

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE ZOOTECNIA

**EFEECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON DOS TIPOS DE CARBOHIDRATOS EN
EL CONCENTRADO SOBRE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA, EN
VACAS LECHERAS EN PASTOREO PRIMAVERAL**

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.

MARIANNE HILDEGARD STRAUCH STANGE

VALDIVIA – CHILE

2003

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Rubén Pulido F.

PROFESOR COPATROCINANTE

Dr. Patricio Orellana B.

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Fernando Wittwer M.

Ing. Bruno Twele W.

FECHA DE APROBACIÓN: 10 de diciembre del 2003.

ÍNDICE

CAPÍTULO	PÁGINA
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	12
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSIÓN	24
7. BIBLIOGRAFÍA	30
8. ANEXOS	37
9. AGRADECIMIENTOS	38

**A mis padres
y hermanas.....**

1. RESUMEN

El propósito del presente ensayo fue estimar la síntesis de proteína microbiana ruminal y el rendimiento microbiano en vacas lecheras a pastoreo suplementadas con dos tipos de concentrados con diferentes fuentes de carbohidratos.

El ensayo tuvo una duración de 63 días, para lo cual se utilizaron 12 vacas Frisón Negro, las que al inicio del ensayo, presentaban en promedio una producción de leche de 33 l/día, un peso vivo de 529 Kg y se encontraban en su segundo mes de lactancia.

El diseño estadístico fue un cuadrado latino de 3 x 3. Los factores utilizados fueron 3 tratamientos, 3 periodos (de 21 días cada uno) y 4 cuadrados. Los tres tratamientos fueron: sólo pastoreo (TSP), pastoreo + 6 Kg diarios de fibra digestible, como coseta seca de remolacha (TCF) y pastoreo + 6 Kg diarios de almidón, como cebada (TCA). En la última semana de cada periodo del ensayo se obtuvieron de cada vaca 2 muestras de orina al día (AM y PM), por 2 días seguidos. En la orina se determinó las concentraciones de creatinina, ácido úrico y alantoína, con el fin de calcular la excreción de derivados de purinas, purinas absorbidas y aporte de nitrógeno microbiano para estimar la proteína microbiana digestible.

Para los tratamientos TSP, TCF y TCA la síntesis de proteína microbiana diaria fue de 897, 964 y 1035 g, respectivamente ($p > 0,05$; d.e. 52,9) y la síntesis de nitrógeno microbiano por Kg de materia seca ingerida fue de 7,4; 7,3 y 7,1 g, respectivamente ($p > 0,05$; d.e. 0,4).

Se concluye, que la suplementación con dos tipos diferentes de carbohidratos en el concentrado, no afecta la síntesis de proteína microbiana en vacas lecheras a pastoreo.

Palabras claves: Vacas, purinas, proteína metabolizable, concentrados.

2. SUMMARY

In a 3 x 3 Latin Square trial using four Squares, 12 Block Friesian cows initially weighing 529 Kg, yielding 33 litres milk daily and in the second months lactation curve used to determinate the microbial protein yield and efficiency of synthesis under grazing conditions and when supplemented with two differents sources of carbohydrates. The three treatments, were: grazing alone (TSP), grazing + 6 Kg per day of digestible fibre as sugar beet-pulp (TCF) and grazing + 6 Kg per day of starch as barley (TCA).

Pre-and post-12:00 h in each of two consecutive days within the last seven days of each 21 days period, urine was sampled for the determination of creatinine, uric acid and allantoin from which daily excretion of purine derivatives, absorbed purines and microbial nitrogen supply were calculated and the contribution of digestible microbial protein estimated.

For treatments TSP, TCF and TCA daily microbial protein synthesis were (g) 897, 964 and 1035 respectively ($p > 0,05$; s.d. 54,9) and microbial yields per Kg dry matter intake were (g) 7,4; 7,3 and 7,1, respectively ($p > 0,05$; s.d. 0,4).

Therefore different carbohydrate sources did not affect significatly microbial protein synthesis in grazing cows in this trial.

Key word: Cows, purine, metabolizable protein, concentrate.

3. INTRODUCCIÓN

La Décima Región de Chile cuenta con una superficie de 1.350.000 hectáreas (há.) de praderas, de las cuales un 90% son permanentes (Chile, 1997). La producción anual de estas praderas varía entre un rango de 4 toneladas de materia seca por año para praderas no fertilizadas, hasta 12 toneladas de materia seca por hectárea en condiciones de fertilización completa (Balocchi, 1998). La superficie destinada a la lechería fue estimada en más de 563.000 há. (Latrille, 1998).

Por otra parte, el VI Censo Nacional Agropecuario, determinó que la Décima Región presenta una población de 380.000 vacas, lo que corresponde al 61,5% del total de vacas lecheras del país (Chile, 1997), mostrando así una marcada orientación hacia dicho rubro.

3.1. RECURSOS ALIMENTICIOS

3.1.1. La pradera y sus limitantes

En el sur de Chile, los sistemas de producción de leche basan su alimentación fundamentalmente en el pastoreo directo de praderas permanentes (Balocchi y col., 2002), ya que éste es sin duda el alimento más económico para los rumiantes y se debe utilizar al máximo en las raciones (Jahn, 1996).

Estudios nacionales señalan que en primavera la producción de leche en vacas alimentadas exclusivamente a base de pastoreo de praderas permanentes es de 20 a 24,5 Kg de leche al día (Lanuzza, 1988; Beck y Pessot, 1992). Sin embargo, la producción de leche basada en pastoreo presenta gran variabilidad, ya que depende del potencial productivo de los animales y de la disponibilidad y calidad de la pradera (Holmes, 1989). La disponibilidad es mayor en primavera (39%) y en verano (29%), seguido por un periodo interesante en otoño (25%) y bajo en invierno (6%). Esto significa que hay épocas de alimentación insuficientes para los animales, lo que no permite satisfacer los requerimientos nutricionales de vacas lecheras de alta producción (Leaver, 1985; Holden y col., 1994).

La marcada estacionalidad en el crecimiento de las praderas obliga a realizar un balance forrajero anual, en el cual se debe contemplar varias estrategias que permitan suplir dicho inconveniente. En general existen dos estrategias, la primera considera el uso de forrajes, que incluye cultivos suplementarios de verano y de invierno, y la práctica de conservación de forrajes, ya sea como heno o ensilaje (Balocchi, 1998). Durante el periodo invernal, se utiliza preferentemente ensilaje de praderas permanentes, principalmente de ballica perenne (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*), y cantidades limitadas de heno de regular calidad. En los últimos años se ha incrementado el uso de praderas de alfalfa para disminuir los problemas que genera la sequía durante el verano y también se ha aumentado la superficie de maíz para ensilaje (Jahn, 1996).

La otra estrategia para suplir el déficit de alimentación dado por la marcada estacionalidad en el crecimiento de las praderas, consiste en el uso de un alimento concentrado altamente energético (Mc Gilloway y Mayne, 1996), ya que la energía es la primera limitante nutricional para vacas de alta producción mantenidas a pastoreo (Kolver y Muller, 1998). Sin embargo, es conocido que la suplementación energética no siempre tiene el efecto esperado, lo cual sugiere que la energía no sería el único factor limitante de la producción, sino que existirían otros factores del forraje involucrados. Éstos son el nivel de carbohidratos estructurales y no estructurales, el nivel de materia seca y la cantidad y tipo de proteína presente. Todos éstos actuarían solos o asociados al aporte de energía (Kellaway y Porta, 1993; Peyraud y col., 1997; Muller, 1999).

Para determinar los niveles de concentrado a utilizar, se deben considerar el precio de la leche y el precio relativo del concentrado. Así, en situaciones en que los precios de leche son bajos, los sistemas de producción basados en forrajes y bajos niveles de concentrado, son los más rentables para el productor, sin embargo, con mayores precios de leche se justifica elevar los niveles de concentrado y utilizar forrajeras de mayor nivel productivo. Por otra parte, cuando el precio relativo del concentrado es bajo, se puede utilizar mayores niveles de concentrado para elevar los niveles productivos por vaca, permitiendo de esta manera aumentar la carga animal, con el consiguiente incremento de la producción de leche por hectárea (Jahn, 1996).

La importancia de la suplementación en épocas de escasez de praderas, radica en que cuando las vacas se mantienen pastoreando una pradera de alta calidad y sin suplementación, presentan una ingesta más baja de materia seca (19,0 vs. 23,4 Kg/día) y una menor producción de leche (29,6 vs. 44,1 Kg/día), que las vacas suplementadas. Por lo tanto, para sobrepasar el límite máximo en producción que impone la pradera, se requiere la provisión de un alimento concentrado de alta concentración energética (Mc Gilloway y Mayne, 1996).

Sin embargo, Rearte (1997), señala que el uso de suplemento conlleva a un efecto de sustitución de forraje por concentrado, por lo que la eficiencia de la suplementación dependerá de varios factores, tales como cantidad de alimento concentrado, cantidad de pradera ofrecida, digestibilidad de la pradera, propiedades físicas y químicas del concentrado y etapa de lactancia. La cantidad de pradera ofrecida por vaca al día es el factor que tiene mayor efecto en la tasa de sustitución (Bargo y col., 2002).

Es aceptado que la tasa de sustitución es el principal factor que contribuye en la variación de la producción de leche (Thomas y col., 1991). Bajas tasas de sustitución, producen mayor producción de leche por kilogramo (Kg) de suplemento (Bargo y col., 2002). En un estudio realizado por Kellaway y Porta (1993), se determinó que vacas con una producción de leche menor a 20 Kg/día y alimentadas con pradera restringida, responden con un promedio de 0,6 Kg de leche/Kg de concentrado y cuando las vacas son alimentadas con pradera a libre disposición, la respuesta productiva a la suplementación es casi nula.

Dixon y Stockdale (1999), señalan que la tasa de sustitución es menor cuando la ingesta de energía es menor a los requerimientos de la vaca. Por lo tanto, una baja tasa de

sustitución y una alta respuesta productiva, pueden ser esperadas en vacas lecheras de alta producción, debido a su alto potencial genético de ingesta y producción de leche, y baja utilización de energía proveniente del concentrado para su mantenimiento (Kellaway y Porta, 1993).

Otra ventaja de la suplementación con concentrado, es que incrementa la producción de proteína en la leche y la concentración de glucosa en el plasma. También, disminuye la concentración de nitrógeno ureico en leche y plasma, lo que sugiere que la suplementación con concentrado mejora la eficiencia de utilización del nitrógeno de la dieta (Bargo y col., 2002).

3.1.2. Alimentos concentrados y sus requerimientos

Los alimentos suplementarios consideran los concentrados proteicos y energéticos, los cuales son usados en forma estratégica, debido a su alto costo. Por su parte, entre los alimentos energéticos podemos señalar los granos de cereales, subproductos de la industria molinera, subproductos de la industria cervecera, subproductos de la industria azucarera, aceites y grasas (Cañas, 1998). Por otra parte, los alimentos proteicos se clasifican según su fuente de origen, en alimentos de origen animal, origen vegetal y nitrógeno no proteico (NNP).

Para determinar la cantidad de proteína que es necesaria aportar en la dieta de los bovinos, se debe considerar los requerimientos de proteína degradable del rumen y los requerimientos de aminoácidos o proteína metabolizable para el mantenimiento, crecimiento, preñez y lactancia de estos animales (Webster, 1993). Durante la lactancia temprana, las vacas lecheras requieren entre 16 a 18% de proteína cruda en la dieta, mientras que en el resto de la lactancia requieren entre 12 a 14%. Esta cantidad varía de acuerdo a la degradabilidad de la proteína en el rumen. La cantidad de proteína degradable depende de factores intrínsecos del alimento (Kellaway y Porta, 1993) y de la tasa de pasaje, la cual está directamente relacionado con el nivel de consumo (AFRC, 1993).

3.2. PROTEÍNA MICROBIANA RUMINAL

La proteína es el nutriente más costoso y limitado para animales de alta producción (Van Kessel y Russel, 1995), sin embargo, los rumiantes tienen la ventaja de no requerir proteína de calidad específica, ya que los microorganismos del rumen digieren las proteínas del alimento y sustancias simples como urea y otras fuentes de NNP, convirtiéndolos en proteína bacteriana de excelente calidad (Cañas, 1998). Por lo tanto, la proteína que escapa de la degradación ruminal es más cara que la proteína microbiana, por lo que la eficiencia de la producción de proteína microbiana tiene mayor impacto en la producción animal (Van Kessel y Russel, 1995).

3.2.1. Síntesis de proteína microbiana (PMC)

La proteína metabolizable, se define como la proteína total digestible (aminoácidos) disponible para el metabolismo del animal, después de que el alimento ha sufrido el proceso de digestión y absorción a nivel del tracto gastrointestinal. Esta proteína está compuesta por proteína microbiana digestible y proteína dietaria no degradable (AFRC, 1995).

La proteína microbiana digestible se origina de la actividad de los microorganismos ruminales, los cuales sintetizan proteína a partir de la energía fermentable presente en el alimento y de los aminoácidos o NNP originados de la degradación de la proteína dietaria a nivel ruminal (AFRC, 1995).

La cantidad de proteína de los forrajes que se degrada en el rumen, varía entre un 30% para las proteínas menos solubles, hasta 80% para la mayoría de las raciones. Durante su paso por el rumen, gran parte de ella es degradada hasta aminoácidos, los cuales darán origen finalmente a los ácidos grasos volátiles, dióxido de carbono y amoníaco (Bondi, 1988). El amoníaco es utilizado por los microorganismos ruminales, si existe suficiente energía, para la síntesis de proteína microbiana. (Maynard y col., 1988). En circunstancias normales al menos el 70% de la proteína microbiana es sintetizada a partir de amoníaco (Webster, 1993). Parte del amoníaco liberado en el rumen no puede ser fijado por los microorganismos, por lo que se absorbe por el rumen y es llevado por la sangre hasta el hígado, donde se transforma en urea. La mayor parte de ésta es excretada por la orina, con un consiguiente gasto energético para el animal y la otra parte de la urea, pero menor, es excretada por la leche (Maynard y col., 1988). La cantidad de proteína microbiana sintetizada en el rumen, proteína no degradable en el rumen y proteína de origen endógeno que alcanzan el duodeno, determinan la cantidad de aminoácidos disponibles para la absorción intestinal (Vérité y Peyraud, 1989; Madsen y col., 1995; NRC, 2001). Estos aminoácidos son utilizados para sintetizar proteínas que participan en el crecimiento de tejido, en la producción de proteína láctea y en el metabolismo normal (Bondi, 1988).

Se ha señalado, que dos tercios a tres cuartos de los aminoácidos absorbidos por el rumiante derivan de la proteína microbiana (Dewhurst y col., 2000), por lo cual ésta es considerada la fuente proteica primaria para vacas lactantes (Muller, 1996). De esta proteína microbiana, el 25% corresponde a ácidos nucleicos, los cuales no pueden ser utilizados por el rumiante para la síntesis de tejidos, leche, etc. (AFRC, 1995; Smith y Mc Allan, 1970), por lo que son transformados por el hígado a derivados de purina y luego eliminados por la orina (Tamminga y Chen, 2000). Por lo tanto, el 75% de la proteína microbiana corresponde a proteína microbiana verdadera, como proteínas, péptidos y aminoácidos libres, de los cuales el 85% es digestible a nivel intestinal. De este modo el 63,75% de la proteína microbiana corresponde a proteína microbiana digestible (AFRC, 1993).

3.2.2. Factores que influyen en la síntesis de proteína microbiana

Los factores que mayormente influyen en la síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal, son la cantidad de energía y nitrógeno disponible en el rumen, y el nivel de consumo de alimento por el animal. La energía fermentable en el rumen es necesaria para que la

fracción degradable ruminalmente de la proteína dietaria y el nitrógeno no proteico, sean eficientemente utilizados por los microorganismos ruminales para su crecimiento y síntesis de proteína microbiana (AFRC, 1995). Por lo tanto, una fuente adicional de energía en la dieta pueden ser los concentrados energéticos. Según el tipo de carbohidrato que contengan los concentrados, ya sea, almidón o fibra digestible, será la velocidad de fermentación en el rumen (Meijs, 1986; Kibon y Holmes, 1984) y por consiguiente, la cantidad de proteína microbiana sintetizada (Webster, 1993).

Evaluaciones preliminares sugieren que el uso de un concentrado rico en fibra digestible podría aumentar el pH del rumen, facilitar la síntesis de proteína microbiana y aumentar la producción de leche (Muller, 1996). El uso de la coseta de remolacha en estos concentrados sería una excelente fuente de energía metabolizable, la que mayormente provendría de la fibra digestible, por lo que fermentaría más lentamente en el rumen, sincronizando mejor con las necesidades de los microorganismos ruminales (Webster, 1993). Por su parte, los concentrados amiláceos, por su rápida fermentación en el rumen, promoverían un incremento en la acidez del rumen y altas tasas de sustitución de forraje por concentrado, por lo que es esperable un efecto negativo en el funcionamiento ruminal (Webster, 1993), pero con una mayor respuesta en la producción de leche (Thomas y col., 1991). Sin embargo, Rearte (1997), señala que el suplemento cualquiera que fuese, sólo modificará el ambiente ruminal, cuando tenga un efecto mayoritario y significativo en el consumo total de materia seca. De esta manera, parecería que el tipo de carbohidrato en el suplemento podría ser un factor muy importante a considerar para optimizar la suplementación en pastoreo, el funcionamiento ruminal, el consumo de materia seca total, y por ende la respuesta productiva del animal a pastoreo (Leaver, 1986; Peyraud y col., 1997).

Otro factor de importancia en la síntesis de PMC es el grado de sincronización de los aportes de nitrógeno (N) y sustratos que aporten energía para los microbios ruminales, debido a que influye en la utilización de la proteína degradable en el rumen y aumenta la producción animal (Kolver y Muller, 1998). Por lo tanto, en vacas lecheras con producción a pastoreo se requiere aportar un suplemento, como una fuente de energía adicional a la pradera y disponible en el rumen, para así mejorar la utilización de los altos niveles de proteína degradable de la pradera y de esa manera estimular la síntesis de proteína microbiana (Muller, 1999). Sin embargo, en un estudio realizado por Kolver y Muller (1998), no se logró aumentar la producción de leche al sincronizar la degradación de los carbohidratos y el N de la pradera, vía suplementación energética. Esto señalaría, que es necesario seguir evaluando el efecto de la suplementación de vacas en pastoreo, no considerando el aporte de energía, si no el tipo de carbohidrato que aporta ésta (Muller, 1999).

Según Kellaway y Porta (1993), para la síntesis de 8-11 g de proteína microbiana, se necesita 1 megajoule (MJ) de energía metabolizable de origen no graso. Esta proporción se incrementa con la calidad del alimento. Cuando la cantidad de grasa de la dieta se encuentra entre un 3 a 6%, la producción de proteína microbiana se reduce, incrementándose los requerimientos para la proteína no degradable de la dieta.

3.3. ORIGEN Y DESTINO DE LOS DERIVADOS DE PURINAS (DP)

Las bases púricas de los ácidos nucleicos microbianos, al ser metabolizados constituyen la principal fuente de los DP urinarios (origen exógeno) y sólo una pequeña fracción proviene de los ácidos nucleicos de los tejidos (origen endógeno) (Tamminga y Chen, 2000). Su excreción diaria está relacionada directamente con la cantidad de purinas absorbidas al día (Chen y col., 1990; Verbic y col., 1990). Entonces, la excreción de DP provee una medida de la cantidad de ácidos nucleicos microbianos absorbidos por el duodeno y por lo tanto de la síntesis de PMC en los rumiantes (Rys y col., 1975; Chen y col., 1991).

Los derivados de purinas excretados en la orina de rumiantes, incluyen alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina (Fujihara y col., 1987). Sin embargo, solamente se ha encontrado alantoína y ácido úrico en la orina de los bovinos, debido a que poseen una alta actividad de la enzima xantina oxidasa en la sangre y tejidos. Ésta convierte la xantina e hipoxantina en ácido úrico, previo a su excreción por la orina, excretándose finalmente sólo alantoína y ácido úrico (Chen y Gomes, 1992), los cuales no están disponibles para ser utilizadas por el tejido animal (Verbic y col., 1990). Consecuentemente, la alantoína es la más importante en los bovinos (Bargo y col., 2002), encontrándose entre un rango descrito para vacas de 89 a 97% (Giesecke y col., 1994; Gonda y col., 1996; Vagnoni y col., 1997).

La principal vía de eliminación de los DP es la vía urinaria. Sin embargo, algunos de los DP de la sangre también pueden ser eliminados por el intestino (vía saliva o a través de la pared intestinal) y la leche. Una vez que la alantoína y ácido úrico son secretados dentro del intestino delgado, ya no pueden volver a entrar a la sangre para ser excretados por la orina (Chen y Gomes, 1992).

La cantidad de derivados de purinas eliminados por la vía no renal es función de la concentración plasmática de DP, siendo proporcional a la cantidad de DP que entra a la sangre. Su eliminación se realiza a una tasa constante de clearance de cerca de 30%/hora (Chen y Gomes, 1992).

La calidad de la dieta puede influenciar el aporte de nitrógeno microbiano, sin embargo, la concentración de DP en muestras puntuales de orina puede no reflejar este efecto por razones relacionados con el volumen urinario y/o catabolismo de los tejidos. De esta manera, no es sorprendente que la concentración de DP en la orina tenga poca relación con la ingesta, cuando la energía es insuficiente para las necesidades de mantenimiento (Nsahlai y col., 2000)

El estado de lactancia es otro factor que influye en la concentración de DP excretados en la orina, ya que la excreción de DP en la orina no es constante a lo largo de la lactancia. En la lactancia temprana la proporción de bases púricas recuperadas en la orina (0.44 ± 0.063) es significativamente menor que en la lactancia tardía (Gonzalez-Ronquillo y col., 2003). No existe información disponible del efecto del estado fisiológico en el metabolismo de los DP, pero puede que la diferencia entre estados de lactancia esté relacionada con la baja eficiencia de absorción. Si la lactancia afecta a las enzimas involucradas en el metabolismo de las

purinas (Johnson y col., 1998), se podría explicar el cambio en la eficiencia de absorción y metabolismo, o alternativamente la distribución entre la vía renal y no renal (Gonzalez-Ronquillo y col., 2003).

Cuando se utiliza la excreción diaria de los derivados de purinas para calcular la cantidad de purinas exógenas absorbidas por el animal, se requiere corregir la contribución de DP de origen endógeno (Chen y Gomes, 1992).

3.3.1. Contribución endógena a la excreción de derivados de purinas

La fracción endógena proviene de los ácidos nucleicos de los tejidos. Su magnitud no es constante entre especies (Chen y col., 1990; Orellana Boero y col., 2001) ni dentro de una misma especie (Liang y col., 1994), y no se sabe si es afectado por la producción o por el estado fisiológico de los animales (Gonzalez-Ronquillo y col., 2003). Según Chen y col. (1992 a), la excreción endógena está relacionada con el peso metabólico de los animales, por lo que al aumentar éste, la excreción endógena también aumenta. En el bovino la excreción endógena de DP es de 385 micromol por Kg de peso metabólico ($\mu\text{mol/Kg PV}^{0.75}$) al día y se sugiere que el coeficiente de recuperación de los DP endógenos es de 0.85, donde la recolección no es completa, porque hay pérdidas en el plasma por vía no renal (Verbic y col., 1990).

Los microbios ruminales no discriminan entre urea de la dieta y urea endógena, reciclada de la sangre al rumen vía saliva o través de la pared ruminal, para degradarla a amoníaco e incorporarla dentro de la proteína (Webster, 1993).

La excreción endógena de DP, por Kg de peso metabólico, es tres veces mayor en los bovinos que en los ovinos (530 y 150 $\mu\text{mol/Kg PV}^{0.75}$ por día, respectivamente). Esta diferencia entre ovinos y bovinos se debe a que los tejidos en el bovino poseen una alta actividad de xantina oxidasa (Chen y Gomes, 1992).

3.4. MÉTODOS DE ESTIMACIÓN DE LA PROTEÍNA MICROBIANA EN EL RUMEN

La medición del contenido de proteína microbiana ruminal es un área importante en el estudio de la nutrición proteica de los rumiantes (Valadares y col., 1999), ya que permite predecir cuanta proteína aporta el ambiente ruminal al intestino delgado, con el fin de corregir problemas en la dieta y utilizar de mejor forma el nitrógeno que entregan los forrajes y las fuentes de proteína de mayor costo económico (Dewhurst y col., 2000).

Existen diversas técnicas para estimar la síntesis de proteína microbiana, entre las que se encuentran:

- Técnica “in vitro”, la cual pretende simular las condiciones del rumen (Cañas, 1998), incubando una muestra de alimento con licor buffer ruminal (Miller, 1982).

- Técnica “in situ”, que permite estimar la concentración de proteína degradable ruminal (Coblentz y col., 1999), incubando alimento en bolsas que se introducen en el rumen (Hvelplund y Weisbjerg, 2000).
- Técnica “in vivo”, que mide la proteína microbiana producida en el rumen y la proteína dietaria que se escapa de la degradación ruminal (AFRC, 1993), usando animales con cánulas ruminales y/o duodenales (Valadares y col., 1999). Las técnicas que utilizan animales tienen la desventaja de ser invasivas, costosas, tediosas y sujetas a error (Tamminga y Chen, 2000).

Debido a la gran importancia que ha adquirido el bienestar animal en estos últimos años, se ha desarrollado un método no invasivo de cuantificación de la excreción urinaria de los DP. Este método asume que el paso de ácidos nucleicos por el duodeno es esencialmente de origen microbiano. En este lugar son digeridos y absorbidos como derivados de purinas, los cuales son excretados proporcionalmente por la orina (Valadares y col., 1999). Por lo tanto, la excreción de DP puede estimar la síntesis de proteína microbiana, si la razón purina: total de nitrógeno microbiano ruminal es constante (Tamminga y Chen, 2000). Para obtener la totalidad de los DP (alantoína y ácido úrico) excretados diariamente se requiere la recolección diaria total de orina, pero para hacerla aplicable a condiciones de animales a pastoreo, es posible sacar muestras puntuales de orina, ya que la producción de DP es constante durante el día (Chen y col, 1992 b) y la dilución de la orina se puede corregir mediante la concentración de la muestra urinaria con un marcador (Orellana y col., 1998).

La creatinina, producto final de la degradación de la fosfocreatinina, puede ser usada como un marcador interno en este método (Gonda, 1995), ya que cumple con los requisitos de ser excretada en forma constante por la orina y de ser independiente, tanto del consumo de alimento como de la producción (Orellana y col., 1998). Según Brody (1945), es excretada en proporción al peso vivo ($N\text{-Creatinina (mg/día)} = 12,7 PV^{0,896}$) dentro de un amplio rango de pesos (0,02 a 800 Kg de peso vivo).

Antoniewicz y col. (1981), encontraron que la excreción diaria de alantoína (A) y creatinina (CT) en ovejas fue suficientemente constante como para predecir la excreción diaria de alantoína a partir de la razón A/CT de la orina (concentración de A en muestras puntuales), con una alta correlación con los valores medidos en la orina total (CV = 13,3%). La razón A/CT puede ser corregida por el peso metabólico, para facilitar la comparación entre animales (Chen y col, 1992 b).

Tamminga y Chen (2000), mencionan que al utilizar muestras puntuales de orina se disminuye la sensibilidad de los resultados, no obstante, permite destacar diferencias entre distintos manejos de alimentación, por lo que los resultados no se deben tomar como valores absolutos, sino como valores comparativos.

Para calcular la excreción diaria total de DP se utiliza la siguiente ecuación (Tamminga y Chen, 2000):

$$Y = (0,385 W^{0,75}) + 0,85 X$$

Donde:

Y : Excreción diaria total de DP (mmol día⁻¹).

W^{0,75} : Peso metabólico corporal.

X : Absorción de purinas exógenas (mmol día⁻¹).

Dentro de las ventajas de utilizar este método no invasivo de cuantificación de la excreción urinaria de los DP, destacan el hecho de que es más simple y económica, debido a que no se requiere realizar procesos quirúrgicos en los animales, y sólo es necesario contar con instrumental de laboratorio, como un espectrofotómetro ultravioleta o un cromatógrafo (Tamminga y Chen, 2000).

Los objetivos de esta memoria de título son estimar la síntesis de proteína microbiana ruminal y el rendimiento microbiano, mediante la determinación de derivados de purinas excretados por la orina en vacas lecheras a pastoreo y suplementadas con dos tipos de concentrados con diferente fuente de carbohidratos. A su vez, la hipótesis que se plantea es que el tipo de carbohidrato ofrecido en el concentrado como suplemento a vacas en pastoreo no afecta la síntesis de proteína microbiana.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA

El ensayo se realizó en la estación experimental Vista Alegre de la Universidad Austral de Chile, ubicada a 6 kilómetros al norte de la ciudad de Valdivia, Décima Región de Los Lagos, Chile. Geográficamente se encuentra entre los paralelos 39°47'46" y 39°48'54" latitud sur y los meridianos 73°13'13" y 73°12'24" longitud oeste.

4.2. DURACIÓN DEL ENSAYO

El ensayo en pastoreo tuvo una duración de 63 días, realizándose entre el 30 de septiembre del 2002 y el 01 de diciembre del mismo año.

4.3. MATERIAL

4.3.1. Animales

Se utilizaron 12 vacas Frisón Negro Chileno, pertenecientes al rebaño lechero de la Universidad Austral de Chile, las cuales fueron seleccionadas de acuerdo a la época de parto, número de lactancia, producción de leche, peso vivo y días en lactancia al inicio del experimento. Los partos fueron en primavera, la mayoría de las vacas se encontraban entre su segunda y quinta lactancia, y presentaban una producción promedio de leche de 33 litros al día. Los pesos vivos y días en lactancia al inicio del experimento fueron en promedio 528.5 Kg y 53 días, respectivamente.

4.3.2. Alimentos

4.3.2.1. Praderas. Se utilizaron dos potreros, el N°16 y N°17, de 1.7 há. cada uno. La pradera utilizada fue de tipo permanente mejorada, con uniformidad en cuanto a composición botánica y manejo, ubicándose a no más de 300 a 500 metros de la sala de ordeña.

4.3.2.2. Concentrados. Se utilizaron dos tipos de concentrados pelletizados con diferentes fuentes de carbohidratos, una con fibra digestible y la otra con almidón, según como se detalla a continuación:

Concentrado F (CF), compuesto por un 11% de afrecho de soja y 89% de coseta seca de remolacha.

Concentrado A (CA), compuesto por un 10% de afrecho de soja y 90% de cebada.

4.3.2.3. Agua y sales minerales. Se ofrecieron sales minerales* y agua de bebida a libre disposición, tanto en el potrero como en el patio de espera de la sala de ordeña.

4.3.3. Muestreo de orina

Para almacenar las muestras de orina, se utilizaron frascos de plástico estéril de 30 ml cada uno. Cada frasco contenía 1 ml de ácido sulfúrico (10%), con el objetivo de mantener el pH de la orina bajo 3 e impedir el crecimiento bacteriano que destruye los DP de la orina (Chen y Gomes, 1992).

4.4. MÉTODOS

4.4.1. Tratamientos

Durante 3 periodos, de 21 días cada uno, los animales fueron asignados a 3 tratamientos, los cuales fueron:

- Tratamiento SP (TSP) : Sólo pastoreo.
- Tratamiento CF (TCF) : Pastoreo más 6 Kg de CF al día.
- Tratamiento CA (TCA) : Pastoreo más 6 Kg de CA al día.

Los periodos fueron:

- Periodo 1: Desde el 30 de septiembre al 20 de octubre del 2002.
- Periodo 2: Desde el 21 de octubre al 10 de noviembre del 2002.
- Periodo 3: Desde el 11 de noviembre al 01 de diciembre del 2002.

A su vez, cada periodo tuvo la siguiente división en el tiempo: del día 1 al 14 las vacas se adaptaron a la dieta (periodo pre-experimental) y del día 15 al 21 se tomaron las muestras (periodo experimental).

4.4.2. Alimentación y manejo de los animales

La suplementación consistió en 6 Kg de concentrado, la cual se dividió en dos raciones diarias de 3 Kg cada una. Estas fueron pesadas en una balanza electrónica y guardadas individualmente en una bolsa plástica rotulada con el número de la vaca, según el tratamiento en que se encontraba en ese momento. Cada una se ofreció individualmente durante la ordeña.

Las vacas se dividieron en 3 grupos, de 4 animales cada uno, y cada grupo de animales fue asignado a un tratamiento distinto en cada periodo, como se detalla a continuación:

*VETERSAL® (vaca lechera alta producción, Veterquímica S.A.).

	Periodo 1	Periodo 2	Periodo 3
Grupo 1	TSP	TCF	TCA
Grupo 2	TCF	TCA	TSP
Grupo 3	TCA	TSP	TCF

La pradera se ofreció a libre disposición. Los animales fueron manejados en un sólo grupo, con un sistema de pastoreo rotativo, asignándoles una superficie de pradera repartida en dos franjas diarias mediante el uso de cerco eléctrico móvil. La disponibilidad de pradera fue de 37 Kg MS/vaca/día. Ésta fue medida 3 veces a la semana con un plato medidor de MS de pradera marca Jenquip (Filip's folding plate pasture meter, New Zealand), realizando 100 mediciones por vez en forma de zig-zag, lo que permitió regular constantemente la superficie de pradera aportada a las vacas según su disponibilidad. La pradera contenida en cada franja se ofreció después de cada ordeña.

4.4.3. Muestreo y análisis de los alimentos

Las muestras de pradera y concentrado, recolectadas al inicio de cada periodo experimental del ensayo, fueron analizadas en el Laboratorio de Nutrición Animal, de la Universidad Austral de Chile, para determinar su composición química mediante los siguientes análisis:

- Materia seca (MS), se determinó mediante Horno de ventilación a 60°C por 48 horas y estufa a 105°C por 12 horas (Bateman, 1970).
- Cenizas totales (CT), se determinaron por combustión a 550°C por 5 horas (Bateman, 1970).
- Proteína cruda (PC), se determinó por medio del método Micro Kjeldhal ($N \times 6.25$) (Bateman, 1970).
- Energía metabolizable (EM), se determinó por regresión sobre el valor D (Garrido y Mann, 1981).
- Fibra detergente neutro (FDN), se determinó a través del método de Goering y Van Soest (1972), por digestión en detergente neutro (Bateman, 1970).

4.4.4. Muestreo y análisis de orina

En la última semana de cada periodo experimental, y durante dos días seguidos, se tomaron 2 muestras de orina por vaca al día, durante o después de la ordeña de la mañana y la tarde. El método de obtención de la orina fue la estimulación vulvar, eliminando los primeros chorros y recogiendo la orina en un frasco recolector. Mediante una jeringa se transfirió 9 ml de orina al frasco estéril con 1 ml de ácido sulfúrico (10%), se homogenizó y almacenó en un freezer a -20°C.

Al terminar el ensayo, las muestras de orina se enviaron al Departamento de Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, donde se cuantificó las concentraciones de creatinina, ácido úrico y alantoína (mmol/l). La técnica de

cuantificación utilizada fue la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) descrita por Resines y col. (1992), usando un Cromatógrafo Hitachi L-500 con bomba programable 655A-11, un detector UV 655 A acoplado a un integrador D-2000 y una columna LiChroSpher 100-RP18 5 μm (244 x4 mm).

4.4.5. Cuantificación de los derivados de purina en la orina y estimación de diferentes variables a partir de éstos

4.4.5.1. Concentración de los derivados de purina en las muestras de orina (mmol/l). Se obtuvo sumando las concentraciones de alantoína (mmol/l) y ácido úrico (mmol/l), obtenidas como se describe en el punto 4.4.4.

4.4.5.2. Estimación de la excreción diaria de derivados de purina. La cantidad de alantoína y ácido úrico excretados en la orina al día, en mmol/día, se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$A \text{ (mmol/día)} = A \text{ (mmol/l)} \times VO.$$

$$AU \text{ (mmol/día)} = AU \text{ (mmol/l)} \times VO.$$

Donde:

A (mmol/l): Concentración molar de alantoína por litro de orina.

AU (mmol/l): Concentración molar de ácido úrico por litro de orina.

Por su parte, el volumen urinario (VO), fue estimado a través de la siguiente fórmula:

VO : CT/CO, donde VO es el volumen de orina estimado (Al-Khalidi y Chaglassian, 1965), CT es la creatinina total excretada en el día (mg) y CO es la concentración de creatinina en la muestra de orina (mg/l).

El cálculo de CT se realizó de la siguiente manera:

CT : PV x C, donde PV es el peso vivo (Kg) y C es una constante que equivale a una excreción de creatinina de 26 mg/Kg PV (Lindberg, 1989).

4.4.5.3. Excreción diaria de los derivados de purina (Dpe). Este parámetro se determinó sumando la excreción diaria de alantoína (mmol/día) con la excreción diaria de ácido úrico (mmol/día).

4.4.5.4. Índice purínico. La excreción diaria de derivados de purinas en la orina corregida por el peso metabólico de los animales, y a la vez, la dilución de la muestra de orina corregida por la creatinina, se calculó por medio de la siguiente fórmula (Sánchez, 2003):

$$I.P = \frac{Dpe \times PV^{0,75}}{CT}$$

Donde:

IP : Índice purínico.

Dpe : Excreción diaria de derivados de purinas en la orina (mmol/día).

CT : Excreción diaria de creatinina en la orina (mmol/día).

PV^{0,75} : Peso metabólico del animal.

4.4.5.5. Estimación de la absorción diaria de purinas (PA). La absorción diaria de purinas provenientes de ácidos nucleicos microbianos, fue calculada en base a las excreciones diarias de los derivados de purinas (Dpe) por medio de la ecuación citada por Chen y Gomes (1992):

$$PA = \frac{Dpe - (0,385 \times PV^{0,75})}{0,85}$$

Donde:

PA : Purinas absorbidas por día (mmol/día).

Dpe : Excreción diaria de los derivados de purinas (mmol/día).

0,85 : Factor de recuperación como DP de las purinas absorbidas.

(0,385 x PV^{0,75}) : Contribución endógena de DP mmol/por kilo de peso metabólico.

4.4.5.6. Estimación del aporte de nitrógeno microbiano (NM). Se calculó según la fórmula citada por Chen y Gomes (1992):

$$NM = \frac{PA \times 70}{0,83 \times 0,116 \times 1000}$$

Donde:

NM : Nitrógeno microbiano (g/día).

PA : Purinas absorbidas (mmol/día).

70 : Contenido de nitrógeno en las purinas (mg N/mmol).

0,83 : Factor de digestibilidad de las purinas.

0,116 : Tasa de N de purinas : N total en los microorganismos ruminales (11,6 : 100).

4.4.5.7. Rendimiento microbiano (NM/MS). Se obtuvo a partir del NM producido por unidad de alimento consumido, expresado como NM producido por Kg de materia seca ingerida (MSI), determinada por Felmer (2003), quien utilizó los mismos animales y tratamientos al de este ensayo (Chen y col. 1992 b).

4.4.5.8. Proteína microbiana total (PMCT). La PMCT se estimó de la siguiente manera:

$$PMCT = NM \times 6,25$$

Donde:

PMCT : Proteína microbiana total (g/día).

NM : Aporte de nitrógeno microbiano (g/día).

6,25 : Contenido de nitrógeno de las proteínas.

4.4.5.9. Proteína microbiana digestible (PMCD). Se estimó con la siguiente fórmula:

$$PMCD = PMCT \times 0,6375$$

Donde:

PMCD : Proteína microbiana digestible (g/día).

PMCT : Proteína microbiana total (g/día).

0,6375 : Porcentaje de PMCT que es digestible, obtenido a partir de la multiplicación del contenido de proteína de los microorganismos ruminales (0,75) y el porcentaje de digestibilidad de ésta (0,85) (AFRC, 1995).

4.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental utilizado fue un Cuadrado Latino con tres tratamientos, tres periodos y cuatro cuadrados por tratamiento.

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico y presentación de los datos se realizó mediante una descripción estadística basada en parámetros de posición y dispersión (media de mínimos cuadrados y desviación estándar), utilizando el método estadístico de análisis de varianza (ANDEVA), el cual se efectuó con un nivel de significancia de 5%. Se analizaron las variables de alantoína, ácido úrico, DP, Dpe, IP, PA, NM, NM/MSI, PMCT y PMCD. La prueba que se utilizó para comparar diferencias entre los tratamientos fue la de Tukey.

Los datos de estas variables fueron analizados usando el programa estadístico Minitab, 1998, mediante el siguiente modelo lineal general:

$$Y_{ijklm} = u + T_i + P_j + M_{jk} + C_l + e_{ijklm}.$$

Donde:

Y_{ijklm} : representa la m-ésima medición realizada en el I-ésimo cuadrado del j-ésimo período en el i-ésimo tratamiento del k-ésimo muestreo dentro del j-ésimo período.

u : media poblacional o intercepto general.

T_i : efecto fijo del i-ésimo tratamiento ($i = 1,2,3$).

P_j : efecto del i-ésimo período ($j = 1,2,3$).

M_{jk} : efecto fijo del k-ésimo muestreo anidado en el j-ésimo período ($k = 1,2$).

C_l : efecto fijo del l-ésimo cuadrado ($l = 1,2,3,4$).

e_{ijklm} : residual aleatorio asociado con la m-ésima medición $\sim N(0, \sigma^2)$.

5. RESULTADOS

5.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS

5.1.1. Composición química de la pradera

En el Cuadro 1, se muestra la composición química de la pradera, como promedio de cada periodo.

Cuadro 1. Composición química promedio de la pradera consumida por las vacas (base MS), en cada periodo del ensayo.

Componentes	Periodo 1	Periodo 2	Periodo 3
Materia seca (% MS)	19,75	22,54	19,35
Proteína bruta (% PB)	29,02	26,17	15,34
Energía metabolizable (Mcal EM/Kg MS)	2,87	2,7	2,79
Fibra detergente neutro (% FDN)	43,62	52,68	44,17
Cenizas totales (% CT)	9,79	7,96	8,62
Valor D (%)	79,6	74,7	77,2

5.1.2. Composición química de los concentrados

En el Cuadro 2, se presenta la composición química del concentrado CF (afrecho de soja + coseta seca de remolacha) y del concentrado CA (afrecho de soja + cebada), aportados durante el ensayo.

Cuadro 2. Composición química de los alimentos concentrados (base MS) utilizados durante el ensayo.

Composición	Alimentos concentrados.	
	CF	CA
Materia seca (% MS)	87,8	87,8
Proteína bruta (% PB)	16,6	17,3
Energía metabolizable (Mcal EM/Kg MS)	3,03	3,02
Fibra detergente neutra (% FDN)	37,6	22,5
Fibra detergente ácida (% FDA)	21,8	7,3
Extracto etéreo (% EE)	1,0	2,3
Cenizas totales (% CT)	8,6	6,1

Se observa que la energía metabolizable, proteína cruda y la materia seca se presentan prácticamente igual en ambos concentrados. Por su parte, el contenido de fibra (F.D.N y F.D.A) se encontró mucho más elevado en el concentrado CF que en el concentrado CA.

5.2. NIVEL DE EXCRECIÓN DE LOS DERIVADOS DE PURINAS (DP)

5.2.1. Excreción diaria de alantoína (A), ácido úrico (AU) y la suma de la excreción de ambos (Dpe), expresado como media de mínimos cuadrados

En el Cuadro 3, se exponen los niveles de ácido úrico, alantoína y la suma de la excreción de ambos por la orina, expresados en mmol/día, estimando la producción diaria de orina a partir de la excreción total de creatinina al día (mg) y la concentración de creatinina en la muestra puntual de orina (mg/l).

Cuadro 3. Excreción diaria de ácido úrico, alantoína y derivados de purinas, en vacas lecheras en pastoreo primaveral (TSP), suplementadas con dos tipos diferentes de carbohidratos en el concentrado, uno a base de fibra (TCF) y el otro a base de almidón (TCA).

	TSP	TCF	TCA	d.e.
AU (mmol/día)	18,7 ^a	21,8 ^a	22,8 ^a	1,57
A (mmol/día)	191 ^a	200,5 ^a	213 ^a	9,22
Dpe(mmol/día)	209,7 ^a	222,3 ^a	235,9 ^a	9,82

Letras iguales en una fila indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

En el Cuadro 3, se puede observar que al suplementar con concentrado, la excreción diaria de DP aumenta en relación al tratamiento sin suplementación. Entre los tratamientos con suplementación, se puede decir que al aportar concentrado a base de cebada, la excreción de DP es igual que con el concentrado a base de fibra ($p > 0,05$).

5.2.2. Índice purínico

En el Gráfico 1 se muestra la excreción diaria de DP, según peso metabólico animal, previa corrección de la dilución de la orina por el indicador de creatinina.

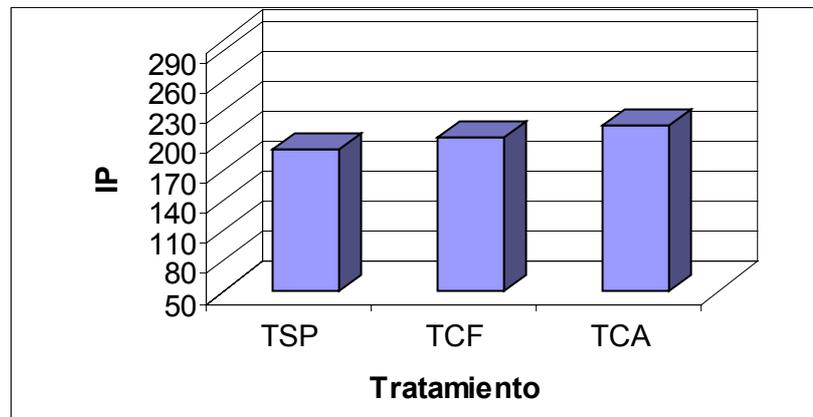


Gráfico 1. Índice purínico (IP) en vacas lecheras en pastoreo primaveral (TSP), suplementadas con dos tipos diferentes de carbohidratos en el concentrado, uno a base de fibra (TCF) y el otro a base de almidón (TCA).

Los índices purínicos para los tratamientos TSP, TCF y TCA fueron 191,2; 202,4 y 214,8 respectivamente, con una desviación standard de 9,07. Esto nos muestra que la excreción diaria de DP en la orina, por peso metabólico animal, fue igual para todos los tratamientos ($p > 0,05$).

5.2.3. Excreción diaria estimada de derivados de purinas (DPe) y purinas absorbidas (PA)

En el Gráfico 2, se presentan los niveles Dpe y PA (estimado a partir de Dpe), para cada tratamiento, expresados en mmol/día.

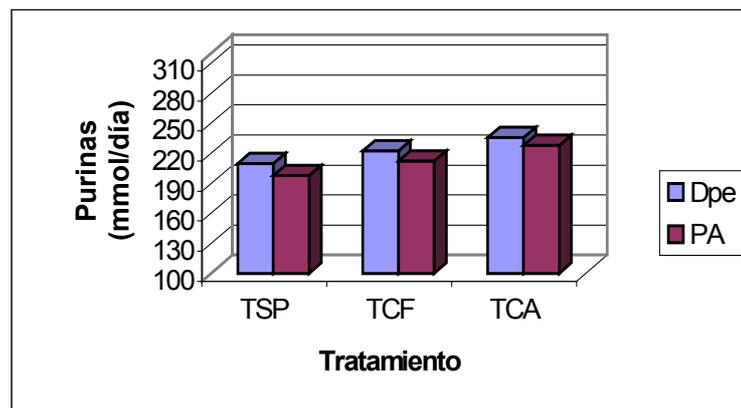


Gráfico 2. Excreción diaria de derivados de purinas (Dpe) y purinas absorbidas (PA), estimados en vacas lecheras en pastoreo primaveral (TSP), suplementadas con dos tipos diferentes de carbohidratos en el concentrado, uno a base de fibra (TCF) y el otro a base de almidón (TCA).

Se observa que en los tratamientos TSP, TCF y TCA, los valores de PA fueron 197,4; 212,1 y 227,7 mmol/día, respectivamente. La desviación standard de las purinas absorbidas fue de 11,6. Los valores de Dpe fueron mencionados anteriormente en el punto 5.2.1. Ambas variables no mostraron diferencias entre los tratamientos ($p > 0,05$).

5.3. APORTE DE NITRÓGENO MICROBIANO (NM)

5.3.1. Síntesis de nitrógeno microbiano

La cantidad de NM (g) producida por vaca al día, según tratamiento, y estimada a partir de PA, se muestra en el Gráfico 3.

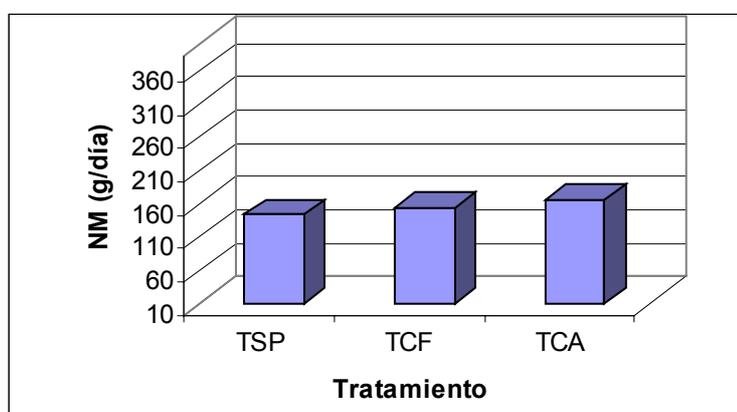


Gráfico 3. Estimación de la síntesis diaria de nitrógeno microbiano (NM) en vacas lecheras en pastoreo primaveral (TSP), suplementadas con dos tipos diferentes de carbohidratos en el concentrado, uno a base de fibra (TCF) y el otro a base de almidón (TCA).

En este gráfico, se observa una producción de NM para el tratamiento TSP de 143,5 g/día, para el tratamiento TCF de 154,2 g/día y para el tratamiento TCA de 165,5 g/día, con una desviación standard de 8,47. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$).

5.3.2. Rendimiento microbiano

En el Gráfico 4, se muestra la cantidad de NM (g) producida por Kg de materia seca ingerida (MSI) al día, estimada a partir de la síntesis diaria de NM, según tratamiento.

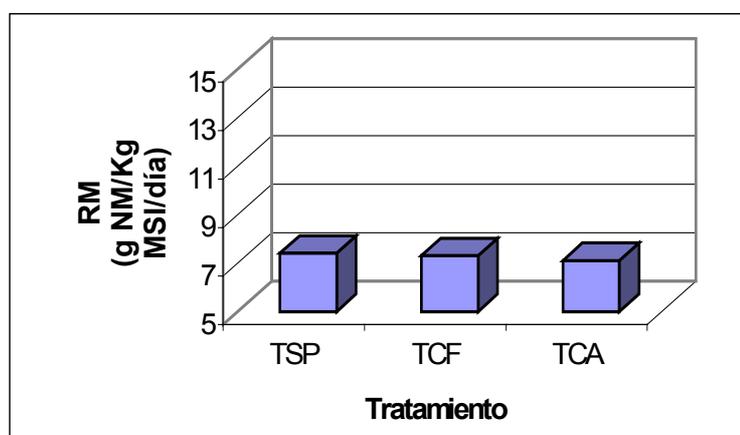


Gráfico 4. Rendimiento microbiano estimado (RM), en vacas lecheras en pastoreo primaveral (TSP), suplementadas con dos tipos diferentes de carbohidratos en el concentrado, uno a base de fibra (TCF) y el otro a base de almidón (TCA).

Los valores obtenidos para el tratamiento TSP, TCF y TCA fueron de: 7,4; 7,3 y 7,1 g/Kg MSI respectivamente, con una desviación standard de 0,4. No se obtuvo diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$).

5.4. SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA (PMC)

En el Cuadro 4, se presenta la cantidad de proteína microbiana total (PMCT) (g/día), estimada a partir de la síntesis diaria de NM y la cantidad de proteína microbiana digestible (PMCD) (g/día), estimada a partir de la PMCT producido, según tratamiento.

Cuadro 4. Producción estimada de proteína microbiana total (PMCT) y de proteína microbiana digestible (PMCD), en vacas lecheras en pastoreo primaveral (TSP), suplementadas con dos tipos diferentes de carbohidratos en el concentrado, uno a base de fibra (TCF) y el otro a base de almidón (TCA).

	TSP	TCF	TCA	d.e.
PMCT (g/día)	896,8 ^a	963,8 ^a	1034,7 ^a	52,92
PMCD (g/día)	571,7 ^a	614,4 ^a	659,6 ^a	33,74

Letras iguales en una fila indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

Del Cuadro 4, se desprende que los valores de PMCT y PMCD no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$).

6. DISCUSIÓN

6.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS

6.1.1. Composición química de la pradera

La pradera permanente fertilizada de la Décima Región, presenta durante la primavera una composición química promedio de 15,2% de materia seca, 17,8% de proteína cruda, valores de energía metabolizable de 2,55 megacalorías (Mcal)/Kg MS y 23,4% de fibra cruda (Anrique y col., 1995).

La pradera utilizada durante el ensayo presentó un alto valor nutritivo (Cuadro 1), mostrando mayores porcentajes de materia seca y proteína cruda, y mayor energía metabolizable respecto a lo reportado por Anrique y col. (1995), para una pradera con similares características.

Kolver y Muller (1998), señalan que los forrajes frescos, como el utilizado en este ensayo, poseen una proteína cruda de rápida y extensa degradación en el rumen, lo que junto a la gran cantidad de energía en la dieta, permitirían una alta síntesis de proteína microbiana y una mayor producción de leche (Holden y col., 1995; Kolver y Muller, 1998).

6.1.2. Composición química de los concentrados

Ambos concentrados mostraron en su composición química promedio valores similares de MS, PC y EM, sin embargo, difieren fuertemente en su contenido de FDN (Cuadro 2). Es así como el concentrado a base de fibra posee 15,1% más FDN que el concentrado a base de almidón. Esto se debe a que la coqueta de remolacha contiene un mayor porcentaje de fibra cruda en comparación a la cebada (Anrique y col., 1995), siendo esta fibra de alta digestibilidad (Miller, 1979) por su bajo contenido de lignina, lo cual contribuye a que la celulosa y hemicelulosa sean de fácil degradación (Anrique, 1989). Por otra parte, el contenido de PC y EM de ambos concentrados están dentro de los niveles adecuados para vacas lecheras de alta producción (25 a 35 l/día) (Kellaway y Porta, 1993).

Según el NRC (1989), los requerimientos nutritivos sugeridos para una vaca de peso vivo promedio de 550 Kg, con una producción promedio de leche de 32 l/día y que cursa su segunda lactancia, son de 17,3 Kg MS/día, 17% de PC, 2,89 Mcal/Kg de MS y 25% de FDN. En este ensayo, los requerimientos nutricionales de las vacas lecheras fueron cubiertos por los diferentes tratamientos otorgados, incluso fueron superiores a los requerimientos propuestos por el NRC (1989), especialmente los aportes de PC.

6.2. SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA RUMINAL

Las mediciones de excreción diaria de DP urinarios (Dpe), constituyen un indicador para estimar la síntesis de proteína microbiana (Orellana Boero y col., 2001), la cual depende de la concentración de DP en la orina (originados de purinas exógenas y endógenas) (Chen y col., 1992 b), de la concentración de creatinina y del peso vivo del animal (Faichney y col., 1995). Por otra parte, la síntesis de proteína microbiana, también depende de la cantidad y tipo de nutrientes disponibles en la dieta, así como de su sincronía en el rumen (AFRC, 1995).

Al analizar la Dpe (Gráfico 2), se observa que al suplementar la pradera con concentrado no aumenta la excreción de DP. Los valores de Dpe obtenidos en el presente ensayo (entre 209,7 a 235,9 mmol/día) son menores a los obtenidos por Orellana y col. (1998), quienes obtuvieron valores máximos de alrededor de 290 mmol/día, con una dieta de ensilaje de maíz, heno de alfalfa, coseta de remolacha y concentrado. Sin embargo, son mayores a los reportados por Köpfer (2001), quien informa valores de Dpe que oscilan entre 119 y 133 mmol/día, en un ensayo realizado con vacas lecheras sometidas a tratamientos basados principalmente en ensilaje de ballica, paja tratada con hidróxido de sodio y concentrado.

La baja cantidad diaria de DP encontrados en la orina pudo deberse a que las vacas utilizadas se encontraban en la etapa inicial de lactancia, lo que coincide con lo señalado por Gonzalez-Ronquillo y col. (2003), quienes observaron que durante esta etapa la proporción de bases púricas recuperadas en la orina son significativamente menor que en la lactancia tardía. Sin embargo, no se reportaron diferencias significativas entre los tratamientos, lo que nos indica que la suplementación con concentrado (comparado al tratamiento sólo a pastoreo), y el tipo de carbohidrato utilizado en ellos, no influyeron significativamente en la excreción de DP urinarios.

La baja Dpe concuerda con la baja concentración urinaria de alantoína, la que varió entre 6,1 y 7,3 mmol/l de orina. En cambio, Delahoy y col. (2003), encontraron valores de ésta de 14,9 y 15,4 mmol/l, para la suplementación de la pradera con maíz molido y fibra, como la coseta de remolacha. Sayers y col. (2003), encontraron valores de 32 y 37,2 mmol de alantoína por litro de orina, para la suplementación de la pradera con 5 Kg diarios de concentrado a base de fibra y almidón, respectivamente. Bargo y col. (2002), encontraron valores de 12,1 y 10,2 mmoles de alantoína por litro de orina, para una disponibilidad de pradera de 40 Kg de MS al día, con y sin suplementación, respectivamente. Todos estos autores obtuvieron valores de alantoína superiores a los encontrados en el presente ensayo.

Respecto al índice purínico, éste soporta la idea que la razón DP/CT puede ser utilizada como un indicador de la excreción total de DP en la orina, evitando toda la recolección de orina producida en el día (Gonda, 1995).

En el presente ensayo el IP para el TSP, TCF y TCA (Gráfico 1) fue de 191,2; 202,4 y 214,8 para consumos diarios de 19,7; 21,5 y 23,5 Kg de MS respectivamente, siendo estos últimos valores estimados por Felmer (2003), quien utilizó los mismos animales y tratamientos de este ensayo. En un estudio realizado por Sánchez (2003), se reportaron valores

de IP de 53,4; 204 y 274,9 para vacas con consumos de 4, 18 y 21 Kg MS diarios. Esto nos indica que los valores de IP calculados en este ensayo, son menores a los reportados por Sánchez (2003), ya que para el mismo nivel de consumo (21 Kg MS/día) se obtuvieron menores valores de IP.

Respecto a la síntesis de nitrógeno microbiano diario (Gráfico 3), ésta fue mayor en los tratamientos con suplementación con concentrado. Tal vez, esto se debió a la mayor ingesta de energía respecto al tratamiento sin suplementación, ya que la energía junto al N disponible en el rumen, permiten la síntesis de NM (AFRC, 1995).

Entre los tratamientos TCF y TCA, este último tuvo la mayor síntesis de NM. Sin embargo, las diferencias entre tratamientos (Gráfico 3) no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$). El valor promedio obtenido en el ensayo fue de 154,2 g NM/día, el cual se encuentra dentro del promedio de los rangos propuestos por el NRC (1985), los cuales van de 9 a 410 g/día, dependiendo de la dieta, con un promedio de 150 g/día. Sin embargo, al comparar los resultados con los reportados por Köpfer (2001), cuyo valor promedio fue de 48,2 g/día, podemos decir que en el presente ensayo se produjo mayor cantidad de NM. Lo mismo sucedió en un estudio de Chen y col. (1992 b), quienes reportaron valores de 71,3 y 84,7 g de nitrógeno microbiano al día.

Para comparar los valores de aporte de nitrógeno microbiano, se utilizó el rendimiento microbiano (producción de NM/Kg de materia seca ingerida) (Gráfico 4). Éste fue mayor en el tratamiento TSP y menor en el tratamiento TCA, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Al respecto, Orellana y col. (1998), reportaron valores entre 6,5 y 11,6 g NM/Kg MS/día, en vacas Holstein Friesian que consumían una dieta a base de paja de trigo y trébol blanco con ballica. Estos resultados fueron mayores a los obtenidos en el presente ensayo, los que variaron entre 7,1 y 7,4 g NM/Kg MSI.

Al comparar los resultados de NM (g/día) con el rendimiento microbiano se puede observar que al mismo tiempo que se produjeron los mayores valores de NM al día, se obtuvieron los menores valores en rendimiento microbiano. Ésto se puede observar en el tratamiento TCA, lo que se pudo deber al mayor consumo de MS diario estimado en este tratamiento (Felmer, 2003). Por otro lado, el tratamiento que presentó mayores rendimientos microbianos, pero menores niveles de NM diarios, fue el tratamiento TSP, debido al menor consumo de MS estimado (Felmer, 2003).

En relación a los resultados de nitrógeno microbiano y rendimiento microbiano, anteriormente discutidos, existiría la posibilidad de que la suplementación con concentrado fibroso fuese más eficiente que la suplementación con concentrado amiláceo, ya que posee una mayor producción de NM/Kg MSI y menor consumo de materia seca. Aguilera (2003), quien utilizó los mismos animales y tratamientos de este ensayo, señala que aunque el tratamiento con suplementación con concentrado CF presentó un menor consumo de MS estimado, que el tratamiento con suplementación con concentrado CA, la producción de leche fue igual en ambos tratamientos (28,5 y 29,8 l/día para TCF y TCA, respectivamente). Por otra parte, el tratamiento que aporta sólo pradera produjo el mayor rendimiento microbiano y menor

consumo estimado de MS, sin embargo, la producción de leche fue significativamente menor a los tratamientos TCF y TCA, lo cual sería reflejo del menor consumo de materia seca y/o energía.

Wittwer y col. (1993), consideran que la concentración de urea en leche sería un buen indicador de la relación energía: proteína de la dieta. Pareciera ser, que en el presente ensayo esta relación no fue la más adecuada, debido a que Aguilera (2003), reportó valores de 7,21; 6,84 y 7,31 mmol/l de urea en leche, para los tratamientos TSP, TCF y TCA, respectivamente ($p > 0,05$), siendo el valor máximo recomendado para la especie de 5,71 mmol/l de urea (Jonkers y col., 1999). Además, al comparar los resultados con los de Delahoy y col. (1993), se observó que éstos presentaron menor eliminación de urea por la leche, (5,32 y 5,5 mmol/l, para la suplementación con maíz molido y coseta de remolacha, respectivamente), en comparación al presente ensayo.

La alta concentración de urea en leche se puede explicar por el alto contenido de proteína en la pradera durante la primavera, estación en la cual generalmente se registran los valores de urea más altos en leche (Wittwer, 1996). Además, ambos concentrados utilizados también contenían altos valores de proteína, cercanos al 17% (Cuadro 2). Pareciera ser que la alta cantidad de N aportada en los diferentes tratamientos, no pudo ser utilizada eficientemente por los microorganismos ruminales. Esto se podría deber a que la energía, aunque mayores a los requerimientos para vacas con las características de este ensayo, no fue suficiente para que los microorganismos utilizaran eficientemente la gran cantidad de N proveniente de la pradera, del concentrado o catabolismo corporal. También podría explicarse por una asincronía entre la degradación de la fuente de carbohidratos y la proteína en el tratamiento con concentrado a base de fibra y a una baja de pH ruminal al utilizar el tratamiento con concentrado a base de almidón. Esto pudo haber llevado a que la alta cantidad de nitrógeno de la dieta no se utilizara eficientemente para la síntesis de PMC.

Delahoy y col. (2003), mencionan que el concentrado basado en almidón, disminuye la concentración de urea en leche, lo que sugeriría que las vacas alimentadas con este concentrado utilizarían mejor el N disponible en la dieta, que las vacas suplementadas con concentrados fibrosos, situación que no ocurrió en este ensayo. Por el contrario, Webster (1993), menciona que los concentrados amiláceos, por su rápida fermentación en el rumen, promoverían un aumento de acidez en el rumen, por lo que se esperaría un efecto negativo en el funcionamiento ruminal. Por otro lado Twigg y Van Gils (1988), señalan que los carbohidratos estructurales presentes en la coseta de remolacha, aunque altamente digestibles, no están inmediatamente disponibles para ser incorporados dentro de la proteína microbiana, produciendo una asincronía entre la tasa de digestión de la fuente de carbohidratos y de la proteína de la pradera. Esto lleva a aumentar la producción de urea, situación que ocurrió en este ensayo.

Sin embargo, en el presente ensayo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en la excreción de urea por litro de leche al utilizar diferentes fuentes de carbohidratos en los concentrados, lo que sugiere que los diferentes carbohidratos en la dieta, no mejoran la utilización del nitrógeno ruminal.

Respecto a los valores de proteína microbiana total (PMCT) y proteína microbiana digestible (PMCD) obtenidos en cada tratamiento (Cuadro 4), se observó que ambas variables aumentaron desde el tratamiento sólo de pradera al tratamiento con concentrado a base de coseta de remolacha, incrementándose aún más al suplementar con concentrados a base de cebada, sin embargo, estos aumentos no fueron estadísticamente significativos ($p > 0,05$). Según Rearte (1997), el suplemento, cualquiera que sea, sólo modificará el ambiente ruminal, cuando tenga un efecto mayoritario y significativo en el consumo total de MS, lo cual no ocurrió en este ensayo.

En un estudio realizado por Orellana y col. (1998), los valores de PMCD obtenidos fueron de 157 g/día al aportar una dieta de paja de trigo más trébol blanco con ballica, y de 844,2 g/día al aportar ensilaje de maíz, heno de alfalfa, coseta de remolacha y concentrado, siendo estos mayores a los obtenidos en este ensayo.

Según AFRC (1993), para el tipo de vacas utilizadas en el ensayo, los requerimientos de proteína metabólica (PM) corresponden aproximadamente a 1786 g/día. El aporte de PMCD en el ensayo fue de 615,2 g/día, por lo que al comparar estos valores, con los requerimientos, se pudo apreciar que los valores de proteína microbiana digestible no coinciden con los señalados por Dewhurst y col. (2000), quienes mencionan que sobre la mitad de los aminoácidos (66 a 75%) derivan de la proteína microbiana. En el presente ensayo sólo el 34% de la PM (aproximadamente) correspondió a PMCD, lo que nos indica que estos valores se encuentran por debajo de lo propuesto por Dewhurst y col. (2000). Esto podría deberse a que el exceso de nitrógeno ruminal presente en el ensayo, dio origen a una alta cantidad de amoníaco que se transforma a urea. Esta transformación considera un gasto energético, lo que disminuiría la energía disponible para los microorganismos ruminales (Twigg y Van Gils, 1988). Otros factores que podrían estar involucrados en la baja síntesis de PMC, son una deficiencia de fosfato y azufre en la ración, ya que el fosfato es necesario para la síntesis de ácidos nucleicos microbianos y el azufre es necesario para la síntesis de metionina y cisteína, aminoácidos presentes en la proteína microbiana (Bondi, 1988). Además, en el caso del tratamiento TCA, es posible que la rápida fermentación del almidón haya conducido a disminuir el pH ruminal, afectando el funcionamiento ruminal (Webster, 1993), lo que conduciría a una disminución de la síntesis de PMC. Todos estos factores, a la vez de disminuir la PMC, aumentan la excreción de urea por la leche, tema discutido anteriormente.

Según Twigg y Van Gils (1988), la detoxificación hepática del exceso de amoníaco ruminal requiere 0,2 Mcal de energía neta (EN) por 100 g de PC consumida en exceso. Los requerimientos de energía neta para la producción de 1 litro de leche diario son 0,69 Mcal EN (NRC, 1989). Por lo tanto, un exceso de 400 g de PC consumido, provocaría una disminución de 1,15 litros de leche al día por animal, lo que impediría que las vacas expresen todo su potencial productivo. En otras palabras, podemos decir que es de gran importancia aportar una dieta balanceada (relación energía: proteína) a los animales, para no disminuir la síntesis de PMC y a la vez no disminuir la producción de leche.

Cabe destacar, que posiblemente las diferencias no fueron estadísticamente significativas, ya que el método utilizado (toma de muestras puntuales de orina), según

Tamminga y Chen (2000), tiene menor sensibilidad que el método de recolección total de orina. Por lo tanto, la estimación de la síntesis de proteína microbiana, basada en la excreción urinaria de DP, no debe ser utilizada como un valor absoluto, sino que como un valor comparativo entre tratamientos (Tamminga y Chen, 2000), para evaluar la condición nutricional de las vacas en pastoreo.

CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente ensayo se obtuvieron de acuerdo a los objetivos de estimar la síntesis de proteína microbiana y rendimiento microbiano en vacas lecheras a pastoreo, con y sin suplementación con dos tipos de concentrados con diferentes fuentes de carbohidratos.

1. La síntesis de proteína microbiana no mostró diferencias significativas entre el tratamiento con sólo pastoreo (TSP), y los tratamientos con pastoreo más concentrado a base de fibra (TCF) y a base de almidón (TCA).
2. La suplementación con dos tipos de concentrados con diferente fuente de carbohidratos, no afectó la síntesis de proteína microbiana en las vacas lecheras a pastoreo.
3. El rendimiento microbiano no presentó diferencias entre los distintos tratamientos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL (AFRC). 1993. Energy and protein requirements of ruminants. An advisory manual prepared by the AFRC Technical Committee on Responses to nutrients. CAB International. Wallingford, UK.
- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL (AFRC). 1995. Energy and protein requirements of ruminants. An advisory manual prepared by the AFRC Technical Committee on Responses to nutrients. CAB International. Cambridge, UK.
- AGUILERA, P. 2003. Efecto de la suplementación con dos tipos diferentes de carbohidratos en el concentrado sobre la respuesta productiva en vacas lecheras en pastoreo primaveral. Memoria de Título, M. V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- AL-KHALIDI, U., T. CHAGLIASSIAN. 1965. The species distribution of xanthine oxidase. *Biochem. J.* 97: 318-320.
- ANRIQUE, R. 1989. Manual de utilización de subproductos de remolacha en alimentación de ganado. Industria Azucarera Nacional Sociedad Anónima (IANSa). Santiago, Chile.
- ANRIQUE, R., X. VALDERRAMA, R. FUCHSLOCHER. 1995. Composición de alimentos para ganado en la zona sur. FIA-UACH. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Producción Animal. Valdivia, Chile.
- ANTONIEWICZ, A. M., W. HEINEMANN, E. M. HANKS. 1981. Effect of level of feed intake and body mass on allantoin excretion and the allantoin to creatinine ratio in the urine of sheep. *Rokz. Nauk Zoot.* 8: 49-65.
- BALOCCHI, O. 1998. Praderas y Recursos Forrajeros en el sur de Chile. En: Amtmann, Mujica y Vera. Pequeña Agricultura en la Región de Los Lagos. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- BALOCCHI, O., R. PULIDO, J. FERNANDEZ. 2002. Comportamiento de vacas lecheras en pastoreo con y sin suplementación con concentrado. *Agricultura Técnica (Chile)* 62: 87-98.
- BARGO, F., L. D. MULLER, J. E. DELAHOY, T. W. CASSIDY. 2002. Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. *J. Dairy Sci.* 85: 1777-1792.
- BATEMAN, R. 1970. Nutrición animal. Manual y método analítico. Centro regional de ayuda técnica. Ciudad de México, México.

- BECK, A., R. PESSOT. 1992. Producción de leche en praderas permanentes durante la primavera. *Agro Sur*. 20: 39-34.
- BONDI, A. 1988. Nutrición Animal. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- BRODY, S. 1945. Bioenergetics and growth. Reinhold Publishing Corporation. New York, USA.
- CAÑAS, R. 1998. Alimentación y nutrición animal. 2ª Ed. Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.
- CHEN, X. B., F. D. HOVELL, E. R. ORSKOV. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. *Br. J. Nutr.* 63: 131-142.
- CHEN, X. B., E. R. ORSKOV, F. D. HOVELL. 1991. The use of purine derivatives as a measure of microbial protein supply in ruminants. Proceedings of the 6th international symposium on protein metabolism and nutrition. 2: 67-70.
- CHEN, X. B., M. J. GOMES. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives. An overview of the technical details. International feed resources unit. Occasional Publication. Rowwett Research Institute. Bucksburn Aberdeen, UK.
- CHEN, X. B., Y. K. CHEN, M. FRANKLIN, E. R. ORSKOV, W. J. SHAND. 1992 a. The effect of feed intake and body weight on purine derivatives excretion and microbial protein supply in sheep. *J. Anim. Sci.* 70: 1534-1542.
- CHEN, X. B., G. GRUBIC, E. R. ORSKOV, P. OSUJI. 1992 b. Effect of feeding frequency on diurnal variation in plasma and urinary purine derivatives in steers. *Anim. Prod.* 55: 185-191.
- CHILE. 1997. Instituto Nacional de Estadística. VI Censo Nacional Agropecuario. Santiago, Chile.
- COBLENTZ, W., I. ABDELGADIR, R. COCHRAN, J. FRITZ, W. FICK, K. OLSON, J. TURNER. 1999. Degradability of forage proteins by In Situ and In Vitro enzymatic methods. *J. Dairy Sci.* 82: 343-354.
- DELAHOY, J. E., L. D. MULLER, F. BARGO, T. W. CASSIDY, L. A. HOLDEN. 2003. Supplemental carbohydrate sources for lactating dairy cows on pasture. *J. Dairy Sci.* 86: 906-915.
- DEWHURST, R., D. DAVIES, R. MERRY. 2000. Microbial protein supply from the rumen. *Anim. Sci. Technol.* 85: 1-20.

- DIXON, R. M., C. R. STOCKDALE. 1999. Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilization. *Aust. J. Agric. Res.* 50: 757-773.
- FAICHNEY, G., R. WELCH, G. BROWN. 1995. Prediction of the excretion of allantoin and total purine derivatives by sheep from the "creatinine coefficient". *J. Dairy Sci. Camb.* 125: 425-428.
- FELMER, E. F. 2003. Comportamiento ingestivo de vacas lecheras en pastoreo primaveral suplementadas con dos fuentes de carbohidratos. Memoria de Título, M. V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- FUJIHARA, T., E. R. ORSKOV, P. J. REEDS, D. J. KYLE. 1987. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *J. Agric. Sci. Camb.* 109: 7-12.
- GARRIDO, O., E. MANN. 1981. Composición química, digestibilidad y valor energético de una pradera permanentemente de pastoreo a través del año. Tesis, Ing. Agr., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Valdivia, Chile.
- GIESECKE, D., L. EHRENTREICH, M. STANGASSINGER, F. AHRENS. 1994. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77: 22376-2381.
- GOERING, H. K., H. VAN SOEST. 1972. Forage and fiber analyses (apparatus, reagents, procedures and some applications). USDA Agric. Handbook 379. ARS-USDA: Washington DC, USA.
- GONDA, H. L. 1995. Nutritional status of ruminants determined from excretion and concentration of metabolites in body fluids. Ph. D. Diss. Swedish Univ. of Agricultural Sciences. Dep. Anim. Nutr. And Management. Uppsala, Suecia.
- GONDA, H. L., M. EMANUELSON, M. MURPHY. 1996. The effect of roughage to concentrate ratio in the diet on nitrogen and purine metabolism in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 64: 27-42.
- GONZALEZ-RONQUILLO, M., J. BALCELLS, J. A. GUADA, F. VICENTE. 2003. Purine derivative excretion in dairy cows: endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. *J. Dairy Sci.* 86: 1282-1291.
- HOLDEN, L. A., L. D. MULLER, G. A. VARGA, P. J. HILLARD. 1994. Ruminal digestion and duodenal nutrient flows in dairy cows consuming grass pasture, hay or silage. *J. Dairy Sci.* 77: 3034-3042.

- HOLDEN, L. A., L. D. MULLER, T. LYKOS, T. W. CASSIDY. 1995. Effect of corn silage supplementation on intake and milk production in cows grazing grass pasture. *J. Dairy Sci.* 78: 154-160.
- HOLMES, W. 1989. Grass. Its production and utilization. Oxford Blackwell Publications. London, England.
- HVELPLUND, T., M. R. WEISBJERG. 2000. In situ techniques for estimation of protein degradability and postrumen availability. In: Givens, D., E. Owen, R. Axford, H. Omed. Forage evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing. Wallingford, UK.
- JAHN, B. E. 1996. La pradera en los sistemas de leche bovina. En: Ruiz, I. Praderas para Chile. 2º Ed. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile.
- JOHNSON, L. M., H. HARRISON, R. E. RILEY. 1998. Estimation of the flow of microbial nitrogen to duodenum using urinary uric acid or allantoin. *J. Dairy Sci.* 81: 2408-2420.
- JONKERS, J. S., R. A. KOHN, R. A. ERDMAN. 1999. Milk urea nitrogen target concentrations for lactating dairy cows feed according to National Research Council recommendations. *J. Dairy Sci.* 82: 1261-1273.
- KELLAWAY, R., S. PORTA. 1993. Feeding concentrates supplements for dairy cows. Dairy Research and Development Corporation. Victoria-Departament of Agriculture. Melbourne, Australia.
- KIBON, A., W. HOLMES. 1984. Supplementary feeding of forage and concentrate to dairy cows at pasture. *Anim. Prod.* 42:462-463.
- KOLVER, E. S., L. D. MULLER. 1998. Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* 81: 1403-1411.
- KÖPFER, A. 2001. Síntesis de proteína microbiana en vacas lecheras alimentadas con ensilaje de pradera y paja de trigo tratada con hidróxido de sodio. Tesis, M. V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- LANUZA, F. 1988. Utilización de concentrados en vacas lecheras a pastoreo. *Investigación y proceso agropecuario.* 8: 20-23.
- LATRILLE, L. 1998. Producción de leche. En: Amtmann, Mujica y Vera. Pequeña Agricultura en la Región de Los Lagos. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- LEAVER, J. D. 1985. Milk production from grazed temperate grassland. *J. Dairy Res.* 52: 313-344.

- LEAVER, J. D. 1986. Effects of supplements on herbage intake and performance. In: Grazing (ed. J. Frame), British Grassland Society Occasional Symposium N°19, Great Malvern, Great Britain.
- LIANG, J. B., M. MATSUMOTO, B. A. YOUNG. 1994. Purine derivative excretion and ruminal microbial yield in Malaysian cattle and swamp buffalo. *Anim. Feed Sci. Technol.* 47: 189-199.
- LINDBERG, J. 1989. Nitrogen metabolism and urinary excretion of purines in goat kids. *Br. J. Nutr.* 61: 39-321.
- MADSEN, J., T. HVELPLUND, M. R. WEISBJERG, J. BERTILSSON, I. OLSSON, R. SPÖRNDLY, O. M. HARSTAD, H. VOLDEN, M. TUORI, T. VARVIKKO, P. HUHTANEN, B. L. OLAFSSON. 1995. The AAT/PBV protein evaluation system for ruminants. *J. Agric. Sci., Suppl.* N° 19.
- MAYNARD, L., L. LOOSLI, H. HINTZ, R. WARNER. 1988. Nutrition animal. 7th ed., Mc Graw-Hill. México D. F, México.
- MC GILLOWAY, D. A., C. S. MAYNE. 1996. The importance of grass availability for the high genetic merit dairy cow. *Recent Advances in Animal Nutrition.* 8: 135-169.
- MEIJS, J. A. C. 1986. Concentrate supplementation of grazing dairy cows. Effect of concentrate composition on herbage and milk production. *Grass Forage Sci.* 41: 229-235.
- MILLER, W. 1979. Dairy cattle feeding and nutrition. Academy Press. New York, USA.
- MILLER, E. 1982. Methods of assessing proteins for ruminants, including laboratory methods. In: Miller, E., I. Pike, A. Vanes. Protein contribution of feedstuffs for ruminants. Butterworths. Cambridge, England.
- MULLER, L. 1996. Managing and feeding high merit cows at pasture. In: Grass & Forage for Cattle of High Genetic Merit. British Grassland Society Winter Meeting. Great Malvern, Great Britain.
- MULLER, L. 1999. Management of pasture and feeding program for high genetic merit cows grazing temperate pastures. En: Latrille, L. Producción Animal. Universidad Austral de Chile. Serie B-22. Valdivia, Chile.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, (NRC). 1985. Ruminant nitrogen usage. National Academy Science, Washington DC, USA.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, (NRC). 1989. Nutrient Requirements of Dairy Cows. 6th Revised Edition National Academy Press. Washington DC, USA.

- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, (NRC). 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th ed. National Academy Press, Washington DC, USA.
- NSAHLAI, I. V., P. O. OSUJI, N. N. UMUNNA. 2000. Effect of form and of quality of feed on the concentrations of purine derivatives in urinary spot samples, daily microbial N supply and predictability of intake. *Anim. Feed Sci. Technol.* 85: 223-238.
- ORELLANA, P., Q. MENDOZA, M. SCORY. 1998. Relaciones entre excreción urinaria de derivados de purinas y creatinina con el consumo de alimento en vacas de lechería. *Arch. Med. Vet.* 30: 75-83.
- ORELLANA BOERO, P., J. BALCELLS, S. M. MARTÍN-ORÚE, J. A. GUADA. 2001. Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. *Livest. Prod. Sci.* 68: 243-250.
- PEYRAUD, J. L., L. DELABY, R. DELAGARTE. 1997. Quantitative approach of dairy cows at grazing. Some recent developments. XXIII Reunión Anual Sociedad Chilena de Producción Animal, Valdivia, Chile.
- REARTE, D. 1997. Sistemas de producción de leche basados en praderas permanentes. Serie de simposios y compendios. *SOCHIPA.* 5: 38-51.
- RESINES, J., M. ARIN, M. DIEZ, 1992. Determination of creatinine and purine derivatives in ruminants' urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Of Chrom.*, 607: 199-202.
- RYS, R., A. ANTONIEWITCZ, J. MACIEJEWICZ. 1975. Allantoin in urine as an index of microbial protein in the rumen. In Tracer studies on non-protein nitrogen in ruminants, vol. 2, IAEA. Viena, Austria.
- SÁNCHEZ, M. 2003. Relación de los derivados de purinas séricos y urinarios en vacas de lechería con diferentes niveles de consumo. Tesis, M. V. Universidad de Concepción, Facultad de Medicina Veterinaria, Chillán, Chile.
- SAYERS, H., J. C. S. MAYNE, C. G. BARTRAM. 2003. The effect of level and type of supplement offered to grazing dairy cows on herbage intake, animal performance and rumen fermentation characteristics. *Anim. Sci.* 76: 439-454.
- SMITH, R., A. MC ALLAN, 1970. Nucleic acid metabolism in the ruminant. *Br. J. Nutr.* 24: 545-556.
- TAMMINGA, S., X. CHEN. 2000. Animal-based techniques for the estimation of protein value of forages. In: Givens, D., E. Owen, R. Axford, H. Omed. Forage evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing, Wallingford, UK.

- THOMAS, C., A. REEVE, G. E. J. FISHER. 1991. Milk from Grass. 2nd Ed., Billingham Press Limited, Cleveland, UK.
- TWIGG, J. R., L. G. M. VAN GILS. 1988. Practical aspects of feeding protein to dairy cows. In: Recent developments in ruminant nutrition. 2. W. Haresign y D. J. A. Cole, Ed. Butterworth, London, England.
- VAGNONI, D. B., G. A. BRODERICK, M. K. CLAYTON, R. D. HATFIELD. 1997. Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amount of purines. *J. Dairy Sci.* 8: 1695-1702.
- VALADARES, R., G. BRODERICK, S. VALADARES, K. CLAYTON. 1999. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *J. Dairy Sci.* 82: 2686-2696.
- VAN KESSEL, J. S., J. B. RUSSEL. 1995. Energy spilling and the role of ruminally degraded protein in bacterial growth efficiency. In: Cornell Nutrition Conference for feed Manufacturers. Cornell University, Ithaca, NY.
- VERBIC, J., X. MC LEOD, E. ORSKOV. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *J. Agric. Sci.* 114: 243-248.
- VÉRITÉ, R., J.-L. PEYRAUD. 1989. Protein: the PDI System. In: R. Jarrige. Ruminant Nutrition. Recommended Allowances and Feed Tables. INRA, Paris, France.
- WEBSTER, A. 1993. Understanding the dairy cow. Blackwell Science 2nd ed., Bodmin, Cornwall, UK.
- WITTWER, F., J. M. REYES, H. OPITZ, P. A. CONTRERAS, H. BOHMWALD. 1993. Determinación de urea en muestras de leche de rebaños bovinos para el diagnóstico de desbalances nutricionales. *Arch. Med. Vet.* 25: 165-172.
- WITTWER, F. 1996. Diagnóstico de desbalances de energía y proteínas mediante el análisis de muestras de leche y su impacto productivo en rebaños lecheros. III Seminario "Aspectos Técnicos y Perspectivas de la Producción de Leche. Osorno", Chile, pp. 71-84.

8. ANEXOS

Anexo 1. Excreción diaria de creatinina en la orina (mg/día) y volumen urinario diario (VO) (l/día), en vacas lecheras a pastoreo primaveral suplementadas con dos tipos diferentes de carbohidratos en el concentrado.

	TSP	TCF	TCA	d.e.
Creatinina mmol/día	119,5 ^a	119,9 ^a	121,1 ^a	1,5
VO (l/día)	32,8 ^a	28,4 ^a	30,6 ^a	1,3

Letras iguales en una fila indican diferencias no significativas ($p > 0,05$).

Anexo 2. Peso vivo (Kg) de vacas lecheras a pastoreo primaveral suplementadas con dos tipos diferentes de carbohidratos en el concentrado (Pablo Aguilera, 2003).

Nº vaca	Peso vivo		
	TSP	TCF	TCA
1960	540,5	524	529
274	542	525	528,5
1955	601	575,5	595
2160	507	481,5	493,5
2068	474,5	503	470
1167	522	533,5	520
1201	501,5	510,5	519,5
992	529	535,5	534,5
1973	490	494	509
1191	481,5	503,5	521,5
1108	565,5	580,5	600,5
1188	485	492	501

9. AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi profunda gratitud a mi profesor patrocinante, Rubén Pulido, por la ayuda, apoyo y consejos que me brindó en el presente ensayo. Del mismo modo, agradezco a mi profesor copatrocinante, Dr. Patricio Orellana, por su buena disposición y las dudas resueltas.

Deseo agradecer a la Dirección de Investigación y Desarrollo de la UACH, quien facilitó los fondos para realizar este ensayo.

Agradezco de todo corazón a mis amigos, por su apoyo y ayuda brindados en esta Memoria de Título, especialmente a Sandra Nannig, Carol Teuber y Eduardo Felmer; y a Alfredo Geisse, por su cariño, compañía y apoyo brindados durante todo el periodo que trabajé en este ensayo.

A quienes fueron como mi familia en Valdivia, la familia Cárcamo-Ibazeta y en especial a mi amiga Marcela Cárcamo por su apoyo incondicional; muchas gracias.

Doy también las gracias a mis padres y hermanas, Susan, Romy y Gisela, y su esposo Ivan Figueroa, por sus consejos y apoyo incondicional, quienes colaboraron para que este trabajo sea hoy una realidad.

Gracias a Dios por guiar mis pasos y acciones en el sendero de mi vida.