

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**  
**INSTITUTO DE CIENCIA ANIMAL Y TECNOLOGÍA DE CARNES**

**EFFECTO DE LA FRECUENCIA DE SUPLEMENTACIÓN CON CONCENTRADO  
SOBRE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA RUMINAL EN VACAS  
LECHERAS EN PASTOREO PRIMAVERAL**

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

**ANA PRICILA LEMARIE ULLOA**

**VALDIVIA – CHILE**

**2005**

**PROFESOR PATROCINANTE**

**Dr. Rubén Pulido F.**

Nombre

Firma

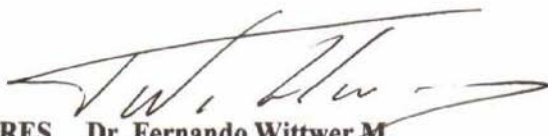


**PROFESOR COPATROCINANTE**

**Dr. Patricio Orellana B.**

Nombre

Firma



**PROFESORES CALIFICADORES**

**Dr. Fernando Wittwer M.**

Nombre

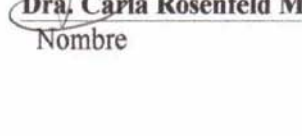
Firma



**Dra. Carla Rosenfeld M.**

Nombre

Firma



**FECHA DE APROBACIÓN:** 15 de Diciembre de 2005

## ÍNDICE

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
5. RESULTADOS.....	22
6. DISCUSIÓN.....	27
7. BIBLIOGRAFÍA.....	34
8. AGRADECIMIENTOS.....	44

A mis padres,  
quienes me alentaron en mis metas y sueños,  
y me apoyaron, transformando mis luchas en triunfos...

## 1. RESUMEN

El propósito del presente ensayo fue estimar la síntesis de proteína microbiana ruminal y el rendimiento microbiano en vacas lecheras a pastoreo primaveral sometidas a tres frecuencias de suplementación con concentrado.

El ensayo tuvo una duración de 65 días. Se utilizaron 21 vacas Frisón Negro, las que al inicio del ensayo, presentaban en promedio una producción de leche de 29,7 L/día, un peso vivo de 501,9 kg y se encontraban dentro del segundo mes de lactancia.

Los tratamientos fueron: pastoreo + 6 kg de concentrado, dos raciones de 3 kg al día (PFS2), pastoreo + 6 kg de concentrado, tres raciones de 2 kg al día (PFS3) y pastoreo + 6 kg de concentrado, cuatro raciones de 1,5 kg al día (PFS4). Por tres días consecutivos a la semana, se obtuvieron 2 muestras de orina diaria, con posterioridad a las ordeñas de la mañana y la tarde. En la orina se determinó la concentración 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 PFS2, PFS3 y PFS4 la síntesis de proteína microbiana diaria fue de 1097,4; 1079,0 y 1087,4 g/vaca/d, respectivamente ( $P>0,05$ ; EE=48,2) y la síntesis de nitrógeno microbiano (NM) por kg de materia seca ingerida (MSI) fue de 8,5; 8,7 y 9,2 g NM/kg MSI/vaca/d ( $P>0,05$ ; EE=0,9).

En consideración a los resultados obtenidos, se concluye que la variación de la frecuencia de suplementación en 2, 3 o 4 veces al día con 6 kg de concentrado, no modifica la síntesis de proteína microbiana en vacas lecheras a pastoreo.

*Palabras claves:* purinas, proteína metabolizable, proteína microbiana, vacas lecheras.

## 2. SUMMARY

### **EFFECT OF FREQUENCY CONCENTRATE SUPPLEMENTATION IN MICROBIAL PROTEIN SYNTHESIS FOR GRAZING DAIRY COWS DURING SPRING**

The purpose of experiment was to evaluate the microbial protein yield and synthesis efficiency with three frequency concentrate supplementation for lactating dairy cows on spring pastures.

21 Friesian cows yielding 29,7 L/d were assigned to a completely randomized design for 65 days. The treatments included: grazing plus 6 kg concentrate with supplementation frequency (GSF) of two ration of 3 kg/d (GSF2), grazing plus 6 kg concentrate, three ration of 2 kg/d (GSF3) and grazing plus 6 kg concentrate, four ration of 1,5 kg/d (GSF4). The cows were managed under a strip grazing system on pasture, consisting mainly of perennial rye grass.

To estimate microbial protein synthesis and microbial yields per kg/DMI, urine samples were collected from each dairy cow twice a day after milking, during three days of every single week for determination of creatinine, uric acid and allantoin. The daily excretion levels of these purine derivatives, absorbed purines and microbial nitrogen supply, were used to calculate the contribution of digestible microbial protein.

Daily microbial protein synthesis, for the treatment GFS2, GFS3 and GFS4 were 1097,4; 1079,0 and 1087,4 g/cow/day ( $P>0,05$ ; EE=48,2) and microbial yield per kg DMI to 8,5; 8,7 y 9,2 g MN/kg DMI ( $P>0,05$ ; EE=0,9), respectively.

The results suggest that concentrate supplementation frequency in 2, 3 or 4 times to day, did not affect significantly the synthesis of ruminal microbial protein in dairy cows on pasture.

*Key words:* purine, metabolizable protein, microbial protein, dairy cows.

### 3. INTRODUCCIÓN

Chile cuenta con una superficie aproximada de 75,4 millones de hectáreas, de las cuales 5.047.324 hectáreas son de uso agrícola o pecuario y de éstas sólo el 17% son destinadas a la producción de leche (Balocchi 1999<sup>a</sup>). La Décima Región de Chile cuenta con una superficie de 1.350.000 hectáreas de praderas (Chile 1997), de las cuales la superficie destinada a la lechería es estimada en más de 563.000 hectáreas (Latrille 1998).

En el VI Censo Nacional Agropecuario se determinó, que la Décima Región presenta una población de 380.000 vacas, de un total nacional de alrededor de 620.000, lo que corresponde al 61,5% del total de vacas lecheras del país (Chile 1997), demostrando la importancia económica del rubro lechero en esta región de Chile. El objetivo del rubro lechero ha sido elevar la producción de leche, mediante el uso de genotipos especializados (Butendieck y col 1995). Estos aumentos en la producción de leche, han tenido y tendrán consecuencias en la nutrición y en el manejo de los animales, por ello es de interés conocer si estos animales responden con diferente eficiencia a cambios de cantidad, calidad y frecuencia de suplementación con concentrado.

#### 3.1. RECURSOS ALIMENTICIOS PARA EL GANADO LECHERO

##### 3.1.1. La pradera, principal recurso alimenticio

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). El uso prioritario del pastoreo de praderas permanentes en la alimentación del ganado de la Décima Región, representa ventajas comparativas con respecto a otras zonas del país (Balocchi 1999<sup>b</sup>), es por esta razón, que el uso de praderas para la producción de leche resulta una buena alternativa para la alimentación animal, debido a que es una fuente barata de nutrientes para los rumiantes (Peyraud y Delaby 2001) y por lo tanto, se debe utilizar al máximo en las raciones (Jahn 1996).

La producción anual de estas praderas varía entre un rango de 4 toneladas de materia seca (MS) por año para praderas no fertilizadas hasta 12 toneladas de MS por hectárea en condiciones de fertilización completa (Balocchi 1998). La composición nutritiva de estas praderas manejadas bajo pastoreo poseen un promedio de 20 a 25 % de proteína cruda y 2,8 Mcal de EM por kg MS, constituido además por un 35 a 40 % de fibra detergente neutro (Muller 1999), composición que según Anrique (1990) alcanza para lograr una producción láctea de 24 litros por vaca al día, solamente a pastoreo.

En estos sistemas, la producción es dependiente en gran medida del consumo y de la calidad del forraje disponible, del número y productividad de los animales utilizados (Peyraud y col 1997). Los sistemas de pastoreo eficientes se caracterizan por una alta producción de

leche por unidad de superficie, mientras que los sistemas a confinamiento son caracterizados por una alta producción por vaca (Clark y Kanneganti 1998).

### **3.1.2 La estacionalidad de la pradera**

La producción de leche basada en el pastoreo presenta gran variabilidad, ya que ésta depende del potencial productivo de los animales, y de la disponibilidad y calidad de la pradera (Holmes 1989).

Muller (1999) señala que los mayores requerimientos nutricionales de las vacas de alta producción no siempre se satisfacen sólo con la pradera, debido a que los nutrientes varían durante el año, tanto en cantidad como calidad. La disponibilidad de la pradera es mayor en primavera (39%) y en verano (29%), seguido por un periodo interesante en otoño (25%) y bajo en invierno (6%). Dada la continua variabilidad en producción y calidad de la pradera (niveles de carbohidratos no estructurales y de materia seca y degradabilidad de la proteína del forraje), existen épocas en que el forraje no satisface los requerimientos energéticos de animales a pastoreo (Leaver 1985; Holden y col 1994). En consecuencia, debido a las condiciones climáticas imperantes del sur de Chile, 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 (Balocchi 1998).

Con respecto al alimento, el consumo de materia seca, es la variable más importante que influye en la productividad de la vaca lechera (Pulido 1999). Según Leaver (1986), vacas lecheras en pastoreo tendrían consumos promedio de materia seca menores de 3% de su peso vivo, pero que éste podría aumentar hasta un 3,5% en vacas de alta producción.

Pulido (1999) señala que animales de producción consumen sólo entre 0,2 y 0,4 % de materia seca adicional de forraje por cada kilogramo de incremento en la producción de leche, pudiendo aumentar de esa forma el balance nutricional negativo. Reportes nacionales indican que en primavera, los consumos de materia seca obtenidos, permiten producir entre 20 a 25 kg/día, bajo buenas condiciones de pastoreo (Lanuzza 1988; Beck y Pessot 1992).

### **3.1.3 Uso estratégico de suplementación**

Como se mencionó anteriormente, para sobrepasar el límite máximo en producción que impone la pradera es necesario recurrir al uso de alimentos suplementarios (Pulido 1999).

Entre los objetivos principales de la suplementación en pastoreo están maximizar la producción de leche por unidad animal, aumentar la carga animal y la producción de leche por unidad de superficie, mejorar el uso de la pradera a través de mayores cargas, mantener o mejorar la condición corporal y los índices reproductivos, lograr mayor persistencia de la lactancia e incrementar la cantidad de proteína láctea (Kellaway y Porta 1993). Según Peyraud y Delaby (2001), esto se lograría a consecuencia del aumento en el consumo de energía junto al de materia seca total.

Las estrategias apropiadas para suplementar vacas de alta producción, requieren de la comprensión de los efectos de los diferentes tipos de suplementos sobre el consumo de materia



seca, del desempeño animal y de la digestión ruminal, además de proveer los nutrientes que cubran las deficiencias nutricionales de la pradera, teniendo en cuenta los requerimientos de los animales, según su estado fisiológico y condición corporal (Kellaway y Porta 1993). Las mayores respuestas a la suplementación, pueden ser encontradas en las vacas de alto mérito genético, debido a que éstas destinan la mayor parte de los nutrientes suplementados a la producción de leche y una menor proporción a la mantención o recuperación de la condición corporal, en relación a las vacas de reducido mérito genético (Kellaway y Porta 1993).

En general existen dos estrategias, la primera considera el uso de forrajes conservados o de cultivos suplementarios de verano y de invierno (Balocchi 1998). La otra estrategia 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, existiendo otros factores limitantes tales como las cantidades de carbohidratos estructurales y no estructurales, 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).

Bajo el escenario económico en que se desarrollan actualmente las lecherías del sur de Chile, es necesario considerar el precio de la leche y el precio relativo del concentrado (Jahn 1996), ya que el costo por kg de MS de forraje es significativamente menor que el costo por kg de MS de concentrado (Balocchi 1999<sup>b</sup>), razón por la cual, la suplementación con concentrado en animales en pastoreo debiera ser estratégica, con el propósito de suplir el déficit de MS, energía metabolizable (EM) y de nutrientes específicos, así como aumentar la producción por sobre la obtenible exclusivamente a pastoreo y de esta manera ofrecer una dieta balanceada, manteniendo una ración de bajo costo (Pulido 1997). Es así como vacas que se mantienen pastoreando una pradera de alta calidad y sin suplementación, presentan una ingesta más baja de MS (19,0 vs. 23,4 kg MS/día) y una menor producción de leche (29,6 vs. 44,1 kg leche/día), que las vacas suplementadas (Mc Gilloway y Mayne 1996).

No obstante, al suplementar las vacas a pastoreo, el consumo de pradera decrece, lo que es definido como tasa de sustitución (Kellaway y Porta 1993). Recientemente, se informó que la tasa de sustitución se debe principalmente a un cambio en el comportamiento alimenticio de los animales en pastoreo (Mayne 1991; Pulido 1997), mediado por un menor tiempo de pastoreo. 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 es generalmente baja (0,5 kg de leche/ kg de concentrado) y 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. 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), por lo tanto, bajas tasas de sustitución, producen mayor producción de leche por kilogramo de suplemento (Bargo y col 2002).

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). 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. Es decir, 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).

### **3.1.4 Nivel y frecuencia de suplementación**

Ha sido reportado que los alimentos concentrados producen menores tasas de sustitución que alimentos voluminosos y que la tasa es mayor a mayor nivel de suplementación (Kellaway y Porta 1993). Es decir, animales de alta producción y con bajos niveles de suplementación tendrían tasas de sustitución menores (Bao y col 1992). Pulido (1997) señaló que vacas lecheras en pastoreo primaveral con suplementación sobre los 6 kg diarios producían un gran efecto depresivo sobre el tiempo de pastoreo, con la consecuencia de una menor eficiencia de kg de leche por kg de concentrado.

Las respuestas esperadas en producción de leche en vacas de alta producción a cantidades crecientes de suplementación con granos, disminuyen desde 1,3 a 0,5 kg de leche/kg de concentrado cuando los niveles de suplementación se incrementan de 2 a sobre 8 kg/vaca/día, respectivamente (Muller 1999).

En los sistemas pastoriles, sólo se maneja la frecuencia en el suministro del concentrado generalmente durante las ordeñas. Es aceptado que la suplementación con concentrado es fácilmente manejada en los sistemas confinados donde se suministra el alimento diariamente a distinta frecuencia en comederos (Rearte 1997).

La literatura es escasa en relación al efecto que generarían diferentes frecuencias de suplementación en vacas lecheras a pastoreo. Según Gibson (1984) las vacas que reciben suplementación con mayor frecuencia mostrarían un pequeño efecto positivo sobre el contenido de grasa en la leche y, en menor medida sobre la producción láctea.

Sin embargo, recientemente, Hongerholt y col (1997) señalan que el aumento en la frecuencia de alimentación de vacas en pastoreo permitiría aumentos en el consumo y en la eficiencia con que el alimento es utilizado, beneficiaría la digestión ruminal, el metabolismo tisular y la producción de leche. Además habría una menor demanda de capacidad ruminal asociada a la frecuencia de alimentación, lo que resultaría de un mayor consumo.

Este aumento en la frecuencia reduciría también las fluctuaciones diurnas en la concentración de metabolitos y de pH en rumen y en el flujo de ingesta al intestino delgado. Ello resultaría en una oferta más consistente de ácidos grasos volátiles y de aminoácidos al flujo sanguíneo y a la glándula mamaria de la vaca (Rearte 1997).

### **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 nitrógeno no proteico (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).

Desde un punto de vista nutricional y económico esto se ha explotado utilizando fuentes nitrogenadas no proteicas de bajo costo, permitiendo que los microorganismos sinteticen proteína para satisfacer los requerimientos de aminoácidos del animal (Cunningham 1999).

#### **3.2.1 Origen y síntesis de proteína microbiana**

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 de 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 metabólica y replicación 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 un 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 la urea es excretada por la orina, con un consiguiente gasto energético para el animal y la otra parte, significativamente 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 tejidos, 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). Clark y col (1992) indican que el 59% de la proteína que llega al intestino delgado correspondería a origen microbiano. 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**

La cantidad de energía y nitrógeno (N) disponible en el rumen, y el nivel de consumo de alimento por el animal son los factores nutricionales que más limitan el crecimiento microbiano (Clark y col 1992). 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 del retículo-rumen para su crecimiento y la síntesis de proteína microbiana (AFRC 1995).

Según Valadares Filho (1995), los carbohidratos constituyen la principal fuente de energía para el crecimiento de los microorganismos ruminales. Sin embargo, la proteína bruta puede contribuir como fuente energética (vía fermentación de los esqueletos de carbono derivados de la deaminación de aminoácidos), aunque ésta no sea su función principal en el rumen.

Clark y col (1992) verificaron que la alteración de la relación voluminoso/concentrado en la dieta podría influir en el crecimiento microbiano, a raíz de la variación de energía. Dependiendo del tipo de carbohidratos que contengan los concentrados, ya sean estos en base a almidón o fibra digestible, variaría 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, facilitando la síntesis de proteína microbiana y aumentando la producción de leche (Muller 1996). Por otro lado, el uso de concentrados amiláceos por su rápida fermentación en el rumen, promueven un incremento en la acidez con disminución del pH ruminal, alterando la ecología microbiana y del consumo de materia seca

(Sniffen y Robinson 1987), esto llevaría a altas tasas de sustitución de forraje por concentrado, por lo que es esperable un efecto negativo en el funcionamiento ruminal (Webster 1993).

Otro factor a ser considerado en la síntesis de proteína microbiana es la sincronización de los aportes de N y de sustratos que aporten energía para los microorganismos del retículo-rumen, ya que se ha sugerido que una correcta sincronización mejoraría la captura y utilización de la proteína degradable en el rumen y aumentaría los niveles productivos del animal (Kolver y col 1998). Es por ello que, en vacas lecheras de sistemas pastoriles, se requiere el aporte de un suplemento como una fuente de energía adicional a la pradera y de alta disponibilidad en el rumen, para así mejorar la utilización de las altas cantidades de proteína degradable de la pradera en primavera y de esa manera estimular la síntesis de proteína microbiana (Muller 1999). Sin embargo, en un estudio realizado por Kolver y col (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.

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%, ésta 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 relacionada con el consumo (AFRC 1993).

### **3.3 LOS DERIVADOS DE PURINAS**

#### **3.3.1 Origen y destino**

Los derivados de purinas (DP) se originan de tres fuentes posibles: bases puricas de microorganismos ruminales, purinas dietéticas y purinas de origen endógeno, esta última fuente como resultante del recambio tisular de los animales. En rumiantes los DP provienen principalmente de ácidos nucleicos de microorganismos ruminales que fluyen al duodeno donde son digeridos y absorbidos (Antoniewicz y col 1981).

En rumiantes, alantoína (A), ácido úrico (AU), hipoxantina (HX) y xantina (X), corresponden al producto final del catabolismo de las purinas y colectivamente se les conoce como derivados de purinas (DP) (Fujihara y col 1987).

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 (Chen y Gomes 1992).

La excreción urinaria de derivados de purinas (DPe) en rumiantes puede ser usada para estimar el flujo intestinal de proteína microbiana. Para lograr esto, primero se requiere estimar

los requerimientos de N de los rumiantes y la cantidad de éste que es digerido y absorbido en el intestino delgado. Esta estimación debe diferenciar entre el N de origen dietético que escapa a la degradación ruminal (sobrepasante) y el N de origen microbiano (Sandoval y Herrera 1999).

La DPe diaria está relacionada directamente con la cantidad de purinas absorbidas (cantidad de ácidos nucleicos microbianos absorbidos) por el duodeno y por lo tanto, con la síntesis de proteína microbiana en los rumiantes (Rys y col 1975; Chen y col 1991).

En bovinos, solamente se ha encontrado A y AU en la orina, debido a que poseen una alta actividad de la enzima xantina oxidasa en la sangre y tejidos. Esta enzima 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 utilizados por el tejido animal (Verbic y col 1990). Consecuentemente, la alantoína es el DP 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 determinación de los DP urinarios es un indicador útil en estudios de nutrición de rumiantes, ya que a partir de ellos es posible calcular la cantidad de ácidos nucleicos microbianos metabolizados por el animal y obtenidos de los microorganismos ruminales (Tamminga y Chen 2000).

Numerosos trabajos han demostrado que existe alta correlación entre la infusión abomasal de ácidos nucleicos con la excreción de DP urinarios (Chen y col 1992<sup>b</sup>). Para obtener la totalidad de los DP (alantoína y ácido úrico) excretados diariamente se requiere la recolección diaria total de orina, pero para hacerlo aplicable a condiciones de animales en producción y pastoreo, es necesario simplificarlo hasta obtener muestras puntuales de orina. Esto es posible ya que la producción de DP es constante durante el día (Chen y col 1992<sup>b</sup>) y la dilución de la orina se puede corregir mediante la concentración de la muestra urinaria con un marcador interno o externo (Orellana y col 1998).

La creatinina (CT), producto final de la degradación de la fosfocreatinina, es un metabolito que se considera como un marcador interno (Gonda 1995), ya que cumple con los requisitos de ser excretada por la orina a una tasa constante con baja variabilidad durante el día y de ser independiente, tanto del consumo de alimento como de la producción y digestión de los microorganismos ruminales (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) determinaron que la excreción diaria de alantoína (A) y creatinina (CT) en ovejas fueron lo suficientemente constante como para predecir la excreción diaria de A a partir de la tasa A/CT de la orina con una alta correlación entre los valores medidos en la orina total ( $r=0,86$ ;  $CV=13,3\%$ ). La tasa A/CT puede ser corregida por el peso metabólico para facilitar la comparación entre animales (Chen y col 1992<sup>b</sup>).

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<sup>0,75</sup> : Peso metabólico corporal.  
 X : Absorción de purinas exógenos (mmol/día -1).

### 3.3.2 Factores que influyen en la excreción de derivados de purinas

La calidad de la dieta puede influir en 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 el 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 puricas recuperadas en la orina ( $0,44 \pm 0,06$ ) es significativamente menor que en la lactancia tardía (González-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 (González-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).

### 3.3.3 Aporte endógeno a la excreción de derivados de purinas

En la orina de los bovinos, tanto las purinas endógenas como las exógenas poseen una composición similar, de aproximadamente 85% de alantoína y 15% de ácido úrico. La excreción endógena de DP, por kg de peso metabólico, en los bovinos es de  $530 \mu\text{mol/kg PV}^{0,75}$  por día (Chen y Gomes 1992). Esta fracción proviene de los ácidos nucleicos de los tejidos. Su valor no es constante entre especies (Chen y col 1990; Orellana Boero y col 2001) ni dentro de una misma especie (Liang y col 2004), y no se maneja información sobre si es afectado por la producción o el estado fisiológico de los animales (González-Ronquillo y col 2003). Según Chen y col (1992<sup>a</sup>), la excreción endógena está relacionada con el peso metabólico de los animales, por lo que al aumentar éste, la excreción endógena también aumenta. En bovinos se ha estimado que la excreción endógena de DP es de 385 micromoles 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, considerando que la recolección nunca es completa, porque hay pérdidas por diferentes vías metabólicas (Verbic y col 1990).

### 3.4. MÉTODOS DE ESTIMACIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA RUMINAL

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). Dichas técnicas que tienen la desventaja de ser invasivas, costosas, tediosas y sujetas a error.

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 derivados de purina. El método no requiere de procesos quirúrgicos en los animales ya que sólo se requiere contar con instrumental de laboratorio como un espectrofotómetro ultravioleta o un cromatógrafo (Tamminga y Chen 2000).

La determinación de la proteína microbiana a partir de la excreción urinaria de los DP es hoy una técnica de uso rutinario en bovinos, ovinos y caprinos. Este modelo ha sido posible dado que se han identificado los DP en estas especies y se han determinado las relaciones entre la infusión de bases púricas y su recuperación urinaria como DP así como también se ha cuantificado la contribución endógena y la recuperación para resíntesis de ácidos nucleicos del animal (síntesis de rescate) (Chen y col 1990).

Finalmente, 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 DP, 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).



### **3.5 HIPÓTESIS Y OBJETIVO DE LA MEMORIA DE TÍTULO**

#### **3.5.1. Hipótesis**

La hipótesis que se plantea es que la variación en la frecuencia de suplementación con concentrado modifica la síntesis de proteína microbiana ruminal en vacas lecheras a pastoreo primaveral.

#### **3.5.2. Objetivo**

El objetivo de esta Memoria de Título es determinar el efecto sobre la síntesis de proteína microbiana total (PMCT), proteína microbiana digestible (PMCD) y el rendimiento microbiano (RM), en vacas lecheras a pastoreo primaveral sometidas a tres frecuencias de suplementación con concentrado, mediante la determinación de derivados purínicos excretados en la orina.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL EXPERIMENTAL

#### 4.1.1. Ubicación geográfica y duración del ensayo

El ensayo se realizó en el predio experimental “Vista Alegre”, de propiedad de la Universidad Austral de Chile, ubicado 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" de latitud sur y los meridianos 73°13'13" y 73°12'24" longitud oeste, a una altura promedio de 12 metros sobre el nivel del mar.

El ensayo tuvo una duración aproximada de 65 días, realizándose entre el 21 de Septiembre y el 22 de Noviembre del 2004.

#### 4.1.2. Animales

Se utilizaron 21 vacas multíparas de raza Frisón Negro Chileno, seleccionadas de los predios “Punahue”, “Santa Rosa” y “Vista Alegre”, pertenecientes al rebaño lechero de la Universidad Austral de Chile. Los criterios de selección dentro de dichos rebaños fueron la época de parto (primavera), número de lactancia, producción de leche, peso vivo y días en lactancia al inicio del ensayo. La media y la desviación estándar de cada uno de los caracteres de selección mencionados para el rebaño, al inicio del ensayo, fueron de  $66,8 \pm 12,0$  días en lactancia;  $3,5 \pm 2,1$  lactancias; producción láctea de  $29,7 \pm 4,8$  litros al día, condición corporal inicial de  $2,3 \pm 0,3$  en la escala de 5 puntos y  $501,9 \pm 46,5$  kg de peso vivo.

#### 4.1.3. Ambiente

Durante el periodo experimental de pastoreo se presentaron en promedio precipitaciones de 6,7 mm por día aproximadamente, y una temperatura promedio de 12,3 °C con una mínima y máxima de 9,1 °C y 17,8 °C, respectivamente.

#### 4.1.4. Alimentos

**4.1.4.1. Pradera.** Para el ensayo de campo se utilizaron 5,2 hectáreas de pradera permanente mixta mejorada, uniforme en cuanto a edad, composición botánica y manejo (Cuadro 2). La superficie fue dividida en 5 potreros de aproximadamente 1,2 hectáreas cada uno. La distancia de los potreros a la sala de ordeña era de aproximadamente 600 metros. Cada potrero se subdividió, con cerco eléctrico móvil, para realizar un pastoreo rotativo en franja. Las mediciones de disponibilidad de materia seca de la pradera se realizaron con un plato medidor de praderas marca JENQUIP® (Filip's folding plate pasture meter, New Zealand).

**4.1.4.2. Concentrado.** Para la suplementación se utilizó un concentrado peletizado de tipo amiláceo, el cual estaba compuesto por 93% de grano de cebada, 5% de afrecho de soja y 2% de melaza (Cuadro 3). Los materiales para manipulación del concentrado fueron una balanza electrónica, bolsas plásticas y lápiz marcador para identificación de las bolsas.

**4.1.4.3. Sales Minerales y agua.** Las sales minerales\* fueron entregadas en forma diaria junto con el concentrado. El agua de bebida fue entregada a libre disposición, en el patio de espera de la sala de ordeño y en el potrero, mediante el uso de bebederos móviles.

#### **4.1.5. Envases para toma de muestras de orina**

Para la recolección, se usaron frascos de plástico de 500 ml sin contenido a los cuales se les colocó una malla filtradora en la parte superior para filtrar la orina y evitar la contaminación con material fecal. Además se dispuso de jeringas para medición y transferencia del volumen de 9 ml de orina a los envases de almacenamiento. Para el almacenamiento de las muestras de orina, se utilizaron frascos de plástico estéril de 30 ml. Cada frasco contenía 1 ml de ácido sulfúrico (10% p/v), 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).

#### **4.1.6. Romana**

La romana utilizada, poseía una capacidad para 1.500 kg y presentaba un margen de error en su lectura, de alrededor de 1 kg, encontrándose instalada a un costado de la sala de ordeña del predio.

## **4.2. MÉTODO EXPERIMENTAL**

### **4.2.1. Tratamientos**

Los 21 animales fueron distribuidos en 3 grupos de 7 vacas cada uno, utilizándose un diseño experimental aleatorio, a cada grupo se le asignó un tratamiento durante todo el período que comprende el experimento, siendo así cada grupo independiente del otro en cuanto a alimentación y potrero de pastoreo.

Los tratamientos fueron:

- PFS2: Pastoreo, más 6 kg de concentrado, entregados con una frecuencia de dos raciones iguales al día de 3 kg, durante ambas ordeñas diarias.
- PFS3: Pastoreo, más 6 kg de concentrado, entregados con una frecuencia de tres raciones iguales al día de 2 kg; dos durante ambas ordeñas diarias y una tercera ración ofrecida en comedero ubicado en el potrero a las 12:00 hrs.
- PFS4: Pastoreo, más 6 kg de concentrado, entregados con una frecuencia de cuatro raciones iguales al día de 1.5 kg; dos durante ambas ordeñas diarias, la tercera y cuarta ración ofrecidas en comedero ubicado en el potrero a las 12:00 hrs. y 20:30 hrs., respectivamente.

---

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

#### **4.2.2. Manejo y alimentación de los animales**

Los animales fueron manejados en un sistema de pastoreo rotativo, asignándoles una superficie de pradera repartida en dos franjas al día mediante el uso de cerco eléctrico. Cada franja se ofreció después de cada ordeña. El ancho de cada franja se relacionó con el crecimiento de la pradera, ofreciendo una disponibilidad de pradera que fluctuó entre 35 y 40 kg MS/vaca/día y considerando una altura de residuo igual o mayor a 10 cm, evitando con ello, que la disponibilidad y la altura fueran factores limitantes en el consumo voluntario.

La disponibilidad de pradera al ingresar y salir de cada franja, se ponderó utilizando el plato medidor, el cual mide la relación entre la altura y densidad de la cubierta pratense (Hodgson 1990). Se realizaron 100 mediciones en forma de zig-zag, 3 veces a la semana, en el sector postpastoreo y prepastoreo de la superficie asignada a cada tratamiento, para obtener la cantidad de materia seca (kg) que quedó como residuo y para determinar la cantidad de pradera (kg) a ofrecer en la franja siguiente, respectivamente.

Las raciones de concentrado se pesaron diariamente con una balanza electrónica, guardándose individualmente en bolsas plásticas identificadas con la cantidad (1,5; 2,0 y 3,5 kg) de concentrado correspondientes a cada tratamiento. El concentrado fue ofrecido como lo señala el punto 4.2.1.

#### **4.2.3. Muestreos y análisis de los alimentos**

La pradera para ser analizada químicamente, fue muestreada semanalmente al azar. Los cortes se efectuaron simulando la altura de talaje realizado por los animales, al cual se le denominó “pradera consumida”.

En el caso del concentrado, éste se muestreo separadamente al azar, desde varios sacos diferentes. Las muestras de pradera y de concentrado, fueron analizadas por el Laboratorio de Nutrición Animal, de la Universidad Austral de Chile. Los análisis químicos realizados se detallan en el siguiente cuadro (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Análisis químicos realizados en muestras de pradera y concentrado.

Parámetro	Unidad	Método	Referencia
Materia seca (MS)	%	Horno de ventilación forzada a 60°C por 48 horas y estufa a 105°C por 12 horas	Bateman (1970) Association of Official Analytical Chemists (AOAC 1996)
Cenizas totales (CT)	% de MS	Calcinación en mufla a 550°-600°C por 5 horas	AOAC (1996)
Proteína cruda (PC)	% de MS	Micro Kjeldhal (Nitrógeno x 6,25)	Bateman (1970)
Fibra detergente ácido (FDA)	% de MS	Digestión con detergente ácido	AOAC (1996)
Fibra detergente neutro (FDN)	% de MS	Digestión con detergente neutro	Van Soest y col (1991)
Energía metabolizable (EM)	Mcal/kg de MS	Regresión a partir del valor "D" (EM = 0,279 + 0,0325 x D %)	Garrido y Mann (1981)
Extracto etéreo (EE)	% de MS	Análisis proximal	Bateman (1970)

#### 4.2.4. Recolección de muestras de orina

De cada animal se obtuvieron en total 6 muestras de orina a la semana, la recolección se realizó durante 3 días consecutivos, 2 veces al día después de finalizadas las ordeñas de la mañana y de la tarde. El método de obtención de la orina, fue por estimulación vulvar, desechándose las primeras micciones. Mediante el uso de una jeringa, se transfirieron 9 ml de orina desde el frasco colector a un frasco estéril, homogenizándose ésta con 1 ml de ácido sulfúrico (10% p/v), previamente incorporado al frasco. Inmediatamente después, las muestras eran almacenadas en un congelador, a una temperatura de -20 °C. Las seis muestras obtenidas fueron descongeladas y homogenizadas, para obtener una muestra compuesta y ser transferidas a un nuevo frasco estéril identificado con el número de cada vaca y semana correspondiente. Al finalizar el ensayo las muestras se enviaron al Departamento de Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, para el análisis y determinación de derivados de purinas (DP).

#### 4.2.5. Análisis de las muestras de orina

Se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), descrita por Resines y col (1992), usando un cromatógrafo marca Hitachi, modelo L-500, con una bomba programable 655A-11, un detector UV 655 A, acoplado a un integrador D-2000 y una columna LiChroSpher 100-RP18 5  $\mu$ m (244 x 4 mm). Las muestras de orina fueron diluidas 1/100 con solución stock y filtradas (0,45  $\mu$ m) antes de ser inyectadas en el cromatógrafo. De las muestras de orina de cada animal se obtuvo la concentración molar de ácido úrico, alantoína y creatinina (mmol/L).

#### 4.2.6. Cuantificación y estimación de variables de interés a partir del análisis químico de las muestras de orina

**4.2.6.1.** Concentración de los derivados de purina (DP) en la muestra de orina. Se obtuvieron sumando las concentraciones molares de A (mmol/L) y AU (mmol/L), obtenidas a través de la técnica HPLC señalada en el punto 4.2.5.

**4.2.6.2.** Concentración diaria de derivados de purina. Las concentraciones de alantoína y ácido úrico excretados en la orina al día (mmol/d), se determinaron mediante las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned} A \text{ (mmol/d)} &= A \text{ (mmol/L)} \times VO \text{ (L/d)} \\ AU \text{ (mmol/d)} &= AU \text{ (mmol/L)} \times VO \text{ (L/d)} \end{aligned}$$

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:

$$VO \text{ (L/d)} = CT \text{ (mg/d)} / CO \text{ (mg/L)}$$

Donde:

VO : Volumen de orina estimado en litros al día (Al-Khalidi y Chaglassian 1965).  
CT : Creatinina total excretada en miligramos al día.  
CO : Concentración de creatinina en la muestra de orina en miligramos por litro.

La excreción diaria de creatinina en la orina (CT), fue calculada de la siguiente forma (mmol/día):

$$CT \text{ (mg/d)} = PV \text{ (kg)} \times C \text{ (mg/kg)}$$

Donde:

CT : Creatinina total excretada en miligramos al día.  
PV : Peso vivo.  
C : Constante que equivale a una excreción de creatinina de 26 mg/kg de PV (Lindberg 1989).

**4.2.6.3.** Excreción diaria de los derivados de purina (DPe). Este parámetro fue calculado mediante la fórmula citada por Faichney y col (1995).

$$DPe \text{ (mmol/d)} = \frac{DPT \text{ (mmol/L)} \times (PV \text{ (kg)} \times K_{CT})}{CT \text{ (mmol/L)}} / 113,12$$

Donde:

- Dpe : Excreción diaria de los derivados de purinas.  
 DPT : Concentración total de los derivados de purinas en la muestra de orina.  
 PV : Peso vivo.  
 CT : Concentración de creatinina en la muestra de orina.  
 K<sub>CT</sub> : Coeficiente de excreción diario de creatinina (mg/d K) =  $113 PV^{-0,25}$ ,  
 obtenido de datos citados por Orskov y MacLeod (1982) y Chen y col  
 (1992<sup>a</sup>).  
 113,12 : Peso molecular de la creatinina.

**4.2.6.4.** Índice purínico (IP). El IP se calculó a través de la Dpe en la orina, corregida por el peso metabólico de los animales al momento de obtener la muestra, y a su vez la dilución de la muestra de orina, corregida por la creatinina (Sánchez 2003):

$$IP \text{ (mmol/d)} = \frac{DPe \text{ (mmol/d)} \times PV^{0,75}}{CT \text{ (mmol/d)}}$$

Donde:

- IP : Índice purínico.  
 DPe : Excreción diaria de derivados de purinas en la orina.  
 CT : Excreción diaria de creatinina en la orina.  
 PV<sup>0,75</sup> : Peso metabólico del animal.

**4.2.6.5.** 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):

$$PA \text{ (mmol/d)} = \frac{DPe \text{ (mmol/d)} - (0,385 \times PV^{0,75})}{0,85}$$

Donde:

- PA : Purinas absorbidas al día.  
 DPe : Estimación de la excreción diaria de los derivados de purinas.  
 0,85 : Factor de recuperación como DP de las purinas absorbidas.  
 (0,385 x PV<sup>0,75</sup>) : Contribución endógena de DP en mmol/kg de peso metabólico.

**4.2.6.6.** Aporte de nitrógeno microbiano (NM). Se estimó utilizando la fórmula descrita por Chen y Gomes (1992):

$$NM \text{ (g/d)} = \frac{PA \text{ (mmol/d)} \times 70 \text{ (mg/mmol)}}{0,83 \times 0,116 \times 1000}$$

Donde:

- NM : Nitrógeno microbiano en gramos al día.
- PA : Purinas absorbidas al día
- 70 : Contenido de nitrógeno en las purinas (mg N/mmol).
- 0,83 : Factor de digestibilidad de las purinas.
- 0,116 : Tasa de nitrógeno en las purinas dividida por el nitrógeno total de los microorganismos del retículo-rumen (11,6 / 100).
- 1000 : Factor de corrección de miligramos (mg) a gramos (g)

**4.2.6.7.** Rendimiento microbiano (RM). Se obtuvo a partir del NM (g/d) producido dividido por la unidad de alimento consumido, expresado como NM por kg de materia seca ingerida (MSI) (Chen y col 1992<sup>a</sup>).

**4.2.6.8.** Proteína microbiana total (PMCT). La proteína microbiana total fue estimada por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{PMCT (g/d)} = \text{NM (g/d)} \times 6,25$$

Donde:

- PMCT : Proteína microbiana total en gramos al día.
- NM : Aporte de nitrógeno microbiano en gramos al día.
- 6,25 : Contenido de nitrógeno de las proteínas.

**4.2.6.9.** Proteína microbiana digestible (PMCD). La proteína microbiana digestible se estimó por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{PMCD (g/d)} = \text{PMCT (g/d)} \times 0,6375$$

Donde:

- PMCD: Proteína microbiana digestible en gramos al día.
- PMCT : Proteína microbiana total en gramos al día.
- 0,6375 : Fracción de PMCT digestible, obtenida a partir de la multiplicación del contenido de proteína de los microorganismos ruminales (0,75) y el (%) porcentaje de digestibilidad de la misma (0,85) (AFRC 1995).

#### **4.2.7. Análisis estadístico**

El diseño experimental utilizado fue aleatorio continuo, utilizando medidas repetidas. El análisis estadístico y presentación de los resultados, se realizó mediante una descripción estadística, basada en parámetros de posición y dispersión (media de mínimos cuadrados y desviación estándar), utilizando análisis de varianza (ANDEVA), el cual se efectuó aplicando un nivel de significancia de 5%. Se analizaron las variables de alantoína, ácido úrico, DPT,



DPe, PA, NM, NM/MSI, PMCT y PMCD. La prueba que se utilizó para comparar diferencias entre los tratamientos fue la Prueba de Tukey.

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

$$Y_{ijkl} = u + T_i + C_{ij} + P_k + TP_{ij} + e_{ijkl}$$

Donde:

$Y_{ijkl}$  : 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.

$u$  : Representa el intercepto.

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

$C_{ij}$  : Representa el efecto de la vaca j, anidada en el tratamiento i ( $j = 1,2,3,4,5,6,7$ )

$P_k$  : Representa el efecto fijo del tiempo de muestreo k ( $k = 1,2,3$ ).

$TP_{ij}$  : Representa el efecto fijo de la interacción entre el tratamiento i y el tiempo de muestreo.

$e_{ijkl}$  : Representa el efecto residual aleatorio  $\sim N(0, \sigma^2)$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS

#### 5.1.1. Composición química de la pradera

En el Cuadro 2 se presenta la composición química y nutricional de la pradera. Los valores corresponden a promedios del periodo, obtenidos de muestreos medidos a la altura del residuo dejado por las vacas (pradera consumida).

**Cuadro 2.** Composición química promedio y desviación estándar (DE) de la pradera consumida por vacas lecheras en pastoreo primaveral y suplementadas con concentrado dos (PFS2), tres (PFS3) y cuatro (PFS4) veces al día, expresada en base a materia seca (MS).

<b>Composición</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>
Materia seca (MS)	16,2	1,95
Proteína cruda (PC)	21,5	1,42
Energía metabolizable (EM)	2,8	0,08
Fibra detergente neutro (FDN)	51,3	5,86
Fibra detergente ácido (FDA)	25,8	1,58
Carbohidratos no estructurales (CNE)	15,4	6,62
Extracto etéreo (EE)	2,1	0,19
Cenizas totales (CT)	9,4	0,54

#### 5.1.2. Composición química del concentrado

En el Cuadro 3, se presenta la composición química del concentrado aportado durante el ensayo, el cual poseía en su composición grano de cebada, afrecho de soja y melaza.

**Cuadro 3.** Composición química promedio y desviación estándar (DE) del alimento concentrado consumido por vacas lecheras en pastoreo primaveral y suplementadas con concentrado dos (PFS2), tres (PFS3) y cuatro (PFS4) veces al día, expresada en base a MS.

<b>Composición</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>
Materia seca (MS)	87,6	0,44
Proteína cruda (PC)	13,2	0,54
Energía metabolizable (EM)	3,1	0,11
Fibra detergente neutro (FDN)	23,1	2,23
Fibra detergente ácido (FDA)	6,3	0,04
Carbohidratos no estructurales (CNE)	56,9	1,96
Extracto etéreo (EE)	3,5	0,29
Cenizas totales (CT)	3,1	0,12

## 5.2. NIVEL DE EXCRECIÓN DE LOS DERIVADOS DE PURINAS

### 5.2.1. Excreción diaria de alantoína, ácido úrico y derivados purínicos totales

En el Cuadro 4, se exponen los valores de excreción urinaria de alantoína (A), ácido úrico (AU) y la suma de ambos (DPT), expresados en mmol/d.

Se observa que al suplementar con concentrado (6 kg) a una frecuencia de dos veces al día las excreciones de A, AU y DPT son superiores en relación con los otros tratamientos. Sin embargo, las diferencias encontradas no fueron significativas estadísticamente ( $P>0,05$ ).

**Cuadro 4.** Excreción urinaria (promedio  $\pm$  DE) de alantoína (A), ácido úrico (AU) y total de derivados de purina (DPT) en vacas lecheras en pastoreo primaveral y suplementadas con concentrado dos (PFS2), tres (PFS3) y cuatro (PFS4) veces al día.

	PFS2	PFS3	PFS4	EE	P
A (mmol/d)	303,8 $\pm$ 89,72	296,5 <sup>a</sup> $\pm$ 61,80	294,2 <sup>a</sup> $\pm$ 73,46	11,628	0,557
AU (mmol/d)	19,3 <sup>a</sup> $\pm$ 11,52	18,6 <sup>a</sup> $\pm$ 7,58	20,3 <sup>a</sup> $\pm$ 11,55	1,584	0,438
DPT (mmol/d)	323,1 <sup>a</sup> $\pm$ 97,01	315,0 <sup>a</sup> $\pm$ 65,13	314,5 <sup>a</sup> $\pm$ 77,08	12,365	0,511

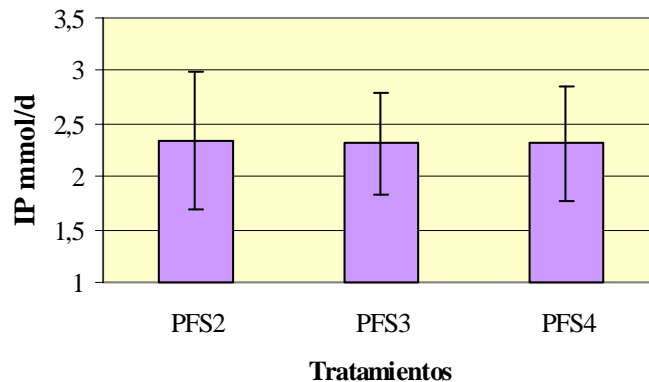
Letras iguales en una misma fila indican diferencias no significativas ( $P>0,05$ ).

P = valor P

EE = error estándar de la media.

### 5.2.2. Índice purínico

En la Figura 1 se presenta la excreción diaria de derivados de purina (DP), según peso metabólico animal, previa corrección de la dilución de la orina por la creatinina.

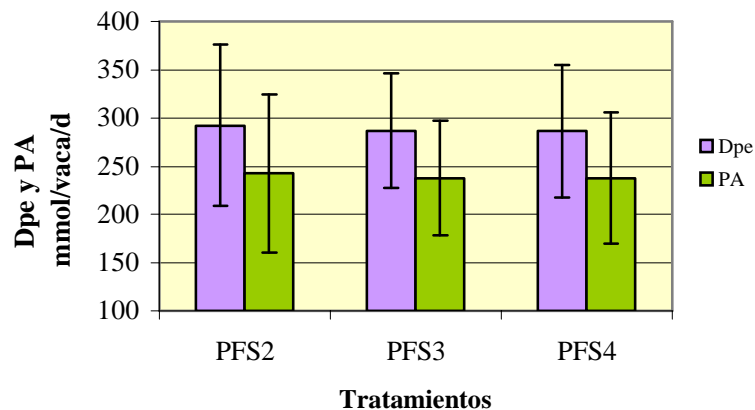


**Figura 1.** Índice purínico (IP) en vacas lecheras en pastoreo primaveral y suplementadas con concentrado dos (PFS2), tres (PFS3) y cuatro (PFS4) veces al día.

### 5.2.3 Excreción diaria de derivados de purinas y purinas absorbidas

En la Figura 2, se presentan los valores de excreción de derivados de purina urinarios y de las purinas absorbidas a nivel intestinal para cada tratamiento, estimados a partir de Dpe y expresados en mmol/vaca/d.

Se observa que en los tratamientos PFS2, PFS3 y PFS4, los valores de PA fueron 242,7; 237,9 y 237,6 mmol/vaca/d, respectivamente. Los valores de Dpe fueron 292,4; 287,0 y 286,7 mmol/vaca/d, respectivamente. Ambas variables (Dpe y PA) fueron similares en los tres grupos ( $P>0,05$ ), sin embargo, se observa una tendencia en el tratamiento PFS2, presentando valores superiores en relación con los otros tratamientos.



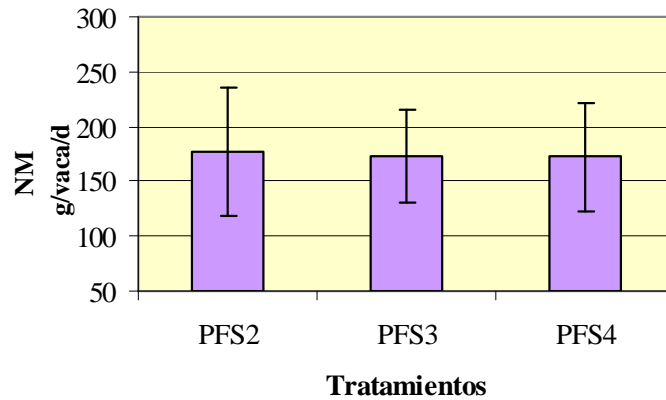
**Figura 2.** Excreción diaria de derivados de purinas (Dpe) y purinas absorbidas (PA), estimados en vacas lecheras en pastoreo primaveral y suplementadas con concentrado dos (PFS2), tres (PFS3) y cuatro (PFS4) veces al día.

## 5.3. METABOLISMO DEL NITRÓGENO A NIVEL RUMINAL

### 5.3.1. Síntesis de nitrógeno microbiano

La cantidad de nitrógeno microbiano expresada como g/vaca/d, producida por animal al día según el tratamiento, y estimada a partir de PA, se expone en la Figura 3.

En la Figura 3, se observa que los valores de NM de los tratamientos fueron para PFS2 de 204,2 g/vaca/d; para PFS3 de 172,9 g/vaca/d y para PFS4 de 172,7 g/vaca/d. Los valores de NM fueron similares en los tres grupos ( $P>0,05$ ), no obstante, en el tratamiento PFS2 se aprecia una tendencia, ya que presenta valores de NM superiores con respecto a los demás tratamientos.

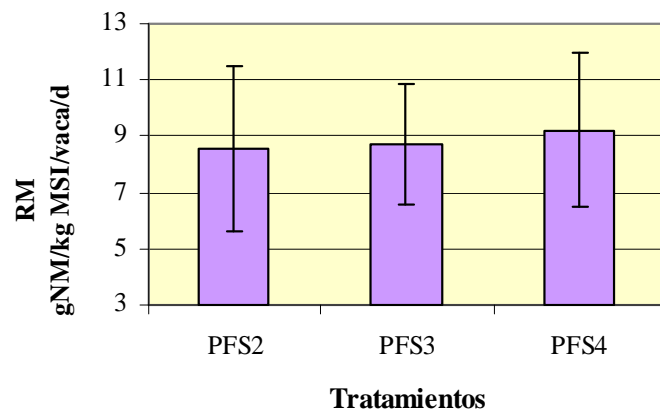


**Figura 3.** Estimación de la síntesis diaria de nitrógeno microbiano (NM) en vacas lecheras en pastoreo primaveral y suplementadas con concentrado dos (PFS2), tres (PFS3) y cuatro (PFS4) veces al día.

### 5.3.2. Rendimiento microbiano

En la Figura 4, se muestra la cantidad de NM producido por kg de materia seca ingerida (MSI) al día, estimada a partir de la síntesis diaria de NM (g/vaca/día), según tratamiento.

Los valores obtenidos para los tratamientos PFS2, PFS3 y PFS4 fueron 8,5; 8,7 y 9,2 g NM /kg MSI/vaca/d, respectivamente. El RM fue similar en los 3 grupos ( $P > 0,05$ ), sin embargo, se denota una tendencia de rendimiento microbiano al aportar el concentrado en 4 raciones/día (PFS4).



**Figura 4.** Rendimiento microbiano estimado (RM) en vacas lecheras en pastoreo primaveral y suplementadas con concentrado dos (PFS2), tres (PFS3) y cuatro (PFS4) veces al día.

#### 5.4. SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA

En el Cuadro 5, se presenta la cantidad de proteína microbiana total (PMCT) (g/d), estimada a partir de la síntesis diaria de NM (g/vaca/d) y la cantidad de proteína microbiana digestible (PMCD) (g/d), estimada a partir de la PMCT producida, según tratamiento.

Del Cuadro 5, se desprende que para ambas variables, PMCT y PMCD (g/d), los valores son similares entre los tres grupos ( $P>0,05$ ). Sin embargo, tienden a ser mayores en el tratamiento a pastoreo suplementado dos veces al día (PFS2), resultando para PFS3 y PFS4 valores menores en ambas variables, con respecto al tratamiento mencionado antes.

**Cuadro 5.** Producción estimada de PMCT y PMCD (promedio  $\pm$  DE), en vacas lecheras en pastoreo primaveral y suplementadas con concentrado dos (PFS2), tres (PFS3) y cuatro (PFS4) veces al día.

	<b>PFS2</b>	<b>PFS3</b>	<b>PFS4</b>	<b>EE</b>	<b>P</b>
PMCT (g/d)	1097,4 <sup>a</sup> $\pm$ 169,62	1079,0 <sup>a</sup> $\pm$ 90,54	1087,4 <sup>a</sup> $\pm$ 122,51	48,213	0,5191
PMCD (g/d)	699,6 <sup>a</sup> $\pm$ 108,13	687,9 <sup>a</sup> $\pm$ 57,72	693,2 <sup>a</sup> $\pm$ 78,10	30,736	0,5191

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

P = valor P

EE = error estándar de la media.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS

#### 6.1.1. Composición química de la pradera

La composición botánica de la pradera utilizada en el pastoreo presentó un alto predominio de gramíneas de carácter forrajero, situación que según Alomar (1992) y Balocchi y Olivares (1992), es característico de las praderas de la zona sur de Chile.

Según Anrique y col (1995), la pradera permanente fertilizada de la Décima Región de Los Lagos de Chile, presenta durante la primavera una composición química promedio de 15,2% de materia seca (MS), 17,8% de proteína cruda (PC), 23,4% de fibra cruda (FC), y valores de energía metabolizable (EM) de 2,5 Mcal/kg de MS. Otros autores como Clark y Kanneganti (1998), sugieren que una pradera con un buen manejo debe presentar características tales como 18 a 24% de MS, 18 a 25% de PC, 40 a 55% fibra detergente neutro (FDN) y 2,5 a 2,9 Mcal de EM por kg de MS.

Los contenidos de nutrientes y fracciones analíticas de la pradera utilizada en este ensayo (Cuadro 2), presentan valores superiores a los reportados por Anrique y col (1995) para praderas de similares características de la Provincia de Valdivia, especialmente en cuanto a valores de materia seca, proteína bruta y energía metabolizable. Por otra parte, los porcentajes de MS, PC, FDN y Mcal/kg MS de EM en este ensayo se encuentran dentro de los rangos señalados por Clark y Kanneganti (1998).

La energía metabolizable promedio de la pradera, fue mayor a la que se señala en el ensayo realizado por Fernández (1999) y Berndt (2005), en los cuales se detallan valores de 2,53 y 2,61 Mcal/kg de MS, respectivamente. El valor de energía metabolizable del presente ensayo fue idéntico al obtenido por Felmer (2003). Los tres autores citados anteriormente realizaron ensayos en primavera y en el mismo predio experimental "Vista Alegre".

El valor promedio de proteína cruda encontrada fue mayor en comparación a trabajos como el de Fernández (1999), Felmer (2003) y Berndt (2005), quienes obtuvieron valores de 20,5%, 20,6% y 20,8% de PC, respectivamente. Holden y col (1995), y Kolver y Muller (1998), señalan que los forrajes frescos, como el utilizado en este ensayo, poseen proteína cruda de rápida y extensa degradación en el rumen, lo que junto a una mayor cantidad de energía en la dieta, permitirían una adecuada síntesis de proteína microbiana y una mayor producción de leche.

La fibra detergente neutro de la pradera del ensayo fue superior a los valores encontrados por Fernández (1999) y Felmer (2003) quienes informaron valores de FDN de 49,2% y 46,8%, respectivamente. Por otro lado, el valor de FDN del ensayo resultó menor al

descrito por Berndt (2005) con 52,1%, ubicándose en el rango descrito como aceptable, propuesto por Clark y Kanneganti (1998).

El crecimiento de la pradera fue afectado positivamente por las condiciones climáticas durante el ensayo, presentándose una temperatura promedio de 12,3°C y una pluviosidad de 6,7 mm por día, aproximadamente. Dichas condiciones provocaron altas tasas diarias de crecimiento de la pradera (Anrique y Balocchi 1993, Balocchi 1993), disponiéndose consecuentemente, de una cantidad de materia seca por hectárea suficiente para satisfacer las necesidades del ensayo.

### **6.1.2. Composición química de los concentrados**

El concentrado aportado en el ensayo (base 93% grano de cebada), mostró en su composición química promedio (Cuadro 3), valores que corresponden a la composición nutricional de concentrados de tipo amiláceo, los cuales se caracterizan por poseer un alto aporte de carbohidratos fermentables y un bajo aporte de fibra cruda a diferencia de otros concentrados (Anrique y col 1995). Según Kellaway y Porta (1993), los valores de composición nutricional se encuentran dentro de los niveles adecuados para vacas lecheras de alta producción (25 a 35 L/día).

Respecto a los concentrados basados en almidón, como el usado en este ensayo, éstos se caracterizan por una rápida fermentación en el rumen, por lo que consumos masivos provocarían que el pH ruminal disminuya bruscamente. Además, se han reportado altas tasas de sustitución de forraje por concentrado, por lo que sería esperable un efecto poco favorable respecto al metabolismo ruminal (Webster 1993). Sin embargo, los potenciales efectos negativos de los concentrados amiláceos no se manifestarían gravemente, debido al moderado nivel de suplementación (6 kg) ofrecido en este ensayo (Herrera-Saldana y col 1990).

## **6.2. NIVEL DE EXCRECIÓN DE DERIVADOS DE PURINA**

La excreción de derivados purínicos por la orina en los rumiantes ha sido propuesta para estimar la proteína microbiana ruminal disponible para el animal (Topps y Elliot 1965). La excreción diaria de DP depende de la concentración de DP en la orina, originados de purinas exógenas y endógenas (Chen y col 1992<sup>b</sup>), 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).

### **6.2.1. Excreción de alantoína y ácido úrico**

Tanto para la alantoína (A), derivado de purina de mayor proporción dentro de la orina, como para el ácido úrico (AU), los valores obtenidos en los tres tratamientos respectivos fueron estadísticamente similares (Cuadro 4). Situación que predispone a pensar que cálculos posteriores de otros indicadores, probablemente sigan un comportamiento similar.



Las concentraciones de alantoína y ácido úrico (mmol/L) excretadas por la orina fueron corregidas por el volumen urinario de cada vaca, obteniendo de esta forma la excreción de A y AU en mmol/d. Los valores de A y AU (mmol/d) del ensayo (Cuadro 4) resultaron mayores a los obtenidos por Strauch (2003), quien obtuvo valores promedio de A de 206,7 y de AU de 22,3 mmol/d en vacas a pastoreo suplementadas con 6 kg de concentrado amiláceo. En un ensayo similar al de Strauch (2003), Berndt (2005) obtuvo valores promedio de 274,2 mmol/d para A y 30,2 mmol/d para AU, lo que revela que en este ensayo se presentaron mayores concentraciones de A pero menores concentraciones de AU en relación al trabajo realizado por Berndt (2005).

### **6.2.2. Excreción diaria de derivados de purina (Dpe)**

Los valores de Dpe obtenidos (Figura 2) fueron similares a los reportados por Orellana y col (1998), quienes obtuvieron valores máximos de alrededor de 290 mmol al día, en animales en confinamiento y con una dieta diferente, basada en ensilaje de maíz, heno de alfalfa, coseta de remolacha y concentrado.

La excreción de derivados de purinas de este trabajo (Figura 2) son levemente mayores a los datos obtenidos por Strauch (2003), quien señala valores entre 235,9 y 222,3 mmol/vaca/d, para vacas a pastoreo suplementadas con concentrado amiláceo y fibroso, respectivamente. Sin embargo, si resultaron mayores a lo reportado por Köpfer (2001), quien informa valores de DPe, que oscilan entre 118,7 y 133 mmol/vaca/d, en un estudio realizado con vacas lecheras en confinamiento, con una dieta diferente, a base de ensilaje de ballica, paja tratada con hidróxido de sodio y concentrado. Las posibles razones que explicarían las discrepancias con los valores de excreción de purinas reportados por Strauch (2003) y Köpfer (2001), estarían dadas por efecto de la composición de las dietas, cantidad de PC y carbohidratos no estructurales de la pradera y los concentrados y el número de días muestreados. Por otro lado, las bajas concentraciones de DP en orina, en el presente ensayo y en los trabajos de Strauch (2003) y Köpfer (2001), se deberían a que los animales utilizados corresponden a vacas lecheras en la etapa inicial de la lactancia. González-Ronquillo y col (2003), observaron que durante esta etapa la proporción de bases púricas recuperadas en la orina eran menores que en la lactancia tardía.

No existe información disponible sobre el efecto que tendría la frecuencia de alimentación sobre la síntesis de proteína microbiana en vacas a pastoreo, sin embargo, se han reportado trabajos sobre este tema con animales en confinamiento. Chen y col (1992<sup>b</sup>) evaluaron el efecto de aumentar la frecuencia de alimentación, de una a dos veces al día, sobre las fluctuaciones diarias de alantoína y DP en plasma y orina en bueyes, alimentados con una dieta a base de heno, maíz roleado, harina de pescado y melaza. El aumento en la frecuencia de alimentación generó concentraciones plasmáticas y urinarias de alantoína y DP con mayores fluctuaciones diarias alimentando una vez al día y valores más constantes durante el día, al alimentar dos veces al día. Esto se podría deber a una menor variación diurna en la absorción de purinas microbianas desde el intestino delgado, asociado a menores cambios en la fermentación del alimento y en la síntesis de proteína microbiana en el rumen ofreciendo el alimento a una mayor frecuencia (Chen y col 1992<sup>b</sup>).

En vacas lecheras en confinamiento, el aumento de la frecuencia de alimentación con grano a partir de dos a cuatro veces al día, puede reducir al mínimo la variación del pH ruminal e incrementar la eficiencia microbiana, debido a que existiría una degradación de N y carbohidratos más equilibrada (Sutton y col 1986). Asimismo, las variaciones diarias extremas del pH ruminal pueden ser más dañinas para los microorganismos ruminales que un pH bajo y constante (Mertens 1979), esto se debe a la presencia de continuos ajustes metabólicos efectuados por los microorganismos ruminales. Si bien, en este ensayo no se realizaron mediciones de pH ruminal, lo que no permite dilucidar si presentó o no cambios, es posible afirmar que no se observaron modificaciones en la excreción de DP por efecto del aumento de la frecuencia de alimentación.

### **6.2.3. Índice purínico (IP)**

El Índice purínico ( $DP/CT \cdot PV^{0.75}$ ) puede ser utilizado como un indicador de la excreción total de derivados de purinas en la orina, evitando así la recolección completa de la orina producida en el día (Gonda 1995).

Strauch (2003) y Berndt (2005) calcularon un IP de 2,1 mmol/d en vacas a pastoreo suplementadas con 6 kg de concentrado de tipo amiláceo, con un consumo estimado de 23,5 y 17,3 kg de MS, respectivamente. En otro estudio efectuado por Sánchez (2003), se reportaron valores de IP de 2,0 y 2,8 mmol/d para vacas con consumos de 18 y 21 kg MS/d. En el presente ensayo, los consumos totales de MS promediaron 21,3; 20,0 y 19,0 kg MS/vaca/d para los tratamientos PFS2, PFS3 y PFS4, respectivamente. A pesar de la diferencia numérica de MS consumida, no se encontraron diferencias en el Índice purínico (Figura 1), lo que significa que los tres grupos produjeron similar cantidad de microorganismos y proteína microbiana ruminal (Orellana y col 2004).

## **6.3. METABOLISMO DEL NITRÓGENO A NIVEL RUMINAL**

### **6.3.1. Síntesis de nitrógeno microbiano (NM)**

En relación al nitrógeno que entregan los microorganismos ruminales, se puede señalar que éste está directamente ligado a la absorción de purinas exógenas absorbidas a nivel intestinal (Chen y Gomes 1992). El presente ensayo generó un valor promedio de NM de 174,06 g/vaca/d (Figura 3), el cual se encuentra cercano al promedio propuesto por el NRC (1985), que establece valores de 9 a 410 g de NM/vaca/d, con un promedio de 150 g de NM/vaca/d, dependiendo del tipo de dieta ingerida.

Strauch (2003) y Berndt (2005), bajo condiciones experimentales muy similares, presentaron valores de 165,5 y 192,9 g de NM/vaca/d, respectivamente en vacas a pastoreo suplementadas con 6 kg de concentrado base almidón parcializado en 2 raciones/día. Por su parte, Chen y col (1992<sup>a</sup>) reportaron valores de 71,3 y 84,7 g de NM/d.

### 6.3.2. Rendimiento microbiano

Para hacer comparables los valores de aporte de nitrógeno microbiano se utilizó el rendimiento microbiano, que relaciona la producción de NM (g/d) por kg de materia seca ingerida (MSI) (Chen y col 1992<sup>a</sup>).

Orellana y col (1998), reportaron valores entre 6,5 y 11,6 g NM/kg MSI/d, en vacas Holstein Friesian que consumieron una dieta a base de paja de trigo y trébol blanco con ballica. Por su parte, los ensayos a pastoreo de Strauch (2003) y Berndt (2005), registraron valores de 7,1 y 7,3 g NM/kg MSI/d con un suplemento a base de almidón, respectivamente y 11,4 y 11,8 g NM/kg MSI/d con un suplemento fibroso, respectivamente. Los resultados del presente estudio (Figura 4) se encuentran dentro de los valores de NM presentados por Orellana y col (1998), Strauch (2003) y Berndt (2005).

## 6.4 SINTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA EN EL RUMEN

### 6.4.1 Proteína microbiana total (PMCT) y proteína microbiana digestible (PMCD)

La determinación de la proteína microbiana a partir de la estimación de los derivados de purinas en muestras de orina, permite explicar las diferencias en el rendimiento productivo y calidad nutricional de la leche (Herrera-Saldana y col 1990).

Como se mencionó anteriormente, la proteína metabolizable (PM) se define como el total de proteína verdadera digestible (aminoácidos) utilizable por el ganado lechero para su metabolismo, después de la digestión y absorción del alimento en el tracto digestivo. Dicha proteína está compuesta por: proteína microbiana digestible y proteína del alimento no degradada a nivel ruminal, pero si digestible en el intestino delgado (AFRC 1996).

La síntesis de proteína microbiana en el rumen se ve afectada por numerosos factores relacionados con el alimento y los animales. Es sabido que el tipo y cantidad de nutrientes utilizables de la ración, así como la sincronización de la liberación de dichos nutrientes en el rumen, afectan la magnitud de la síntesis de proteína microbiana (AFRC 1996).

Diversos estudios indican que sincronizando la fermentación y degradación de fuentes de carbohidratos y proteína se estimulan mayores síntesis de proteína microbiana (NRC 2001). Esto fue demostrado por Herrera-Saldana y col (1990) quienes reportaron que el paso de proteína microbiana al duodeno en vacas lecheras fue mayor cuando la degradabilidad de carbohidratos y proteína fue sincronizada con alimentos de alta tasa de digestión (cebada y harina de semilla de algodón) que cuando se ofrecieron alimentos de lenta degradabilidad (milo y grano de cerveza). Asimismo, Lykos y col (1997) evaluaron dietas formuladas con una tasa de proteína degradable en rumen (RDP) similar y 3 tasas de degradación de carbohidratos (6,04; 6,98 y 7,94 %/hora), donde el flujo de proteína microbiana al duodeno tendió a ser mayor con tasas de degradación de carbohidratos más altas. Por su parte, Shabi y col (1998) no observaron diferencias significativas en la síntesis de proteína microbiana al ofrecer dietas a diferente frecuencia de alimentación y con diferentes concentraciones de proteína cruda y materia orgánica.

La síntesis de proteína microbiana en el rumen depende principalmente, de la disponibilidad de N y carbohidratos en el rumen (NRC 2001). Según AFRC (1993), para el tipo de vacas utilizadas en este ensayo, los requerimientos de PM corresponden aproximadamente a 1642 g/día. Dewhurst y col (2000), señalan que sobre la mitad de los aminoácidos (66 a 75%) derivan de la proteína microbiana. El aporte de PMCD en el ensayo promedió 693,5 g/día, es decir sólo el 42% de la PM, correspondió a PMCD, lo que nos indica que estos valores se encuentran por debajo de lo propuesto por Dewhurst y col (2000). Esto podría ser causado por la presencia de un desbalance energético, promovido por una baja cantidad de carbohidratos no estructurales en la dieta y la alta disponibilidad de N de la pradera (Cuadro 2 y 3). Como consecuencia del ineficiente aprovechamiento de la proteína, el exceso de nitrógeno ruminal, daría origen a una alta cantidad de amoniaco que se transformaría a urea a nivel hepático. Esta transformación considera un gasto energético, lo que disminuiría la energía disponible para los microorganismos ruminales (Twiggy y Van Gils 1988).

Strauch (2003) obtuvo valores de PMCD y PMCT de 614,4 y 963,8 (g/d) con vacas a pastoreo suplementadas con un concentrado fibroso, y 659,6 y 1034,7 (g/d) con un concentrado amiláceo, respectivamente, indicando una mayor eficiencia en la síntesis de proteína microbiana utilizando concentrados de tipo amiláceo. En un estudio realizado por Orellana y col (1998), los valores de PMCD obtenidos fueron de 157 g/d al aportar una dieta de paja de trigo más trébol blanco con ballica, y de 844,2 g/d al aportar ensilaje de maíz, heno de alfalfa, coseta de remolacha y concentrado, lo que demostraría que a medida que las dietas son nutritivamente mejor balanceadas, se generan mayores niveles de proteína microbiana.

Los porcentajes de PC en leche promediaron  $3,3 \pm 0,19$  para PFS2,  $3,1 \pm 0,25$  para PFS3 y  $3,1 \pm 0,25$  para PFS4 (Muñoz y col 2005). Las concentraciones de urea en sangre presentaron valores de  $5,2 \pm 1,41$ ,  $5,4 \pm 1,31$  y  $5,4 \pm 1,74$  mmol/L para los tratamientos PFS2, PFS3 y PFS4, respectivamente (Pulido y col 2005). Los valores anteriores, indicarían que el aumento en la frecuencia de suplementación en vacas a pastoreo no produjo un beneficio sobre los parámetros productivos (PC en leche) ni en las concentraciones plasmáticas de urea, ya que no existiría un mayor aprovechamiento del nitrógeno de la pradera por parte de las bacterias ruminales (Muñoz y col 2005, Pulido y col 2005).

Wittwer y col (1993), consideran que la concentración de urea en leche sería un buen indicador de la relación energía: proteína de la dieta. Las concentraciones de urea en leche generadas en el ensayo, fueron en promedio de 5,6 mmol/L para PFS2, 5,9 mmol/L para PFS3 y 5,5 mmol/L para PFS4, (Muñoz y col 2005), los que se encontrarían dentro del rango de referencia (2,5-7,0 mmol/L) propuesto por Wittwer y col (1999). Para Jonkers y col (1999), el valor máximo de urea en leche recomendado para la especie bovina sería de 5,71 mmol/L, lo que revelaría que la concentración de urea en leche en los 3 tratamientos estuvo cerca del máximo, evidenciando que el contenido de proteína en el rumen, fue elevado en relación a la disponibilidad de energía. Las concentraciones de urea en leche coinciden con los valores de rendimiento microbiano (RM) registrados, ya que la mayor concentración de urea se encontró en el tratamiento PFS3 el cual presentó una menor cantidad de PMCD y PMCT. Las

concentraciones de nitrógeno ureico en leche no presentaron diferencias significativas ( $P>0,05$ ), lo que sugiere que las diferentes frecuencias de suplementación con concentrado en vacas a pastoreo no mejoraron la eficiencia de utilización del nitrógeno de la dieta.

Sumado a lo expuesto anteriormente, es posible que al haber utilizado el método de recolección puntual de orina, en vez de haber hecho una recolección total de ella, situación que en vacas a pastoreo es extremadamente complicada, haya limitado la capacidad de detectar diferencias significativas entre los tratamientos, ya que dicha técnica posee una menor sensibilidad que el método de recolección total (Chen y Gomes 1992, Faichney y col 1995, Shingfield y Offer 1998). Por lo tanto, la estimación de la síntesis de proteína microbiana, basada en la excreción urinaria de DP, no debiera ser utilizada como un valor absoluto, sino que como un valor comparativo entre tratamientos (Tamminga y Chen 2000).

## **6.5. CONCLUSIONES**

En vacas lecheras en pastoreo primaveral sometidas a dos (PFS2), tres (PFS3) y cuatro (PFS4) frecuencias de suplementación con 6 kg de concentrado, se concluye que:

- La frecuencia de suplementación con concentrado, no modifica el rendimiento microbiano.
- La frecuencia de suplementación con concentrado, no modifica la síntesis de proteína microbiana total ni la cantidad de proteína microbiana digestible.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Agricultural and Food Research Council (AFRC). 1993. Energy and protein requirements of ruminants. En: *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. En: *An advisory manual prepared by the AFRC Technical Committee on Responses to nutrients*. CAB International. Cambridge, UK.
- Agricultural and Food Research Council (AFRC). 1996. Necesidades energéticas y proteicas de los rumiantes. Manual de consulta preparado por el Comité Técnico sobre respuestas a los nutrientes del AFRC. Traducido por Sanz R. Acribia. Zaragoza, España, 175 p.
- Al-Khalidi U, Chaglassian T. 1965. The species distribution of xanthine oxidase. *Biochem J* 97, 318-320.
- Alomar D. 1992. Valor nutritivo de las leguminosas forrajeras. En: Latrielle L, Balocchi O. (eds.) *Producción Animal*. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Producción Animal. Serie B-16. Valdivia, Chile. pp. 154-172.
- Anrique R. 1990. Potencial de producción de la pradera en vacas lecheras. *Curso de Postgrado. Producción intensiva de leche*, capítulo 1. Colegio Médico Veterinario de Chile. Osorno, pp. 53-59.
- Anrique R, Balocchi O. 1993. Atributos de la pradera que afectan el consumo y producción de animales en pastoreo. En: *Serie Simposios y Compendios*. Sociedad Chilena de Producción Animal (SOCHIPA). 1, 23-32.
- Anrique R, Valderrama X, Fuchslocher R. 1995. Composición de alimentos para el ganado en la zona sur. Fundación Fondo de Investigación Agropecuaria (FIA), Ministerio de Agricultura. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Producción Animal. Valdivia, Chile. 56 p.
- Antoniewicz AM, Heinemann W, Hanks EM. 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.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1996. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16<sup>th</sup> Ed. AOAC International. Gaithersburg, MD, USA.

- Balocchi O. 1993. Manejo Del pastoreo en vacas lecheras. En: Latrille L. (ed.) Producción Animal. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Producción Animal. Serie B-17. Valdivia, Chile. pp. 99-131.
- 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. 1999<sup>a</sup>. Recursos forrajeros utilizados en producción de leche. En: Latrille L. (ed). Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias. Pp 186-214. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Balocchi O. 1999<sup>b</sup>. Recursos forrajeros más utilizados. *Agroanálisis*. 184, 37-40.
- Balocchi O, Olivares J. 1992. Leguminosas en praderas permanentes. En: Latrille L, Balocchi O. (eds.) Producción Animal. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Producción Animal. Serie B-16, Valdivia, pp. 33-58.
- Balocchi O, Pulido R, Fernández J. 2002. Comportamiento de vacas lecheras en pastoreo con y sin suplementación con concentrado. *Agricultura Técnica* 62, 87-98.
- Bao J, Giller PS, Kett JJ. 1992. Irish Journal of Agricultural and food Research. 31, 23-33. En: Pulido (1999). *Avances en nutrición de la vaca lechera*. Consideraciones para una suplementación estratégica en vacas lecheras a pastoreo. IV Jornada Chilena de Buiatría. pp. 51-60.
- Bargo F, Muller LD, Delahoy JE, Cassidy TW. 2002. Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. *J Dairy Sci* 85, 1777-1792.
- Bateman JV. 1970. Nutrición Animal: Manual de métodos analíticos. Centro de ayuda técnica, México D.F.
- Beck A, Pessot R. 1992. Producción de leche en praderas permanentes durante la primavera. *Agrosur* (Chile) 20, 34-39.
- Berndt SA. 2005. Estimación de la síntesis de proteína microbiana en vacas lecheras a pastoreo primaveral, con y sin suplementación de concentrado. *Memoria de Magíster en Ciencias, mención Producción Animal*, Escuela de Graduados, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile.
- Bondi A. 1988. Nutrición Animal. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

- Butendieck BN, Valenzuela C, Miranda H. 1995. Análisis de los efectos fenotípicos del cruzamiento absorbente Holstein Friesian sobre Overo Negro Europeo en 20 años de registros del criadero Carillanca. I. Lactancias individuales. En: XX Reunión Sociedad Chilena de Producción Animal (SOCHIPA), Valdivia, Chile.
- Brody S. 1945. Bioenergetics and growth. Reinhold Publishing Corporation. New York, USA.
- Cañas R. 1998. Alimentación y nutrición animal. 2ª Edición. Facultad de Agronomía. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
- Chen XB, Hovell FD, Orskov ER. 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 XB, Orskov ER, Hovell FD. 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 XB, Gomes MJ. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives. En: International feed resources unit. *An overview of the technical details*. Rowwett Research Institute. Bucksburn Aberdeen, UK.
- Chen XB, Chen YK, Franklin M, Orskov ER, Shand WJ. 1992<sup>a</sup>. 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 XB, Grubic G, Orskov ER, Osuji P. 1992<sup>b</sup>. 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 (INE). VI Censo Nacional Agropecuario, Chile.
- Clark DA y Kanneganti VR. 1998. Grazing management systems for dairy cattle. En: Cherney JH y Cherney DJR. (eds). *Grass for Dairy Cattle*. Pp. 331. CAB International. Oxon, U.K.
- Clark JH, Klusmeyer TH, Cameron MR. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J Dairy Sci* 75, 2304-2323.
- Coblentz W, Abdelgadir I, Cochrane R, Fritz J, Fick W, Olson K, Turner J. 1999. Degradability of forage proteins by In Situ and In Vitro enzymatic methods. *J Dairy Sci* 82, 343-354.
- Cunningham JG. 1999. Fisiología veterinaria. 2ª edición. Mc Graw-Hill Interamericana, México.



- Dewhurst R, Davies D, Merry R. 2000. Microbial protein supply from the rumen. *Anim Sci Technol* 85, 1-20.
- Dixon RM, Stockdale CR. 1999. Associative effects between forages and grains consequences for feed utilization. *Austr J Agr Res* 50, 757-773.
- Faichney GJ, Welch RJ, Brown GH. 1995. Prediction of the excretion of allantoin and total purine derivatives by sheep from the "creatinine coefficient". *J Agric Sci Camb* 125, 425-428.
- Felmer EF. 2003. Comportamiento ingestivo de vacas lecheras en pastoreo primaveral suplementadas con dos fuentes de carbohidratos. *Memoria de titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Fernández J. 1999. Comportamiento ingestivo de vacas lecheras en pastoreo con y sin suplementación con concentrados. *Tesis de licenciatura*, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile.
- Fujihara T, Orskov ER, Reeds PJ, Kyle DJ. 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, Mann E. 1981. Composición química, digestibilidad y valor energético de una pradera permanente de pastoreo a través del año. *Tesis de licenciatura*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile.
- Gibson, JP. 1984. The effects of feeding frequency on milk production of dairy cattle: an analysis of published results. *Anim Prod* 38, 181-189.
- Giesecke D, Ehrenreich L, Stangassinger M, Ahrens F. 1994. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. *J Dairy Sci* 77, 2376-2381.
- Goering HK, Van Soest PJ. 1972. Forage Fiber Analysis. United States Department of Agriculture, Agriculture Handbook 379, 20 p.
- Gonda HL. 1995. Nutritional status of ruminants determined from excretion and concentration of metabolites in body fluids. *Ph.D. Diss.* Department of Animal Nutrition and Management, Swedish Univ. of Agricultural Sciences.
- Gonda HL, Emanuelson M, Murphy M. 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.

- González-Ronquillo M, Balcells J, Guada JA, Vicente F. 2003. Purine derivative excretion in dairy cows: endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. *J Dairy Sci* 86, 1282-1291.
- Herrera-Saldana R, Gómez-Alarcon R, Tobradi M, Huber T. 1990. Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis. *J Dairy Sci* 73, 142-148.
- Hodgson J. 1990. Grazing management: science into practice. Longman Handbooks in Agriculture. Essex, UK. 203 p.
- Holden LA, Muller LD, Fales SL. 1994. Estimation of intake in high producing Holstein cows grazing grass pasture. *J Dairy Sci* 77, 2332-2340.
- Holden LA, Muller LD, Lykos T, Cassidy TW. 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.
- Hongerholt DD, Muller LD, Buckmaster DR. 1997. Evaluation of a mobile computerized grain feeder for lactating cows grazing grass pasture. *J Dairy Sci* 80, 3271-3280.
- Hvelplund T, Weisbjerg MR. 2000. In situ techniques for estimation of protein degradability and postrumen availability. En: Givens D, Owen E, Axford R, Omed H. *Forage evaluation in ruminant nutrition*. Pp 268-271. CABI Publishing. Wallingford, UK.
- Jahn BE. 1996. La pradera en los sistemas de leche bovina. En: Ruiz, I. Praderas para Chile. 2° Ed. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Santiago, Chile.
- Johnson LM, Harrison H, Riley RE. 1998. Estimation of the flow of microbial nitrogen to duodenum using urinary uric acid or allantoin. *J Dairy Sci* 81, 2408-2420.
- Jonkers JS, Kohn RA, Erdman RA. 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, Porta S. 1993. Feeding concentrates supplements for dairy cows. Dairy Research and Development Corporation. Victoria - Department of Agriculture. Melbourne, Australia.
- Kibon A, Holmes W. 1984. Supplementary feeding of forage and concentrate to dairy cows at pasture. *Anim Prod* 42, 462-463.

- Kolver ES., Muller LD. 1998. Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J Dairy Sci* 81, 1403-1411.
- Kolver ES, Muller LD, Varga GA, Cassidy TJ. 1998. Synchronization of ruminal degradation of supplemental carbohydrate with pasture nitrogen in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 81, 2017-2028.
- Köpfer A. 2001. Síntesis de proteína microbiana en vacas lecheras alimentadas con ensilaje de pradera y paja de trigo tratada con hidróxido de sodio. *Memoria de titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de 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 JD. 1985. Milk production from grazed temperate grassland. *J Dairy Res* 52, 313-344.
- Leaver, JD. 1986. Effects of Supplements on Herbage intake and performance. British Grassland Society Occasional Symposium N°. 19, Winter Meeting, Great Malvern, UK. pp. 79-87.
- Liang JB, Pimpa O, Balcells J, Jelan ZA, Abdullah N. 2004. An overview on the use of urinary purines derivatives excretion as a method for estimation of rumen microbial protein production in swamp buffaloes and zebu cattle. En: Makkar HPS y Chen XB. (eds.) Estimation of microbial protein supply in ruminants using urinary purine derivatives. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. Pp 42-55.
- Lindberg J. 1989. Nitrogen metabolism and urinary excretion of purines in goat kids. *Br J Nutr* 61, 39-321.
- Lykos T, Varga GA, Casper D. 1997. Varying degradation rates of total nonstructural carbohydrates: Effects on ruminal fermentation, blood metabolites, and milk production and composition in high producing Holstein cows. *J Dairy Sci* 80, 3341-3355.
- Madsen J, Hvelplund T, Weisbjerg MR, Bertilsson J, Olsson I, Spörndly R, Harstad OM, Volden H, Tuori M, Varvikko T, Huhtanen P, Olafsson BL. 1995. The AAT/PBV protein evaluation system for ruminants. *J Agric Sci* 19.
- Maynard L, Loosli L, Hintz H, Warner R. 1988. Nutrición animal, 7ª ed. Mc Graw-Hill. México DF, México.
- Mayne CS. 1991. *Occasional symposium N° 25*. British Grassland Society, Hurley.

- Mc Gilloway DA, Mayne CS. 1996. The importance of grass availability for the high genetic merit dairy cow. *Adv Ani Nutr* 8, 135-169.
- Meijs JA. 1986. Concentrate supplementation of grazing dairy cows. Effect of concentrate composition on herbage and milk production. *Grass Forage Sci* 41, 229-235.
- Mertens DR. 1979. Effects of buffers on fiber digestion. En: *Regulation of acid-base balance*. Hale WH, Meinhardt. Ed. Church and Dwight Co., Inc., Piscataway, NJ.
- Miller E. 1982. Methods of assessing proteins for ruminants, including laboratory methods. En: Miller E, Pike I, Vanes A. *Protein contribution of feedstuffs for ruminants*. Butterworths, Cambridge, England.
- Muller L. 1996. Managing and feeding high merit cows at pasture. En: British Grassland Society Winter Meeting. *Grass & Forage for Cattle of High Genetic Merit*. 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*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- Muñoz R, Pulido R, Wittwer F, Orellana P. 2005. Frecuencia de suplementación con concentrado en vacas lecheras en pastoreo. I. Respuesta productiva. En: Libro de resúmenes XXX Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal (SOCHIPA), Valdivia, pp. 87-88.
- National Research Council, (NRC). 1985. Ruminant nitrogen usage. National Academy Science, Washington DC, USA.
- National Research Council (NRC). 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7<sup>th</sup> Edition National Academy Press, Washington DC, USA.
- Nsahlai IV, Osuji PO, Umunna NN. 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 Tech* 85, 223-238.
- Orellana P, Mendoza Q, Scory M. 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 P, Venegas M, Pulido R, Wittwer F. 2004. Eficiencia de utilización del nitrógeno dietario en vacas en lactación en pastoreo solo o suplementadas con dos tipos de concentrado. En: Hazard S y Romero O. (eds.) Resúmenes del XXIX Reunión Anual Sociedad Chilena de Producción Animal (SOCHIPA), Villarrica, pp. 81-82.

- Orellana Boero P, Balcells J, Martín-Orúe SM, Guada JA. 2001. Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. *Livest Prod Sci* 68, 243-250.
- Orskov RE, MacLeod NA. 1982. The determination of the minimal nitrogen excretion in steers and dairy cows and its physiological and practical implications. *Br J Nutr* 47, 625-636
- Peyraud JL, Delaby L. 2001. Ideal concentrate feeds for grazing dairy cows responses to supplementation in interaction with grazing management and grass quality. En: Garnsworthy PC, Wiseman J (ed). *Recent Advances in Animal Nutrition*, Pp 203 Nottingham University Press, UK.
- Peyraud JL, Delaby L, Delagarte R 1997. Quantitative approach of dairy cows at grazing. Some recent developments. Resúmenes de XXIII Reunión Anual Sociedad Chilena de Producción Animal (SOCHIPA), Valdivia, Chile.
- Pulido R. 1997. Interaction of pasture conditions, concentrate supplementation and milk yield level in relation to dairy cow performance and behaviour. *Ph.D. Thesis*, University of London.
- Pulido R. 1999. Avances en nutrición de la vaca lechera. Consideraciones para una suplementación estratégica en vacas lecheras a pastoreo. IV Jornada Chilena de Buiatría. pp. 51-60.
- Pulido R, Wittwer F, Orellana P. 2005. Frecuencia de suplementación con concentrado en vacas lecheras en pastoreo IV. Evaluación del balance de energía y proteínas. XII Congreso Latinoamericano de Buiatría, Valdivia, pp. 214-215.
- Rearte D. 1997. Sistemas de producción de leche basados en praderas permanentes. Serie de simposios y compendios. Sociedad Chilena de Producción Animal (SOCHIPA) 5, 38-51.
- Resines J, Arin M, Diez M. 1992. Determination of creatinine and purine derivatives in ruminant's urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J of Chrom* 607, 199-202.
- Robinson PH, McQueen RE. 1994. Influence of supplemental protein source and feeding frequency on rumen fermentation and performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 77, 1340-1353.
- Ruiz I. 1997. Conceptos generales del rol de la pradera en la producción de leche. En: Serie de Simposios y Compendios. Sociedad Chilena de Producción Animal (SOCHIPA) 5, 13-37.

- Rys R, Antoniewicz A, Maciejewicz J. 1975. Allantoin in urine as an index of microbial protein in the rumen. In Tracer studies on non-protein nitrogen in ruminants, 2<sup>d</sup> Edition. IAEA, Viena, Austria.
- Sandoval-Castro CA, Herrera-Gómez F. 1999. Estimación de la síntesis de proteína microbiana en rumiantes a través de la medición de derivados de purina en orina. *Rev Biomed* 10, 241-251.
- Sánchez M. 2003. Relación de los derivados de purinas séricos y urinarios en vacas de lechería con diferentes niveles de consumo. *Memoria de titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Concepción.
- Shabi Z, Arieli A, Bruckental I, Aharoni Y, Zamwel S, Bor A, Tagari H. 1998. Effect of the synchronization of the degradation of dietary crude protein and organic matter and feeding frequency on ruminal fermentation and flow of digesta in the abomasum of dairy cows. *J Dairy Sci* 81, 1991–2000.
- Shingfield JK, Offer NW. 1998. Evaluation of the spot urine sampling technique to assess urinary purine derivative excretion in lactating dairy cows. *Animal Sci (UK)* 66, 557-568.
- Smith R, McAllan A. 1970. Nucleic acid metabolism in the ruminant. *Br J Nutr* 24, 545-556.
- Sniffen CJ, Robinson PH. 1987. Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulations. *J Dairy Sci* 70, 425-441.
- Strauch M. 2003. Estimación de la síntesis de proteína microbiana y rendimiento microbiano en vacas lecheras a pastoreo, con y sin suplementación con dos concentrados con diferentes fuentes de carbohidratos. *Memoria de titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Sutton JD, Hart IC, Broster WH, Elliot RJ, Schuller E. 1986. Feeding frequency for lactating cows: effects on rumen fermentation and blood metabolites and hormones. *Br J Nutr* 56, 181.
- Tamminga S, Chen X. 2000. Animal-based techniques for the estimation of protein value of forages En: Givens, D., Owen E, Axford R, Omed H. *Forage evaluation in ruminant nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Thomas C, Reeve A, Fisher GEJ. 1991. Milk from Grass. 2<sup>d</sup> Edition, Billingham Press Limited, Cleveland, UK.
- Tilley JM, Terry RA. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J Agr Sci* 17, 264-268.

- Topps JH, Elliot RC. 1965. Relationships between concentrations of ruminal nucleic acid and excretion of purines derivatives by sheep. *Nature* 205, 498-499.
- Twigg JR, Van Gils LGM. 1988. Practical aspects of feeding protein to dairy cows. En: Haresign W y Cole DJA, (eds). *Recent developments in ruminant nutrition 2*. Buttersworth, London, England.
- Vagnoni DB, Broderick GA, Clayton MK, Hatfield RD. 1997. Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amount of purines. *J Dairy Sci* 8, 1695-1702.
- Valadares Filho SC. 1995. Eficiencia de síntese de proteína microbiana, degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína bruta, em bovinos. *Anais*. pp. 355-388.
- Valadares R, Broderick G, Valadares S, Clayton K. 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 JS, Russel JB. 1995. Energy spilling and the role of ruminally degraded protein in bacterial growth efficiency. *Cornell Nutrition Conference for feed Manufacturers*. Cornell University, Ithaca, NY.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74, 3583-3597.
- Verbic J, McLeod X, Orskov E. 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, Peyraud JL. 1989. Protein: the PDI System. En: Jarrige R. Ruminant Nutrition. *Recommended Allowances and Feed Tables*. INRA, Paris, France.
- Webster A. 1993. Understanding the dairy cow. Blackwell Science, 2<sup>d</sup> Edition. Bodmin, Cornwall, UK.
- Wittwer F, Reyes JM, Opitz H, Contreras PA, Böhmwald H. 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, Gallardo P, Reyes J, Opitz H. 1999. Bulk milk urea in grazing dairy herds. *Vet Prev Med* 38, 159-166.

## 8. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que directa o indirectamente participaron en el proceso de esta Memoria de Título:

- Al profesor patrocinante Dr. Rubén Pulido, por la ayuda, el apoyo y la disposición brindada durante el presente trabajo.
- Al profesor co-patrocinante Dr. Patricio Orellana, de la Universidad de Concepción, quien analizó las muestras y atendió mis consultas.
- Al profesor colaborador Dr. Héctor Uribe, quien respaldó el análisis estadístico de este trabajo.
- A la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), a través del proyecto FONDECYT, quien financió y me permitió formar parte de este proyecto.
- A Don Erico y Don Luis, quienes trabajaron junto a mi en la etapa de terreno.
- A mis compañeros Roberto Muñoz y Marcia Leiva, quienes formaron parte de mi equipo de trabajo.
- Agradezco a mis padres, hermanas, Edwin Ferreira y a mis incondicionales amigos por su apoyo y compañía durante mi vida y estadía universitaria.