

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**EFFECTOS DE LA FRECUENCIA DIARIA DE SUPLEMENTACIÓN SOBRE
EL AMBIENTE RUMINAL DE VAQUILLONAS ALIMENTADAS EN BASE A
UNA FORRAJE TEMPLADO MADURO**

por

HUELMO CAMPIONI, José Ignacio
ZAMORA LONGINOTTI, Carlos Sebastián
ZAMORA LONGINOTTI, Rodrigo

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO

URUGUAY

2015

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por:

Presidente de mesa:

DMTV, MSc. Alejandro Britos

Segundo miembro (Tutor):

DCV. MSc. Germán Antúnez Tort

Tercer miembro:

Ing. Agr. Santiago Monteverde

Cuarto miembro (Co-tutor):

DMTV. PhD. José Luis Repetto

Fecha:

Autores:

Br. Huelmo Campioni, José Ignacio

Br. Zamora Longinotti, Carlos Sebastián

Br. Zamora Longinotti, Rodrigo

AGRADECIMIENTOS

A nuestro tutor, Germán Antúnez, por el respaldo y dedicación en este trabajo.

A todos los integrantes de los Departamentos de Bovinos y Nutrición de Facultad de Veterinaria, por su apoyo y colaboración en la realización de este ensayo.

Al personal de biblioteca y del campo experimental N° 2 de Facultad de Veterinaria.

A nuestros compañeros tesistas y amigos de facultad por estar junto a nosotros durante estos años.

A nuestros familiares y amigos por su apoyo incondicional.

A todos ellos muchas gracias!

TABLA DE CONTENIDO

| | Página |
|---|---------------|
| PÁGINA DE APROBACIÓN | 2 |
| AGRADECIMIENTOS | 1 |
| LISTA DE CUADROS Y FIGURAS | <i>i</i> |
| LISTA DE ABREVIATURAS | <i>ii</i> |
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. SUMMARY | 2 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 4.1. SUPLEMENTACIÓN EN SISTEMAS PASTORILES | 4 |
| 4.2. RESPUESTA A LA SUPLEMENTACIÓN | 4 |
| 4.3. AMBIENTE RUMINAL Y MECANISMOS DE REGULACIÓN | 5 |
| 4.3.1. El pH ruminal y mecanismos de regulación | 6 |
| 4.3.2. Factores que determinan la producción y absorción de ácidos grasos volátiles ... | 6 |
| 4.3.3. Nitrógeno amoniacal (N-NH ₃) en rumen..... | 7 |
| 4.4. FRECUENCIA DE SUPLEMENTACIÓN | 8 |
| 5. HIPÓTESIS..... | 9 |
| 6. OBJETIVOS | 9 |
| 6.1. OBJETIVO GENERAL..... | 9 |
| 6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 9 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS | 10 |
| 7.1. ANIMALES, ALIMENTOS Y TRATAMIENTOS | 10 |
| 7.2. DETERMINACIONES Y MUESTREOS..... | 11 |
| 7.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 12 |
| 8. RESULTADOS | 13 |
| 9. DISCUSIÓN | 16 |
| 10. CONCLUSIONES | 18 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA | 19 |

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

| CUADROS | | pág. |
|--------------------|--|-----------------|
| CUADRO I. | Composición química de los alimentos utilizados (media \pm DE) | 10 |
| CUADRO II. | Media diaria de pH ruminal, concentraciones de N-NH ₃ y AGV de vaquillonas no suplementadas o suplementadas con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo (PV) a distintas frecuencias diarias | 13 |
| FIGURAS | | pág. |
| FIGURA 1. | Dinámica diaria del pH ruminal de vaquillonas alimentadas <i>ad libitum</i> en base a una pastura templada sin suplementación (T0) o suplementadas con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo, suministrado una (T1), dos (T2) u ocho veces (T8) al día | 14 |
| FIGURA 2. | Dinámica de las concentraciones (mg/dL) diarias de amoníaco ruminal (N-NH ₃) de vaquillonas alimentadas <i>ad libitum</i> en base a una pastura templada sin suplementación (T0) o suplementadas con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo, suministrado una (T1), dos (T2) u ocho veces (T8) al día | 14 |
| FIGURA 3. | Dinámica de las concentraciones (mmol/L) diarias de ácidos grasos volátiles totales (AGV) de vaquillonas alimentadas <i>ad libitum</i> en base a una pastura templada sin suplementación (T0) o suplementadas con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo, suministrado una (T1), dos (T2) u ocho veces (T8) al día | 15 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------|---|
| AGV | ácidos grasos volátiles |
| FAD | fibra ácido detergente |
| FND | fibra neutro detergente |
| MO | materia orgánica |
| MS | materia seca |
| N-NH₃ | nitrógeno amoniacal |
| PV | peso vivo |
| T0 | consumo de pastura <i>ad libitum</i> sin suplementación |
| T1 | consumo de pastura <i>ad libitum</i> y suplementación con maíz a razón de 1% de PV en una sola vez al día |
| T2 | consumo de pastura <i>ad libitum</i> y suplementación con maíz a razón de 1% de PV en dos veces al día |
| T8 | consumo de pastura <i>ad libitum</i> y suplementación con maíz a razón de 1% de PV en ocho veces al día |
| TS | tasa de sustitución |

1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de diferentes frecuencias diarias de suplementación sobre el ambiente ruminal de vaquillonas estabuladas alimentadas en base a forraje de raigrás maduro. Veinte vaquillonas Hereford (252 ± 22 Kg de PV y 18 meses de edad), fueron bloqueadas según su peso vivo y asignadas al azar a uno de los cuatro tratamientos: alimentación con raigrás *ad libitum* (T0), raigrás *ad libitum* + grano de maíz suministrado una vez al día (T1), raigrás *ad libitum* + grano de maíz suministrado dos veces al día (T2) y raigrás *ad libitum* + grano de maíz suministrado ocho veces al día (T8). La duración total del experimento fue de veintitrés días, siendo los primeros veintidós días de adaptación. El día veintitrés se realizó la colecta de líquido ruminal a través de catéteres ruminales. A partir de estas muestras se determinó el pH ruminal a las horas 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18 y 21, (hora cero de medición, 9:00 AM). Los ácidos grasos volátiles (AGV) y el nitrógeno amoniacal (N-NH₃) fueron determinados a partir del líquido ruminal colectado cada tres horas, en un período de veinticuatro horas. Las variables fueron analizadas por el PROC MIXED de SAS (2002). Las medias diarias del pH ruminal no fueron afectadas por la suplementación ni por la frecuencia de suministro del grano de maíz. Sin embargo hubo efecto de la hora de muestreo e interacción tratamiento por hora para esta variable, lo que indica que hubo una dinámica diferente entre tratamientos. Las concentraciones ruminales diarias de N-NH₃ fueron mayores ($p=0,023$) en T0 y T1 (4,63 y 3,79 mg/dL respectivamente) que en T2 y T8 (3,32 y 3,50 mg/dL respectivamente). No fueron detectadas interacciones entre las concentraciones ruminales medias de N-NH₃ de cada tratamiento y la hora de muestreo. Las concentraciones de AGV totales fueron similares entre tratamientos (133 mmol/L; $p=0,14$). Sin embargo hubo una tendencia a una menor proporción ($p=0,09$) de acetato en las vaquillonas suplementadas (T1, T2 y T8) y no fueron detectadas diferencias significativas en las concentraciones y proporciones de acetato, butirato, ni en la relación acetato:propionato. La suplementación con grano de maíz a razón de 1 % del peso vivo a vaquillonas con una dieta basada en forrajes maduros no produce cambios importantes en el ambiente ruminal, por lo tanto no sería necesario el fraccionamiento del suministro del concentrado.

Palabras clave: frecuencia de suplementación, ambiente ruminal, forrajes maduros

2. SUMMARY

The objective of this research was to study the effect of different daily frequencies of supplementation on the rumen environment of heifers consuming mature ryegrass forage. Twenty Hereford heifers (252 ± 22 kg LW and 18 months old), were blocked by body weight and randomly assigned to one of four treatments: feeding ryegrass ad libitum (T0); ryegrass ad libitum + maize grain supplied once daily (T1); ryegrass ad libitum + maize grain delivered twice a day (T2) and ryegrass ad libitum + corn grain supplied eight times a day (T8). The total duration of the experiment was twenty three days, the first twenty two days for adaptation. On day twenty third ruminal fluid was collected through ruminal catheters. From these samples the ruminal pH to times 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18 and 21 (measuring zero hour, 9:00 AM). The volatile fatty acids (VFA) and ammonia nitrogen (N-NH₃) were determined from the rumen fluid collected every three hours in a 24 hour period. The variables were analyzed by the PROC MIXED of SAS (2002). Daily ruminal pH averages were not affected by supplementation or by the frequency of supplementation. However, there was effect for the sampling time and the interaction treatment per hour for this variable, indicating that there was a different dynamic between treatments. Ruminal daily NH₃-N concentrations for T0 and T1 ($p=0.023$) 4.63 and 3.79 mg/dL, respectively, were higher than for T2 and T8, 3.32 and 3.50 mg/dL, respectively. No interactions were detected between mean ruminal NH₃-N concentration of each treatment and time of sampling. VFA total concentrations were similar between treatments (133 mmol/L; $p=0.14$). However there was a trend to a lower proportion of acetate ($p=0.09$) in supplemented heifers (T1, T2 and T8) and no significant differences were detected in the concentrations and proportions of acetate, butyrate or in the acetate:propionate relation. Supplementation with corn grain at 1% of body weight to heifers fed a diet based on mature forage does not produce significant changes in the rumen environment, thus splitting the supply of concentrate is not necessary.

Keywords: frequency of supplementation, rumen environment, mature forage

3. INTRODUCCIÓN

Los rumiantes se caracterizan por su capacidad de aprovechar material vegetal fibroso. Esta ventaja en relación a otros animales se basa en el hecho que en estos, la digestión se produce a través de la acción fermentativa de los microorganismos ruminales previo a la digestión enzimática del propio animal. El rumen actúa como una gran cámara de fermentación, que funciona con un medio líquido, en condiciones de anaerobiosis, con un rango acotado de pH, temperatura y presión osmótica (Van Soest, 1994). Estas características les otorgan a los rumiantes la capacidad de utilizar carbohidratos estructurales, como celulosa, hemicelulosa y pectina, que son poco digeribles para las especies no rumiantes. Basada en esta diferencia fundamental, la fisiología digestiva del rumiante adquiere ciertas características particulares.

En los sistemas de producción de leche y carne de nuestro país la principal fuente de alimentos la constituyen las pasturas (DIEA, 2014). Sin embargo la suplementación de los rumiantes con granos de cereales se torna necesaria en los sistemas ganaderos semi-intensivos e intensivos (Rearte y Santini, 1989; Cajarville y Repetto, 2005), debido a que las pasturas presentan déficit estacionales en la cantidad o en la calidad del forraje producido (Rearte y Santini, 1989). En estas condiciones, donde la calidad del forraje consumido es quizás el factor más importante en la productividad de los rumiantes (Cajarville y Repetto, 2005), la suplementación es una estrategia que permite incrementar el consumo de MS y energía, incrementar el número de animales por hectárea y mejorar la utilización de las pasturas (Bargo, 2003).

Sin embargo, la adición de cereales en la dieta de rumiantes puede generar una serie de efectos a nivel ruminal que en algunos casos pueden reducir la ventaja de la suplementación (Dixon y Stockdale, 1999). Algunos de los efectos negativos se han asociado a reducciones del pH ruminal, cambios en el tipo de flora ruminal y reducción de la digestión de la fracción fibrosa de la dieta (Dixon y Stockdale, 1999).

La revisión bibliográfica que se presenta a continuación se centrará fundamentalmente en la suplementación de rumiantes en sistemas pastoriles, las características del ambiente ruminal, sus mecanismos de regulación, así como el empleo de la frecuencia de suministro del concentrado como estrategia de manejo de la suplementación.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. SUPLEMENTACIÓN EN SISTEMAS PASTORILES

En los sistemas ganaderos de producción de carne y leche de nuestro país la principal fuente de alimentos de los rumiantes proviene del forraje cosechado en forma directa mediante el pastoreo. En dichos sistemas la calidad del forraje es quizás el factor que explica en mayor medida el desempeño productivo de los rumiantes (Cajarville y Repetto, 2005).

En muchas ocasiones la productividad se ve limitada por la cantidad y la calidad del forraje consumido por los animales. Es por ello que la suplementación de rumiantes con granos de cereales es una práctica frecuente en estos sistemas (Rearte y Santini, 1989) y tiene como uno de los principales objetivos incrementar el consumo de energía de los animales (Owens, 2005).

4.2. RESPUESTA A LA SUPLEMENTACIÓN

Existen varios factores que afectan la ingesta de nutrientes cuando los rumiantes son suplementados, uno de ellos es la tasa de sustitución (TS) de pastos por concentrado, mientras que el otro factor es la depresión en la digestión de la fibra (Rearte y Pieroni, 2001). En pasturas de alta calidad el efecto de suplementación sobre la TS es más importante que el efecto sobre la digestión de la fibra, mientras que en pasturas de baja calidad ocurre lo contrario, es decir que la depresión en la digestión de la fibra es lo que afecta la ingesta de nutrientes en mayor medida (Galyean y Goetsch citados por Rearte y Pieroni, 2001).

Cuando los rumiantes son suplementados el consumo de pastura se reduce, aunque el consumo total de materia seca (MS) aumenta (Bargo y col., 2003, Aguerre y col., 2013). Esta reducción en el consumo de forraje cuando los animales reciben suplementos se le denomina sustitución (Bargo y col., 2003). Sin embargo en otras ocasiones ocurre un efecto de adición en el consumo de MS, en dichas circunstancias el consumo de forraje no disminuye y el consumo de suplemento se adiciona, aumentando el consumo total de MS (Cajarville y col., 2003). Según algunos autores la tasa de sustitución es causada por efectos asociativos negativos en el rumen (Dixon y Stockdale, 1999) o por reducciones en el tiempo total de pastoreo (Bargo y col., 2003).

La respuesta a la suplementación puede depender de varios factores, como las características de las pasturas, el comportamiento ingestivo, los niveles de suplementación y la especie de rumiante suplementada, entre otros. En este sentido un trabajo publicado por Aguerre y col. (2013) en el que se comparó la respuesta de ovinos y bovinos suplementados a diferentes niveles (0,5 1 y 1,5% del peso vivo) con grano de sorgo molido, observaron que al aumentar los niveles de suplementación en bovinos

aumentó la ingesta total de materia orgánica (MO) y la utilización digestiva de la dieta, sin embargo, en ovinos, se redujo la digestibilidad de la fibra y la ingesta total de MO. Según la discusión planteada por los autores la respuesta diferencial en la digestibilidad del almidón entre las especies, sumado al ambiente ruminal más estable observada en bovinos, podría indicar que la tasa de pasaje fue mayor en los bovinos que en los ovinos. (Aguerre y col., 2013).

Los tipos de granos de cereales son otros de los factores que pueden influir en la respuesta a la suplementación, los mismos pueden ser clasificados en rápidamente degradables, como el trigo o la cebada y lentamente degradables, como maíz y sorgo (Offner y col., 2003). Como consecuencia, los primeros proporcionan mayor energía para los microorganismos del rumen y favorecen la síntesis de proteína microbiana, pero también pueden ocasionar patologías ruminales como la acidosis (de Blas y col., 1995). En comparación con el trigo y la cebada, el grano de maíz es un cereal de lenta degradación y de alto valor energético, con un alto contenido en almidón (63-65%) y bajos niveles de fibra neutro detergente (FND, 8-9%,) (Cajarville y col., 2003).

4.3. AMBIENTE RUMINAL Y MECANISMOS DE REGULACIÓN

La capacidad de los rumiantes para digerir forrajes es determinada por su relación simbiótica con los microorganismos ruminales. Los rumiantes proporcionan el rumen como hábitat y el alimento, mientras que los microorganismos proveen al animal fundamentalmente de AGV y proteína microbiana como resultado de la fermentación del alimento (Russell, 1998).

Los AGV que se producen en el rumen en mayor cantidad son acetato, propionato y butirato, estos constituyen una importante fuente de energía para el rumiante (Van Soest, 1994). También los microorganismos ruminales producen metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂).

Los carbohidratos (CHO) representan el componente más abundante de la dieta de los rumiantes. El tipo de CHO predominante en la dieta (estructurales o no estructurales) condiciona el tipo de flora que los fermenta y el pH óptimo para cada población microbiana. De esta forma una dieta rica en almidón es fermentada por una flora predominantemente amilolítica que se desarrolla mejor en un rango de pH de 5,5-6,0, mientras que una dieta compuesta por forraje con alto contenido de carbohidratos estructurales (fibra), será fermentada por una flora predominantemente celulolítica, que tiene una mejor actividad fermentativa a pH de 6,0-6,9 (Relling y Mattioli, 2002).

Es así que la actividad celulolítica y la digestión de la fibra es óptima en un rango de pH de 6,7-6,8, una concentración de N-NH₃ de 5-8 mg/dL, 70-90 mmol/L de AGV y una relación acetato:propionato de 3-3,5:1 (Rearte y Santini, 1989; Van Soest, 1994; Yang y Beauchemin, 2007).

4.3.1. El pH ruminal y mecanismos de regulación

El pH es una de las principales condiciones físico-químicas del rumen, el mismo condiciona la intensidad de la actividad fermentativa microbiana y a su vez es determinado por el balance entre las cantidades de AGV producidos durante la actividad fermentativa microbiana, la eficiencia de absorción de estos a través de la pared ruminal y el aporte de buffers por la saliva (Calsamiglia, 1997). Tanto la actividad fermentativa como el aporte de saliva son modificados por la dieta y el manejo de la alimentación (Repetto, 1996).

Los alimentos no inducen todos por igual a la rumia. Es así que los alimentos más fibrosos estimulan más la rumia que los alimentos menos fibrosos, como los concentrados. Esto en teoría está determinado por la fibra efectiva del alimento, la cual mide la capacidad de un ingrediente para estimular la secreción salival y aumentar el pH ruminal. Las características de esta fibra también va a estar determinada por el tamaño de partícula, condicionando la velocidad de pasaje ruminal (Calsamiglia, 1997). Durante la rumia se secreta gran cantidad de saliva que llega al rumen (unos 150 litros por día, en bovinos adultos y 10 litros en ovinos). Esta tiene un pH ligeramente alcalino (8,2), ya que contiene bicarbonatos y fosfatos, los cuales actúan como sustancias tampón y contribuyen a mantener el pH del rumen (Cajarville y col., 2003).

Pero no solo la forma física de los alimentos afecta el pH ruminal, sino que también su composición química. Los CHO como los azúcares solubles y el almidón, son fermentados más rápido que carbohidratos estructurales tales como celulosa y hemicelulosa (Herrera-Saldaña y col., 1990). En general los concentrados tales como los granos de cereales implican una mayor producción de AGV y menor producción de saliva, lo cual lleva a un pH ruminal más bajo (Van Soest, 1994).

4.3.2. Factores que determinan la producción y absorción de ácidos grasos volátiles

La concentración de AGV en el rumen depende fundamentalmente de la dieta. En función de la cantidad y fuente de carbohidratos varía la cantidad y la proporción de los distintos AGV producidos (Noziere y col., 2011). Los carbohidratos se clasifican en fácil digestión, los cuales permiten un fácil acceso de los m.o. al almidón. Y en difícil digestión, estos se encuentran asociados a las fracciones fibrosas del alimento, como son la celulosa y la hemicelulosa (van Lier y Regueiro, 2008).

Cuando la dieta de los animales se basa en forrajes templados, la proporción de AGV en promedio es 65% acetato, 25% propionato y 10% butirato, mientras que las concentraciones de AGV se encuentran en el rango de 100 a 120 mmol/L, con relaciones acetato/propionato de 3,5 - 4,0/1,0 (Bargo y col., 2003). Sin embargo cuando la dieta tiene una alta proporción de granos de cereales, la proporción de AGV en general es de 45% acetato, 40% propionato y 15% butirato (Cajarville y col., 2003).

Los AGV producidos se eliminan principalmente por medio de la absorción a través de la pared ruminal y por el orificio omasal junto al alimento (Allen, 1997). Cuando se

absorben los AGV, se elimina ácido del medio ruminal. Para aumentar la superficie de absorción del epitelio del rumen presenta papilas. Los AGV difunden pasivamente hacia el epitelio ruminal, tanto en estado ionizado como no ionizado. Pero para atravesar el epitelio ruminal hacia la sangre deben encontrarse en forma no ionizada. La mayoría de los AGV se encuentran en forma ionizada, afectando la velocidad de absorción, haciéndola más lenta (van Lier, Regueiro, 2008). Una parte del acetato se transforma en la en la pared ruminal a cuerpos cetónicos, mientras que la mayor proporción llega al hígado en donde se transforma a Acetil Co-A, un precursor de la lipogénesis. El destino del propionato es ser transformado a lactato en la pared ruminal y el resto pasa a la sangre para ser precursor de la glucosa. En cuanto al butirato este se transforma en cetonas durante su absorción por el epitelio ruminal (Cajarville y col. 2003).

4.3.3. Nitrógeno amoniacal (N-NH₃) en rumen

Los rumiantes son capaces de utilizar eficientemente alimentos con bajos porcentajes de proteína verdadera, debido a que los microorganismos del rumen pueden sintetizar gran parte las proteínas que el animal necesita a partir de nitrógeno no proteico (Broderick, 2010). Cuando el rumiante ingiere proteína verdadera, en su mayoría son degradadas por proteasas microbianas en el rumen, siendo los productos finales N-NH₃, AGV y CO₂. El N-NH₃, puede ser utilizado por algunas poblaciones de microorganismos, para sintetizar proteína microbiana, sin embargo debe existir suficiente energía proveniente de los CHO (Cajarville y col, 2003). Por lo tanto la proteína microbiana es producida a partir de proteína vegetal y nitrógeno no proteico que ingresan al rumen con el alimento y el nitrógeno metabólico reciclado (Kozloski, 2011).

El nitrógeno no proteico es degradado rápidamente por los microorganismos y convertido en N-NH₃. Un parte de dicho N-NH₃ puede ser utilizado fundamentalmente por los m.o. celulolíticos dependiendo del aporte de energía (Kozloski, 2011). Sin embargo el N-NH₃ que no es utilizado es absorbido a través de la pared ruminal e intestino, pasando al torrente sanguíneo. Mediante esta vía es transportado al hígado donde es convertido rápidamente en urea y excretada por la orina. No obstante una fracción vuelve al rumen a través de un proceso de reciclaje metabólico (Kozloski, 2011).

Las características físico-químicas del alimento, la actividad microbiana y el tiempo de permanencia de los alimentos en el rumen condicionan la velocidad de degradación de la fracción nitrogenada de la dieta (Repetto, 1996). Una fracción variable de la proteína de la dieta puede escapar a la digestión ruminal y pasar al intestino sin modificarse en el rumen, dicha fracción no degradada es denominada proteína de *by pass* o proteína indegradable en rumen (RUP). La misma junto a la proteína microbiana llegan al intestino donde son digeridas por enzimas propias del animal y constituyen parte de la proteína metabolizable (Cajarville y col., 2003).

La ingestión de suplementos provoca cambios en el ambiente ruminal, entre ellos el pH. La energía proporcionada por estos incide directamente sobre la intensidad de la

actividad microbiana modificando la cantidad y las especies de microorganismos. En dietas con alto porcentaje de concentrados, el ritmo de degradación proteica disminuiría al verse resentida la actividad de la flora celulolítica, en favor de las amilolíticas (Dixon y Stockdale, 1999). Según estudios en los que se midió la concentración de N-NH₃ y de aminoácidos, la actividad enzimática microbiana y la población de microorganismos a diferentes valores de pH del medio, llegaron a la conclusión que la población microbiana disminuía al hacerlo el pH y ello causaba una menor degradabilidad proteica (Repetto, 1996). Por otro lado la solubilidad de la proteína en un medio está relacionada al pH del mismo. La disminución del pH afectaría más a la solubilidad de las proteínas que a la actividad degradativa de los microorganismos (Repetto, 1996).

4.4. FRECUENCIA DE SUPLEMENTACIÓN

La suplementación de rumiantes con carbohidratos de rápida degradación genera un menor pH ruminal medio (Tebot y col., 2012; Aguerre y col., 2013). Estos descensos del pH afectan la digestibilidad de la fracción fibrosa de la dieta, las concentraciones de ácidos grasos volátiles y de N-NH₃ (Calsamiglia y col., 2008). Según algunos trabajos la frecuencia de suministro de concentrado es una estrategia que podría minimizar los problemas de acidosis ruminal asociados al consumo de concentrado (Soto-Navarro y col., 2000; Robles y col., 2007). El objetivo de estos trabajos es disminuir las fluctuaciones en el pH ruminal, a través del aumento de la frecuencia de suministro del concentrado (Sutton y col., 1986).

Robles y col. (2007) evaluaron en cuatro vaquillonas Holstein fistuladas en el rumen, en base a una dieta TMR suministrada *ad libitum*, cuatro diferentes frecuencias de alimentación diarias y concluyeron que el promedio de pH no se vio afectado por la frecuencia de alimentación. En cuanto a las concentraciones de NH₃, concentraciones de AGV y sus proporciones no se vieron afectadas por los tratamientos. Los resultados difieren de los datos reportados por Soto-Navarro y col. (2000); en ese trabajo se utilizaron nueve novillos mestizos, con cánulas ruminales, alimentados con una dieta de TMR suministrada *ad libitum* y otra al 90% del consumo diario con el mismo alimento, en dos frecuencias de alimentación diarias (una y dos veces al día), en el cual obtuvieron una menor concentración de AGV y una mayor relación acetato:propionato con la mayor frecuencia de alimentación. En cuanto a la concentración de N-NH₃ encontraron que a una mayor frecuencia de suplementación los valores no se veían afectados.

5. HIPÓTESIS

El suministro de grano de maíz molido al 1% de PV a vaquillonas en crecimiento, consumiendo raigrás maduro, con una mayor frecuencia diaria permite atenuar las caídas del pH ruminal que se producen luego de la ingesta de carbohidratos rápidamente fermentescible y reducir las fluctuaciones diarias de pH ruminal, de las concentraciones de ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la frecuencia diaria de suministro de grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo sobre el ambiente ruminal de vaquillonas en crecimiento.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el efecto de la frecuencia de suplementación sobre:

- El pH ruminal y su dinámica diaria.
- Las concentraciones de N-NH₃ y su dinámica diaria.
- Las concentraciones de ácidos grasos volátiles totales, las proporciones de acetato, propionato, butirato y su dinámica diaria.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue realizado en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria (34° Sur y 56° Oeste). Los análisis de composición química de los alimentos y el procesamiento de las muestras se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria en Montevideo.

Las maniobras con los animales se realizaron de acuerdo al protocolo de experimentación aprobado por la CEUA de la Facultad de Veterinaria (protocolo: CEUAFVET PI 11).

7.1. ANIMALES, ALIMENTOS Y TRATAMIENTOS

Fueron utilizadas 20 vaquillonas Hereford, de 18 meses de edad y 252 ± 22 kg de peso vivo (PV), a las cuales se les colocó a través del flanco catéteres ruminales (5×110 mm). Durante el experimento las vaquillonas permanecieron en jaulas metabólicas individuales.

Las vaquillonas fueron bloqueadas según su PV y asignadas al azar a uno de cuatro tratamientos, quedando determinados así 4 tratamientos de 5 animales cada uno. Los tratamientos fueron:

- T0: Alimentación con forraje *ad libitum*.
- T1: Forraje *ad libitum* + suplemento a razón de 1% del PV suministrado una vez al día (9:00 hs).
- T2: Forraje *ad libitum* + suplemento a razón de 1% del PV suministrado dos veces al día (9:00 y 21:00 hs).
- T8: Forraje *ad libitum* + suplemento a razón de 1% del PV suministrado ocho veces al día (9:00, 10:45, 12:30, 14:15, 16:00, 17:45, 19:30 y 21:15 hs).

El forraje fue cortado diariamente a las 12:00 hs a partir de una pastura compuesta por 98,5% de raigrás anual (*Lolium multiflorum*) y 1,5% trébol blanco (*Trifolium repens*).

Cuadro I. Composición química de los alimentos utilizados (media \pm DE) ^a

| Alimento | MS | MO | PB | FND | FAD |
|-------------------------|--------------|--------------|------------|--------------|--------------|
| Pastura ^b | 240 \pm 27 | 910 \pm 10 | 88 \pm 8 | 530 \pm 62 | 347 \pm 33 |
| Suplemento ^c | 823 \pm 1 | 986 \pm 50 | 70 \pm 2 | 100 \pm 50 | 30 \pm 3 |

^a MS: materia seca en g/kg de materia fresca. MO: materia orgánica (100 - % Cenizas totales) en g/kg MS. PB: proteína bruta (N \times 6,25) en g/kg MS. FND: fibra neutro detergente en g/kg MS. FAD: fibra ácido detergente en g/kg MS.

^b Compuesta por: *Lolium multiflorum* 98,5% y *Trifolium repens* 1,5% (n=10).

^c Grano de Maíz (*Zea mays*) seco y molido (n=2).

El suplemento utilizado fue grano de maíz seco y molido (Cuadro I), que fue administrado de acuerdo a la frecuencia establecida para cada tratamiento. Durante el suministro de maíz, los animales no tuvieron acceso al forraje.

Se tomaron diez muestras de forraje y dos muestras de maíz, que se colocaron en estufa a 105 grados hasta peso constante, para determinar MS; se determinó MO (método 942.05) y PB ($N \times 6,25$; método 942.01) de acuerdo con AOAC (1990). Las determinaciones de FND y fibra ácido detergente (FAD) se realizaron según Mertens (2003).

7.2. DETERMINACIONES Y MUESTREOS

El experimento tuvo una duración total de 23 días, siendo los 22 primeros de adaptación de los animales a la dieta y a las condiciones experimentales. Luego del período de adaptación y durante 24 hs se extrajo de cada animal 20 mL de líquido ruminal a través de los catéteres ruminales en cada muestreo.

El pH ruminal se determinó inmediatamente después de la colecta mediante pHmetro digital (Cole Parmer, Illinois, EUA) a las horas 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18 y 21 luego de la hora cero de mediciones (9:00 AM).

A partir de la hora 0 y cada tres hs se colectaron sub muestras de 0,5 mL de líquido ruminal para determinar posteriormente las concentraciones de acetato (Ac), propionato (Pr) y butirato (Bu). A dichas muestras se les adicionó ácido perclórico 0,1 M como conservante (50:50, v/v) y fueron congeladas a -18°C hasta su posterior análisis. Las concentraciones de Ac, Pr y Bu (mmol/L) se determinaron en cada muestra mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, Dionex UltiMate 3000[®], Dionex Corporation, Sunnyvale, EUA) usando una columna de $300 \times 7,8$ mm (Acclaim, Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%), Phenomenex, EUA), de acuerdo a la técnica descrita por Adams y col. (1984). La concentración de ácidos grasos volátiles totales (AGVt) se calculó como la suma de las concentraciones de Ac, Pr y Bu. Se calculó además la relación entre la concentración de acetato y propionato.

Otra sub muestra de 0,5 mL de líquido ruminal (colectada cada 3 hs durante 24 hs) fue conservada en ácido sulfúrico 0,1 M y congelada a -18°C , para la posterior determinación de la concentración de N-NH₃ (mg/dL) por colorimetría (Weatherburn, 1967) en un espectrofotómetro (Unico 1200 series[®], United Products and Instruments, Inc. NJ, EEUU).

7.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El pH ruminal, las concentraciones de AGV y las concentraciones de N-NH₃ fueron analizadas como medidas repetidas en el tiempo mediante un modelo mixto (SAS, 2002), en el que se consideraran los efectos fijos del tratamiento, la hora de muestreo y la interacción tratamiento por hora, el bloque fue considerado como un efecto aleatorio según el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + H_j + (T_i \times H_j) + B_k + e_{ijk}$$

Donde Y_{ijk} es la variable en estudio, μ la media, T_i el efecto del tratamiento, H_j el efecto hora, T_i por H_j la interacción tratamiento hora, B_k el efecto aleatorio del bloque y e_{ijk} la sumatoria de errores. Las medias de los distintos tratamientos se compararon mediante el test de Tukey. Fueron declaradas diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$ y como tendencias cuando $0,05 < p < 0,10$.

8. RESULTADOS

Los valores de pH oscilaron en un rango de 6,14 y 6,78, y no fueron afectados por la suplementación, ni por la frecuencia de suministro ($p=0,939$). Sin embargo hubieron diferencias significativas según la hora de muestreo ($p<0,01$) e interacción tratamiento por hora ($p=0,011$, Cuadro II), indicando esto último, diferencias en las curvas diarias de pH (FIGURA 1).

En la FIGURA 1 se observa que el pH en T2 disminuyó, llegando al valor mínimo 4 hs luego del consumo del suplemento, siendo esta media de pH la más baja de todos los tratamientos y horarios.

CUADRO II. Medias diarias de pH ruminal, concentración de N-NH₃, de AGV y de proporción de AGVs y relación A:P de vaquillonas no suplementadas o suplementadas con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo (PV) a distintas frecuencias diarias.

| | Tratamientos ^a | | | | EEM ^b | p-valor ^c | | |
|----------------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------------|-------|-------|
| | T0 | T1 | T2 | T8 | | T | H | T × H |
| pH | 6,41 | 6,40 | 6,36 | 6,43 | 0,040 | 0,939 | <0,01 | 0,011 |
| N-NH ₃ , mg/dL | 4,63 ^a | 3,79 ^a | 3,32 ^b | 3,50 ^b | 0,403 | 0,023 | <0,01 | 0,267 |
| AGV ^d totales, mmol/L | 142 | 136 | 130 | 125 | 6,028 | 0,140 | 0,048 | 0,243 |
| AGV, mmol/mol | | | | | | | | |
| Acetato | 60,4 ^x | 59,0 ^y | 59,0 ^y | 58,9 ^y | 0,480 | 0,090 | <0,01 | 0,350 |
| Propionato | 25,4 | 25,4 | 25,2 | 24,5 | 0,298 | 0,144 | <0,01 | 0,943 |
| Butirato | 14,9 | 15,6 | 15,4 | 15,9 | 0,411 | 0,363 | <0,01 | 0,236 |
| Acetato:Propionato ^e | 2,41 | 2,33 | 2,36 | 2,42 | 0,037 | 0,271 | <0,01 | 0,927 |

^a Tratamientos: T0= pastura *ad libitum* sin suplementación, T1, T2, T8= pastura *ad libitum* y suplementación con grano de maíz a razón del 1% del PV suministrado una vez, dos veces u ocho veces al día respectivamente.

^b Error estándar de la media (n= 5 por tratamiento).

^c Nivel de significancia para la comparación de medias entre tratamientos, diferentes letras en superíndice en cursiva entre columnas indican diferencias significativas (*a, b*, $p\leq 0,05$) o tendencias (*x, y*, $0,05 < p < 0,10$).

^d Ácidos grasos volátiles totales, como la suma de las concentraciones de acetato, propionato y butirato.

^e Relación entre la concentración de acetato/la concentración de propionato.

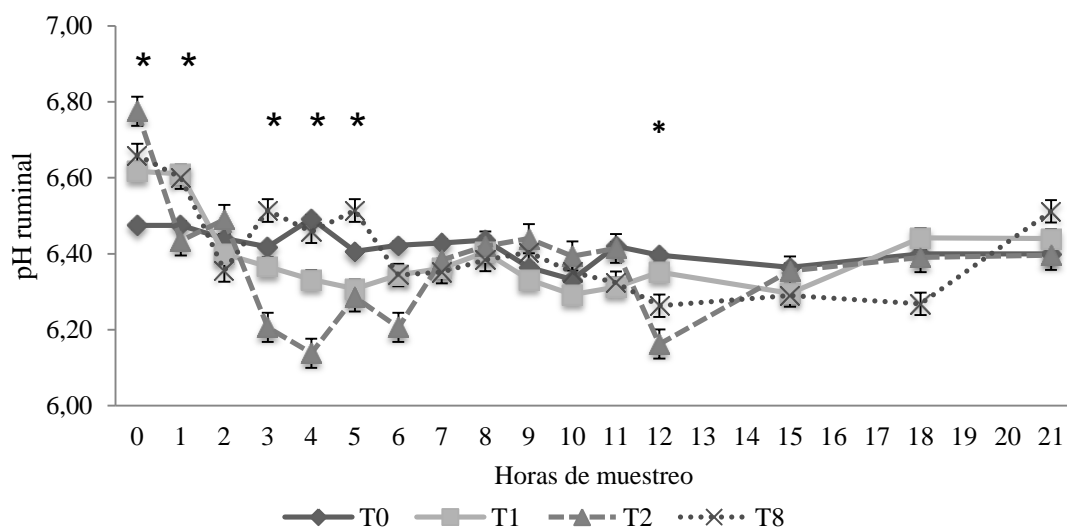


Figura 1. Dinámica diaria de pH ruminal de vaquillonas alimentadas *ad libitum* en base a una pastura templada sin suplementación (T0) o suplementadas con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo, suministrado una (T1), dos (T2) u ocho veces (T8) al día. * indican $p < 0,05$ entre las medias de los tratamientos para cada horario de muestreo.

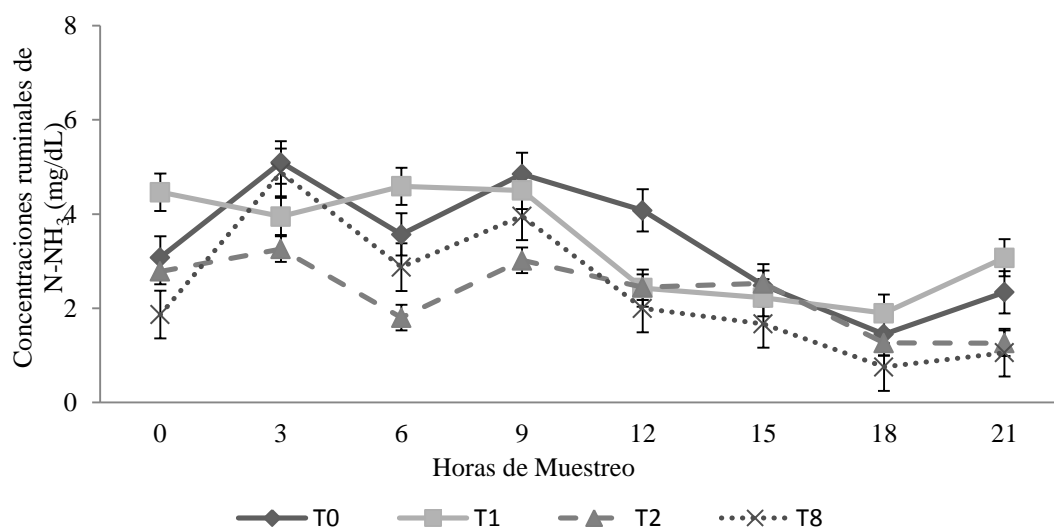


Figura 2. Dinámica diaria de las concentraciones (mg/dL) de amoníaco ruminal ($N-NH_3$) de vaquillonas alimentadas *ad libitum* en base a una pastura templada sin suplementación (T0) o suplementadas con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo, suministrado una (T1), dos (T2) u ocho veces (T8) al día.

Las concentraciones de $N-NH_3$ ruminal se mantuvieron en un rango de 5,10 y 0,75 mg/dL y fueron detectadas diferencias significativas en las concentraciones medias diarias de $N-NH_3$ entre tratamientos (Cuadro II). Sin embargo no fue detectada interacción entre el tratamiento y la hora de muestreo, indicando una dinámica diaria similar entre tratamientos (Figura 2).

La concentración total de AGV, así como sus proporciones y la relación acetato:propionato no fueron afectadas por la suplementación ni por la frecuencia de

suministro del concentrado ($p>0,05$, CUADRO II). Tampoco fueron detectadas interacciones entre tratamientos y la hora de muestreo. Sin embargo se detectó una leve tendencia de las vaquillonas suplementadas a presentar una menor proporción de ácido acético ($p=0,09$, CUADRO II).

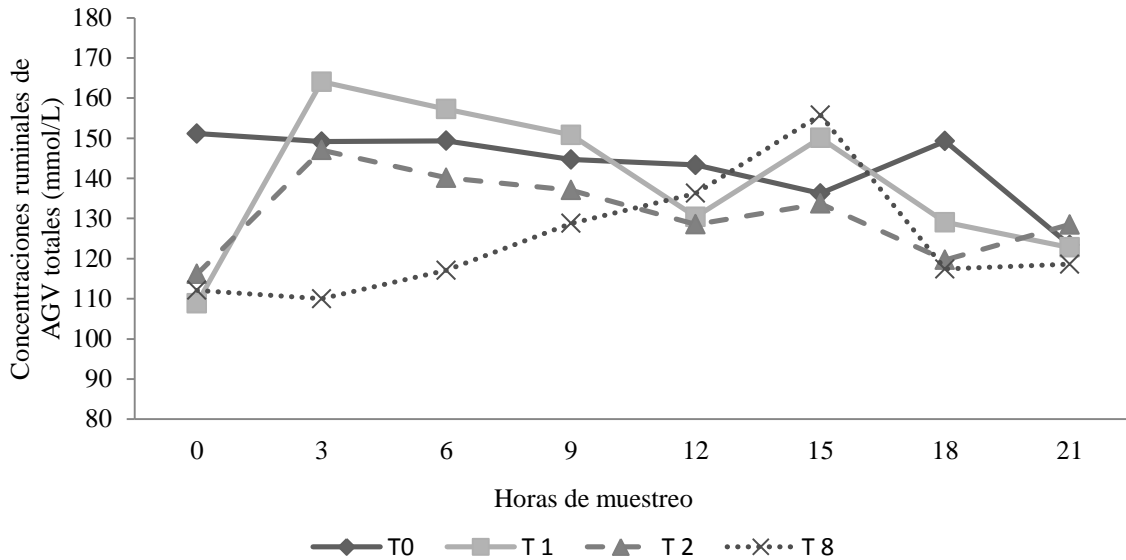


Figura 3. Dinámica diaria de las concentraciones (mmol/L) de ácidos grasos volátiles totales (AGV) de vaquillonas alimentadas *ad libitum* en base a una pastura templada sin suplementación (T0) o suplementadas con grano de maíz molido a razón de 1% del peso vivo, suministrado una (T1), dos (T2) u ocho veces (T8) al día. * indican $p<0,05$ entre la medias de los tratamientos para ese horario de muestreo.

9. DISCUSIÓN

La ausencia de diferencias en los valores medios de pH ruminal entre las vaquillonas no suplementadas y las suplementadas, resulta llamativa, ya que existen varios trabajos que reportan menores valores medios de pH ruminal cuando los animales son suplementados con granos de cereales (Cajarville y col., 2006, Tebot y col., 2012, Aguerre y col., 2013). Sin embargo es ampliamente conocido que la regulación del pH ruminal depende de múltiples variables, que involucran las características de las pasturas, las características del concentrado, los niveles de inclusión del mismo, el comportamiento animal, el manejo de la suplementación, entre otras (Allen, 1997).

En este experimento en particular la regulación del pH pudo estar dada por las características del forraje (53% FND y 35% FAD), los niveles de FND consumidos por las vaquillonas (1,5% del PV, datos de este experimento presentado por Gutiérrez y col., 2014) y los niveles de suplementación empleados (8 g MS/ kg PV). Los trabajos que detectaron diferencias significativas en el pH ruminal medio entre los animales suplementados y los no suplementados, utilizaron pasturas de mayor calidad, con menores niveles de FND (18 % PB, 42 % FND en Cajarville y col., 2006, 13 % PB, 55 % FND en Tebot y col., 2012, 13 % PB, 42 % FND en Aguerre y col., 2013). El contenido de FND esta correlacionado positivamente con el pH ruminal (Rearte y Santini, 1989). Al aumentar la cantidad de FND de la dieta aumenta el tiempo de rumia y el flujo de saliva, la cual actúa como buffer (Allen, 1997). Estos niveles de FND de la dieta superan en más de dos veces los valores mínimos (22% de MS) recomendados por el NRC (2000) para estimular la rumia y la salivación.

A pesar de la ausencia de efecto de la suplementación sobre el pH y del acotado rango de variación del mismo (6,14- 6,78) hubo diferencias significativas en el pH ruminal según la hora de muestreo e interacción tratamiento por hora. Observándose para los tratamientos suplementados una mayor estabilidad del pH cuando la frecuencia de suplementación se incrementó. Esto coincide con varios reportes que mencionan una mayor estabilidad del pH ruminal cuando los animales son alimentados con mayor frecuencia (Nocek y Braund, 1985; Sutton y col., 1986; French y Kennelly, 1990; Yang y Varga, 1989; Soto-Navarro y col., 2000; Robles y col., 2007). De todos modos en nuestro trabajo al igual que en reportes previos (Caton y Dhuyvetter, 1997, Cajarville y col., 2006) se resalta un descenso significativo del pH alrededor de las 3 a 5 horas posteriores a la ingesta principal.

La ausencia de diferencias significativas en el pH ruminal promedio concuerda con la ausencia de diferencias en las concentraciones promedio de AGV totales, las proporciones de los mismos y la relación acetato:propionato. Esto pudo estar dado en primer lugar por los bajos niveles de suplementación empleados en este experimento que si son considerados en base seca, fueron de 0,8% del PV y representaron alrededor del 25% de la MS consumida por las vaquillonas suplementadas (Gutiérrez y col., 2014).

Todos los tratamientos tuvieron patrones similares en las concentraciones medias de N-NH₃ y no se detectó efecto entre la hora de muestreo y la concentración de N-NH₃, esto difiere con el trabajo realizado por Cajarville y col. (2006), quienes observaron picos máximos de N-NH₃ 4 horas post ingestión de praderas con alta digestibilidad de materias nitrogenadas. Sin embargo es importante resaltar que en este experimento los niveles de amoníaco registrados fueron bajos (promedio 2,86 mg/dL) con respecto a los comunicados por otros autores (Bargo y col., 2003; Cajarville y col., 2006; Santana, 2012; Tebót y col., 2012; Aguerre y col., 2013). Los mismos siempre estuvieron por debajo de 5 mg/dL, valor señalado como mínimo óptimo para una correcta actividad de los microorganismos ruminales (Satter y Slyter, 1974; Clark y col., 1992; Van Soest, 1994). A pesar de ello, parecería que la actividad fermentativa ruminal, al menos de la flora fibrolítica, fue escasamente afectada, ya que en resultados obtenidos en este experimento, pero que no pertenecen a este trabajo, se observan valores de digestibilidad aparente *in vivo* de la FND superiores al 65% (Antúnez, 2015)

Al igual que lo que ocurre en el pH ruminal, la concentración de N-NH₃ depende de varios factores. Sin embargo parece claro que las características de la pastura utilizada en este trabajo, con niveles de PB menores al 10% de la MS (Cuadro 1), fueron determinantes. También hay que considerar otros mecanismos que pudieron intervenir, como por ejemplo el pH ruminal. Es sabido que la absorción del N-NH₃ a través de la pared ruminal es mayor a medida que el pH aumenta (Kozloski, 2011). Por otro lado el rango de pH fue óptimo para la actividad fermentativa de la flora fibrolítica (Van Soest, 1994, Calsamiglia y col., 2008), que es precisamente la que utiliza en mayor medida el N-NH₃ ruminal como principal fuente de N (Russell, 1992, Kozloski, 2011), lo que también pudo contribuir a las bajas concentraciones de N-NH₃ observadas, teóricamente al aumentar la síntesis de proteína microbiana.

Las concentraciones ruminales de N-NH₃ disminuyeron significativamente en T2 y T8 con respecto a T0 y T1. En la mayoría de la bibliografía consultada, se reporta una disminución en los niveles de N-NH₃ cuando se incluyeron grano de cereales a una dieta en base a pasturas (Rearte y Pieroni 2001; Bargo y col., 2003; Bertrand y col., 2006; Cole, 2008). Esto puede deberse a un mayor consumo (Elizalde, 1999) y sincronización del aporte de N-NH₃ y los azúcares presentes en la dieta (Kolver y Muller, 1998; Bargo y col., 2003; Trevaskis y col., 2004). Según Henning y col. (1991), el suministro de energía en el rumen tiene mayor importancia para la sincronización que la disponibilidad de nitrógeno en el rumen, ya que este posee un sistema endógeno de reciclaje.

10. CONCLUSIONES

La suplementación con grano de maíz molido a razón de 1 % del peso vivo a vaquillonas en crecimiento, con una dieta basada en raigrás anual maduro, no produce cambios importantes en el ambiente ruminal.

Con este forraje y niveles de suplementación menores a 1% del peso vivo con grano de maíz molido, no sería necesario el fraccionamiento del suministro del concentrado.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams R.F., Jones R.L., Conway P.L. (1984). High-performance liquid chromatography of microbial acid metabolites. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 336:125–137.
2. Aguerre M., Cajarville C., Kozloski G.V., Repetto J.L. (2013). Intake and digestive responses by ruminants fed fresh temperate pasture supplemented with increased levels of sorghum grain: A comparison between cattle and sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 186: 12 – 19.
3. Allen M.S. (1997). Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *Journal of Dairy Science*. 80: 1447 - 1462.
4. Antúnez G. (2015). Frecuencia diaria de suplementación en bovinos. Tesis de maestría. Facultad de Veterinaria, UdelaR. En prensa.
5. AOAC (1990). *Official Methods of Analysis*, 15a. Ed. Arlington, Ed. Association of Official Analytical Chemists.
6. Bargo F. (2003). Suplementación en Pastoreo: Conclusiones sobre las últimas experiencias en el mundo. Disponible en: www.agro.uba.ar/sites/default/files/catedras/bargo.pdf Fecha de consulta 10/10/14.
7. Bargo F., Muller L.D., Kolver E.S., Delahoy J.E. (2003). Invited Review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *Journal of Dairy Science*. 86: 1 - 42.
8. Bertrand M., Gehman A., Jenkins T. C., Pinkerton B., (2006). The effect of carbohydrate source on nitrogen capture in dairy cows on pasture. *Journal of Dairy Science*. 89: 2659 - 2667.
9. Broderick, G. (2010). Nuevas perspectivas en la eficiencia del uso de nitrógeno en vacas lecheras. Simposio: Claves para el Manejo Nutricional de la vaca de alto potencial, Facultad de Veterinaria, UdelaR. Colonia del sacramento, Uruguay, 15 de abril de 2010, p. 5-18. .
10. Cajarville C., Aguerre M., Repetto J.L. (2006). Rumen pH, NH₃-N concentration and forage degradation kinetics of cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. *Animal Research*. 55: 511 - 520.

11. Cajarville C., Curbelo A., Repetto J.L., Corso C. (2003). Curso a distancia sobre nutrición de rumiantes. Módulo 1: Utilización de los nutrientes por el rumiante. Facultad de Veterinaria UdelaR. p. 9 - 19.
12. Cajarville C., Repetto J.L. (2005). Uso de concentrados para optimizar el aprovechamiento digestivo de las pasturas. XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. p. 121 - 128.
13. Calsamiglia S. (1997). Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas de rumiantes. XIII Curso de especialización FEDNA. 6 y 7 de Noviembre de 1997, Madrid, 16 p. Disponible en: fundacionfedna.org/sites/default/files/97CAP_I.pdf. Fecha de consulta: 13/05/2014.
14. Calsamiglia S., Cardozo P., Ferret A., Bach A. (2008). Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *Journal of Animal Science*. 86: 702 – 711.
15. Caton J.S., Dhuyvetter D.V. (1997). Influence of energy supplementation on grazing ruminants: requirements and responses. *Journal of Animal Science*. 75: 533 - 542.
16. Clark J.H., Klusmeyer T.H., Cameron M.R. (1992). Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to duodenum of dairy cows. *Journal of Animal Science*. 75: 2304 - 2323.
17. de Blas C., Rebollar P.G., Méndez J. (1995). Utilización de cereales en dietas de vacuno lechero. XI Curso de especialización FEDNA. 7 y 8 de Noviembre de 1995, Barcelona, España, 19 p. Disponible en: fundacionfedna.org/sites/default/files/95CAP_III.pdf. Fecha de consulta 13/05/2014. Págs. 48-67.
18. DIEA (2014). Censo General Agropecuario 2011. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. 142 pp. Disponible en: <http://mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-censo-2011-resultados-definitivos,O,es,0>. Fecha de consulta: 12/11/2014.
19. Dixon R.M., Stockdale C.R. (1999). Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilization. *Australian Journal of Agricultural Research*. 50: 757-774.
20. French N., Kennelly J. (1990). Effects of feeding frequency on ruminal parameters, plasma insulin, milk yield, and milk composition in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 73: 1857 - 1863.
21. Gutiérrez L.E., Rostagnol R.Y., Saravia J.I. (2014). Consumo, comportamiento y ritmo de ingestión en vaquillonas alimentadas en base a una pastura templada

- y suplementadas a razón del 1% de peso vivo en diferentes frecuencias diarias. Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, Udelar. 35 p.
22. Henning P.H., Steyn D.G., Meissner H.H. (1991). The effect of energy and nitrogen supply pattern on rumen bacterial growth in vitro. *Animal Production*. 53:165 - 175.
 23. Herrera-Saldaña R., Gomez-Alarcon R., Torabi M., Huber J.T. (1990). Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis. *Journal of Dairy Science*. 73: 2386 - 2393.
 24. Kolver E., Muller L. (1998). Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*. 81: 1403 - 1411.
 25. Kozloski G.V. (2011) *Bioquímica dos ruminantes – 3ª ed.* Santa Maria. USFM. 214 pp.
 26. Mertens D.R. (2003). Challenges in measuring insoluble dietary fiber. *Journal of Animal Science*. 81:3233–3249.
 27. Nocek J.E., Braund D.G. (1985). Effect of feeding frequency on diurnal dry matter and water consumption, liquid dilution rate, and milk yield in first lactation. *Journal of Dairy Science*. 68: 2238 – 2247.
 28. Nozière P., Glasser F., Sauvant D. (2011). In vivo production and molar percentages of volatile fatty acids in the rumen: a quantitative review by an empirical approach. *Animal* 5: 403 – 414.
 29. National Research Council (2000). *Nutrient Requirements of Beef Cattle*. 7a. ed. Washington National Academy, 248 p.
 30. Offner A., Bach A., Sauvant D. (2003). Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*. 106: 81 - 93.
 31. Owens F.N. (2005). Corn grain processing and digestion. *Minnesota Nutrition Conference*. 113 - 133. Disponible en: <http://www.ddgs.umn.edu/prod/groups/cfans/@pub/@cfans/@ansci/documents/asset/ddgs-techinfo-pro-17.pdf>. Fecha de consulta: 12/05/2015.
 32. Rearte D.H., Pieroni G.A. (2001). Supplementation of temperate pastures. *International Grassland Congress 19 (2001)*. Disponible en: <http://www.internationalgrasslands.org/files/igc/publications/2001/tema19-2.pdf>. Fecha de consulta 25/02/2015.
 33. Rearte D.H., Santini F.J. (1989). Digestión ruminal y producción en animales a pastoreo. *Revista Argentina de Producción Animal*. 9: 93.

34. Relling A.E., Mattioli G.A. (2002). Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, 72 p. Disponible en: <http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catbioquimicavet/fisio%20dig%20rumiantes.pdf>. Fecha de consulta. 03/03/2015.
35. Repetto J.L. (1996). Degradabilidad de la alfalfa deshidratada. Curso a Distancia para Profesionales sobre Nutrición de Rumiantes, Facultad de Veterinaria UdelaR. Módulo 1: p. 102 - 134.
36. Robles V., González L., Ferret A., Manteca X., Calsamiglia S. (2007). Effects of feeding frequency on intake, ruminal fermentation, and feeding behavior in heifers fed high-concentrate diets. *Journal of Animal Science*. 85:2538-2547.
37. Russell J.B. (1998). Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *Journal of Animal Science*. 76: 1955 - 1963.
38. Santana A. (2012). Inclusión de pastura templada en una dieta completamente mezclada en vaquillonas: efectos sobre el consumo, el aprovechamiento digestivo y metabólico de los nutrientes. Tesis de Maestría en Nutrición de Rumiantes. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. 45 p.
39. Satter L., Slyter L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *British Journal of Nutrition*. 32:199-208.
40. Soto-Navarro S., Krehbiel C., Duff G., Galyean M., Brown M., Steiner R. (2000). Influence of feed intake fluctuation and frequency of feeding on nutrient digestion, digesta kinetics, and ruminal fermentation profiles in limit-fed steers. *Journal of Animal Science*. 78: E2215 - E2222.
41. Sutton J.D., Hart I.C., Broster W.H., Rosemary J.E., Schuller E. (1986). Feeding frequency for lactation cows: effects on rumen fermentation and blood metabolites and hormones. *British Journal of Nutrition* 56: 181 - 192.
42. Tebot I., Cajarville C., Repetto J.L., Cirio A. (2012). Supplementation with non-fibrous carbohydrates reduced fiber digestibility and did not improve microbial protein synthesis in sheep fed fresh forage of two nutritive values. *Animal* 6: 617 - 623.
43. Trevaskis L.M., Fulkerson W.J., Nandra K.S. (2004). Effect of time of feeding carbohydrate supplements and pasture on production of dairy cows. *Livestock Production Science*. 85: 275 – 285.
44. van Lier E., Regueiro M. (2008). Digestión en retículo-rumen. Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay. Departamento de Producción Animal y Pasturas. 30 p.
45. Van Soest P.J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. 2a ed. Ithaca, Cornell University Press, 476 p.

46. Weatherburn M.W. (1967). Phenol–Hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*. 39:971–974.
47. Yang C., Varga G.A. (1989). Effect of three concentrate feeding frequencies on rumen protozoa, rumen digesta kinetics, and milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 72: 950 - 957.
48. Yang W.Z., Beauchemin K.A. (2007). Altering physically effective fiber intake through forage proportion and particle length: digestion and milk production. *Journal of Dairy Science*. 90: 3410 - 3421.