

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DIFERENTES FRECUENCIAS DE SUPLEMENTACIÓN CON GRANO DE MAÍZ A
VAQUILLONAS QUE CONSUMEN UN FORRAJE DE CALIDAD MEDIA Y SU
EFECTO EN EL CONSUMO, DIGESTIBILIDAD Y BALANCE DE NITRÓGENO**

por

GARRETANO FAILLA, Matías.

GUICHÓN CLAVIJO, Martín.

GUIDI EGUÍA, Bruno.

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

Tercer miembro:

Ing. Agr, MSc Santiago Monteverde

Cuarto miembro (Co-tutor):

DMTV. PhD. Cecilia Cajarville

Fecha:

Autores:

Br. Matías Eduardo Garretano

Br. Martín Alberto Guichón

Br. Bruno Sebastián Guidi

AGRADECIMIENTOS

A nuestro tutor y co-tutor, Germán Antúnez y Cecilia Cajarville, por el apoyo brindado y el tiempo dedicado para hacer posible la realización de este trabajo.

A Álvaro González por su ayuda y apoyo en la realización del trabajo de campo.

A las personas y funcionarios del Campo Experimental Número 2 de San José.

A nuestros compañeros de tesis, del Orientado de Producción Animal y a aquellos que nos acompañaron en el transcurso de toda nuestra carrera.

A todos y cada uno de los integrantes de la Cátedra de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria por el apoyo y asesoramiento en múltiples aspectos.

A nuestras familias, parejas y amigos que estuvieron siempre presentes y apoyando incondicionalmente para que esto sea una realidad...

A todos ellos... ¡Muchas gracias!

TABLA DE CONTENIDOS

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS	6
1. RESUMEN.....	7
2. SUMMARY	8
3. INTRODUCCIÓN	9
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
4.1 SUPLEMENTACIÓN	10
4.2 FRECUENCIA DE SUPLEMENTACIÓN	10
4.3 CONSUMO, DIGESTIBILIDAD Y BALANCE DE NITRÓGENO .¡Error! Marcador no definido.	
4.4 METABOLISMO DEL NITRÓGENO Y SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA	12
5. HIPÓTESIS	15
6. OBJETIVOS.....	15
4.5 OBJETIVO GENERAL.....	15
4.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
7. MATERIALES Y MÉTODOS	16
7.1. LUGAR.....	16
7.2. ANIMALES E INSTALACIONES	16
7.3. TRATAMIENTOS	16
7.4. CÁLCULOS, DETERMINACIONES Y MUESTREOS	17
7.4.1. Consumo	17
7.4.2. Digestibilidad aparente <i>in vivo</i>	18
7.4.3. Balance de nitrógeno	18
7.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	19
8. RESULTADOS	20
9. DISCUSIÓN.....	23
10. CONCLUSIONES	25
11. BIBLIOGRAFÍA.....	26

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

Cuadro I Composición química de los alimentos suministrados (media±DE)..... 17

Cuadro II Consumo, excreción y retención de nitrógeno (N) de vaquillonas no suplementadas (T0) o suplementadas con grano de maíz molido a razón del 1% del peso vivo (PV) en una (T1), dos (T2) u ochos comidas diarias (T8). 20

FIGURAS

Figura 1 Consumo de proteína bruta (PB) (g/kg PV/d) proveniente de la pastura y el maíz para los diferentes tratamientos, T0: pastura ad libitum; T1, T2 y T8: pastura ad libitum y suplementación con grano de maíz a razón de 1% del PV en una (T1), dos (T2) u ocho (T8) veces al día respectivamente. Letras diferentes (a, b) indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$)..... 21

Figura 2 Excreción de PB expresado en g/kgPV/d en Orina y Heces para los diferentes tratamientos, T0: pastura ad libitum; T1, T2 y T8: pastura ad libitum y suplementación con grano de maíz a razón del 1% del PV en una, dos u ocho veces al día respectivamente. Letras diferentes (a, b) indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$)..... 22

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AGV	Ácidos Grasos Volátiles
BW	Body Weight
CH	Carbohidratos
CP	Crude Protein
ESPM	Eficiencia de síntesis de proteína microbiana
EUN	Eficiencia de utilización del Nitrógeno
FND	Fibra Neutro Detergente
MO	Materia Orgánica
m.o.	Microorganismos
MS	Materia seca
NDF	Neutral Detergent Fiber
NH₄	Amonio
N-NH₃	Nitrógeno amoniacal
PB	Proteína bruta
PM	Proteína microbiana
PV	Peso vivo
SPM	Síntesis de proteína microbiana
T₀	Solo Pastura <i>ad libitum</i>
T₁	Pastura <i>ad libitum</i> + suplemento (Maíz, 1% PV) una vez al día.
T₂	Pastura <i>ad libitum</i> + suplemento (Maíz, 1% PV) 2 veces al día.
T₈	Pastura <i>ad libitum</i> + suplemento (Maíz, 1% PV) 8 veces al día.

1.RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del aumento de la frecuencia diaria de suplementación con grano de maíz molido al 1% de PV, a vaquillonas que consumían raigrás fresco de mediana calidad (Proteína Bruta (PB) = 9%; Fibra Neutro Detergente (FND)= 53%) *ad libitum*, sobre el consumo, la digestibilidad y el balance de nitrógeno (N). Para ello fueron utilizadas 22 vaquillonas Hereford de aproximadamente 18 meses de edad y 255 ± 22 kg de PV y 4 cruzas de 12 meses de edad y 159 ± 10 kg de PV. Los animales fueron bloqueados por PV y raza, para posteriormente ser asignados al azar a uno de los 4 tratamientos: pastura *ad libitum* (T0), pastura *ad libitum* más grano de maíz molido a razón de 1 % del PV suministrado en una (T1), dos (T2) y ocho (T8) fracciones diarias. Luego de 10 días de adaptación, se comenzó con los muestreos y determinaciones. Durante 7 días se midió el consumo de alimento y la excreción de heces y orina. A partir de muestras del alimento, heces y orina se determinó el contenido de PB para calcular el consumo y la digestibilidad de la misma así como el balance de N. Las variables determinadas fueron analizadas por el PROC MIXED (SAS, 2002). Se observaron diferencias significativas en el consumo de PB total medido en g/kg PV/día entre los animales pertenecientes al T2 y T8, en comparación con los del T0. La principal vía de excreción de PB fueron las heces tanto en los animales suplementados como en los no suplementados (77% y 63% respectivamente), mientras que por vía urinaria, no se observaron diferencias entre los distintos tratamientos. Tanto el balance como la retención de PB no presentaron variaciones significativas entre los distintos tratamientos. La digestibilidad de la PB fue menor para T2 y T8 en comparación con T0. Se concluye que, la administración en más de una fracción diaria de grano de maíz, a niveles de inclusión del 1% del PV, en animales consumiendo una pastura de calidad media, llevó a aumentos en el consumo total de PB. El aumento de la frecuencia de administración del grano, no causó efecto en la retención de PB por parte de los animales. Se observó un efecto sobre la digestibilidad, que fue menor administrando el grano de maíz en 2 u 8 fracciones diarias.

2.SUMMARY

The aim of this work was to study the effect of increasing the frequency of supplementation with ground corn grain at 1% of body weight (BW), in heifers consuming a medium quality fresh ryegrass pasture (Crude Protein (CP)= 9%; Neutral Detergent Fiber (NDF) = 53%) *ad libitum*, on intake, digestibility and nitrogen balance. We used twenty two (22) Hereford heifers about 18 months old and 255±22 kg of BW and 4 crosses about 12 months and 159±10 kg BW. Heifers were blocked by BW and race, later they were randomly disposed to one of the four treatments: pasture *ad libitum* (T0), pasture *ad libitum* plus ground corn grain at a rate of 1% of BW supplied in one (T1) two (T2) and eight (T8) times a day. After 10 days of adaptation, samplings and determinations began. During seven days feed intake and excretion of feces and urine were measured. From samples of food, feces and urine, CP content was determined to calculate the intake, digestibility and balance of N. Variables were analyzed by PROC MIXED (SAS, 2002). Significant differences in total CP intake, measured in g/kg BW/day, were observed between T2 and T8 animals, compared to T0. T1 animals showed no statistically significant differences with T0 or with the other supplemented treatments. The main route of excretion of CP in both supplemented and non- supplemented animals were feces (77 % and 63 % respectively), whereas in urine, no differences between treatments were observed. Both the balance and CP retention showed no significant variations between treatments. The CP digestibility was lower for T2 and T8 compared with T0. It was concluded that the inclusion of ground corn grain at 1% of BW, in animals consuming medium quality pastures, the total CP intake increased when corn was administered daily in more than one fraction. Increasing the frequency of administration of grain had no effect on retention of CP by animals, but an effect was observed in digestibility, which was lower administering the grain of corn in 2 or 8 daily fractions.

3.INTRODUCCIÓN

Los sistemas ganaderos de base pastoril presentan ventajas productivas cuando el uso de las pasturas es el adecuado (Cajarville y Repetto, 2010), ya que aseguran un mejor bienestar animal, un menor impacto sobre el medio ambiente (Chaudhry, 2008) y agregan características nutricionales distintivas a productos tales como la carne y la leche (Rearte, 2007). Sin embargo, en sistemas exclusivamente pastoriles la energía es el principal nutriente limitante (Moore y col., 1999; Bargo y col., 2003). Es por ello que frecuentemente son utilizados granos de cereales como suplementos energéticos, con el fin de balancear así la dieta (Cajarville y Repetto, 2005). A su vez la utilización de suplementos en estos sistemas, permite obtener mayor producción por unidad de superficie y por animal, así como alcanzar metas productivas en menor tiempo (Ramírez y Hernández, 2011).

La capacidad de los rumiantes de aprovechar las pasturas radica en la relación simbiótica entre éstos y los microorganismos (m.o) ruminales. Mientras que el animal aporta sustratos y las condiciones (temperatura, acidez, anaerobiosis y ambiente reductor) para el desarrollo óptimo de los m.o, estos últimos fermentan los alimentos ingeridos por el rumiante, generando ácidos grasos volátiles (AGV) y proteína microbiana (PM) que son de gran valor nutritivo para el rumiante (Calsamiglia y Ferret, 2002).

Cuando los animales ingieren alimentos se produce un aporte de proteína al rumen (Poppi y McLennan, 1995), la que es degradada por los m.o ruminales, liberando nitrógeno amoniacal ($N-NH_3$). Parte de este es utilizado para la síntesis de proteína microbiana (SPM), siendo el restante absorbido a través de la pared ruminal, posteriormente es transformado en urea en el hígado y excretada principalmente por orina (Elizondo, 2006; Zegarra y col., 2007).

Los carbohidratos (CH) fácilmente fermentables como el almidón, son más eficaces en la promoción del crecimiento microbiano y la utilización del $N-NH_3$ liberado (Bach y col., 2005; Cajarville y Repetto, 2010). Es por ello que la utilización de estrategias de alimentación que aumenten la eficiencia de uso del nitrógeno (EUN), además podrían ayudar a disminuir la contaminación ambiental (Zegarra y col., 2007).

A continuación se presenta la revisión bibliográfica que se centrará en la suplementación de rumiantes, la frecuencia de suplementación, el consumo, digestibilidad y metabolismo del N.

4.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 SUPLEMENTACIÓN

En los sistemas ganaderos pastoriles la suplementación de rumiantes con concentrados tiene como principales objetivos aumentar el consumo de materia seca (MS) y energía (Bargo y col., 2003; Tebot y col., 2012; Aguerre y col., 2013), aportar los nutrientes para mantener los niveles productivos a lo largo del año y mejorar la utilización de las pasturas (Bargo y col., 2003).

Los granos de cereales tales como maíz, sorgo, trigo y cebada son frecuentemente utilizados en la suplementación de rumiantes. Los granos de cereales tienen una digestibilidad mayor que la de los forrajes, dada por su bajo contenido de fibra y por su alto contenido de almidón. Cuando son adicionados a la dieta de rumiantes, en general se produce un aumento de la digestibilidad de la MS y la materia orgánica (MO) de la dieta (Aguerre y col., 2013; Tebot y col., 2012). Sin embargo, la suplementación con granos de cereales, genera a nivel ruminal descensos del pH como consecuencia de una actividad fermentativa más intensa, un rápido aumento de las concentraciones de AGV (Dixon y Stockdale, 1999). Esto puede repercutir en forma negativa, sobre todo cuando los animales se están adaptando a dietas con mayor inclusión de concentrados energéticos, donde la ingesta de grandes cantidades de almidón rápidamente fermentable, puede establecer un cuadro de acidosis ruminal subclínica, que si se prolonga en el tiempo, lleva a un descenso del consumo voluntario y la productividad del animal (Owens y col., 1998).

En cuanto a la fermentación ruminal de los componentes fibrosos de las plantas, ésta ocurre por la acción de enzimas microbianas ya que no son atacados por enzimas producidas por los animales. Los CH estructurales o fibrosos son aquellos que forman la pared de las células vegetales: celulosa, hemicelulosa y pectina (Relling y Mattioli, 2003). Para maximizar la tasa de fermentación de la fibra, es necesario un ambiente ruminal que optimice el desarrollo de las especies microbianas fibrolíticas (Dixon y Stockdale, 1999). Al suplementar la dieta con granos de cereales, tanto las características de la flora ruminal como su actividad fermentativa pueden verse alteradas como consecuencia de descensos en el pH. Cuando el pH ruminal disminuye por debajo de 6,2, disminuye la cantidad y la actividad de los m.o. fibrolíticos, reduciéndose la digestibilidad de la fibra (Dixon y Stockdale, 1999, Calsamiglia y col., 2008). En estas condiciones es esperable una menor utilización del N-NH₃ para la SPM, debido a que es la flora celulolítica la que en mayor medida utiliza el N-NH₃ (Dijkstra y col., 2005).

4.2 FRECUENCIA DE SUPLEMENTACIÓN

En cuanto a frecuencia de suplementación se refiere existen dos enfoques completamente distintos; el primero de ellos apunta a la reducción de los costos operativos y de la mano de obra así como a facilitar el manejo. En este sentido, dos trabajos donde se asignó un nivel de suplementación del 0,5% de PV diario y se varió la frecuencia de suplementación a lo largo de la semana (suplementados diariamente; de lunes a viernes; y lunes, miércoles y viernes)

demonstró que suplementar tres veces por semana, no afectó la ganancia diaria (g/d), el consumo total de MS, ni la digestibilidad de la misma. Se determinó también que este es un método viable para ahorrar tiempo de trabajo, y disminuir costos operativos por uso de maquinaria para un nivel de suplementación de 0,5% del PV (La Manna y col., 2005; Morais y col., 2014).

El segundo enfoque busca optimizar el aprovechamiento digestivo de los nutrientes aumentando la frecuencia diaria de suplementación.

Sobre este enfoque, Gibson (1981) analiza los resultados de trabajos publicados en los que se evaluó este efecto en ganado de carne. En ganado de carne en crecimiento el autor reporta una mayor ganancia de PV cuando los mismos fueron alimentados con mayor frecuencia, lo que atribuye a un mayor consumo y aprovechamiento digestivo del alimento.

El aumento en la frecuencia diaria de suplementación influye en la disponibilidad de almidón para los m.o. del rumen y para el propio animal (Dhiman y col., 2002), esto disminuye la cantidad de almidón disponible para la fermentación en cada comida, por lo que el descenso del pH es menos abrupto, generándose un ambiente ruminal más estable (Soto-Navarro y col., 2000).

Johnson (1976) observó que alimentar el ganado más frecuentemente aumenta la eficiencia de utilización del concentrado en el rumen y estimula el consumo del mismo, traduciéndose esto en una mayor producción de leche. En este sentido Yang y Varga (1989) observaron que suministrando alimentos concentrados 4 veces al día, a vacas Holando en lactación media y tardía, se minimizaba las fluctuaciones posprandiales de N-NH₃ en rumen y se producían incrementos en los niveles de grasa y proteína en leche, como consecuencia de un pH ruminal más estable.

Un trabajo realizado por Kaufmann (1976) en vacas lecheras demostró que una alta frecuencia de alimentación (14 veces por día), permitiría aumentar el consumo de concentrado y mantener los niveles de pH estables y superiores a 6,3 en comparación con una frecuencia de 2 veces por día, donde las fluctuaciones del pH fueron mayores durante el día, llegando a valores críticos de 5,8. Además observó que la relación acético/propiónico se mantuvo en 3:1 con una alta frecuencia de suplementación mientras que cuando ésta disminuyó, la relación acético/propiónico también lo hizo a 2,6:1.

Pulido y col. (2009) evaluaron el efecto de la suplementación y la frecuencia de administración de concentrados a vacas lecheras en pastoreo, con una dieta basada en una pastura de buena calidad, reportando que la suplementación tuvo un efecto positivo en el consumo total de MS. Este efecto tiende a disminuir a medida que se aumentó la frecuencia de suplementación. El autor lo atribuye a que porciones excesivamente pequeñas producirían un impacto negativo sobre el comportamiento ingestivo, disminuyendo el tiempo de pastoreo con tendencia a un menor consumo, mayor tasa de sustitución que provocaría una menor producción de leche.

4.3 DIGESTION DE LOS COMPUESTOS NITROGENADOS

La mayor parte de la proteína ingerida por los rumiantes en la dieta es degradada y utilizada por los m.o. ruminales para su crecimiento y la SPM (Bach y col., 2005). Las pasturas templadas, cuando se consumen frescas, contienen una alta proporción de proteína verdadera (aproximadamente un 80% de la PB) y la PB restante son mayoritariamente péptidos y aa (aminoácidos). Esta proteína se caracteriza por ser soluble y de rápida degradación generando altas concentraciones de N-NH₃ en el rumen (Cajarville y Repetto, 2010). El contenido proteico del grano de maíz tiene una baja proporción de proteínas solubles (albúminas y globulinas, 6%) y alta proporción de proteínas de reserva (40% de glutelina y 54% de prolamina) siendo la prolamina de muy baja solubilidad y responsable de la baja degradabilidad de la proteína del grano de maíz (FEDNA., 2015).

La estructura de la proteína es un factor clave que determina la susceptibilidad de la misma a la acción enzimática microbiana y su consecuente degradabilidad. A su vez la degradación proteica en el rumen se ve afectada por el pH del medio, el grado de dilución de las proteínas en el medio ruminal, el tipo de sustrato fermentado y las especies de flora microbiana presentes (Bach y col., 2005). La degradación de la proteína a nivel de rumen se produce mediante la acción de proteasas de la pared celular de los m.o, liberando péptidos pequeños y aa. Estos son absorbidos e hidrolizados en el soma bacteriano liberando aa, los cuales pueden ser utilizados para la SPM, o bien como fuente de energía (Bach y col., 2005).

Los m.o. desdoblan el grupo NH₂ (amino) del aa y lo liberan al medio, donde es reducido por adiciones de H⁺ transformándolo en N-amoniaco (N-NH₃) y luego en amonio (NH₄), sirviendo este último como indicador de la actividad proteolítica en el rumen (Relling y Mattioli., 2003).

Una proporción de la proteína ingerida, no es degradable en el rumen, llegando inalterada al abomaso (Bach y col., 2005). La digestión tanto de las proteínas sintetizadas a nivel ruminal como de las de pasaje comienza en el abomaso, con la actividad de pepsinas, ayudadas por lisozimas que hidrolizan la pared bacteriana. Cuando llegan al intestino delgado son digeridas por enzimas pancreáticas (tripsinógeno, quimotripsinógeno, procarboxipeptidasas, proelastasas) obteniéndose aa libres y oligopéptidos como producto final. Los oligopéptidos ingresan a los enterocitos donde son hidrolizadas por di y tripeptidasas específicas hasta aa. (Kozloski, 2011)

4.4 METABOLISMO DEL NITRÓGENO

Teóricamente la adición de CH de rápida fermentación como almidón y azúcares solubles, podrían aumentar la eficiencia en el uso del N a nivel ruminal, debido a una oferta simultánea de energía para la flora ruminal (Cajarville y Repetto, 2010). Las bacterias que en mayor medida pueden aprovechar este N-NH₃ ruminal son las celulolíticas ya que puede ser utilizado como única fuente de N, mientras que la flora amilolítica y sacarolítica también

requiere aa (Dijkstra y col., 2005). Delagarde y col. (1999) evaluó la actividad celulolítica ruminal, en alimentos, con distintos niveles de PB, y reportó que la misma no presentaba grandes diferencias, incluso en alimentos con un nivel muy bajo de PB (95 g/kg MS) equiparándose en todos los casos luego de 24 horas de permanencia en el rumen.

Los esqueletos carbonados, provenientes tanto de los CH de la pastura y los cereales, como de los aa desaminados, además de utilizarse para generar energía, pueden utilizarse directamente con el N-NH₃ disponible para el ensamblaje de aa microbianos (Bryant, 1973, citado por Bach y col., 2005). La SPM a nivel ruminal requiere además de sustratos ricos en energía, péptidos, aa, N-NH₃, y otros nutrientes esenciales, como el azufre, trazas de minerales, ácidos grasos de cadena ramificada y ciertos factores de crecimiento (Nolan y Dobos, 2005).

El aumento del crecimiento microbiano al suministrar proteína verdadera, puede deberse también a la incorporación de aa como lisina, fenilalanina, leucina e isoleucina (mayor dificultad de síntesis) de forma directa para la síntesis de PM (Bach y col., 2005; Cañas Cruchaga y col., 1992; Repetto y Cajarville, 2010).

Las bacterias ruminales pueden clasificarse según el tipo de sustrato que degradan en celulolíticas y amilolíticas (Relling y Mattioli, 2003). Russell y col. (1992), propusieron un modelo simplificado donde describen los requerimientos de energía y proteína de estas sub poblaciones bacterianas. Reportando que los m.o. celulolíticos tienen menores requerimientos de mantenimiento, crecen más lento y utilizan el N-NH₃ como su principal fuente de N. Mientras que los m.o amilolíticos tienen mayores requerimientos de mantenimiento, su crecimiento es más rápido y utilizan N-NH₃, péptidos y aa como fuentes de N.

Cuando la energía disponible a nivel de rumen es limitante, los m.o. la utilizan exclusivamente para producir ATP con el fin de cubrir sus requerimientos metabólicos básicos. Por el contrario cuando la cantidad de energía es suficiente, la misma además de cubrir requerimientos básicos es utilizada para la SPM.

A partir de N-NH₃ y esqueletos carbonados simples, producidos mediante la degradación del alimento, los m.o ruminales son capaces de sintetizar los 10 aa esenciales para los tejidos de los mamíferos (Rodríguez y col, 2007). Además de la cantidad y calidad de los nutrientes suministrados, la sincronía con que los mismos se vuelven disponibles es también importante. Cuando la velocidad de degradación de la proteína excede la velocidad de fermentación de los CH, grandes cantidades de N se pierden o por el contrario cuando la velocidad de fermentación de los CH excede la velocidad de degradación de las proteínas, la SPM disminuye (Bach y col, 2005).

Maximizar el crecimiento microbiano y la captura de N degradable son bases fundamentales de una adecuada nutrición ruminal, mejorando el aporte de aa al duodeno y disminuyendo las pérdidas de N (Bach y col., 2005).

4.5 EXCRECIÓN DE NITROGENO

Los mamíferos excretan el N principalmente en forma de urea. El N-NH₃ excedente que no es utilizado por la flora ruminal es absorbido y metabolizado en el hígado para transformarse en urea (Relling y Mattioli, 2003). La urea formada puede tener diferentes destinos: excreción renal, recirculación al rumen por saliva o a través de la pared ruminal, dependiendo del nivel de urea en sangre y excreción en leche (Cirio y Tebot, 2000).

Maltby y col. (2005), evaluaron el metabolismo esplénico de compuestos nitrogenados y la excreción urinaria de N en novillos alimentados con alfalfa en condiciones de absorción aumentada de amoníaco y suplementados con L-arginina a través del drenaje portal, reportando aumentos en la excreción urinaria de N equivalentes a los niveles de N ingeridos como urea, o infundidos como arginina, mientras que los niveles de excreción en saliva y heces permanecieron constantes para ambos tratamientos.

En este sentido un trabajo experimental realizado por Marini y Van Amburgh (2003) donde evaluaron el efecto de distintos niveles de N consumido, sobre la excreción de N en heces y orina, en vaquillonas Holando, observó que la excreción de N por vía urinaria aumento a medida que lo hacia el nivel de N en la dieta mientras que la excreción en heces se mantuvo constante. Tal es así que cuando el nivel de N es bajo, la excreción de N en heces supera a la excreción urinaria.

Cuando los animales consumen una pastura templada cuyo contenido proteico es de rápida degradación ruminal, excediendo la captura por parte de los m.o ruminales, se absorbe dicho excedente aumentando la excreción urinaria de N (Santana, 2012).

Zegarra y col. (2007), en un trabajo realizado en vacas en lactancia observaron la siguiente proporción de excreción de N en relación a lo consumido: orina 34%, heces 19% y leche 22% para una dieta con una concentración de 18% de PB. Lo que revela una excreción del 53% de N consumido, directamente hacia el ambiente, siendo este potencialmente contaminante y observándose además a la orina como principal vía de excreción. La contaminación de fuentes de agua puede tener repercusiones en la salud pública y animal, por la formación de nitratos en pozos de agua y vertientes, pudiendo presentarse casos de metahemoglobinemia en animales o humanos que la consumen. Además de los efectos ambientales negativos, otro problema concerniente con el exceso de N en el ganado es el relacionado con aspectos reproductivos; diversos estudios han reportado bajas tasas de concepción en vacas con altos niveles de urea en la sangre (Elizondo, 2006).

La utilización de estrategias alimentarias que aumenten la retención de N, podría ayudar a disminuir la polución ambiental de los sistemas intensivos y semi-intensivos además de mejorar la eficiencia productiva (Zegarra y col., 2007).

5.HIPÓTESIS

El suministro de grano de maíz a razón de 1% del PV, suministrado en varias comidas a lo largo del día, permitirá incrementar el aprovechamiento digestivo y metabólico del N de la dieta de bovinos alimentados *ad libitum* con un forraje de calidad media, con respecto a los que reciban el mismo nivel de suplementación en un solo momento.

6.OBJETIVOS

4.6OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la suplementación y de la frecuencia diaria de suministro de grano de maíz molido, sobre el consumo y el aprovechamiento digestivo y metabólico del N de la dieta, en vaquillonas consumiendo un forraje maduro de calidad media ofrecido *ad libitum*.

4.7OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de la suplementación y la frecuencia diaria de suministro del suplemento sobre el consumo y la digestibilidad aparente *in vivo* del N de la dieta.
- Evaluar el efecto de la suplementación y la frecuencia diaria de suministro del suplemento sobre el aprovechamiento ruminal del N de la dieta.
- Evaluar el efecto de la suplementación y la frecuencia diaria de suministro del suplemento sobre la excreción y el balance del N.

7.MATERIALES Y MÉTODOS

7.1.LUGAR

El experimento se realizó en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, San José, Uruguay. El procesamiento de las muestras y los análisis de composición química se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria en Montevideo y en el laboratorio COLAVECO ubicado en Nueva Helvecia.

7.2.ANIMALES E INSTALACIONES

El período experimental tuvo una duración total de 17 días, donde los primeros 10, fueron destinados a la adaptación de los animales a las instalaciones, el manejo y a la dieta; seguidos de 7 días de mediciones y muestreos. Todos los procedimientos con los animales fueron realizados de acuerdo al protocolo experimental aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria (CEUAFVET - PI 11).

Fueron utilizadas 22 vaquillonas Hereford de aproximadamente 18 meses de edad y 255 ± 22 kg de PV y 4 cruza de 12 meses de edad y 159 ± 10 kg de PV (n total= 26 vaquillonas). Las mismas fueron bloqueadas por PV y raza (Hereford y cruza) y posteriormente se asignaron al azar a uno de los tratamientos. A los tratamientos 2 y 8 se les asignó 7 animales, mientras que a los demás tratamientos se les asignó 6. Todas las vaquillonas permanecieron en jaulas metabólicas individuales durante todo el período experimental.

7.3.TRATAMIENTOS

Los alimentos que se utilizaron para este experimento fueron, un forraje compuesto principalmente por raigrás anual (*Lolium multiflorum*) en estado vegetativo avanzado y como suplemento grano de maíz (*Zea mays*) seco y molido (Cuadro I). El forraje fue ofrecido *ad libitum* como único alimento (T0) o forraje *ad libitum* suplementada con grano de maíz molido suministrado a razón de 1% del PV en base fresca, en una (T1), dos (T2) u ocho (T8) comidas al día. Conformando así los siguientes tratamientos:

- T0: Forraje *ad libitum* sin suplementación.
- T1: Forraje *ad libitum* + suplemento (maíz, 1% PV) una vez al día (9:00 h).
- T2: Forraje *ad libitum* + suplemento (maíz, 1% PV) 2 veces al día (9:00 y 21:00 h).
- T8: Forraje *ad libitum* + suplemento (maíz, 1% PV) 8 veces al día (9:00; 10:45; 12:30; 14:15; 16:00; 17:45; 19:30 y 21:15 h).

El forraje fue cosechado diariamente a las 12:00 horas desechándose el sobrante del día anterior. Todos los animales recibieron agua fresca *ad libitum*.

Cuadro I Composición química de los alimentos suministrados (Media± Desvío Estándar).

	Forraje ^b	Maíz ^c
MS ^a (%)	24±1,4	82±0,2
Composición de la MS		
MO	91±0,1	99±0,5
PB	9±0,8	7±0,2
FND	53±6,2	10±0,5
FAD	35±7,9	3±0,4
EE	2,2±0,23	4,0±0,31

^a MS: % de materia seca; MO: materia orgánica como % de la MS; PB: proteína bruta (N x 6,25) como % de la MS; FND: Fibra Neutra Detergente expresada como % de la MS; FAD: Fibra Ácida Detergente expresada como % de la MS; EE: extracto al éter como % de la MS.

^b Composición botánica: 98,5% de *Lolium multiflorum* y 1,5% de *Trifolium repens* (n=7).

^c Grano de maíz seco y molido (n=2).

7.4.CÁLCULOS, DETERMINACIONES Y MUESTREOS

Luego de 10 días de adaptación se comenzó con las determinaciones y muestreos durante 7 días. En este período se midió el consumo de alimentos, para luego poder determinar el consumo de N, y se realizó la colecta total de heces y orina para determinar posteriormente la digestibilidad aparente *in vivo* del N y el balance de N. Además se tomaron diariamente muestras del forraje y dos muestras de maíz (una al inicio y otra al final del experimento). Dichas muestras se congelaron a -18° C para posteriormente determinar MS parcial en estufa a 60°C durante 48 hs y sobre esta se realizaron los análisis de composición química. Las muestras también fueron secadas en estufa a 105 °C hasta peso constante para determinar la MS total. Se determinó MO (método 942.05) y PB (N × 6,25; método 942.01) de acuerdo con A.O.A.C. (1990). Las determinaciones de FND y FAD se realizaron según Mertens (2002) y se utilizó en el caso de la FND amilasa termo resistente y sulfito de sodio. La FAD fue determinada en forma no secuencial y se expresó como % de la MS, descontando el contenido de cenizas. Para la determinación del N en la orina, se utilizó el método Dumas (método 968.06) según A.O.A.C. (2003) utilizando un equipo de LECO Corporation, MI, USA en el laboratorio COLAVECO. El extracto al éter (EE) fue determinado en un sistema de reflujo con éter etílico durante 3 horas (Goldfish fat extractor, Labconco Corporation, Kansas City, Missouri, USA) en el laboratorio COLAVECO.

7.4.1.Consumo

El consumo de alimento se determinó durante 7 días como la diferencia diaria entre los Kg de alimento ofrecido y los Kg de alimento rechazado. Al inicio de cada jornada (hora 09:00) se determinaron los rechazos mediante el pesaje de los remanentes del día anterior (que se desecharon), sustituyéndose por forraje fresco. Mientras que para el maíz, las vaquillonas suplementadas consumieron siempre el 1 % de su PV en base fresca.

Con estos datos y los resultantes del análisis de composición química del alimento se obtuvo el consumo de PB.

7.4.2. Digestibilidad aparente *in vivo*

Para evaluar la digestibilidad se realizó la colecta diaria del total de heces emitidas por los animales mediante el uso de bandejas de plástico. Se registró el peso total de la materia fecal emitida por día, se tomó una muestra representativa de 500 g la cual fue conservada a -18°C para el posterior análisis de composición.

En total, se obtuvieron 7 muestras por animal (1 por día), las que fueron secadas por triplicado en estufa durante 48 horas a 60°C.

Posteriormente se procedió a la molienda de las muestras secas (molino con criba de 1 mm). Con las muestras ya molidas, se elaboró para cada animal un pool de heces (50 g) respetando las proporciones de excreciones diarias. De cada pool se determinó, el contenido de PB.

Para determinar la digestibilidad aparente *in vivo* de la PB utilizamos la siguiente fórmula:

$$\text{Digestibilidad PB (\%)} = \frac{\text{g PB consumida} - \text{g PB excretada en heces}}{\text{g PB consumida}} \times 100$$

7.4.3. Balance de N

Para calcular el balance de N, además de la colecta de heces, se colectó durante 7 días el total de la orina emitida por animal por día, mediante sondaje uretral (Sondas Foley). La orina se almacenó en recipientes de plástico conteniendo ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 10% como conservante.

El volumen diario de orina fue registrado y se tomaron submuestras proporcionales (0,1% del total excretado), completando con agua destilada un volumen final de 50 ml. Estas muestras fueron congeladas a -18°C para la posterior elaboración de un pool representativo de cada animal y determinar la concentración de N.

Para determinar el balance de N, utilizamos la siguiente fórmula:

$$\text{Balance de N (g)} = \text{g N ingerido} - (\text{g N excretado en heces} + \text{g N excretado en orina})$$

Con los datos obtenidos para el balance de N también se calculó la proporción retenida de N, de la siguiente manera:

$$\text{Retención N} = \frac{\text{Balance de N (g)}}{\text{g N ingerido}}$$

7.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El consumo, la digestibilidad y el Balance de PB, fueron analizados mediante Proc Mixed de SAS (2002) según el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + e_{ij}$$

Siendo Y_{ij} la variable en estudio, μ la media, T_i el efecto del tratamiento, B_j el efecto aleatorio del bloque y e_{ij} la sumatoria de errores.

Las medias se analizaron con el test de Tukey, declarándose significancias con $P \leq 0,05$ y tendencias cuando $0,05 < P < 0,1$.

8.RESULTADOS

En el Cuadro II se presentan el consumo, la excreción, la digestibilidad y la retención de la PB de los animales en los distintos tratamientos.

Cuadro II Consumo, excreción, digestibilidad y retención de PB en vaquillonas que consumen forraje compuesto principalmente por raigrás no suplementadas (T0) o suplementadas con grano de maíz molido a razón del 1% del PV en una (T1), dos (T2) u ocho comidas diarias (T8).

	Tratamientos ^a				ESM ^b	p ^c
	T0	T1	T2	T8		
MS Total (kg/d)	7.0 ^b	8.3 ^a	8.5 ^a	8.4 ^a	0.88	0.03
Consumo de PB, g/kg PV						
Total	2,54 ^b	2,84 ^{ab}	3,01 ^a	3,08 ^a	0,44	0,034
Excreción de PB, g/kg PV						
Total	1,01 ^b	1,27 ^{ab}	1,53 ^a	1,47 ^a	0,34	0,003
Heces	0,64 ^b	0,96 ^a	1,19 ^a	1,15 ^a	0,34	0,002
Orina	0,37	0,32	0,34	0,32	0,08	0,351
Balance ^d , g/kg PV	1,53	1,56	1,48	1,61	0,47	0,897
Retención N ^e	0,59	0,55	0,48	0,52	0,116	0,129
Digestibilidad de la PB	0,74 ^a	0,66 ^{ab}	0,60 ^b	0,62 ^b	0,115	0,016

^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 en una, dos y ocho veces al día respectivamente. ^b Error estándar de la media. ^c Nivel de significancia para el efecto de los tratamientos; diferentes letras en superíndice en la misma línea indican diferencias significativas ($p < 0,05$). ^d Balance determinado como: (g consumidos- g excretados en heces y orina)/kg de PV. ^e Proporción de N retenido calculada como (Balance / N Ingerido).

Las vaquillonas de T2 y T8, en comparación con las de T0 tuvieron mayor consumo total de PB, sin embargo los animales del T1 no mostraron diferencias significativas con los demás tratamientos. Cuando se compararon los animales de los T2 y T8 con los pertenecientes al T0, se observó en los primeros un aumento promedio del 20% en el consumo de PB total ($p < 0,05$).

En este caso la frecuencia de suplementación en 2 y 8 veces diarias, provocó un efecto de adición en el consumo de PB ($p > 0,05$; Figura 1), siendo el consumo de PB de la pastura similar en todos los tratamientos.

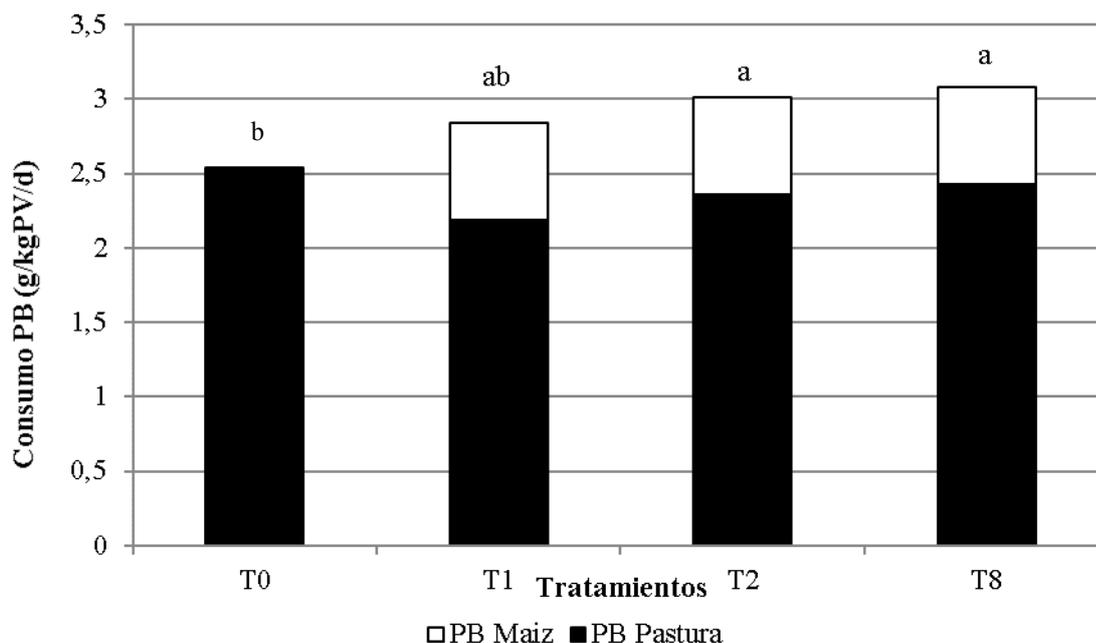


Figura 1 Consumo de PB (g/kg PV/d) proveniente de la pastura y el maíz para los diferentes tratamientos, T0: pastura *ad libitum*; T1, T2 y T8: pastura *ad libitum* y suplementación con grano de maíz a razón de 1% del PV en una (T1), dos (T2) u ocho (T8) veces al día respectivamente. Letras diferentes sobre las barras (a, b) indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p \leq 0,05$). Letras iguales dentro de las barras indican que no hubo diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$).

La principal vía de excreción de la PB fueron las heces y fue significativamente mayor en los animales suplementados ($p \leq 0,05$; Figura 3). La excreción de PB por vía urinaria fue menor a la excreción de PB en heces en todos los tratamientos, y no se observaron diferencias significativas en la concentración de PB en orina entre tratamientos (0,34 g/kg PV; $p > 0,05$).

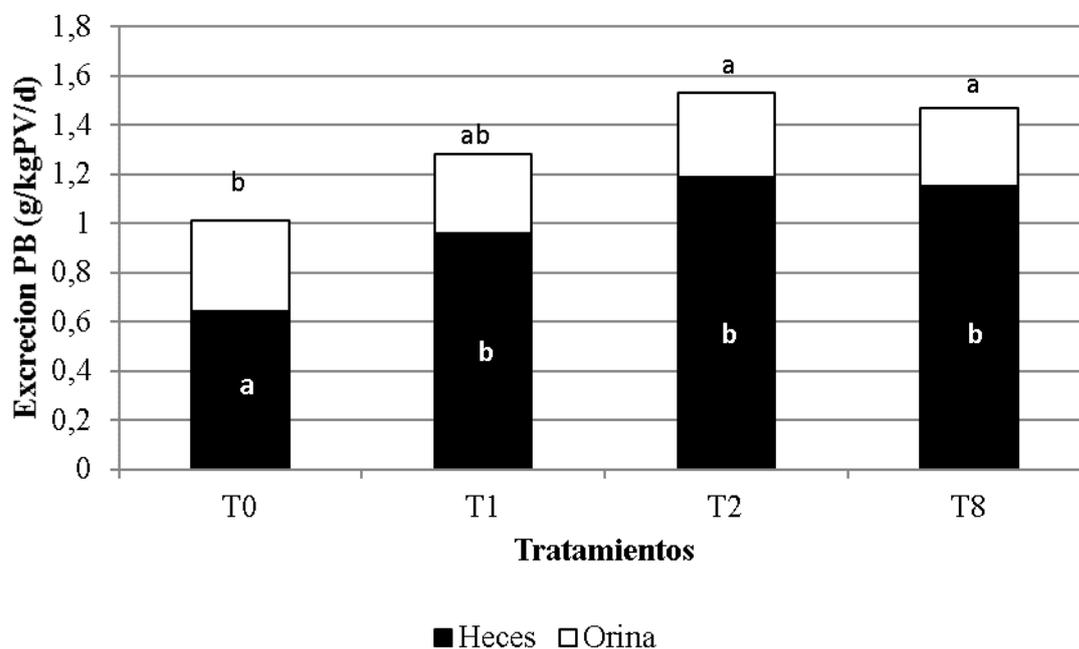


Figura 2 Excreción de PB expresado en g/kgPV/d en Orina y Heces para los diferentes tratamientos, T0: pastura *ad libitum*; T1, T2 y T8: pastura *ad libitum* y suplementación con grano de maíz a razón del 1% del PV en una, dos y ocho veces al día respectivamente. Letras diferentes (a, b) dentro de las barras negras indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) en la excreción en heces, mientras que letras diferentes (a, b) sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) en la excreción total.

El balance de PB, así como los g de PB retenida en función de la consumida fueron similares entre tratamientos.

La digestibilidad de la PB fue menor para T2 y T8 en comparación con el T0, mientras que el T1 no presentó diferencias significativas con los demás tratamientos (Cuadro II).

9.DISCUSIÓN

Resulta llamativo el mayor consumo de PB total de las vaquillonas suplementadas, dado que en algunos trabajos en los que se suplemento con concentrados energéticos, se observó un menor consumo total de PB (Elizalde y col., 1999; Aguerre y col., 2013). Sin embargo se debe de tener en cuenta que en dichos trabajos se utilizaron pasturas templadas de alta calidad con niveles de PB superiores al 15% por lo que al sustituir dicha pastura por grano de cereal (PB usualmente inferiores al 10%) determina una disminución en el consumo total de PB. En este experimento esto no sucedió así, ya que los animales no sustituyeron un alimento por otro, sino que tuvieron una respuesta aditiva en el consumo. Esta respuesta aditiva pudo deberse al bajo contenido de PB de la pastura utilizada en este experimento en comparación a la empleada en otros trabajos (Elizalde y col., 1999; Aguerre y col., 2013). En este sentido, Moore y col. (1999) observaron que pasturas con una relación de nutrientes digestibles totales (NDT)/PB inferior a 7, el consumo voluntario de forraje se ve más afectado (produciéndose sustitución) que cuando dicha relación es mayor a 7, donde el consumo voluntario de forraje se ve poco afectado mostrando un comportamiento de adición.

La pastura empleada en este experimento, presentó una relación NDT/PB de 7,1 (Anexo 1) y concuerda con lo expresado por Moore y col. (1999) ya que tratamientos suplementados mostraron cierta adición que se manifiesta con un mayor consumo de PB. Esta relación de NDT/PB es frecuentemente observada en este tipo de pasturas durante la primavera, cuando las mismas se encuentran en estado vegetativo avanzado, donde disminuye el contenido de PB (FEDNA., 2015).

En este experimento el metabolismo del N se caracterizó por una baja excreción de N (1,4 g N/ kg de orina, datos no presentados) lo que supone un alto reciclaje y coincide además con un bajo N-NH₃ en rumen, observado en este mismo experimento (Antúnez., 2015). La principal vía de excreción de N fue a través de las heces, este resultado coincide con los resultados obtenidos por Marini y Van Amburgh (2003), quienes observaron que para dietas con valores de PB inferiores a 12%, la principal vía de excreción fueron las heces, mientras que cuando dicho nivel supera el 16% de la MS la principal vía de excreción del N pasa a ser la orina. Esto se debe a que cuando la dieta tiene un bajo contenido de PB, aumenta la reabsorción renal de urea, disminuyendo su concentración en la orina (Marini y Van Amburgh., 2003). Además la mayor excreción de N en heces coincide con la menor digestibilidad de la PB para los tratamientos suplementados. Esto en parte puede estar dado porque la proteína presente en el grano de maíz fue una parte importante del total de PB ingerida para los tratamientos suplementados, y la misma tiene menor digestibilidad que la proteína de la pastura (FEDNA., 2015; McDonald y col., 2006).

A pesar de los resultados obtenidos por (Delagarde y col., 1999) los cuales observaron que dietas basadas en pasturas, con bajo contenido de N pueden afectar la digestibilidad de la fibra, esto no se vio en nuestro experimento. En nuestro trabajo la digestibilidad de la MO y la

FND no se vio afectada por la suplementación (Antúnez., 2015). Podemos inferir que el N reciclado a través de las paredes del rumen y en menor medida en la saliva colaboraron a cubrir los requerimientos de la flora fibrolítica.

Si bien se observó un aumento en el consumo de PB por parte de los animales suplementados, la retención de la misma no presentó variaciones entre tratamientos. Esto se debió a que simultáneamente al aumento de consumo de PB, aumentó la excreción en heces mientras que la orina mostró concentraciones constantes de PB, lo cual indica que el mayor consumo no fue absorbido y se excretó en heces. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Aguerre (2010), donde los tratamientos suplementados mostraron una mayor retención de N. En términos porcentuales la retención de N en nuestro trabajo fue superior a otros experimentos (Marini y Van Amburgh 2003; Aguerre 2010), e inferior a los resultados obtenidos por Santana (2012) utilizando dietas totalmente mezcladas y pastura. Contrariamente a lo que planteamos en nuestra hipótesis no tenemos evidencias de que la suplementación y la frecuencia de suministro de concentrados produzcan un aumento en la EUN. Sin embargo, en este trabajo no se midió la SPM ni la EUN en el rumen lo que hubiera permitido profundizar más en el estudio del aprovechamiento ruminal del N.

10.CONCLUSIONES

La suplementación con grano de maíz a animales consumiendo una pastura con baja concentración de PB, aumentó el consumo total de PB cuando se administró en más de una fracción diaria.

Con los valores de PB presentes en los alimentos utilizados en este experimento, la principal vía de excreción del N, fueron las heces, mientras que la vía urinaria se mantuvo constante en todos los tratamientos.

La frecuencia en que fue administrado el grano de maíz, no causó efecto en la retención de PB por parte de los animales. Sin embargo sí hubo efecto en la digestibilidad, siendo ésta menor cuando se administró el grano de maíz en 2 u 8 fracciones diarias.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. A.O.A.C. (1990). Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of analysis. 15a ed. AOAC, Arlington VA. 684 p.
2. A.O.A.C. (2003). Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of analysis. 17a ed. AOAC, volumen 1.
3. Aguerre M. (2010). Suplementación con grano de sorgo a vaquillonas consumiendo una pastura templada: efecto sobre el consumo, el aprovechamiento digestivo y el metabolismo de la glucosa. Tesis de Maestría en nutrición de Rumiantes, Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica. Montevideo, Uruguay. 45 P.
4. 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.
5. Antúnez G. (2015). Frecuencias diarias de suplementación en bovinos: efectos sobre el aprovechamiento digestivo y metabólico de la dieta, la actividad fermentativa y el ambiente ruminal. Tesis de Maestría, Programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria, UdelaR. Montevideo, Uruguay (En prensa).
6. Bach A., Calsamiglia S., Stern M.D. (2005). Nitrogen metabolism in the Rumen. *Journal of Dairy Science*. 88:9–21.
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. Cajarville C., Repetto J.L. (2005). Uso de Concentrados para mejorar el aprovechamiento digestivo de las pasturas. XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. pp 121–128.
9. Cajarville C., Repetto J.L. (2010). ¿Cómo integramos las pasturas templadas a los nuevos sistemas intensivos de producción de leche y carne? *Agrociencia*. 14:51–53.
10. Calsamiglia S., Ferret A. (2002). Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: acidosis y meteorismo. *Avances en nutrición y alimentación animal*. XVIII Curso de Especialización. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA). Barcelona, España. pp 95–115.
11. Calsamiglia S., Cardozo P.W., 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.

12. Cañas Cruchaga R., Aguilar González C., García Gómez F., Quiroz R.A. (1992). Simulación de Sistemas Pecuarios, Red de Investigación en Sistemas de Producción Animal en Latinoamérica (RISPAL). Programa II Generación y Transferencia de Tecnología. Departamento de zootecnia. Facultad de Agronomía. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 272 p. Disponible en: orton.catie.ac.cr/repdoc/A8537E/A8537E.PDF Fecha de consulta: 31/10/2014.
13. Chaudhry A. (2008). Forage based animal production systems and sustainability, an invited keynote. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 37:78-84.
14. Cirio A., Tebot I. (2000). Fisiología metabólica de los rumiantes. Departamento Fisiología. Facultad de Veterinaria, UdelaR. Montevideo, Uruguay. 146 p.
15. Delagarde R., Peyraud J.L., Delaby L. (1999). Influence of carbohydrate or protein supplementation on intake, behavior and digestion in dairy cows strip-grazing low-nitrogen fertilized perennial ryegrass. *Annales de Zootechnie*. 48:81-96.
16. Dhiman T.R., Zaman M.S., MacQueen I.S., Boman R.L. (2002). Influence of Corn Processing and Frequency of Feeding on Cow Performance. *Journal of Dairy Science*. 85: 217-226.
17. Dijkstra J., Forbes J.M., France J. (2005). Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. 2a ed. Cambridge. CAB International. 734 p.
18. Dixon R.M., Stockdale C.R. (1999). Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilization. *Australian Journal of Agricultural Research*. 50:757-773.
19. Elizalde J. C., Merchen N. R. y Faulkner D. B. (1999) Supplemental cracked corn for steers fed fresh alfalfa: II. Protein and amino acid Digestion. *Journal of Animal Science*. 77: 467-475
20. Elizondo J. (2006). El nitrógeno en los sistemas ganaderos de leche. *Revista Agronomía Mesoamericana*. 17: 69-77.
21. FEDNA (2015). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Tabla de composición de alimentos y valor nutritivo, maíz USA. Disponible en: http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/ma%C3%ADz-usa Fecha de consulta: 21/01/2015
22. FEDNA (2015). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Tabla de composición de alimentos y valor nutritivo, ray grass verde. Disponible en: <http://www.fundacionfedna.org/forrajes/ray-grass-verde> Fecha de consulta: 21/01/2015

23. Gibson J.P. (1981). The effects of feedings frequency on the growth and efficiency of food utilization of ruminants: an analysis of published results. *Animal Production*. 32:275–283.
24. Gibson J.P. (1984). The effects of frequency of feeding on milk production of dairy cattle: an analysis of published results. *Animal Production*. 38:181–189.
25. INIA (2004). Guía para la alimentación de rumiantes. Serie técnica 142, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Montevideo, Uruguay.
26. Johnson R.R. (1976). Influence of carbohydrate solubility on non-protein nitrogen utilization in the ruminant. *Journal of Animal Science*. 43:184–191.
27. Kaufmann W. (1976). Influence of the composition of the ration and the feeding frequency on pH-regulation in the rumen and on feed in-take in ruminants. *Livestock Production Science*. 3:103–114.
28. Kozloski G.V. (2011). *Bioquímica dos Rumiantes*, 3ª ed. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Ed. UFSM, 214 p
29. La Manna, A.; Fernández, E.; Mieres, J.; Banchemo, G.; Vaz Martins, D. (2005) Frecuencia de alimentación: Una estrategia de manejo. Jornada Producción Animal Intensiva. Serie Actividades de Difusión N° 406. INIA La Estanzuela. pp 47-57.
30. McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A. (2006). *Nutrición animal*. 6a ed. Zaragoza, España, Ed. Acribia, 581 p.
31. Maltby S.A., Reynolds C.K., Lomax M.A., Beaver D.E. (2005). Splanchnic metabolism of nitrogenous compounds and urinary nitrogen excretion in steers fed alfalfa under conditions of increased absorption of ammonia and l-arginine supply across the portal-drained viscera. *Journal of Animal Science*. 83:1075–1087.
32. Marini J.C., Van Amburgh M.E. (2003). Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers. *Journal of Animal Science*. 81:545-552.
33. Mertens, D.R. (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. *J. AOAC Int*. 85, 1217–1240.
34. Moore J.E., Brant M.H., Kunkle W.E., Hopkins D.I. (1999). Effects of supplementation on voluntary forage intake, diet digestibility, and animal performance. *Journal of Animal Science*. 77:122–135.
35. Morais J.A.S., Queiroz M.F.S., Keli A., Vega A., Fiorentini G., Canesin R.C., Reis R.A., Berchielli T.T. (2014). Effect of supplementation frequency on intake, behavior and performance in beef steers grazing Marandu grass. *Animal Feed Science and Technology*. 189:63-71.

36. Nolan J.V., Dobos R.C. (2005). Nitrogen Transactions in Ruminants. En: Dijkstra J., Forbes J.M., France J. Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. Cambridge. CAB International. pp 177–198.
37. Owens F.N., Secrist D.S., Hill W.J., Gill D.R. (1998). Acidosis in cattle: a review. *Journal of Animal Science*. 76:275–286.
38. Poppi D.P., McLennan S.R. (1995). Protein and energy utilization by ruminants at pasture. *Journal of Animal Science*. 73:278–290.
39. Pulido R.G., Muñoz R., Lemarie P., Wittwer F., Orellana P., Waghorn G.C. (2009). Impact of increasing grain feeding frequency on production of dairy cows grazing pasture. *Livestock Science*. 125:109-114.
40. Ramírez M.M., Hernández O. (2011). Respuesta productiva de vacas lecheras en pastoreo al maíz fresco picado como suplemento. *Archivos de Zootecnia*. 60:647-657.
41. Rearte D. (2007). La producción de carne en Argentina. INTA. 25 p. Disponible en: http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/origenes_evolucion_y_estadisticas_de_la_ganaderia/48-ProdCarneArg_esp.pdf. Fecha de consulta: 31/10/2014.
42. Relling A., Mattioli G. (2003). Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Argentina. 72 p.
43. Rodríguez R., Sosa A., Rodríguez Y. (2007). La síntesis de proteína microbiana en el rumen y su importancia para los rumiantes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 41:303–311.
44. Russell J.B., O'connor J.D., Fox D.G., Van Soest P.J., Sniffen C.J. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. *Journal of Animal Science*. 70:3551-3561.
45. Santana A. (2012). Inclusión de pasturas templadas en una dieta completa totalmente mezclada en vaquillonas. Tesis de Maestría en Nutrición de Rumiantes. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 36 p.
46. Soto-Navarro S.A., Krehbiel C.R., Duff G.C., Galyean M.L., Brown M.S., Steiner R.L. (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*. 78:2215–2222.
47. Stern M.S., Calsamiglia S., Endres M.I. (1994). Dinámica del metabolismo de los hidratos de carbono y del nitrógeno en el rumen. Avances en nutrición y alimentación animal. X curso de especialización Fundación española para el desarrollo de la nutrición animal (FEDNA). Madrid. España. pp 177-194.

48. 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.
49. Yang C.M., 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.
50. Zegarra J., Díaz G., Vélez V., Torres J. (2007). Efecto del uso de concentrados con carbohidratos de diferente degradabilidad ruminal sobre el balance de nitrógeno en vacas lecheras bajo pastoreo de alfalfa. Subproyecto de investigación y extensión Agrícola. XX Reunión de ALPA, Cusco, Perú. 7 p. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/45-Zegarra-Concentrados.pdf Fecha consulta: 15/11/2014.