

TRABAJOS DE INVESTIGACION

Método rápido para determinación de digestibilidad por el uso del óxido crómico en dietas de ratas

JOSÉ F. CHÁVEZ, M. C. MONDRAGÓN, N. DI GERÓNIMO
Y W. G. JAFFÉ

División de Investigaciones - Instituto Nacional de Nutrición
Caracas. Venezuela.

RESUMEN

Se presenta un método para determinar la digestibilidad, basado en el análisis rápido del óxido crómico en heces de rata. Se utiliza una concentración de 1% de marcador en la dieta. La digestión de la materia orgánica y la oxidación del cromo trivalente a hexavalente se efectúan por calentamiento con una mezcla de ácido perclórico, ácido sulfúrico y agua (20:15:5). La determinación del cromo como dicromato se realiza por lectura colorimétrica a 430 m μ , previo trazado de una curva standard. Se observa buena coincidencia entre los valores de digestibilidad obtenidos por este método y por el del análisis de nitrógeno en heces en diversos materiales, con una diferencia máxima de 2%. Se comentan los resultados obtenidos.

La determinación de la digestibilidad *in vivo*, utilizando el óxido crómico como marcador, presenta la ventaja sobre el método del balance de nitrógeno directo, de no ser necesario conocer el peso total de heces por animal ni tampoco la cantidad de dieta ingerida. (1). Ello representa una economía de tiempo en el desarrollo de los ensayos biológicos, pero por otra parte supone una labor extra en el aspecto analítico, destinada a la determinación química del marcador. En consecuencia, cualquier método que proporcione resultados confiables y de fácil aplicabilidad para el análisis rutinario del óxido crómico en las heces, es deseable para los fines anotados.

En el presente trabajo se describe un procedimiento sencillo y práctico para determinar el óxido crómico presente en heces de rata y se comparan los valores de digestibilidad obtenidos por el método en referencia y por el del análisis de nitrógeno en heces.

MATERIAL Y METODOS

Ensayos biológicos

Se utilizaron grupos de 6 ratas integrados por 3 machos y 3 hembras, entre 70 y 90 gr de peso y descendientes de la cepa "Sprague Dawley" de la colonia animal del Instituto. Los animales fueron alojados en jaulas galvanizadas individuales con fondo levantado de tela metálica y se les suministraba agua y dieta "*ad libitum*".

La composición de las dietas por cada 100 g era como sigue: material ensayado: cantidad suficiente para obtener 10 - 15 g. de proteínas; sales USP XIV: 4 g; aceite de maíz: 5 g; aceite de hígado de bacalao: 1 g; solución de vitaminas (2): 1 g; óxido crómico anhidro p.a.¹ 1 g y almidón de yuca cantidad suficiente para 100 g. Es esencial asegurar la mezcla uniforme de los ingredientes y determinar el óxido crómico en la dieta. Las arepas preparadas con la harina de maíz precocida comercial, suplementada con harina de soya² y de maíz opaco-2, fueron elaboradas en la Cocina Experimental de la División de Educación de este Instituto.

El procedimiento recomendado es: comenzar los ensayos con un período de adaptación de 48 horas, durante el cual los animales se alimentan con la dieta. Al cabo de este tiempo se descartan las heces, las cuales ya deben tener color verde y se continúa el ensayo por 72 horas más, recolectándose finalmente las heces de cada animal individualmente. En ciertos ensayos no incluidos en este trabajo, el período de adaptación de 48 horas puede resultar insuficiente, lo cual se manifiesta por el hecho de que al cabo de ese tiempo todavía se observan heces de color pardo. En ese caso es necesario prolongar dicho período hasta ausencia de heces pardas.

Construcción de la curva standard.

Se usó el mismo óxido crómico anhidro p.a. que se utilizó en la elaboración de las dietas para los ensayos biológicos. Se

1. "E. Merck" AG., Darmstadt, N° de Catálogo 2483.

2. Se agradece a Extractora Nacional de Oleaginosas S. A. (ENDOSA), el suministro de las mezclas de harina de maíz con soya.

pesaron cantidades entre 2 y 20 mg, las cuales se oxidaron en matraces de digestión tal como se describe para la determinación del óxido crómico en las heces. Se observa que con cantidades de más de 15 mg, no hay proporcionalidad entre la densidad óptica a 430 mu y el peso de óxido crómico. Es recomendable una zona de lectura comprendida entre 10 y 50 (D.O. x 100), la cual es usualmente obtenida al digerir entre 50 - 60 mg. de heces provenientes de ratas alimentadas con dieta que contienen 1% de óxido crómico.

Determinación del óxido crómico en las heces.

El procedimiento a seguir es el siguiente: 1) Secar las heces limpias y libres de residuos de dieta en estufa a 80°C por 2 horas; 2) Moler las heces secas en un molino de martillo; 3) Pesar entre 50 y 60 mg en un matraz de micro-Kjeldahl de 30 ml de capacidad. Agregar perlas de vidrio para regular la ebullición; 4) Añadir 10 ml de la mezcla ácida, compuesta por ácido perclórico (70%) : ácido sulfúrico (95-97%) : agua (20 : 15 : 5) Llevar los matraces a un digestor de micro-Kjeldahl¹ con regulador individual de temperatura. Comenzar el calentamiento en posición intermedia hasta completa destrucción de la materia orgánica, lo cual se evidencia por la ausencia de residuo carbonoso y la presencia de un color verde que corresponde al óxido en suspensión. Al llegar a este punto, se hace girar el dial selector para alcanzar mayor temperatura, hasta aparición del color anaranjado, típico del cromo hexavalente como dicromato. Dejar 30 segundos en ebullición y retirar del digestor. El líquido debe presentar un aspecto límpido y transparente y de un color amarillo o naranja, según la cantidad de óxido crómico que contenían las heces digeridas; 6) Después de enfriar, se lleva cuantitativamente con agua destilada el contenido de los matraces a balones aforados de 100 ml y se enrasa; 7) Leer en un colorímetro a 430 mu, contra agua destilada como blanco.

A fin de descartar una posible influencia de color desarrollada por otros iones metálicos al sufrir las heces el proceso de digestión con la mezcla ácida, se aplicó el método a un peso igual de heces limpias y secas provenientes de ratas alimentadas con dietas a base de varias oleaginosas, maíz y torta de ajonjolí, pero sin el marcador. Se pudo comprobar que la solución resul-

1. Micro Kjeldahl Digestion Unit. Labconco Corporation, 8800 Prospect, K. C. Mo. 64132.

tante era completamente transparente y no provocaba a la longitud de onda establecida, ninguna deflección en el colorímetro, al ser leída contra agua destilada.

El cálculo para hallar el valor de la digestibilidad, en base al contenido de óxido crómico en las heces, responde a la fórmula:

$$\% = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

donde:

A = % de nitrógeno en la dieta / % Cr_2O_3 en la dieta

B = % de nitrógeno en la dieta — C

C = $\frac{\% \text{ N en heces}}{\% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ en heces}}$

Como de la lectura de la curva estandar se obtiene directamente la cantidad en mg de óxido crómico en el peso de heces digerida, el porcentaje se calcula:

$$\% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ en heces} = \frac{\text{mg en curva}}{\text{peso heces digeridas (g)} \times 10}$$

Determinación de nitrógeno.

El nitrógeno se determinó en las dietas y en las heces secas y molidas por el método de micro-Kjeldahl. En la digestión puede emplearse el equipo digestor mencionado anteriormente.

RESULTADOS

En la Tabla 1 figuran los valores de digestibilidad aparente obtenidos por el presente método, comparados con los resultados calculados mediante el análisis de nitrógeno en heces. Para este fin se procedió al final del ensayo a tomar nota del peso de las heces limpias y secas por rata y del total de la dieta ingerida. Los valores de digestibilidad obtenidos por los dos métodos coinciden aceptablemente, observándose que con excepción del ensayo 954, los valores correspondientes al método del óxido crómico, son algo más bajos en todos los casos presentados. Las diferencias entre los resultados obtenidos por ambos procedimientos es menor de 2%.

Se observa que las digestibilidades aparentes de las harinas de maíz precocidas comerciales, con diferentes niveles de harina de soya son mayores que las correspondientes a las arepas pre-

paradas con dichas harinas. De igual manera, la digestibilidad del maíz Opaco-2 en grano entero, y la de la harina cruda comercial de maíz amarillo corriente (funche), también grano entero, son mayores que las halladas para la arepa y para la harina autoclaveada en el laboratorio, respectivamente.

La digestibilidad aparente de la caseína, tanto a 10% como a 15% de nivel proteico en la dieta, fluctúa entre 92% y 94%. La digestibilidad algo baja de la lactalbúmina, 85 - 86%, puede ser debida a cambios ocurridos durante el prolongado tiempo de almacenamiento del lote utilizado en la confección de las dietas.

Con el objetivo de comprobar si el valor de 1, correspondiente al porcentaje de óxido crómico añadido en la preparación de las dietas, era realmente detectado, se aplicó el método a las dietas experimentales. Los resultados que se ofrecen en la Tabla 1, no justifican, dada la naturaleza práctica y de muestreo del método, una modificación en los cálculos.

DISCUSION

Los métodos descritos para la determinación del óxido crómico en heces, por Barnicoat (3), Kane y colaboradores (4) y Schurch y colaboradores (1), se fundamentan en una fusión alcalina de la muestra en un crisol de níquel y determinación del cromo hexavalente en solución como cromato, mediante lectura colorimétrica (1) o por titulación con tiosulfato de sodio (4). Estos métodos han sido estudiados por Stevenson y de Langen (5) quienes reportan tales procedimientos como inexac-tos e inapropiados por su minuciosidad, para determinaciones de rutina en gran escala.

Posteriormente, otros autores han simplificado la etapa inicial al utilizar mezcla ácida para digerir y oxidar la muestra. Christian y Coup (6) emplean una combinación de ácido fosfórico, sulfato de manganeso y bromato de potasio, determinando el dicromato por reducción o por titulación directa con sulfato ferrosoamónico. Este método aunque más exacto supone una mayor labor operativa. De acuerdo a Stevenson y de Langen (5), la muestra es incinerada durante la noche en un crisol y oxidada empleando bromato de potasio. La solución es luego alcalinizada y leída como cromato a 400 mu. Czarnocki y colaboradores (7) efectúan la oxidación con mezcla ácida y el cromo

es determinado mediante lectura espectrofotométrica a 300 m μ , mientras que Cheong y Salt (8) emplean una mezcla de ácido sulfúrico, perclórico al 60% y nítrico (1.5 : 3:3).

La exactitud en la determinación final del cromo como cromato o dicromato en muestras de heces o de dietas adicionadas de óxido crómico, ha sido mejorada mediante la aplicación de un autoanizador (9) o con el empleo de la espectrofotometría de absorción atómica, luego de incinerada la muestra y oxidada con mezcla ácida y solución de bromato de potasio (10). Estos procedimientos, si bien más sofisticados y exactos, suponen el concurso de equipo costoso, lo cual no es dable de obtener en todos los centros de investigación.

El presente método comprende destrucción de la materia orgánica y oxidación cuantitativa del cromo trivalente a hexavalente, pasos que se efectúan seguidamente y en una misma operación, al digerir con la mezcla ácida las muestras de heces o de dieta. De acuerdo a experiencias realizadas con heces provenientes de ratas alimentadas con dietas elaboradas con los mismos materiales pero libres de óxido crómico, no hay interferencia por parte de otras sustancias capaces de desarrollar color o turbidez durante los procesos de digestión y oxidación. Ello representa rapidez y simplicidad de reactivos y equipo, sin menoscabo en la exactitud ni en la reproductibilidad de los resultados.

En la Tabla 1 se ofrecen los valores de digestibilidad obtenidos por los métodos del óxido crómico y por el análisis de nitrógeno en heces. Se observa que en ningún caso la desviación entre los resultados es mayor que 2%, asumiendo el valor correspondiente a éste último como verdadero.

Se aprecian valores menores para el método del óxido crómico, lo cual es compatible con lo expresado por Sirknik (11), quien informa de cifras más bajas obtenidas por dicho método. En la misma Tabla 1 se indica el contenido de óxido crómico determinado experimentalmente en las dietas usadas. Los valores hallados son satisfactorios y las variaciones, tanto por exceso como por defecto, pueden ser atribuidas a diferencias en la textura y en el tamaño de las partículas de los materiales ensayados.

Resulta de interés destacar los valores de digestibilidad más bajos, hallados en las arepas y en la harina autoclaveada de

maíz entero, comparados con sus respectivos valores en las harinas precocidas o crudas, obtenibles en el comercio. Esta disminución de digestibilidad en las arepas, es quizás atribuible a la formación de la concha o tostado excesivo durante el proceso de su elaboración y en el caso de la harina de maíz entero, a un tratamiento algo severo de autoclaveado. Estos resultados sugieren la importancia que podría tener un estudio de la digestibilidad en productos de este tipo, suplementados con otras fuentes de proteínas y la conveniencia de disponer de un método rápido para su determinación.

El método descrito permite determinar la digestibilidad aparente. Para la determinación de la digestibilidad real es necesario utilizar los mismos animales en un ensayo aparte, empleando la dieta problema libre de proteínas pero igualmente adicionada de óxido crómico. En esta fase del experimento se debe determinar cuantitativamente la cantidad de heces con lo cual se pierde parte de la ventaja del método. Sin embargo, para los fines prácticos, el valor de la digestibilidad aparente tiene más interés que el de la digestibilidad real.

Evidentemente la coprofagia puede introducir un error en los resultados. Sin embargo esta costumbre es de poca importancia cuando las dietas tienen un valor alimenticio normal.

Debido a su corta duración y sencillez el presente método modificado del óxido crómico, puede ser aplicado al final del período de 28 días que corresponde a un ensayo para determinar la eficiencia proteica (P.E.R.). De esta forma es posible obtener además del valor PER, la digestibilidad aparente de la proteína bajo estudio. Para ello solo es necesario modificar la ración incluyendo el marcador en la proporción indicada y proceder de acuerdo a "ensayos biológicos" en Materiales y Métodos.

SUMMARY

A rapid method for the determination of digestibility of diets in rats by the use of chromic oxide.

A method for the determination of digestibility based on the rapid analysis of chromic oxide in rat faeces is presented. The marker was used at 1% level in the diets. Digestion of organic matter and oxidation of trivalent to hexavalent chromium are accomplished by heating with a mixture of perchloric acid, sulfuric acid and water (20:15:5) and the dichromate determined photolorimetrically at 430 mu. The results of digestibility of several diets obtained by the method of nitrogen analysis and the one described in this paper did not differ by more than 2%.

TABLA N^o 1
**COMPARACION ENTRE LOS VALORES HALLADOS DE DIGESTIBILIDAD APARENTE POR EL METODO
 PROPUESTO DEL OXIDO CROMICO Y POR EL METODO DE ANALISIS DE NITROGENO HECEs**

Ensayo No.	Oxido crómico en dieta %	Producto ensayado	Proteínas en dieta (Nx6.25) %	DIGESTIBILIDAD		Desviación %
				Método de óxido crómico %	análisis de N en heces %	
979	1.025	Harina precocida de maíz (comercial)	7.0	88.5±1.7 ¹	90.3±2.5	— 1.9
885	1.031	Harina de maíz precocida con 5% de soya (comercial)	7.4	87.9±1.5	87.9±1.4	0.0
954	0.986	Harina de maíz precocida con 8% de soya (comercial)	9.1	88.7±1.7	87.4±1.2	+ 1.4
980	1.023	Arepa de maíz ² con 5% de soya	8.7	77.7±1.8	78.2±2.1	— 0.6
978	0.985	Arepa de maíz ² con 10% de soya	10	80.5±2.0	81.1±2.4	— 0.7
970	1.029	Maíz opaco-2 ³ (grano entero)	8.6	85.2±1.6	85.5±2.7	— 0.3
961	1.018	Arepa de maíz ² opaco-2	6.8	81.2±1.7	82.2±1.8	— 1.2
962	1.003	Harina cruda de maíz entero	7.8	85.3±1.1	85.4±1.5	— 0.1
963	0.988	Harina autoclaveada de maíz entero	8.4	82.1±1.5	82.5±2.0	— 0.4
990	0.986	Alimento comercial para ratas ⁴	11.8	73.3±2.5	73.5±3.2	— 0.2
981	0.982	Lactalbúmina ⁵	9.4 ⁶	85.3±1.6	86.7±1.4	— 1.6
958	1.041	Caseína ⁵	10.4 ⁶	92.3±0.5	94.0±0.7	— 1.8
986	0.965	Caseína ⁵	15.6 ⁶	93.2±0.9	94.1±0.9	— 0.9

1. Desviación estandard.
2. Pan típico venezolano hecho de masa de maíz amasada con agua y sal en forma redonda, cocido sobre budare o al horno.
3. Cultivado en Venezuela. Opaco-2, N^o 1, 5^a generación.
4. "Ratarina", fabricado por Protinal, C. A., Valencia, Venezuela. La dieta se preparó diluyendo el alimento hasta el nivel de proteínas indicado.
5. General Biochemicals Inc. Chagrin Falls, Ohio.
6. N x 6.38.

BIBLIOGRAFIA

1. Schurch, A.F., L.E. Lloid & E.W. Crampton. The use of chromic oxide as an index for determining the digestibility of a diet. *J. Nutr.*, **41**: 629-636, 1950.
2. Jaffé W.G. & C.L. Vega Lette. Heat-labile growth inhibiting factors in beans (*phaseolus vulgaris*). *J. Nutr.*, **94**: 203-210, 1968.
3. Barnicoat, C.R. Estimation of apparent digestibility coefficients by means of an inert reference-substance. *N.Z.J. Sci. Technol.*, **27**: 202-212, 1945.
4. Kane, E.A., W.C. Jacobson & L.A. Moore. A comparison of techniques used in digestibility studies with dairy cattle. *J. Nutr.*, **41**: 583-596, 1950.
5. Stevenson, A.E. & H. de Langen Measurement of feed intake by grazing cattle and sheep. VII Modified wet digestion method for determination of chromic oxide in faeces. *N.Z.J. Agri. Res.* **3**: 314-319, 1960.
6. Christian, K.R. & M.R. Coup Measurement of feed intake by grazing cattle and sheep. VI. The determination of chromic oxide in faeces. *N.Z.J. Sci. Technol.*, **36**: 328-330, 1954.
7. Czarnocki, J., I.R. Sibbald & E.V. Evans The determination of chromic oxide in samples of feed and excreta by acid digestion and spectrophotometry. *Canad. J. Animal Sci.* **41**, 167-179, 1961.
8. Cheong, F.H. & F.J. Salt A rapid wet-digestion method for the determination of chromic oxide in faeces. *Lab. Practice*, **17**: 199-200, 1968. Citado en Nut. Abst. & Revs. **38**, 4290, 1968.
9. Stevenson, A.E. & N.T. Clare Measurement of feed intake by grazing cattle and sheep. 9. Determination of chromic oxide in faeces using an autoanalyzer. *N.Z.J. Agric. Res.*, **6**: 121-126, 1963.
10. Williams, C.H., D.J. David & O. Iismaa The determination of chromic oxide in faeces samples by Atomic Absorption Spectrophotometry. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, **59**: 381-385, 1962.
11. Sirník, V. Comparison of coefficients of digestibility of obtained by standard and chromic oxide methods in albino rats. *Zborn. Biotch. Fak. Univ. Ljubljani*, 15-A, 47-54, 1968. Citado en Nut. Abst. & Revs. **39**, 1148, 1969.