



Efecto del congelado sobre la composición nutricional de los forrajes

Effect of freezing on nutritional composition of forages

Barra, P.^a, Anrique, R.^b, Keim, J.P.^{b*}

^a Instituto de Producción Animal, Universidad Austral de Chile

^b Escuela de Agronomía, Universidad Austral de Chile.

ARTICLE INFO

Keywords:

Nutritional composition
Freezing
Forage species
NDF
NDIN

Original Research Article,
Animal Science

*Corresponding author:

Juan Pablo Keim

E-mail address:

juan.keim@uach.cl

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of freezing on nutritional composition of three forage species types: grasses, legumes and mixed perennial pastures. The study was carried out between November 2006 and January 2007 in the X Region of Los Lagos, Chile. Sixty six forage samples were collected from different farms within the region, and 33 of them were frozen at a temperature of -20 °C for a period of 15-17 days. Samples were analyzed for Dry Matter (DM), Crude Protein (CP), Metabolizable Energy (ME), Neutral Detergent Fiber (NDF), Acid Detergent Fiber (ADF), Soluble Protein (SP), Total Ashes (TA), *in vitro* digestibility (VD) and insoluble nitrogen in the NDF contents (NDIN). The effect of freezing was evaluated, blocking according to species with freezing time as a fixed factor. Treatments were statistically analyzed using complete randomized blocks and linear regressions between sets of fresh and frozen samples. The results showed that freezing affects the chemical composition of forages, particularly increasing the ADF and altering the NDIN given by a decrease in the crude protein concentration.

RESUMEN

En el laboratorio de Nutrición Animal del Instituto de Producción Animal de la Universidad Austral de Chile se llevó a cabo un estudio entre noviembre del 2006 y enero del 2007. Se analizaron muestras de forraje provenientes de un proyecto FONDEF en donde se recolectaron un total de 66 muestras, 33 de las cuales fueron congeladas a una temperatura de -20 °C por un periodo de 15-17 días. Las muestras se analizaron mediante análisis químico evaluando el efecto del congelamiento sobre la composición nutricional de los forrajes frescos versus muestras congeladas de tres especies forrajeras: gramíneas, leguminosas y mixta perenne. Los análisis llevados a cabo fueron MS (materia seca), PC (proteína cruda), EM (energía metabolizable), FDN (fibra detergente neutra), FDA (fibra detergente ácida), PS (proteína soluble), CT (cenizas totales), digestibilidad *in vitro* (DV) y nitrógeno insoluble presente en la FDN (FDNIN). Se evaluó el efecto del congelado sobre diferentes tipos de forrajes, bloqueando según especies. Los tratamientos se analizaron estadísticamente mediante bloques completos al azar y regresiones lineales entre los set de las muestras frescas y congeladas. Los resultados obtenidos muestran que el congelamiento afecta la composición química de los forrajes particularmente con un aumento en la FDA y una alteración en la FDNIN dada por una disminución en la proteína cruda.

Palabras clave: Composición nutricional, congelamiento, especies forrajeras, FDN, FDNIN.

INTRODUCCIÓN

La producción pecuaria de la zona sur de Chile basa su alimentación principalmente en el pastoreo que representa el recurso alimenticio más abundante y de menor costo (Balocchi, 1999). Las praderas presentan una dinámica de crecimiento estacional mostrando las mayores producciones en primavera y otoño con una variabilidad en la calidad nutritiva durante todo el año (Cuevas *et al.*, 1983), lo cual se presenta por la composición botánica y el estado fenológico en que se encuentre (Cuevas *et al.*, 1982; Alomar, 1996). El conocer estos

factores, permitirá una correcta utilización del recurso forrajero logrando una mayor productividad sin deterioro del ecosistema y un óptimo balanceo nutricional en las raciones administradas al ganado con el propósito de disminuir los costos de alimentación.

Cuando el enfoque productivo de una explotación pecuaria se basa en un balanceo de raciones ideal para su producción, es fundamental la utilización de los resultados analíticos de laboratorio, pero en épocas de primavera, la oferta es muy alta haciéndose necesario el congelamiento de las muestras para posteriores resultados.

Según Desrosier y Desrosier (1977), dentro de la célula vegetal, la parte acuosa contiene sustancias orgánicas e inorgánicas, incluyendo sales y azúcares en soluciones ácidas como también proteínas coloidales y gases que deben asegurar una masa coloidal protoplasmática. Cuando el proceso de congelamiento es rápido, la formación de cristales es uniforme por todos los tejidos manteniendo la estabilidad de la célula, pero si el proceso de congelamiento es lento, la forma de la célula se distorsiona y comienza a acelerarse el proceso de degradación (Martino y Zaritzky, 1988) formando cristales que al descongelarse no logran volver al estado coloidal original provocando la ruptura de la membrana celular y liberación de un gran porcentaje de proteína y de carbohidratos (Martino y Zaritzky, 1988). En condiciones normales, la temperatura del agua debe descender bajo 0 °C antes de formar cristales de hielo, los cuales pueden ser grandes cuando la congelación es lenta, y cristales de textura fina cuando la congelación es rápida. Sin embargo, cuando se da el proceso de derretido y recongelamiento varias veces, como es el caso de las heladas, el cristal de hielo cambia su forma de pequeño a grande perjudicando la estructura de la célula vegetal.

Según Desrosier y Desrosier (1977), los cambios físicos, químicos y biológicos ocurridos durante el congelamiento y subsiguiente descongelamiento de los alimentos, son complejos y no completamente entendibles. No obstante, estudiar la naturaleza de estos cambios es útil, ya que éstos han sido reconocidos como pautas para diseñar un proceso de congelamiento exitoso para los alimentos. Según Macrae *et al.* (1975), cambios en la composición físico-química ocurridos durante el almacenamiento, congelado y subsiguiente descongelado de forrajes de baja calidad es poco probable que tenga efectos significativos en la digestión fisiológica de los consumidores rumiantes, pero si alteran la composición química de los forrajes de mejor calidad.

Macrae *et al.* (1975) reportan cambios en la composición química en aumento en la fibra detergente neutra (FDN), disminución del nitrógeno soluble y un aumento del nitrógeno insoluble en la fibra detergente neutro (FDNIN), mientras que los cambios serían menores en la fibra detergente ácido (FDA) y carbohidratos solubles, mientras que habrían incrementos en la materia seca (MS), cenizas totales (CT), FDN y FDA dado por el efecto del congelamiento en ensilajes en fresco de girasol.

El objetivo de esta investigación es evaluar el efecto del congelamiento sobre la composición nutricional de los forrajes frescos versus muestras congeladas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización y duración del estudio

El presente estudio fue llevado a cabo en el Laboratorio de Nutrición Animal del Instituto de Producción

Animal de la Universidad Austral de Chile, con muestras de forrajes provenientes de un proyecto FONDEF, recolectadas entre noviembre del 2006 hasta enero del 2007, en la X Región de Los Lagos.

Procedimiento de muestreo y conservación de forrajes

Cada muestra fue tomada a una altura de corte de 5 cm, en donde cada corte del conjunto de muestreo pesó 1000 gramos, los cuales fueron homogenizados y subdivididos en dos sub-muestras de 500 gramos, aproximadamente. El total de muestras obtenidas fueron 66, las cuales se dividieron en 2 grupos, 33 muestras que fueron analizadas en fresco y 33 contramuestras que fueron congeladas a -20 °C durante 15 días. Las muestras fueron tomadas mediante un sistema dirigido con el objetivo de determinar un grupo heterogéneo de especies que fueron divididos en tres orígenes según el tipo de forraje: gramíneas, leguminosas y mixta perenne. Luego de ser cortadas y almacenadas en bolsas plásticas, fueron transportadas al Laboratorio de Nutrición Animal, en recipientes térmicos para mantenerlas lo más intactas posibles para su procesamiento y análisis. Las muestras que se sometieron a un análisis químico en fresco, fueron colectadas y analizadas de inmediato, la excepción a la regla está determinada por la incapacidad de analizar el forraje el mismo día de la colección, por lo que se permitió conservar el forraje por un máximo de 48 horas a una temperatura de 5 °C. El proceso de congelamiento de las contramuestras se llevó a cabo en un congelador convencional a -20 °C, directamente permaneciendo de esta forma hasta el momento de su análisis.

Secado de las muestras y análisis químicos realizados

El secado de la muestra, previo al análisis químico, fue similar para el forraje fresco y congelado; en horno de aire forzado a una temperatura de 60 °C por 48 horas utilizando 200 gramos de forraje. Luego de ser extraídas del horno, fueron pesadas para la determinación de materia seca parcial, y maceradas en un tamiz de grosor 1mm, la sub-muestra fue almacenada en bolsa de plástico, para conservar el material para los próximos análisis. La obtención de los datos se realizó mediante tratamientos químicos observados con métodos de referencia para materia seca (MS), cenizas totales (CT), proteína soluble (PS) por los métodos descritos por AOAC (1996), proteína cruda (PC) por el método de micro-Kjeldhal según Playne y McDonald (1966), fibra detergente neutra (FDN), nitrógeno insoluble en la fibra detergente neutro (FDNIN) según método de Van Soest *et al.* (1991), fibra detergente ácida (FDA) según método de AOAC (1996), digestibilidad *in vitro* (DV) se-

gún método de Tilley y Terry (1963) y energía metabolizable (EM) según método de Garrido y Mann (1981).

Tratamientos, diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental establecido en esta investigación fue de bloques completos al azar, en donde la congelación o no del forraje fue la variable independiente y las especie forrajera el factor de bloqueo. A su vez, se realizaron regresiones lineales entre las muestras congeladas versus no congeladas, determinándose el coeficiente de determinación (R^2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los promedios obtenidos por cada uno de los tratamientos de las variables nutricionales analizadas muestran una gran variabilidad entre especies (Cuadro 1).

Materia seca (MS)

De los resultados obtenidos en las muestras analizadas, se observa una mayor cantidad de materia seca

para las praderas de gramíneas y de mezcla de perennes, mientras que en las leguminosas esta variable es menor. En el caso de las muestras congeladas, todas las praderas presentan un incremento de la MS. Las leguminosas tienen menor contenido de MS tanto en forrajes frescos como congelados (Cuadro 1), lo que puede deberse a que poseen hojas más suculentas con mayor contenido celular y menor fibra, lo cual podría ser determinante en el proceso de descongelamiento, dada su mayor capacidad de eliminar agua.

Las praderas, en general sin diferenciar su especie, poseen un crecimiento vegetativo cíclico y activo alterando con periodos de alta tasa de acumulación de MS y periodos de inactividad a través del año, lo que se debe a factores climáticos como la radiación solar, luminosidad y temperatura, como también, factores edáficos como la humedad disponible y fertilidad (Bernier, 1988; White *et al.*, 2000; Fernández, 2007). Anrique *et al.* (1995) y Ramírez (2007) reportaron contenidos de MS de una pradera permanente fertilizada en la Décima Región entre los meses de octubre y febrero dentro del rango 13,2-42,4%, lo que concuerda con los valores obtenidos en este estudio dentro de los mismos meses de evaluación, aunque el valor máximo registrado se

Cuadro 1. Promedios de las variables nutricionales analizadas para cada tratamiento.

Table 1. Averages of nutritional variables analyzed for each treatment.

Variable	Tratamiento	Tipo de Forraje		
		Gramíneas	Leguminosas	Perenne
MS	Fresco	19,8	16,5	19,1
	Congelado	20,7	18,1	19,5
PC	Fresco	17,5	21,9	14,9
	Congelado	16,8	21,6	15,0
EM	Fresco	2,8	2,8	2,6
	Congelado	2,9	2,9	2,6
FDN	Fresco	45,1	31,7	50,1
	Congelado	48,1	32,0	49,8
FDA	Fresco	25,6	21,3	30,5
	Congelado	24,6	20,6	28,4
PS	Fresco	7,0	6,7	3,6
	Congelado	4,9	7,3	3,5
CT	Fresco	8,9	9,0	8,2
	Congelado	8,5	8,7	8,0
FDNIN	Fresco	0,7	0,8	1,0
	Congelado	1,2	0,9	1,2
DV	Fresco	78,6	74,1	71,0
	Congelado	82,3	75,3	70,6

encuentra levemente por encima del reportado en otro estudio por Anrique *et al.* (1995). Se debe destacar que se observó un efecto asociado al bloque ($p \leq 0,01$). El R^2 de la variable MS fue de 0,50 presentando una baja dependencia entre los tratamientos (Figura 1).

Proteína Cruda (PC)

En las gramíneas y mezclas perennes de este estudio se presenta la menor proporción de proteína cruda en comparación a las leguminosas (Cuadro 1), comportamiento que se mantiene en las muestras congeladas de cada una de las especies y que coincide con estudios reportados por Alomar *et al.* (2003) y Petersen *et al.* (1987), quienes demuestran que los espectros de las

muestras de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) y balluca inglesa (*Lolium perenne* L.) presentan diferencias en bandas de absorción específicas mediante espectroscopía de reflectancia al infrarrojo cercano, mostrándose un mayor contenido de proteína en las leguminosas, lo que puede deberse a que su contenido celular es mayor y a que reducen su calidad nutricional más lentamente con la madurez (Conrad y Martz, 1985; Alomar *et al.*, 2003).

Cabe destacar, que si bien se encontraron diferencias entre las especies, no existió un efecto del congelado, por lo que se podría determinar el contenido de PC una vez congeladas las muestras, sin que dichos resultados sean alterados por el congelamiento. El R^2 de la variable materia seca MS fue de 0,52 presentando una baja dependencia entre los dos tratamientos (Figura 2).

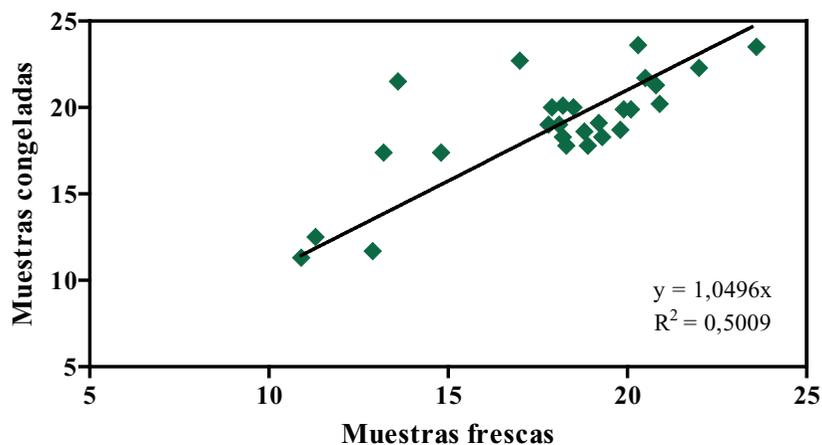


Figura 1. Relación entre muestras frescas y congeladas para materia seca.

Figure 1. Relationship between fresh and frozen samples for dry matter.

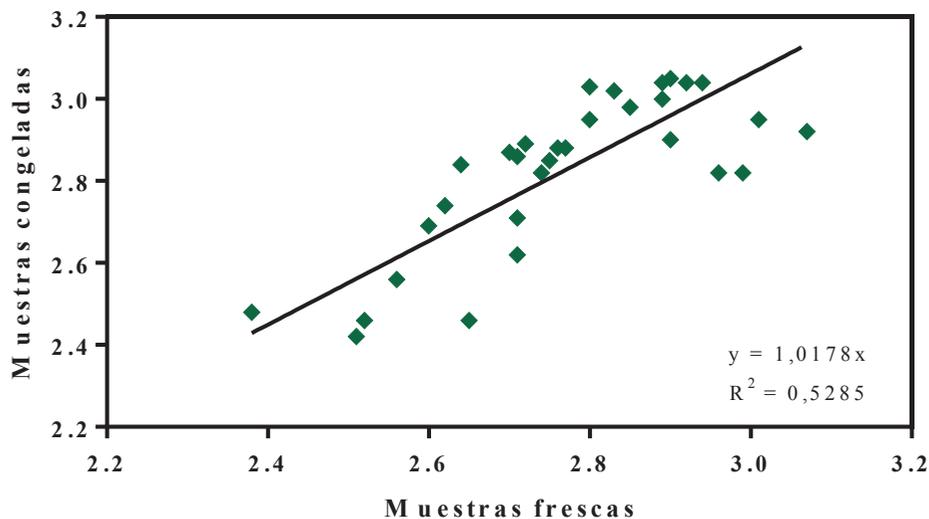


Figura 2. Relación entre muestras frescas y congeladas para proteína cruda.

Figure 2. Relationship between fresh and frozen samples for crude protein.

Energía Metabolizable (EM) y Cenizas totales (CT)

Los promedios de los resultados analizados en este estudio muestran una tendencia en ambas variables y tratamientos (Cuadro 1), presentándose valores más altos para las gramíneas y leguminosas en comparación a las praderas perennes. Sin embargo, los valores de EM obtenidas después del congelamiento, no presentaron mayores distorsiones. No se observa diferencia significativa entre los tratamientos, no obstante, para EM se presentó un efecto asociado al bloque ($p \leq 0,01$).

El R^2 obtenido para EM, determina una baja confiabilidad, lo que puede generarse debido a que su cálculo es en base al valor DV, tomado por el valor de MS inicial. En este estudio en particular, la correlación de la MS ya era deficiente, por lo que esto puede influir en forma indirecta en el parámetro actualmente analizado, mientras que el R^2 para CT fue de 0,74 mostrando una alta correlación entre las muestras analizadas en fresco y las congeladas (Figura 3).

Fibra Detergente Neutro (FDN) y Fibra Detergente Ácida (FDA)

La variable de fibra detergente neutro es mayor en las praderas perennes seguido de las gramíneas, y como último, las leguminosas quienes presentan la menor concentración (Cuadro 1), mostrándose la misma tendencia en las muestras analizadas después del proceso de congelamiento.

Estudios reportados por O'Neil y Allen (1993) demuestran que la acumulación de fibra en las muestras congeladas, se debe mayoritariamente al descongelamiento de ellas, dado que este proceso provoca una ruptura de la célula con pérdida de contenido celular lo que conlleva a un incremento de la fibra y la fracción

proteica insoluble (Griggs *et al.*, 1999). Además estos autores señalan que en forrajes frescos descongelados por tres horas, se encontró altos niveles de FDN en los tejidos que habían sido congelados. Sin embargo, Deinum y Maasen (1994), no encontraron cambios en el nivel de fibra debido al congelamiento y descongelamiento de las muestras, mientras que Park *et al.* (2002) reportaron disminución en los valores de FDN en muestras descongeladas de ensilaje de ballica.

No obstante, para FDN no se observaron diferencias significativas entre muestras frescas y congeladas, obteniéndose un R^2 de 0,89, lo que refleja una alta correlación entre muestras procesadas en fresco y las congeladas (Figura 4).

En cuanto a los resultados obtenidos en esta investigación, se observaron concentraciones de FDA en un rango de 21-30% (Cuadro 1), valores que están por encima de los reportados por Anrique *et al.* (1995). Ramírez (2007) señala que para mantener un buen funcionamiento ruminal en vacas lecheras en lactancia, la concentración de FDA en la materia seca debe fluctuar entre 19 y 24%, valores que se encuentran cercanos a los reportados en este estudio para las leguminosas. Fernández (2007) reporta que los mayores contenidos de FDA y FDN en muestras corresponden a praderas naturalizadas, valores que pueden disminuir a medida que se incorporan nuevas especies y planes de fertilización.

Park *et al.* (2002) reportan que muestras congeladas de ensilajes de ballica presentan una disminución en los valores de FDA sobre los valores en fresco, lo que coincide con este estudio.

Se determinó un efecto significativo del congelamiento sobre las concentraciones de FDA ($p \leq 0,05$), donde muestras congeladas presentan menor FDA, mientras que el R^2 fue de 0,68 presentando una baja dependencia entre los tratamientos (Figura 4).

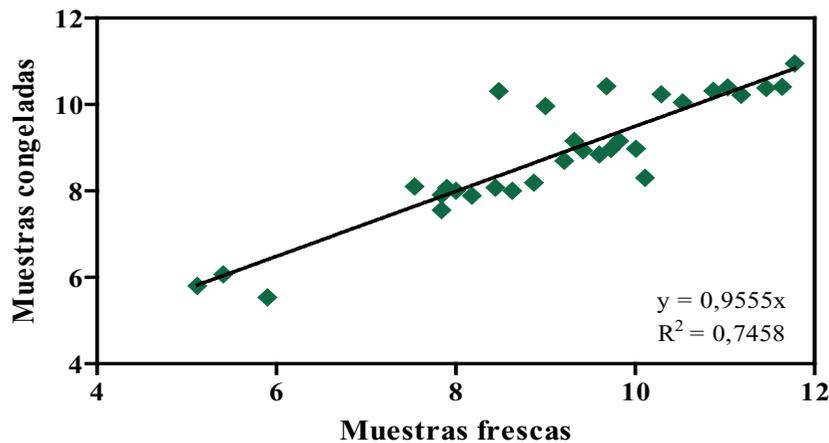


Figura 3. Relación entre muestras frescas y congeladas para energía metabolizable y cenizas totales.

Figure 3. Relationship between fresh and frozen samples for metabolizable energy and total ash.

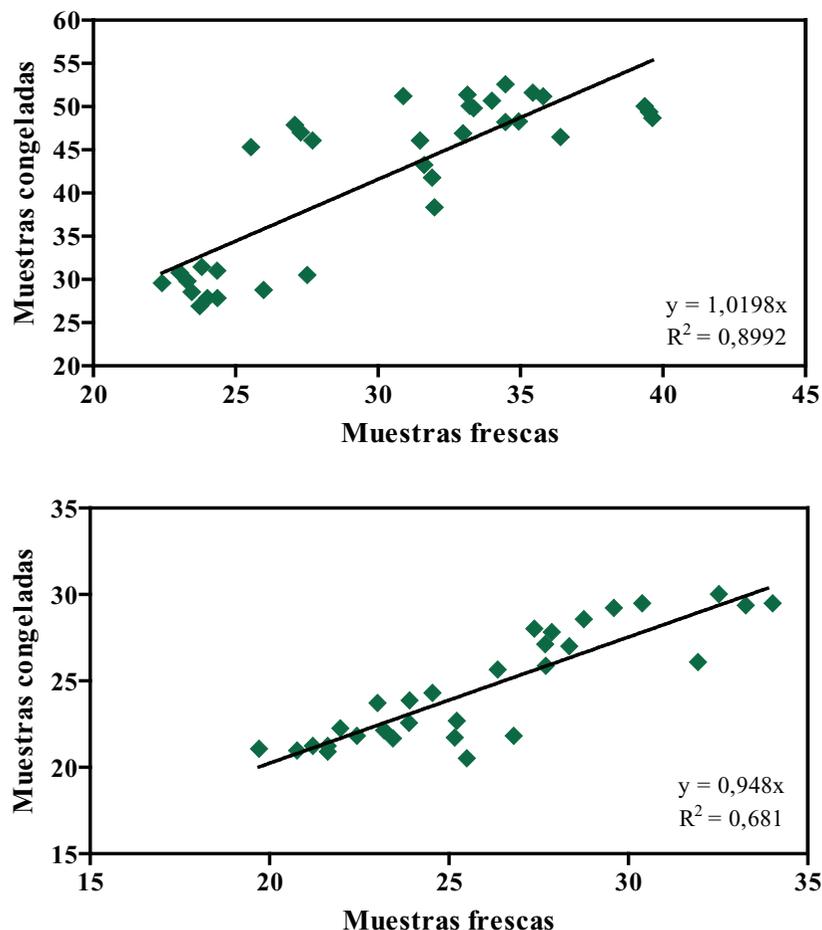


Figura 4. Relación entre muestras frescas y congeladas para fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA).
Figure 4. Relationship between fresh and frozen samples for neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF).

Proteína Soluble (PS)

Los valores de proteína solubles en las muestras analizadas en fresco son similares (Cuadro 1) entre las gramíneas y leguminosas, mientras que en las muestras analizadas en congelado, gramíneas y praderas perennes se comportan de forma similar, y las leguminosas presentan un valor promedio superior al de las otras especies. En las gramíneas se observa una disminución entre las muestra en fresco y las congeladas coincidiendo con lo reportado por López *et al.* (1995) y De Pablo (2002), quienes argumentan que al aumentar la temperatura decrece la solubilidad del nitrógeno dado en el momento en que se descongelan las muestras para su respectivo análisis.

Los resultados obtenidos en este estudio reportan que no se presentaron diferencias significativas para el método de congelación, pero si un efecto asociado a la especie forrajera ($p \leq 0,01$). Se determinó un R^2 de 0,46 para PS, lo que nos permite concluir que presenta una baja dependencia entre los tratamientos (Figura 5).

Nitrógeno Insoluble en la Fibra Detergente Neutro (FDNIN)

Pelletier *et al.* (2010) reportan en su investigación que las muestras de gramíneas, durante diferentes etapas de crecimiento, presentan valores más altos en la FDNIN cuando son congeladas, previo análisis nutricional, en comparación con muestras de leguminosas como las alfalfas, valores que coinciden con los reportados en este estudio (Cuadro 1).

Los resultados estadísticos de esta investigación mostraron un efecto significativo del congelado sobre las concentraciones de FDNIN ($p \leq 0,01$), observándose un R^2 de 0,45 lo que indica una baja correlación entre los valores de las muestras analizadas en fresco y congeladas (Figura 6).

Las especies gramíneas presentaron un mayor valor DV que las praderas perennes (Cuadro 1 y Figura 7). El proceso de congelamiento no afectó el valor DV de los forrajes ($p > 0,05$), observándose un R^2 de 0,53.

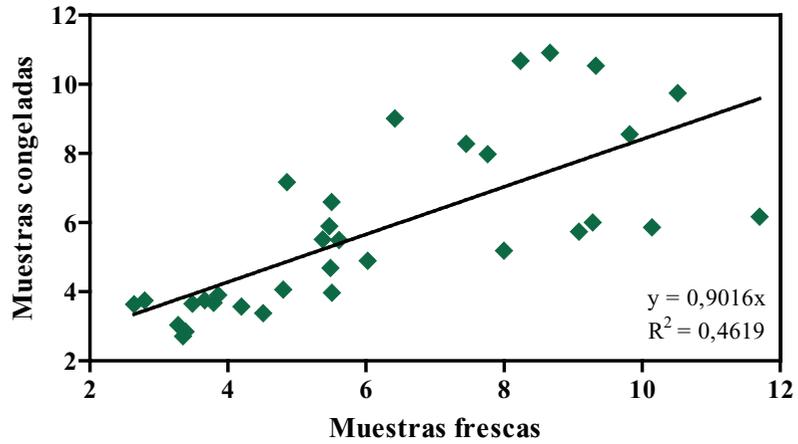


Figura 5. Relación entre muestras frescas y congeladas para proteína soluble.

Figure 5. Relationship between fresh and frozen samples for soluble protein.

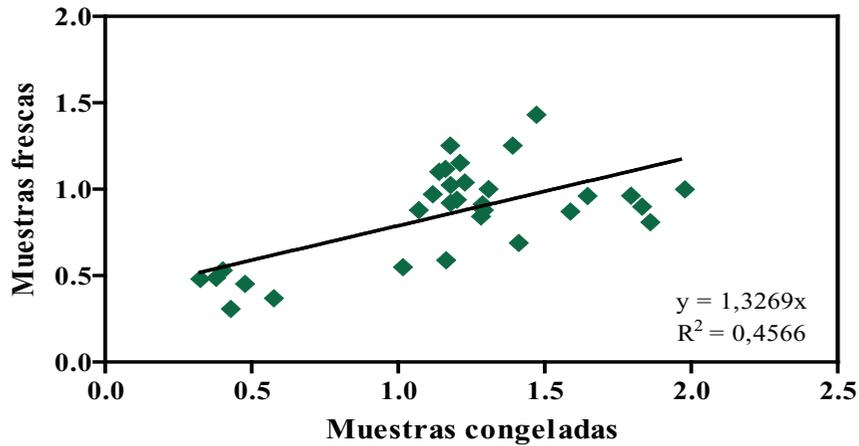


Figura 6. Relación entre muestras frescas y congeladas para nitrógeno insoluble de la fibra detergente neutro (FDNIN).

Figure 6. Relationship between fresh and frozen samples for insoluble nitrogen of the neutral detergent fiber (NDIN).

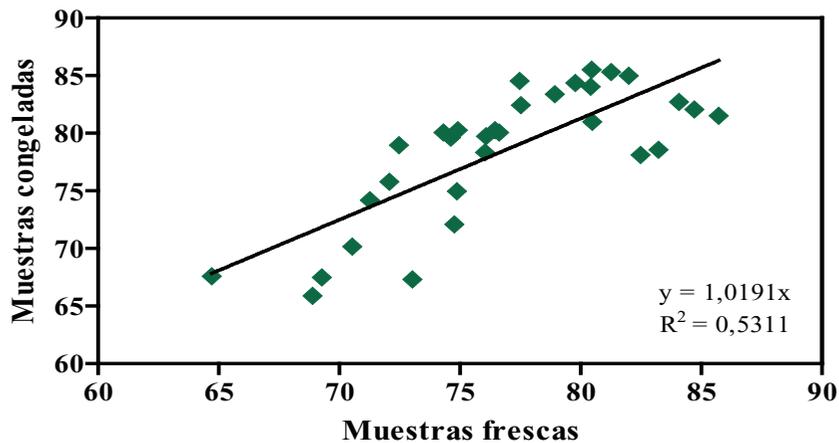


Figura 7. Relación entre muestras frescas y congeladas para digestibilidad *in vitro*.

Figure 7. Relationship between fresh and frozen samples for *in vitro* digestibility.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio muestran que el congelamiento afectó la composición química de los forrajes, específicamente con un aumento en la FDA y un aumento en la FDNIN, mientras que las otras variables no se vieron afectadas.

REFERENCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST (AOAC). 1996. Official methods of analysis of AOAC International, 16th ed. Gaithersburg, MD, USA.
- ALOMAR, D. 1996. Efecto del estado fenológico sobre la composición químico-nutricional de tres gramíneas forrajeras. *Agro Sur* 24(1): 14-22.
- ALOMAR, D., FUCHSLOCHER, R., DE PABLO, M. 2003. Effect of preparation method on composition and NIR spectra of forage samples. *Animal Feed Science and Technology* 107(1-4): 191-200. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00124-X](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00124-X)
- ANRIQUE, R., VALDERRAMA, X., FUCHSLOCHER, R. 1995. Composición de alimentos para el ganado de la zona sur. Universidad Austral de Chile, Fundación Fondo de Investigación Agropecuaria, Valdivia, Chile.
- BALOCCHI, O. 1999. Recursos forrajeros utilizados en producción de leche. En: Latrille, L., (Ed.), *Producción Animal*. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Producción Animal, Valdivia, pp. 186-214.
- BERNIER, R. 1988. Fertilización de Praderas. *Boletín Técnico* N° 136, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Osorno, Chile, pp. 1-20. <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/boltec/NR07800.pdf>
- CONRAD, H., MARTZ, F. 1985. Forages for dairy cattle. In: Heath, M., Barnes, R., Metcalfe, D. (Eds.), *Forages: the science of grassland agriculture*. Iowa State University Press, Iowa, USA, pp. 550-559.
- CUEVAS, E., BALOCCHI, O., ANRIQUE, R., JORQUERA, M. 1982. Valor nutritivo de las principales especies de una pradera permanente en la Décima Región. I. Proteína y pared celular. *Agro Sur* 10(2): 79-83.
- CUEVAS, E., ANRIQUE, R., BALOCCHI, O. 1983. Producción, utilización y calidad de una pradera permanente del sur de Chile. *Agro Sur* 11(2): 98-104.
- DEINUM, B., MAASSEN, A. 1994. Effects of drying temperature on chemical composition and in vitro digestibility of forages. *Animal Feed Science and Technology* 46(1-2): 75-86. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90066-3](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90066-3)
- DE PABLO, M. 2002. Efecto de los métodos de congelado y secado sobre características espectrales (NIRS) y composición nutricional de forrajes frescos. Tesis de Grado Ingeniero Agrónomo, Universidad Austral de Chile. 82 p.
- DESROSIER, N., DESROSIER, J. 1977. The technology of food preservation, 4th ed. AVI Publishing Company, Inc., USA.
- FERNÁNDEZ, P. 2007. Efecto de la fertilización sobre la composición botánica, producción y calidad en praderas del dominio húmedo de Chile. Tesis de Grado Ingeniero Agrónomo, Universidad Austral de Chile. 73 p.
- GARRIDO, O., MANN, E. 1981. Composición química, digestibilidad y valor energético de una pradera permanente de pastoreo a través del año. Tesis de Grado Ingeniero Agrónomo, Universidad Austral de Chile. 59 p.
- GRIGGS, T., LOBOS, K., KINGERY, P. 1999. Digestibility analysis of undried, unground, and dry ground herbage by near-infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science* 39(4): 1164-1170. <https://doi.org/10.2135/cropsci1999.0011183X003900040036x>
- LÓPEZ, S., HOVELL, F., MANYUCHI, B., 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(3): 439-450. <https://doi.org/10.1017/S135772980001331X>
- MACRAE, J., CAMPBELL, D., EADIE, J. 1975. Changes in the biochemical composition of herbage upon freezing and thawing. *Journal of Agricultural Science* 84(1): 125-131. <https://doi.org/10.1017/S0021859600071963>
- MARTINO, M., ZARITZKY, N. 1988. Ice crystal size modifications during frozen beef storage. *Journal of Food Science* 53(6): 1631-1637. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb07802.x>
- O'NEIL, K., 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. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77373-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77373-7)
- PARK, R., AGNEW, R., KILPATRICK, D. 2002. The effect of freezing and thawing on grass silage quality predictions based on near infrared reflectance spectroscopy. *Animal Feed Science and Technology* 102(1-4): 151-167. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00247-X](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00247-X)
- PELLETIER, S., TREMBLAY, G., BERTRAND, A., BÉLANGER, G., CASTONGUAY, Y., MICHAUD, R. 2010. Drying procedures affect non-structural carbohydrates and other nutritive value attributes in forage samples. *Animal Feed Science and Technology* 157(3-4): 139-150. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2010.02.010>
- PETERSEN, J., BARTON II, F., WINDHAM, W., HOVELAND, C. 1987. Botanical composition definition of tall fescue-white clover mixtures by near

- infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science* 27(5): 1077-1080. <https://doi.org/10.2135/cropsci1987.0011183X002700050050x>
- PLAYNE, M., MCDONALD, P. 1966. The buffering constituents of herbage and of silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 17(6): 264-268. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740170609>
- RAMÍREZ, G. 2007. Tasa de crecimiento y predicción de la composición nutricional por espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano de praderas permanentes en tres zonas agro ecológicas de la Décima Región. Tesis de Grado Ingeniero Agrónomo, Universidad Austral de Chile. 110 p.
- TILLEY, J., TERRY, R. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society* 18(2): 104-111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>
- VAN SOEST, P., ROBERTSON, J., LEWIS, B. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74(10): 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- WHITE, R., HELYAR, K., RIDLEY, A., CHEN, D., HENG, L., EVANS, J., FISHER, R., HIRTH, J., MELE, P., MORRISON, G., CRESSWELL, H., PAYDAR, Z., DUNIN, F., DOVE, H., SIMPSON, R. 2000. Soil factors affecting the sustainability and productivity of perennial and annual pastures in the high rainfall zone of south-eastern Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 40(2): 267-283. <https://doi.org/10.1071/EA98013>

