,451	0,434	0,492

(Continúa)

Continuación Anexo 2

Fibra detergente ácido.

MUESTRA	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	26,42	25,45	25,92	24,35	24,22	23,49	24,71
2	23,93	23,51	25,03	23,21	22,93	23,09	23,97
3	24,23	24,09	25,27	25,22	24,73	24,23	23,5
4	34,86	33,35	34,23	33,09	34,21	32,78	32,52
5	31,45	31,10	31,26	30,38	30,52	29,73	30,56
6	33,45	31,14	31,17	31,26	32,12	31,53	31,48
7	25,28	23,23	26,08	23,45	25,77	23,97	23,95
8	18,55	19,59	22,02	19,21	21,86	19,82	21,20
9	14,68	13,84	14,04	15,06	13,75	13,45	13,34
10	27,16	28,61	25,95	28,66	28,60	29,89	28,39
11	28,52	27,94	30,52	31,37	31,37	30,67	29,72
12	33,70	33,28	34,24	35,16	34,77	33,81	33,86
13	31,18	31,99	33,32	33,53	33,13	31,66	31,71
14	20,82	23,39	20,87	22,99	23,25	23,87	23,62
15	28,12	28,76	25,83	26,98	30,61	28,10	26,65
16	18,42	22,67	17,98	20,22	19,56	22,89	20,16
17	32,30	29,74	29,48	30,63	30,70	30,11	29,92
18	31,05	31,04	30,97	31,78	31,55	31,09	30,56
19	17,44	20,81	18,68	21,84	19,99	19,43	21,51
20	26,54	28,98	26,63	28,73	27,49	27,56	27,89
Promedio	26,405	26,626	26,475	26,856	27,057	26,559	26,461
Desviación Estándar	5,803	5,028	5,483	5,317	5,519	5,191	5,013

(Continúa)

Continuación Anexo 2

Valor D.

MUESTRA	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	79,52	79,26	78,59	79,48	78,96	79,98	79,20
2	80,85	80,47	81,95	80,31	81,16	81,26	80,25
3	81,14	77,83	79,19	79,17	80,68	80,88	78,67
4	67,26	64,82	67,56	67,75	66,61	66,53	65,90
5	76,15	74,41	73,29	72,72	73,49	74,58	73,19
6	71,99	73,8	74,41	72,05	73,04	70,11	73,41
7	77,20	76,94	76,86	77,13	75,89	76,64	75,69
8	78,33	78,09	77,67	77,40	77,96	77,08	75,99
9	80,83	81,01	80,25	80,09	79,60	80,94	80,99
10	78,09	76,14	77,64	77,58	75,62	76,72	76,03
11	72,70	72,37	71,40	68,85	67,62	66,59	69,07
12	64,35	64,40	64,36	61,15	61,49	64,62	62,21
13	73,36	72,21	73,69	71,94	71,90	70,35	72,35
14	71,84	70,69	73,60	73,22	72,42	74,53	70,17
15	70,22	62,51	68,33	65,7	62,2	63,97	67,24
16	74,19	75,10	76,40	74,00	72,56	73,31	73,92
17	69,02	66,88	71,93	65,73	66,22	64,65	67,07
18	70,42	67,22	70,58	68,02	66,32	65,32	68,65
19	78,85	78,91	78,92	78,07	77,93	78,51	76,09
20	75,35	71,52	75,82	71,09	70,74	70,44	70,41
Promedio	74,583	73,229	74,622	73,073	72,621	72,851	72,825
Desviación Estándar	4,718	5,500	4,477	5,430	5,842	5,941	5,035