

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**DISTRIBUCIÓN DEL TIEMPO DE PASTOREO EN DIETAS MIXTAS DE VACAS  
LECHERAS: PRODUCCIÓN, COMPOSICIÓN DE LECHE Y EFICIENCIA DE  
UTILIZACIÓN DE LOS NUTRIENTES**

**Por**

Micaela GARCÍA CUCHMA

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  
2019**

## **PÁGINA DE APROBACIÓN**

**Presidente de Mesa:**

\_\_\_\_\_

**Ing. Agr. Alejandro Mendoza**

**Segundo Miembro (Tutor):**

\_\_\_\_\_

**Dr. Álvaro Santana**

**Tercer Miembro:**

**Cuarto Miembro (Co-tutor):**

\_\_\_\_\_

**Dra. Cecilia Cajarville**

**Fecha:**

**Autor:**

\_\_\_\_\_

**Micaela Raquel García Cuchma**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, por su apoyo incondicional durante toda la carrera.

Al Dr. Álvaro Santana y Dra. Cecilia Cajarville, por su tutoría y co-tutoría, y el respaldo brindado.

A la Facultad de Veterinaria, por la formación profesional y personal.

A mis amigos y compañeros de Facultad, por el apoyo y los momentos compartidos.

A mis compañeros de tesis durante el período de experimentación, por el trabajo en conjunto y los momentos vividos.

A los amigos y compañeros con los que compartimos el ensayo experimental, Juan Dayuto y Ricardo Biasiolo.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Página</b>
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	5
1. RESUMEN.....	6
2. SUMMARY.....	7
3. INTRODUCCIÓN.....	8
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
4.1 Sistemas de alimentación y consumo de nutrientes.....	9
4.2 Suplementación y sistemas de alimentación de ración parcialmente mezclada.....	10
4.3 Tiempo total y distribución diaria del tiempo de pastoreo.....	11
4.4 Distribución del tiempo de pastoreo.....	13
4.5 Manipulación del perfil lipídico de la leche.....	14
4.6 Eficiencia en el uso de los nutrientes.....	16
5. HIPÓTESIS.....	18
6. OBJETIVOS.....	18
6.1 Objetivo general.....	18
6.2 Objetivos específicos.....	18
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
7.1 Animales, Alimentos y Manejo.....	19
7.2 Mediciones y Metodologías.....	21
7.3 Análisis estadístico.....	22
8. RESULTADOS.....	23
9. DISCUSIÓN.....	28
10. CONCLUSIONES.....	33
11. BIBLIOGRAFÍA.....	34

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Patrón diario de pastoreo de vacas lecheras con dos ordeñes diarios y 24h de acceso a la pastura.....	12
<b>Figura 2.</b> Consumo de MS en función del tiempo de acceso a la pastura.....	13
<b>Tabla 1.</b> Ingredientes de la ración totalmente mezclada (RTM).....	20
<b>Tabla 2.</b> Composición química (base seca) de la RTM y alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ).....	20
<b>Tabla 3.</b> Consumo de MS en vacas lecheras alimentadas con RTM o dietas mixtas con diferente distribución del tiempo de pastoreo.....	23
<b>Tabla 4.</b> Producción y composición láctea en vacas lecheras consumiendo RTM o dietas mixtas con diferente distribución del tiempo de pastoreo.....	24
<b>Tabla 5.</b> Balance de Energía, Eficiencia aparente de utilización de la energía y el N para producción de leche, en vacas lecheras consumiendo RTM o dietas mixtas con diferente distribución del tiempo de pastoreo.....	25
<b>Tabla 6.</b> Perfil de ácidos grasos de la leche de vacas lecheras consumiendo RTM o dietas mixtas con diferente distribución del tiempo de pastoreo.....	27

## 1. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la inclusión de pastura y distribución del tiempo de pastoreo en dietas mixtas, en el consumo de materia seca (CMS), producción y composición de leche, perfil de ácidos grasos lácteos y eficiencia del uso de los nutrientes en vacas lecheras en lactancia media. El experimento se llevó a cabo en el Instituto de Producción Animal (IPAV), Facultad de Veterinaria, Libertad, San José, Uruguay. Doce vacas Holstein multíparas con  $584 \pm 71$  kg de peso vivo y  $193 \pm 83$  días en lactancia, se distribuyeron en cuatro cuadrados latinos simultáneos de  $3 \times 3$ . Todos los animales pasaron por 3 tratamientos alimenticios: **RTM+0h** con 22 h de acceso a una ración totalmente mezclada (RTM), **RTM+2x4h** con 14 h de acceso a RTM más dos sesiones de 4 horas de acceso a una pastura de alfalfa luego de cada ordeño y **RTM+8h** con 14h de acceso a RTM más 8 horas continuas de acceso a alfalfa luego del ordeño vespertino. Cada período experimental consistió de 12 días de adaptación a la dieta y 7 días de mediciones. El CMS de RTM (diferencia entre ofrecido y rechazado) y alfalfa (corte del 5% del área antes y después del pastoreo) se midió individualmente durante 5 días de cada período. La producción de leche se registró también en cada período individualmente durante 5 días y se tomaron muestras durante 2 días en ambos ordeños diarios para analizar la composición de la leche y el perfil de ácidos grasos. La eficiencia de utilización de los nutrientes para producción de leche se calculó en base a la composición química de los alimentos, los requerimientos de los animales, el consumo de nutrientes y su excreción en leche. El CMS de pastura fue de 38% del total de la MS consumida. La distribución del pastoreo en dos sesiones de 4h aumentó el CMS de pastura respecto a una sola sesión de pastoreo y mantuvo el CMS total respecto a una dieta 100% RTM. No se encontró efecto de los tratamientos sobre la producción y composición de la leche, la eficiencia de conversión del alimento, el balance de energía, la eficiencia aparente de utilización de la energía y el nitrógeno para producción de leche. La inclusión de una pastura de alfalfa de buena calidad y la distribución del pastoreo en dos sesiones en una dieta mixta para vacas lecheras mejoró el perfil nutracéutico de la grasa láctea, debido a un mayor contenido de ácidos grasos trans, con propiedades beneficiosas para la salud humana. Es posible incluir una pastura de alfalfa de buena calidad en una dieta mixta para vacas con una producción de leche de 25 L/d, sin afectar el CMS y la producción de sólidos lácteos, respecto a una dieta RTM, distribuyendo el tiempo de pastoreo en dos sesiones diarias.

## 2. SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effects of pasture inclusion and distribution of grazing time in mixed diets, on dry matter intake (DMI), milk production and composition, milk fatty acid profile and feed nutrients efficiency in dairy cows in mid lactation. The experiment was carried out at the Institute of Animal Production (IPAV), School of Veterinary Medicine, Libertad, San José, Uruguay. Twelve multiparous Holstein cows with  $584 \pm 71$  kg of live weight and  $193 \pm 83$  days in lactation were distributed in four simultaneous Latin squares of  $3 \times 3$ . All the animals went through 3 food treatments: TMR + 0h with 22 h of access to a total mixed ration (TMR), TMR + 2x4h with 14 h of access to TMR plus two sessions of 4 hours of access to an alfalfa pasture after each milking and TMR + 8h with 14h of access to TMR plus 8 continuous hours of access alfalfa after the evening milking. Each experimental period consisted of 12 days of adaptation to the diet and 7 days of measurements. The DMI of TMR (difference between offered and rejected) and alfalfa (cut of 5% of the area before and after grazing) was measured individually during 5 days of each period. Milk production was also recorded in each period individually for 5 days and samples were taken for 2 days in both daily milkings to analyze the composition of the milk and the fatty acids profile. The efficiency of nutrients utilization for milk production was calculated based on the chemical composition of the diet, the requirements of the animals, the consumption of nutrients and their excretion in milk. The DMI of pasture was 38% of the total DMI. The distribution of grazing in two sessions of 4h increased the DMI of pasture with respect to a single grazing session and maintained the total DMI with respect to a 100% TMR diet. No effect of the treatments was found on milk production and composition, feed conversion efficiency, energy balance, apparent efficiency of energy use and nitrogen for milk production. The inclusion of a good quality alfalfa pasture and the distribution of grazing in two sessions in a mixed diet for dairy cows improved the nutraceutical profile of milk fat, due to a higher content of trans fatty acids, with beneficial properties for human health. It is possible to include a good quality alfalfa pasture in a mixed diet for cows with a milk production of 25 L / d, without affecting the DMI and the production of dairy solids, with respect to a TMR diet, distributing the grazing time in two daily sessions.

### 3. INTRODUCCIÓN

En la última década, el sector lechero uruguayo ha crecido a una tasa del 4% anual (DIEA, 2017), debido fundamentalmente a un aumento en la productividad (litros por hectárea) dado que la superficie lechera se ha reducido en un 18% (DIEA, 2018). Esta estrategia de intensificación de la producción de leche en Uruguay se ha basado en un incremento significativo en el uso de concentrados y reservas de forraje mientras que la cosecha directa de forraje por parte de los animales ha permanecido sin cambios significativos (Chilibroste y col., 2012).

Pero a pesar de que la suplementación con concentrados ha aumentado el consumo de materia seca (**CMS**) total y la producción de leche, ambas variables siguen siendo bajas respecto a cuándo se utiliza una ración totalmente mezclada (**RTM**) (Bargo y col., 2002). Sin embargo, la inclusión de pasturas en la dieta de las vacas lecheras presenta claras ventajas, ya que se asocia con menores costos de producción, con niveles más altos de ácidos grasos (**AG**) beneficiosos para la salud humana (Elgersma, 2015) y mayor bienestar para los animales.

En este sentido, deben desarrollarse estrategias de alimentación que contribuyan a aumentar la cantidad de pastura en la dieta sin deprimir la producción de leche respecto a sistemas de alimentación más intensivos. Las dietas mixtas o raciones parcialmente mezcladas constituyen un sistema de alimentación que combina sesiones de pastoreo y oferta de RTM en el mismo día y tienen como principal ventaja aumentar la producción de sólidos lácteos, comparado con un sistema de alimentación en base a pastura con suplementación de concentrados (Bargo y col., 2002). Sin embargo, una de las principales limitantes para aumentar la cantidad de pastura en la dieta es la depresión en el CMS total. En términos generales cuando la inclusión de pastura representa más de un 30% de la MS ingerida, se deprime la ingestión de nutrientes y la producción de leche (Pastorini y col., 2019).

La gestión del proceso de pastoreo es una de las principales herramientas para influir en el CMS de pastura. Los dos factores más importantes en la gestión del pastoreo son el tiempo diario total de acceso a la pastura y la distribución del tiempo total en diferentes sesiones. Tanto la restricción en el tiempo de acceso al pastoreo como su distribución a lo largo del día han mostrado resultados positivos sobre la producción de leche (Clark y col., 2010). Períodos de acceso a la pastura restringidos pueden aumentar la eficiencia del pastoreo (MS consumida por hora de acceso a la pastura) debido al mayor período dedicado a la actividad de pastorear (Kennedy y col., 2009; Perez-Ramirez y col., 2009). Por otro lado, distribuir el tiempo de pastoreo en dos sesiones diarias puede contribuir a aumentar el consumo de pastura (Kennedy y col., 2009; Dall-Orsoletta y col., 2016) debido a cambios en el comportamiento de pastoreo (tiempo de pastoreo, tasa de bocado, peso de bocado, tasa de ingestión) (Gregorini y col., 2009).

La eficiencia neta de utilización de los nutrientes (Ingreso / Egreso) para la producción es de suma importancia para desarrollar sistemas de alimentación sustentables económica, ambiental y socialmente. El Nitrógeno (**N**) es uno de los macronutrientes más importantes y su metabolismo puede implicar diferentes grados de eficiencia en su utilización. La eficiencia de utilización de los nutrientes para producir leche podría aumentar a través de tres factores: a) al mejorar la sincronía

de nutrientes y generar mayor estabilidad ruminal mediante el consumo de una dieta balanceada en carbohidratos (**CH**) y N (Trevaskis y col., 2001), b) la distribución del tiempo de pastoreo en dos sesiones, que alternaría más frecuentemente el consumo de pastura y RTM, y c) la asignación de los tiempos de acceso al pastoreo respetando el patrón normal de comportamiento de los animales (Chilibroste, 2002) y las variaciones en la concentración de nutrientes en las pasturas a lo largo del día (Cajarville y col., 2007).

## 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Sistemas de alimentación y consumo de nutrientes

En Uruguay, la mayoría de los sistemas de producción de leche son de base pastoril a cielo abierto con suplementación. Los sistemas pastoriles, son aquellos en los que al menos el 50% de la materia seca total anual consumida es proporcionada por la pastura (García y Fulkerson, 2005). El potencial para la producción de leche a partir de las pasturas está determinado por su producción de materia seca (**MS**) por ha, el nivel de utilización y la eficiencia de transformación de esa MS en leche (Hodgson, 1990). Adicionalmente la utilización de pasturas en la dieta de vacas lecheras tiene como ventajas la modificación del perfil nutracéutico de los productos obtenidos para la alimentación humana (Elgersma, 2015), mejora el bienestar de los animales y la percepción de los consumidores sobre el sistema de producción y por último contribuye a disminuir los costos de alimentación por kg de MS suministrado (Tozer y col., 2003).

En sistemas de alimentación basados en pasturas el CMS y energía son las principales limitantes para la producción de leche (Kolver y Muller, 1998). El consumo está relacionado con las variaciones estacionales en el crecimiento, la disponibilidad y sus características nutritivas, en particular la concentración energética de las pasturas (Doyle y col., 2001). Adicionalmente existen aspectos de la fisiología digestiva y el comportamiento de los animales en pastoreo que determinan el nivel de consumo. Estos factores de la pastura y el animal se relacionan entre si y pueden ser manipulados mediante el manejo del pastoreo, entendido como el tiempo total asignado de pastoreo, el momento del día y la duración de las sesiones en que se permite el acceso a la pastura (Wales et., al 2005).

Desde el punto de vista de la fisiología digestiva uno de los principales reguladores del consumo en rumiantes a pastoreo es el llenado ruminal. En este sentido el % de fibra detergente neutro (**FDN**) es buen predictor del CMS (Weiss y Shockey, 1991). En un trabajo de metaanálisis, Arelovich y col. (2008), observaron que la mayor concentración de FDN se asoció con un menor CMS y menor concentración energética del alimento, en una amplia variedad de contenidos en FDN y dietas para ganado lechero.

En sistemas de producción de leche en confinamiento se suministran dietas completas y balanceadas específicamente para los requerimientos nutricionales de los animales que la consumirán. Este tipo de dieta se conoce como ración

totalmente mezclada (**RTM**). Las dietas RTM maximizan la producción de leche y el CMS, esto se logra mediante la reducción o eliminación de la selectividad sobre los alimentos individuales y la formulación de precisión. Kolver y Muller (1998) reportaron una mayor producción de leche (44,1 vs 29,6 kg/d) y un mayor CMS (23,4 vs 19,0 kg/d) cuando los animales consumieron RTM respecto a pasturas de alta calidad como único alimento, debido a un mayor consumo de energía. Otros autores reportaron un 49% más de producción de leche con dietas RTM respecto a una alimentación únicamente con pasturas (Bargo y col., 2002).

#### 4.2 Suplementación y sistemas de alimentación con dietas mixtas

La utilización de alimentos suplementarios en forma de forraje, concentrados o RTM deberían contribuir a maximizar la utilización de las pasturas y la eficiencia de utilización de los nutrientes (Tozer y col., 2003). Independientemente del sistema de suplementación utilizado, las respuestas a la suplementación (**RS**: kg de leche obtenido / kg de suplemento suministrado) son curvilíneas, obedecen a la ley de incrementos decrecientes y disminuyen a medida que aumenta la cantidad de suplemento (Stockdale y col., 1987; Walker y col., 2001). Se ha reportado una disminución de la RS cuando se suministran más de 5 kg de MS de grano / vaca al día, aunque varía según la etapa de lactancia y las características nutritivas de la pastura (Beever y Doyle, 2007). La elección e implementación de los sistemas más eficientes y apropiados para proporcionar dichos suplementos continúa siendo uno de los principales desafíos para los productores lecheros (Wales y col., 2013).

La combinación de pasturas con RTM en la dieta diaria es denominada ración parcialmente mezclada (**RPM**) o dieta mixta, debido a que el forraje no es físicamente parte de la RTM. Las dietas mixtas tienen el potencial de capitalizar los beneficios de las dietas RTM (maximización de consumo y producción), manteniendo las ventajas de la incorporación de pasturas en la dieta (Bargo y col., 2002). Se ha reportado que bovinos alimentados con dietas mixtas alcanzan consumos de nutrientes similares a los logrados con dietas RTM cuando se utilizan pasturas templadas de alta calidad, como rygrass o praderas mezcla de trébol rojo, trébol blanco y rygrass (Vibart y col., 2008; Morales-Almaráz y col., 2010; Santana y col., 2012). Adicionalmente se han reportado niveles de producción de leche similares con dietas mixtas a los obtenidos con dietas RTM (Soriano y col., 2001; García y Fulkerson, 2005). Particularmente cuando se suministran más de 8 kg de MS de grano de cereales por vaca por día en la dieta, pueden aumentar las variaciones diurnas en el pH del fluido ruminal y la cantidad de tiempo en el día que el pH es menor a 6,0 (Wales y Doyle, 2003). En estas condiciones las dietas mixtas pueden contribuir a una fermentación ruminal más estable con menos variaciones en el pH ruminal, al ser comparada con la suplementación con grano de cereales, suministrada durante los ordeños (Wales y col., 2013). La mayor estabilidad ruminal puede mejorar la digestión de la FDN (Leddin y col., 2010), contribuyendo a aumentar el consumo, mejorar la RS y disminuir la tasa de sustitución (**TS**: kg de forraje que se dejan de consumir/kg de suplemento suministrado) (Dixon y Stockdale, 1999).

Se han realizado estudios combinando diferentes tipos de pasturas con RTM de diferentes características y con vacas lecheras en diversos estados de lactancia,

encontrándose respuestas contradictorias. Sprunck y col. (2012) reportaron que vacas multíparas alimentadas ad libitum con dietas RTM produjeron 30% más leche que vacas en pastoreo con alta disponibilidad de forraje y suplementadas con RTM a razón de 8,5 kg MS/d. Asimismo, Fajardo y col. (2015) reportaron un mayor CMS (5,2 kg/d) y mayor producción de leche (3,4 l/día) en vacas consumiendo exclusivamente RTM respecto a vacas alimentadas con dietas mixtas. Otros autores han encontrado resultados similares al comparar dietas RTM vs dietas mixtas. Bargo y col. (2002) reportaron un mayor CMS (26,7 vs 25,2 kg/d) y mayor producción láctea (36,6 vs 30,9 kg/d) en las vacas consumiendo RTM en comparación con las que consumieron una dieta mixta. Sin embargo, varios autores han reportado similares respuestas en cuanto a CMS y producción de leche al comparar dietas RTM vs dietas mixtas. En este sentido, Mendoza y col. (2016a) no reportaron diferencias en CMS ni en producción de leche al comparar una dieta RTM con una dieta mixta con 4 horas de acceso a una pastura de raygrass. Tampoco se reportaron diferencias en CMS y producción de leche al comparar una dieta RTM contra una dieta mixta con 29% de pastura fresca (Pastorini y col., 2019). En un trabajo reciente, Barca y col., (2018) reportaron similares resultados al comprar RTM y una dieta mixta para CMS y producción de leche, utilizando una pradera mezcla (Festuca, Lotus y Trébol).

Estos resultados contradictorios entre los diferentes autores pueden deberse a varios factores, entre ellos se encuentran los inherentes al animal, como el estado de lactancia; factores relacionados a la RTM (composición y proporción en la dieta mixta) y los factores relacionados con la pastura (calidad, composición química y proporción en la dieta). Estudios previos (Mendoza y col., 2016a; Pastorini y col., 2019) han utilizado gramíneas invernales (raygrass) o praderas mezcla de calidad media (Festuca, Lotus y Trébol) (Fajardo y col., 2015). No se encontraron trabajos nacionales o internacionales que evaluaran dietas mixtas con la inclusión de alfalfa.

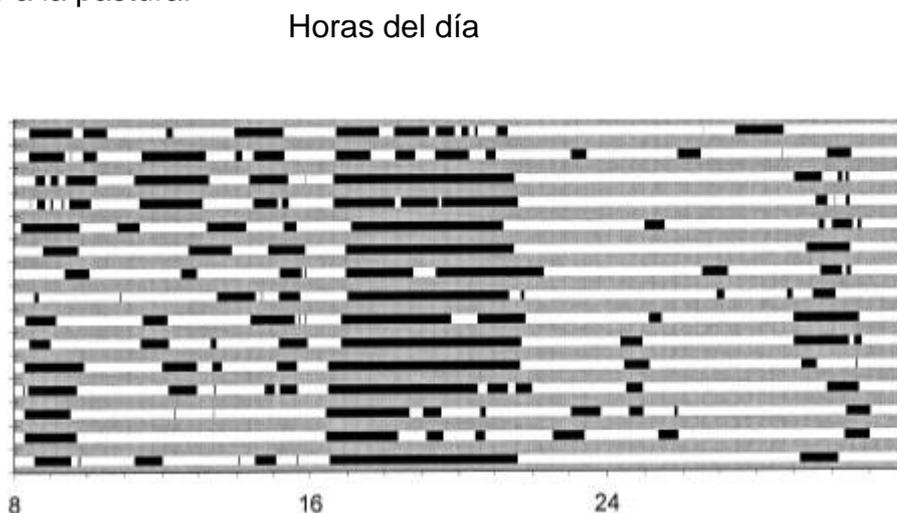
Algunos autores han reportado diferencias entre tratamientos al realizar el mismo experimento pero en distintas estaciones del año, utilizando la misma pastura pero con calidad y composición diferentes, particularmente en su concentración de Proteína Bruta (**PB**). Vibart y col. (2008) realizaron un primer experimento en otoño, donde se utilizó una variedad anual de raygrass (16,4% MS, 41,6% FDN, 23,7% PB) y no reportaron diferencias en CMS y producción de leche al comparar una dieta RTM con tres dietas mixtas con niveles crecientes de pastura (79:21, 68:32 y 59:41, relación RTM: pastura). Sin embargo, en un segundo experimento realizado en primavera utilizando el mismo raygrass (24,8% MS, 44,7% FDN, 13,9% PB) el CMS y la producción de leche disminuyeron linealmente con el aumento de la proporción de pastura en la dieta.

#### **4.3 Tiempo total y distribución diaria del tiempo de pastoreo**

El tiempo de pastoreo diario es el resultado de la suma de los largos de las diferentes sesiones o comidas que el animal realiza durante el día (Gill y col., 1994) y es afectado por las actividades tales como búsqueda, cosecha, masticado e ingestión del forraje (Laca y Demment, 1996). Krysl y Hess (1993) reportaron que el pastoreo es predominantemente una actividad desarrollada durante el día. Como se muestra en la Figura 1, el 65 a 100% de la actividad es realizada entre las 6 am y 7 pm, en un grado amplio de temperaturas, niveles de suplementación, manejos de

pastoreo y consumo de MS de pastura. Según Lyons y Machen (2000) hay dos momentos de pastoreo importantes, uno a la salida del sol dónde los animales pastorean entre 3 a 5 horas, y otro al atardecer que dura aproximadamente 3 horas. Además, los animales pastorean cerca del mediodía y durante la noche pero son sesiones más cortas e irregulares. En vacas lecheras el evento de retirar los animales para el ordeño ejerce una influencia fundamental sobre el patrón natural de comportamiento ingestivo, concentrándose las dos sesiones principales de pastoreo a la salida de los ordeños (Gibb y col., 1997).

**Figura 1.** Patrón diario de pastoreo de vacas lecheras con dos ordeños diarios y 24h de acceso a la pastura.



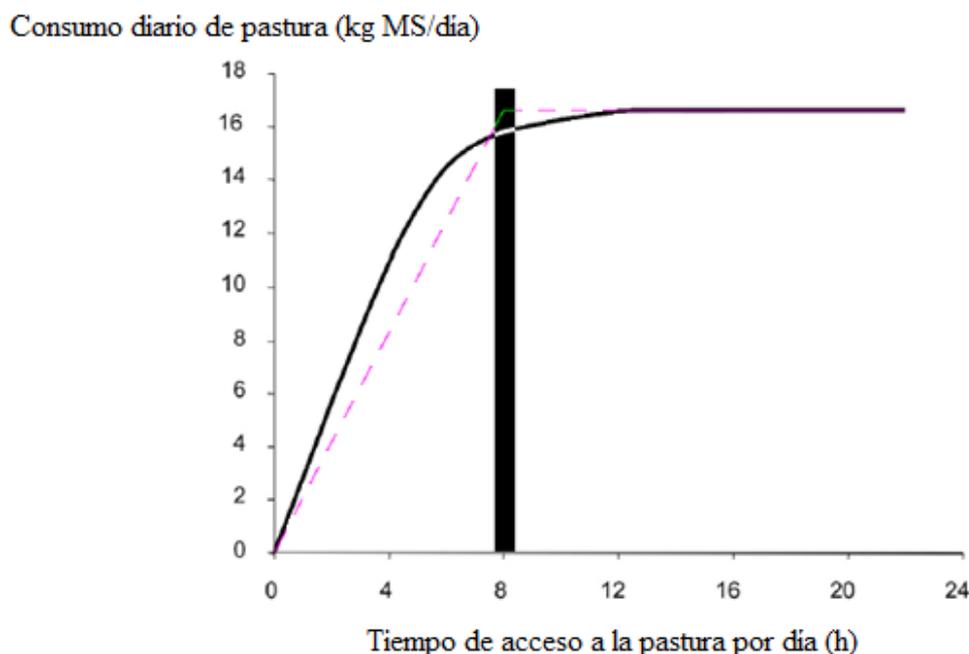
Fuente: adaptado de Chilibroste (1998)

Referencias: cada línea es un individuo. Las barras negras indican períodos en que las vacas están pastoreando.

La restricción en el tiempo de acceso a la pastura conduce a aumentos en la proporción del tiempo dedicado a pastoreo, lo que se logra a través de una disminución en el tiempo dedicado a rumia y descanso (Soca y col., 2000). Adicionalmente, restringir el tiempo de pastoreo puede aumentar la producción y la utilización de forraje al reducir los efectos negativos del ganado sobre la pastura al pisotear y ensuciar. Estos beneficios pueden variar según la gravedad de la restricción del acceso y las condiciones de pastoreo (Gekara y col., 2005; Smith y col., 2006). Al restringir el tiempo de acceso a la pastura de 16 a 8 horas en vacas lecheras, estas dedicaron el 52% y 74%, respectivamente, del tiempo disponible a pastorear (Chilibroste y col., 2007). Existen dos modelos de cómo el tiempo de acceso diario a la pastura interactúa con el CMS. Tal como se representa en la Figura 2, un modelo lineal propuesto por Buckmaster y col. (1997), y otro exponencial propuesto por Delagarde y col. (2004). Ambos modelos predicen que 8 horas de acceso al pastoreo son suficientes para obtener niveles de consumo similares a cuando no existen restricciones en el tiempo de acceso a la pastura. Félix y col. (2017) reportaron un menor CMS al restringir el tiempo de acceso al pastoreo en vaquillonas de carne a 6 y 4 h. Sin embargo, no encontraron diferencias

entre 8 y 24 h de acceso al pastoreo. Se ha reportado que vacas lecheras con altos requerimientos pueden lograr similares CMS al restringir el tiempo de acceso a la pastura de 24 a 8 h (Gregorini y col., 2009). Restringir el tiempo de acceso al pastoreo no afecta el CMS, siempre que los animales tengan acceso por más de 7 a 8 horas por día (Gekara y col., 2005; Smith y col., 2006). Sin embargo otros autores han reportado una reducción en el CMS de 1,7 kg MS/vaca/día al restringir el tiempo de acceso al pastoreo de 22 a 9 h por día (Kennedy y col., 2009).

**Figura 2.** Consumo de MS en función del tiempo de acceso a la pastura



Fuente: adaptado de Delagarde y O`Donovan (2005)

Referencias: Línea punteada: modelo lineal (Buckmaster y col., 1997). Línea continua: modelo exponencial (Delagarde y col., 2004).

#### 4.4 Distribución del tiempo de pastoreo

Los efectos de la distribución del tiempo de pastoreo sobre la producción de leche no son concluyentes. Se han reportado incrementos de 6,25 % (20,8 y 22,1 kg/vaca/día) con la distribución de 8 h de acceso al pastoreo en dos sesiones de 4 h (Clark y col., 2010). Sin embargo, otros autores no encontraron diferencias en producción de leche ensayando tiempos de acceso de 9 y 2 x 4,5 h (Kennedy y col., 2009). En el mismo sentido, pero utilizando una sesión de 6 h o dos sesiones de 3 h, Dall-Orsoletta y col. (2016) no reportaron diferencias en producción de leche ni concentración de sólidos lácteos.

La distribución del tiempo total diario de pastoreo en varias sesiones más cortas puede aumentar la eficiencia del pastoreo (MS consumida por hora de acceso a la pastura). La mayor eficiencia de pastoreo se debe a un incremento en el tiempo dedicado efectivamente a pastorear del total de tiempo de permanencia en la

pastura y paralelamente a una mayor tasa de consumo (kg MS consumidos por hora) lograda por los animales. En este sentido, vacas en lactación con accesos a la pastura durante 9 h continuas, dos sesiones de 4,5 h o dos sesiones de 3 h, dedicaron una mayor proporción de su tiempo al pastoreo (81, 81 y 96%, respectivamente) en comparación con los animales con acceso de 22 h a la pastura (42%) (Kennedy y col., 2009). Además, estos autores reportaron un aumento de 0,8 kg de MS/vaca/día al comparar dos sesiones de 4,5 h respecto a una sesión de pastoreo de 9 h. En otro estudio, se encontró un incremento de 11% en el tiempo dedicado a pastorear y un incremento de la tasa de consumo de 1,0 a 1,2 kg de MS/hora, lo que resultó en un aumento del CMS de 1,4 kg de MS/vaca/día cuando se comparó dos sesiones de 3 h y una sesión de 6 h de acceso al pastoreo (Dall-Orsoletta y col., 2016). Por último, Clark y col. (2010) reportaron un mayor CMS al distribuir el acceso al pastoreo en dos sesiones de 4 h en comparación con una sesión de 8 hs (13 vs 10,9 kg de MS/vaca/día, respectivamente). Sin embargo, Gregorini y col. (2009), no reportaron diferencias en CMS total diaria entre 8 h y 2 x 4 h de acceso al pastoreo. Estos resultados coinciden con los reportados por Pérez-Ramírez y col. (2009), quienes no encontraron un efecto del tiempo de acceso a la pastura (1 x 9 vs 2 x 2,75 h) sobre el CMS de la pastura.

#### 4.5 Manipulación del perfil lipídico de la leche

Los animales que consumen pasturas tienen dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados (**PUFA**, por sus siglas en inglés). El 50–75% de su contenido de AG está representado por el C18: 3 n-3 (ácido  $\alpha$ -linolénico, **ALA**). También se encuentran generalmente C18: 2 n-6 (ácido linoleico, **AL**) y C16: 0 (ácido palmítico, **AP**) (Elgersma, 2015).

La síntesis de PUFA juega un papel importante en la adaptación y supervivencia de las plantas a temperaturas frías (Iba y col., 2002; Routaboul y col., 2012), ya que contribuye al mantenimiento de la fluidez de la membrana en el cloroplasto. Por lo tanto, los PUFA están presentes en grandes cantidades en plantas en climas templados (Hugly y Somerville, 1992).

La manipulación dietética de la composición de AG en la leche se ha convertido en un tema importante en la última década, con el objetivo de obtener productos lácteos más saludables (Chouinard y col., 1999). Hay una tendencia creciente de los consumidores a seleccionar alimentos con alto contenido de PUFA en particular omega-3 (n-3) y ácido linoleico conjugado (**CLA**, por sus siglas en inglés), debido a sus propiedades beneficiosas postuladas para la salud, como sus efectos antioxidantes, anticancerígenos, antiaterogénicos y antidiabéticos (Pariza y col., 2001).

El CLA es un término que incluye varios isómeros de C18: 2, que se originan a partir de la biohidrogenación (**BH**) ruminal de los AG dietéticos y por la acción de la enzima  $\Delta$ 9-desaturasa en la glándula mamaria (Griinari y col., 2000; Lock y Garnsworthy, 2002). El isómero cis-9, trans – 11 (ácido ruménico, **AR**) representa más del 85% del total de CLA en la leche y es responsable de muchas de las actividades biológicas observadas (Pariza, 1999).

La nutrición animal es el factor más influyente capaz de modificar la composición de la grasa de la leche y la inclusión de pasturas en la dieta tiene el potencial de aumentar el contenido de ácidos grasos monoinsaturados (**MUFA**, por sus siglas en inglés) y PUFA (Dewhurst y col., 2006). Existen varias formas de aumentar la concentración de PUFA en la leche de vaca, por ejemplo, aumentando la cantidad (es decir, la ingesta) o la concentración de sus precursores en la dieta, reduciendo la extensión de la BH en el rumen, y / o al aumentar la actividad de la enzima  $\Delta 9$ -desaturasa (Elgersma, 2015).

Aumentar el CMS de la pastura en vacas lecheras de 33 a 100% del total de la ingesta, lleva a que la concentración de AR aumente linealmente de 0,89 a 2,21% (Dhiman y col., 1999). Las concentraciones de CLA en la leche de las vacas alimentadas con pastura pueden ser dos (1,09 vs. 0,46 g / 100 g de grasa de leche) a cinco (2,21 vs 0,39/ 100 g de grasa de leche) veces más altas que en las vacas que reciben únicamente RTM (Kelly y col., 1998; Dhiman y col., 1999, respectivamente). Schroeder y col. (2004) compararon las concentraciones de AR en la leche de vacas alimentadas con dietas basadas en pasturas con la de vacas alimentadas con dietas RTM de 7 estudios, e informaron un aumento del 134% en comparación con el control, con una variación considerable en el rango de respuestas del 15 al 396%.

La microbiota del rumen metaboliza la mayoría de los PUFA dietéticos mediante procesos complejos. Los AG dietéticos se alteran ampliamente en el rumen, lo que da lugar a marcadas diferencias entre la ingesta de AG (principalmente PUFA) y la salida (principalmente AG saturados (**SFA**, por sus siglas en inglés)) como resultado de la población microbiana del rumen que realiza dos procesos principales: lipólisis y BH (Jenkins y col., 2008). Estos procesos se ven afectados por la fuente de lípidos (cantidad y composición de AG, forma tecnológica) y las características de la dieta basal (tipo de forraje, proporción forraje: concentrado (F:C), contenido de fibra y contenido de almidón). Los AG insaturados son tóxicos para los microorganismos del rumen; por este motivo, les es necesario hidrogenar la molécula de AG, eliminando los dobles enlaces, transformando un AG insaturado en un AG saturado "no tóxico". Así, el AL, con dos dobles enlaces, por este proceso es transformado en ácido esteárico (**AE**), sin ningún doble enlace; los intermediarios de este proceso, cuando se desarrolla normalmente, son el AR y el ácido vaccénico (**AV**), dos AG que, en experimentos con animales y cultivos de células humanas in vitro han demostrado poseer efectos anticancerígenos directos e indirectos (Elgersma, 2015). La saturación ruminal del AV a AE es el paso limitante en la BH ruminal, lo que lleva a la acumulación de AV en el rumen y su absorción en el intestino delgado. El AV absorbido se puede convertir en AR por la enzima  $\Delta 9$ -desaturasa mamaria. Esta síntesis endógena de AR en la glándula mamaria puede producir más del 75% del total de éste AG en la leche (Griinari y col., 2000).

Específicamente la inclusión de pastura en dietas mixtas ha demostrado ser una vía eficiente para mejorar el perfil nutracéutico de la leche. Estudios recientes han demostrado que la inclusión de pastura tan solo en un 16% de la MS total consumida aumenta la concentración de AR en la leche en comparación con vacas alimentadas únicamente con RTM (0,77, vs 0,49 g/100g de AG, respectivamente). Asimismo, la relación n-6: n-3 fue menor en la leche de las vacas que tuvieron

acceso a la pastura en relación con el tratamiento RTM (5,64 vs 8,03, respectivamente), mostrando una mayor proporción de ácidos grasos beneficiosos para la salud humana (Mendoza y col., 2016b). Similares resultados fueron reportados por Morales-Almaráz y col., (2010), quienes encontraron una mayor concentración de AG de cadena larga en la leche de vacas consumiendo dietas mixtas respecto a las que consumieron RTM. La leche de las vacas que tuvieron acceso a la pastura durante 12 h presentó un 50% y 30% más CLA que la leche de las vacas con 6 h de acceso a pastoreo o consumiendo únicamente RTM, respectivamente. En el mismo sentido, Vibart y col. (2008), al reducir la proporción de RTM y aumentar la de pastura en dietas mixtas, encontraron que las concentraciones de AG saturados y AL en leche disminuyeron linealmente al aumentar la proporción de pastura en la dieta, y las concentraciones de AV, AR y ALA aumentaron linealmente.

A nivel nacional se han reportado resultados beneficiosos al combinar pasturas con RTM ya que se han encontrado cambios en el perfil de AG de la leche, aumentando la concentración de CLA y sus derivados (Mendoza y col., 2016a; Barca y col., 2018; Pastorini y col., 2019). Sin embargo, no se encontraron reportes previos que estudiaran la modificación del perfil lipídico de la leche en función de la distribución del tiempo de pastoreo. Tampoco se han encontrado trabajos que utilicen alfalfa como parte de la dieta mixta.

#### **4.6 Eficiencia en el uso de los nutrientes**

El uso de pasturas para producir leche resulta en sistemas de producción de bajo costo porque el forraje pastoreado es una fuente de nutrientes barata (Bargo, 2014). Las especies forrajeras que se utilizan en nuestro país en los sistemas intensivos, representadas principalmente por gramíneas C3, leguminosas y sus mezclas, poseen algunas características particulares. De acuerdo con un relevamiento realizado en nuestro país, que incluyó forrajes provenientes de más de 40 parcelas de establecimientos productivos, las pasturas presentaron una composición característica de un alto valor nutritivo (Cajarville y col., 2007). En promedio, los datos de composición fueron los siguientes (base seca): 18% de MS, 19 % de PB, 40 % de FDN y entre un 6 y un 10 % de CH.

La proteína de estos forrajes, se caracteriza por ser altamente soluble y de muy rápida degradación (Repetto y col., 2005), dando como resultado altas concentraciones instantáneas de N-NH<sub>3</sub> en el rumen (Cajarville y col., 2006a, 2006b). Por otra parte, la degradabilidad de las fracciones fibrosas de este tipo de pasturas, según diferentes trabajos realizados en nuestro país, se ubica en torno al 50-60% (Cajarville y col., 2003; 2006a), valores que pueden catalogarse como altos, aportando energía al rumen a través de la producción de ácido acético. Esto determina que, si bien las praderas aportan mucha energía por su alta digestibilidad, la utilización del N es baja resultando en poca retención en leche y alta excreción al medio ambiente vía orina o heces (Bargo, 2014).

En 1839 Boussingault realizó los primeros balances de nutrientes en vacas lecheras, entonces de muy baja producción, y concluyó que la eficiencia de utilización del N (**EUN**) para producir leche era del 23%. Más de un siglo después, la eficiencia media de utilización de N se mantiene en 26% (Huhtanen y Hristov, 2009).

Existen varios factores que influyen en la EUN, y uno de ellos es el contenido de PB de la dieta. La EUN disminuye a medida que la PB en la dieta aumenta. Por lo tanto, adaptar el suministro de PB a los requerimientos del animal (teniendo en cuenta su estado fisiológico) puede ser una primera medida a tomar para reducir las pérdidas de N. En este sentido, si utilizamos el modelo del NRC (2001), una vaca que produce 25 o 35 litros de leche al día necesita raciones con 14,1 o 15,2% de PB (Calsamiglia y col., 2010).

Según datos de experimentos revisados por otros autores, en la Unión Europea los tratamientos con mayor EUN (32%) resultaron de vacas con alto CMS y producción de leche (28,7 L/d), alimentadas con dietas conteniendo un 57% de forraje de baja calidad, con bajo contenido de PB (14,8%) y alto contenido de FDN (59,4%). Por el contrario, en USA la mayor EUN (32,8%) resultó de vacas de mayor producción láctea (41,6 L/d), consumiendo dietas con bajo contenido de PB (15,4%) y alto contenido de CH no fibrosos (38,2%). Por lo tanto, las vacas más productivas fueron también las más eficientes desde el punto de vista del uso del N, demostrando que cuando las dietas están bien formuladas, una alta EUN es compatible con una alta producción de leche (Calsamiglia y col., 2010).

Los experimentos de alimentación en confinamiento han proporcionado evidencia de que es posible aumentar la EUN sustancialmente al cambiar la composición de la dieta, lo que resulta en una reducción significativa de las pérdidas de N en el medio ambiente (Jonker y col., 1998). Castillo y col. (2000) han revisado las vías para aumentar la EUN utilizando dietas mixtas de forraje y suplementos. En este sentido, las dietas mixtas, donde el forraje y la RTM son suministradas simultáneamente, pueden ayudar a estabilizar el suministro y la proporción de nutrientes en la dieta, resultando en altos consumos y alta productividad por animal (Coppock y col., 1981). Además, hay evidencia de que las dietas mixtas, aunque no están equilibradas para el suministro de N para el animal, pueden ser efectivas para capturar el exceso de proteínas degradables de la pastura, mejorando así el flujo total de N microbiano y la eficiencia de producción de proteína microbiana, pudiendo esto mejorar la EUN para producción de leche (Vibart y col., 2010).

En un trabajo realizado en nuestro país, Santana y col. (2017) compararon la EUN en vaquillonas alimentadas con 100% RTM (T), 71% RTM más 29% de forraje (T+H) y 100% forraje (H). Los animales del tratamiento T+H tuvieron una mayor EUN para síntesis de proteína microbiana. A su vez, la combinación de RTM y forraje no presentó diferencias con respecto a la dieta RTM en cuanto a consumo de nutrientes y EUN.

En otros trabajos, donde se utilizaron vacas lecheras, se han reportado EUN para producción de leche similares al comparar dietas exclusivamente RTM contra dietas mixtas. En un experimento donde se compararon tres tratamientos; uno con acceso sólo a RTM, otro con acceso a RTM y 8 h de acceso a una pastura de raygrass, y un tercer tratamiento con acceso a RTM y 4 h de acceso a la misma pastura, no se encontraron diferencias en la EUN para producción de leche (Mendoza y col., 2016a).

En un experimento reciente, Pastorini y col. (2019) compararon la EUN en vacas lecheras alimentadas con 100% RTM, 71% RTM más 29% forraje y 53% RTM más 47% forraje. No se encontraron diferencias en la excreción de N en leche entre los tratamientos con 100% RTM y 71% RTM, pero las vacas que consumieron 53% RTM más 47% de forraje excretaron menos N en leche, debido probablemente a que consumieron menos N que los otros tratamientos. A pesar de esto, la EUN para producción de leche presentó una tendencia mayor en ese tratamiento (24,5%) respecto a 100% RTM (22,7%), lo que concuerda con lo reportado por otros autores (Castillo y col., 2000), quienes afirman que al aumentar el consumo de N de la dieta, la EUN para producción de leche disminuye.

La eficiencia de conversión de los alimentos (**ECA**: Leche corregida por grasa (**LCG**) 3,5% kg de leche/ kg de MS consumida) es otra forma común de medir la eficiencia de utilización de la energía y el N consumidos en vacas lecheras (Arndt y col., 2015). A diferencia de la EUN, que ha permanecido típicamente baja (alrededor de 25%) y muy variable (10 a 40%; Calsamiglia y col., 2010), se ha logrado una mejora considerable en la ECA mediante la dilución del mantenimiento asociado con la selección genética para una mayor producción de leche (USDA, 2013). Se ha sugerido que la ECA debe encontrarse en un rango de 1,3 a 1,5 kg LCG 3,5%/kg de CMS o incluso mayor en rodeos sanos y bien manejados (Oetzel, 1998).

Los efectos de incluir pastura en la dieta de las vacas alimentadas con RTM en la ECA son inconsistentes, ya que los experimentos informan tanto aumento como disminución en la ECA a medida que aumenta la proporción de pastura en la dieta (Wales y col., 2013). Mendoza y col. (2016a) reportaron similares ECA entre los tratamientos con 4 y 8h de acceso a pastura y el tratamiento 100% RTM, (1,56, 1,46, 1,57 kg LCG 3,5%/kg MS (k/d), respectivamente).

Otros autores han reportado altas ECA, y superiores para los tratamientos con acceso a pastura durante 6 h y 9 h respecto a solo RTM (Fajardo y col., 2015). Así mismo, Vibart y col. (2008) reportaron una mayor ECA en las vacas con acceso a pastura respecto al tratamiento RTM (1,25 vs 1,46, respectivamente).

## 5. HIPÓTESIS

La distribución de 8 h de pastoreo en alfalfa en dos sesiones de 4 h, contribuirá a aumentar el consumo de MS y la eficiencia en la utilización del alimento, así como la producción de sólidos lácteos, respecto a 8 h continuas de pastoreo. La inclusión de alfalfa en la dieta modificará el perfil de ácidos grasos de la leche, con un incremento de los CLA y ácidos grasos trans, respecto a una dieta exclusivamente RTM.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la inclusión de 8 h de acceso a una pastura de alfalfa y la distribución del pastoreo en dos sesiones de 4 h, sobre el consumo de MS, la producción de sólidos y el perfil de ácidos grasos de la leche en dietas mixtas de vacas lecheras de alta producción.

### 6.2 Objetivos específicos

Estudiar como la inclusión de 8 h de acceso a una pastura de alfalfa y la distribución del tiempo de pastoreo en dos sesiones de 4 h afecta:

- a) El CMS de alfalfa y RTM
- b) La producción de sólidos lácteos (proteína, grasa y lactosa)
- c) El perfil lipídico de la grasa láctea
- d) La eficiencia de uso de la energía y el N para producción de leche

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Animales, alimento y manejo

El experimento fue realizado en el Instituto de Producción Animal de Facultad de Veterinaria (**IPAV**) en el departamento de San José, Uruguay (S 34°, 40´, W 56° 32´). Se utilizaron doce vacas Holstein multíparas en lactancia media, con 584 kg ± 71kg de peso vivo y 193 ± 83 días en lactancia. Nueve vacas fueron provistas de catéteres ruminales semipermanentes y collares (Heatime ®, HR-Tag™) para registrar el tiempo de rumia.

El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con los reglamentos sobre el uso de animales en experimentación, enseñanza e investigación (Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A), UdelaR, Uruguay), en el marco de un protocolo de investigación aprobado por la Comisión de Experimentación en el Uso de Animales (CEUA), número de protocolo CEUAFVET-351.

Las vacas fueron alojadas en bretes individuales donde se les ofrecía la RTM en comederos y aquellos tratamientos que incluían pastura realizaron pastoreo directo en parcelas individuales. Tuvieron acceso permanente al agua fresca mediante bebederos. Los animales fueron ordeñados dos veces por día (0700 y 1800 h) en el tambo para luego volver a sus respectivos bretes o parcelas de pastoreo donde continuaron con las actividades propias de sus tratamientos asignados.

Las doce vacas pasaron por tres tratamientos alimenticios en un diseño de cuatro cuadrados latinos simultáneos de 3x3. Un tratamiento tuvo acceso 20h a una RTM (**RTM + 0h**), otro tratamiento tuvo acceso durante 12h a la misma RTM más 8h continuas de acceso a alfalfa, ingresando a pastorear luego del ordeño de la tarde (**RTM + 8h**) y un tercer tratamiento con acceso durante 12h a RTM más dos sesiones de 4h de acceso a alfalfa, comenzando la primer sesión de pastoreo luego

del ordeño de la mañana y la segunda sesión luego del ordeño de la tarde (**RTM + 2x4h**).

Las vacas fueron bloqueadas por días en lactancia, peso vivo (**PV**), número de lactancias, condición corporal en la escala de 5 puntos de Edmonson y col. (1989) y producción.

La RTM fue formulada de acuerdo con las recomendaciones del NRC (2001) para cubrir los requerimientos de una vaca de 600 kg de peso produciendo 28 a 35 L de leche / día, según el potencial de los animales. Los ingredientes utilizados para la RTM se presentan en la Tabla 1 y fueron silo de maíz de planta entera, grano seco de maíz molido, harina de soja peleteada y aditivos. La cantidad de alimento se asignó a cada animal en función del consumo potencial individual, el cual se determinó durante 10 días previos al inicio del experimento. Durante el experimento, la RTM se ofreció, en el caso de las vacas en el tratamiento sin acceso a pastura, para cubrir el 100% de su consumo potencial. Para las vacas en los tratamientos con acceso a pastura la oferta de RTM tuvo como objetivo cubrir el 50% del consumo potencial medido previamente y la oferta de pastura fue de 14 kg/MS/vaca/d a 5cm del suelo. Se utilizó una pradera de alfalfa (*Medicago sativa*, variedad *Crioula*) de segundo año, cuya composición química y de la RTM se presenta en la Tabla 2.

Los cambios en las dietas se realizaron progresivamente durante cada período de adaptación. Cada período tuvo 12 días de adaptación y 7 días de mediciones, por lo que la duración total del experimento fue de 57 días.

**Tabla 1.** Ingredientes de la ración totalmente mezclada (RTM)

	<b>% de la MS</b>
<b>Silo de Maíz</b>	58,48
<b>Grano de Maíz molido</b>	14,62
<b>Harina de soja</b>	24,37
<b>Urea</b>	0,39
<b>Premezcla Vitamínico - Mineral<sup>1</sup></b>	1,46
<b>Polisiloxano<sup>2</sup></b>	0,19
<b>Oxido de magnesio</b>	0,24
<b>Bi carbonato de sodio</b>	0,24

<sup>1</sup>Rovimix® Lecheras, DSM Nutritional Products Ltd. Basilea, Suiza.

<sup>2</sup>Teknamix® Vacas Lecheras, Teknal, Nutrición Animal.

**Tabla 2.** Composición química (base seca) de la RTM y sus ingredientes y alfalfa (*Medicago sativa*)

	<b>RTM</b>	<b>Alfalfa</b>	<b>Grano de maíz</b>	<b>Silo de maíz</b>	<b>Harina de soja</b>
<b>MS</b>	36,65	18,39	88,08	36,10	88,84
<b>PB</b>	22,15	20,66	8,35	8,94	46,52
<b>FND</b>	32,20	35,58	14,83	52,08	14,78
<b>FAD</b>	20,87	27,13	4,47	32,31	11,75
<b>ENL/kg MS</b>	1,57	1,55	-	-	-

MS- Materia seca; PB- Proteína bruta; FDN- Fibra detergente neutro; FDA- Fibra detergente ácido; ENL- Energía Neta de lactación.

## 7.2 Mediciones y Metodologías

### **Consumo de nutrientes**

Durante el período de medición de consumo de cada período se colectaron muestras diarias de la RTM y la pastura ofrecida y rechazada por los animales, que se utilizaron para confeccionar una muestra compuesta para cada período. Las muestras compuestas fueron congeladas, luego secadas a estufa a 55°C y se molieron en un molino con tamaño de malla de 1 mm. Se determinó el contenido de MS, cenizas, Materia orgánica (**MO**= 100 -% cenizas), PB (N x 6,25) según (AOAC, 1990), FDN y FDA de acuerdo con la técnica descrita por Robertson y Van Soest (1981), usando un analizador de fibra Ankom220 (Ankom Technology Corp. Fairport, NY, USA). Todas las muestras se analizaron por duplicado, aceptando coeficientes de variación entre análisis del 3 al 5 % según el parámetro.

Durante 5 días de cada período de mediciones se determinó el consumo individual diario de alimentos tanto de la RTM como del forraje fresco. La RTM por diferencia de peso entre la cantidad total de alimento ofrecido y rechazado por animal. Los animales con acceso a pastoreo fueron alojados en franjas individuales. Se determinó el consumo de pastura por diferencia entre lo ofrecido y rechazado mediante corte con una cortadora de césped, a 5 cm del suelo, 5m<sup>2</sup> del área individual asignada de pastoreo al ingreso (oferta) y 5% del área asignada a la salida de los animales (rechazo). Tanto el alimento ofrecido como rechazado se congeló a -20°C para su posterior análisis de composición química. A partir del análisis de composición química de los alimentos, se determinó el consumo de cada fracción de los alimentos.

### **Producción y composición de la leche**

La producción de leche se determinó durante cinco días de cada período de mediciones en los dos ordeños con lactómetros manuales (Tru-test by Tru-test Limited. New Zeland). Se colectaron muestras individuales de leche en 4 ordeños consecutivos de cada período de mediciones, utilizándose bronopol como conservante, para posteriormente determinar el contenido de grasa, proteína, caseína total y lactosa. La producción de leche corregida por grasa se calculó de la forma descrita por Tyrrell y Reid (1965), como  $(LCG 3.5\% = 0,4324 \times \text{leche (kg)} + 16,218 \times \text{Grasa (kg)})$ .

Adicionalmente se tomaron muestras de leche sin conservante, las cuales fueron congeladas a -20° C para posterior determinación del perfil de ácidos grasos en la leche. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y la extracción de la materia grasa se realizó de acuerdo con lo descrito por Feng y col. (2004). Una alícuota de 50 mg de la grasa extraída fue disuelta en 100 µL de hexano, seguido de una esterificación con 100 µL de 2 N hidróxido de potasio en metanol para la obtención de éster metílico de ácidos grasos (**FAME**, por sus siglas en inglés) luego fueron separados y cuantificados usando GC-MS. Los ácidos grasos se identificaron comparando los tiempos de retención con FAME standards: 37 componentes FAME Mix (47885, Supelco, Bellefonte, PA), trans-11 octadienoico metil ester (46905-U,

Supelco), y ácido octadecadienoico metil ester conjugado (O5632, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y con la base del National Institute of Standards and Technology (US Government library). El índice de  $\Delta 9$ -desaturasa y el índice de aterogenicidad se calcularon de la forma descrita por Kelsey y col. (2003) y Ulbricht y Southgate (1991), respectivamente.

### ***Eficiencia de utilización de la materia seca, el nitrógeno y la energía para producción de leche, balance de energía.***

La concentración de energía neta de lactación (**ENL**) fue calculada para la alfalfa y la RTM según la composición química descrita y las características de las vacas (PV, producción de sólidos y días en leche) utilizando el software del NRC (2001). El consumo de ENL se calculó como el producto entre los kg consumidos de cada alimento por su concentración energética para cada tratamiento. La eficiencia aparente de utilización de energía consumida para producción de leche se calculó como el cociente entre el total de energía secretada en leche (Mcal/día) y la cantidad de energía total consumida (Mcal/día) x 100 (Phoung y col., 2013).

El balance de energía (**BE**) se calculó de la forma descrita por Mendoza y col. (2016a) como:

$BE \text{ (Mcal de ENL/d)} = \text{consumo de energía (Mcal de ENL/d)} - (\text{requerimientos de mantenimiento (Mcal de ENL/d)} + \text{requerimientos de lactación (Mcal de ENL/d)})$ .

Los requerimientos de mantenimiento fueron calculados como el producto entre 0,08 y el  $PV^{0,75}$  (peso metabólico). El PV fue medido con una balanza de cajón al inicio del experimento y al final de cada período de mediciones, y el promedio de cada período fue usado para el cálculo. Los requerimientos de lactación se calcularon como:

$\text{Producción de leche} \times (0,0929 \times \% \text{ grasa} + 0,0547 \times \% \text{ PB} + 0,0395 \times \% \text{ lactosa}),$

Se utilizó para los cálculos la composición promedio de cada período.

La ECA se calculó como:

$ECA = \text{kg de } 3,5\% \text{ LCG por día} / \text{kg de MS consumida por día.}$

La EUN se calculó de la manera sugerida por Phoung y col. (2013) como el cociente entre N secretado en leche (gr/día) y el total de N consumido (gr/día) x 100.

### **7.3 Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados con la versión 9.0 del software de SAS (SAS Institute Inc, Cary, NC, EE.UU.). Los datos fueron sometidos inicialmente a un análisis para detectar valores atípicos y para comprobar la normalidad de los residuales mediante procedimientos univariantes (PROC UNIVARIATE).

Los datos de las variables con una medición en cada período como CMS, producción y composición de la leche, perfil de AG, ECA, EUN, Eficiencia aparente

de utilización de la energía y BE se analizaron utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS (2002) de acuerdo al modelo lineal mixto:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + V_j(C_i) + P_k + T_l + e_{ijkl},$$

Donde  $\mu$  es el promedio general,  $Y_{ijkl}$  es la variable dependiente,  $C_i$  es el efecto aleatorio del cuadrado,  $V_j(C_i)$  efecto variable de vaca dentro del cuadrado,  $P_k$  efecto aleatorio del período,  $T_l$  el efecto fijo del tratamiento y  $e_{ijkl}$  es el error residual.

Los datos de consumo de nutrientes fueron adaptados con el paquete estadístico SAS (versión 9.0, SAS Institute INC., Cary, NC, USA). Utilizándose el modelo PROC MIXED:

$$Y_{ijklm} = \mu + C_i + V_j(C_i) + P_k + T_l + H_m + T_l \times H_m + e_{ijklm},$$

Donde  $\mu$  es el promedio general,  $Y_{ijklm}$  es la variable dependiente,  $C_i$  es el efecto aleatorio del cuadrado,  $V_j(C_i)$  efecto de vaca dentro del cuadrado,  $P_k$  efecto aleatorio del período,  $T_l$  el efecto fijo del tratamiento,  $H_m$  efecto fijo de la hora,  $T_l \times H_m$  efecto fijo de la interacción del tratamiento x la hora y  $e_{ijklm}$  es el error residual.

Las medias de todos los parámetros evaluados fueron comparadas mediante el test de Tukey. Se aceptaron como diferencias significativas valores de P inferiores o iguales a 0,05 y como tendencia valores de P mayores a 0,05 y menores a 0,1.

## 8. RESULTADOS

En la Tabla 3 se presentan los datos de consumo de nutrientes para los distintos tratamientos.

**Tabla 3.** Consumo de MS en vacas lecheras alimentadas con RTM o una dieta mixta con diferente distribución del tiempo de pastoreo.

	Tratamientos <sup>1</sup>			EEM	P
	RTM + 0h	RTM +2x4h	RTM +8h		Tratamiento
<b>CMS(kg/d)</b>					
<b>Alfalfa</b>	0,00 <sup>c</sup>	8,18 <sup>a</sup>	6,99 <sup>b</sup>	0,266	0,0001
<b>RTM</b>	23,26 <sup>a</sup>	13,51 <sup>b</sup>	12,43 <sup>b</sup>	0,801	0,0001
<b>Total</b>	23,26 <sup>a</sup>	21,7 <sup>ab</sup>	19,41 <sup>b</sup>	0,839	0,0259

<sup>a,b,c</sup> En una misma fila, valores con diferente superíndice son diferentes ( $p < 0,05$ ). EEM: error estándar de las medias.

<sup>1</sup>Tratamientos: RTM + 0h: 22 h de acceso a RTM; RTM + 8h: 14 h de acceso a RTM más 8 h de acceso a pastura de alfalfa; RTM + 2x4h: 14 h de acceso a RTM más dos sesiones de pastoreo de 4 h.

La ingesta de pastura fue cercana al 38% del total de MS consumida en los tratamientos con inclusión de pastura en la dieta.

Las vacas que pastorearon la alfalfa en 2 sesiones lograron un CMS similar al de las que consumieron sólo RTM (21,7 y 23,26 kg/MS/d, respectivamente). Sin embargo, las que pastorearon en una sola sesión continua consumieron 3,85 kg MS/d menos que las vacas en el tratamiento RTM.

Respecto al CMS de pastura, las vacas que pastorearon en dos sesiones diarias consumieron 1,2 kg/MS/d más que las que tuvieron una sola sesión de pastoreo ( $p < 0,05$ ). Las vacas en el tratamiento RTM + 0h consumieron 46,5% y 42% más RTM que las vacas en RTM + 8h y RTM + 2x4h respectivamente, pero no se encontraron diferencias en CMS de RTM entre los tratamientos RTM + 8h y RTM + 2x4h.

En la Tabla 4 se presentan los resultados de producción y composición láctea. No se encontraron diferencias en producción de leche ni en su contenido de grasa, proteína y lactosa entre los tratamientos.

**Tabla 4.** Producción y composición láctea en vacas lecheras consumiendo RTM o una dieta mixta con diferente distribución del tiempo de pastoreo.

	Tratamientos <sup>1</sup>			EEM	P
	RTM + 0h	RTM + 2x4h	RTM + 8h		Tratamiento
<b>Leche (L/día)</b>	24,1	26,2	24,8	2,010	0,5835
<b>3.5% LCG (L/d)<sup>2</sup></b>	27,4	28,6	27,5	2,153	0,7040
<b>Grasa (kg/d)</b>	1,05	1,07	1,04	0,083	0,8508
<b>Grasa (%)</b>	4,33	4,04	4,28	0,165	0,4225
<b>Proteína (kg/d)</b>	0,89	0,91	0,88	0,065	0,8402
<b>Proteína (%)</b>	3,77	3,54	3,57	0,105	0,2410
<b>Lactosa (kg/d)</b>	1,16	1,26	1,20	0,100	0,6198
<b>Lactosa (%)</b>	4,77	4,78	4,81	0,037	0,6678

<sup>1</sup>Tratamientos: RTM + 0h: 22 h de acceso a RTM; RTM + 8h: 14 h de acceso a RTM más 8 h de acceso a pastura de alfalfa; RTM + 2x4h: 14 h de acceso a RTM más dos sesiones de pastoreo de 4 h.

<sup>2</sup>LCG 3,5% =  $0,4324 \times \text{leche (kg)} + 16,218 \times \text{Grasa (kg)}$

En la Tabla 5 se presentan los resultados del balance de energía y la eficiencia de utilización de la energía y el N.

**Tabla 5.** Balance de energía, eficiencia aparente de utilización de la energía y del N para producción de leche, en vacas lecheras consumiendo RTM o una dieta mixta con diferente distribución del tiempo de pastoreo.

	Tratamientos <sup>1</sup>			EEM	P
	RTM+0h	RTM+2x4h	RTM+8h		Tratamiento
<b>Consumo de ENL (Mcal / día)</b>	36,2 <sup>a</sup>	33,8 <sup>ab</sup>	30,3 <sup>b</sup>	1,3157	0,0230
<b>Concentración de ENL, Mcal / kg MS</b>	1,5699 <sup>a</sup>	1,5603 <sup>b</sup>	1,5606 <sup>b</sup>	0,000526	<0,001
<b>ENL excretada en leche (Mcal/d)</b>	21,8	21,9	21,5	1,7268	0,9335
<b>Balance ENL (Mcal/d)</b>	5,30 <sup>x</sup>	2,77 <sup>xy</sup>	-0,36 <sup>y</sup>	2,2333	0,0774
<b>ENL leche/ ENL consumida<sup>2</sup></b>	0,62	0,66	0,70	0,06263	0,3964
<b>Eficiencia de conversión del alimento<sup>3</sup></b>	1,24	1,35	1,42	0,12	0,3335
<b>Consumo de N (g/d)</b>	822,2 <sup>a</sup>	749,2 <sup>ab</sup>	673,9 <sup>b</sup>	28,6391	0,0097
<b>Excreción de N en leche (g/d)</b>	211,6	210,4	203,9	14,6	0,7478
<b>EUN (%)<sup>4</sup></b>	27,1	29,0	31,4	2,5274	0,2286

<sup>a,b,c</sup> En una misma fila, valores con diferente superíndice son diferentes ( $p < 0,05$ ).

<sup>y, x</sup> En una misma fila, valores con diferente superíndice indican tendencia ( $0,05 > p > 0,1$ ).

<sup>1</sup>Tratamientos: RTM + 0h: 22 h de acceso a RTM; RTM + 8h: 14 h de acceso a RTM más 8 h de acceso a pastura de alfalfa; RTM + 2x4h: 14 h de acceso a RTM más dos sesiones de pastoreo de 4 h.

<sup>2</sup> Eficiencia aparente de la utilización de ENL para producción de leche.

<sup>3</sup> ECA = 3,5% LCG (kg/d)/CMS (kg/d).

<sup>4</sup> Eficiencia de utilización del N = N consumido (g/d)/ N excretado en leche (g/d) x 100.

Existió una diferencia en el consumo de ENL (Mcal/día). Las vacas en el tratamiento RTM + 0h consumieron 5,94 Mcal/d más que las vacas en RTM + 8h ( $p < 0,05$ ). El consumo de ENL (Mcal/ kg MS) fue superior para las vacas que consumieron únicamente RTM y similar entre las que consumieron una dieta mixta ( $p < 0,001$ ). No se encontraron diferencias entre los tratamientos en cuanto a la ENL excretada en leche (Mcal/d) ni en la Eficiencia aparente de utilización de la ENL para producción de leche.

Respecto al balance de energía, el tratamiento RTM + 0h tendió a presentar un balance más positivo respecto a RTM + 8h, mientras que RTM + 2x4h tuvo un valor intermedio y no difirió de los otros tratamientos. RTM + 8h mostró un BE neutro.

No se observaron diferencias en la ECA entre los tratamientos. Sin embargo, existieron diferencias en el consumo de N, donde el tratamiento RTM + 0h consumió 148,35 g de N/d más que RTM+8h ( $p < 0,05$ ). No se observaron diferencias entre RTM + 0h y RTM + 2x4h ni entre este último y RTM + 8h. La excreción de N en leche no varió entre los tratamientos, así como tampoco se encontraron diferencias en la EUN, que promedió 29% entre los tres tratamientos.

En la Tabla 6 se muestra el perfil de AG de la leche de las vacas en los tres tratamientos.

**Tabla 6.** Perfil de ácidos grasos de la leche de vacas lecheras consumiendo RTM o una dieta mixta con diferente distribución del tiempo de pastoreo.

	Tratamientos <sup>1</sup>			EEM	P
	RTM+0h	RTM+2x4h	RTM+8h		Tratamiento
<b>AG seleccionados (g/100g)</b>					
<b>C4:0</b>	1,292	1,354	1,765	0,275	0,459
<b>C6:0</b>	1,305	1,563	1,801	0,226	0,3478
<b>C8:0</b>	1,039	1,283	1,340	0,154	0,3918
<b>C10:0</b>	2,943	3,668	3,591	0,373	0,368
<b>C12:0</b>	4,064	4,570	3,882	0,401	0,4929
<b>C14:0</b>	13,4	13,9	12,4	0,867	0,5033
<b>C14:1 cis-9</b>	1,239	1,209	1,263	0,086	0,8943
<b>C16:0</b>	40,9 <sup>x</sup>	37,7 <sup>y</sup>	37,3 <sup>y</sup>	1,201	0,0638
<b>C16:1 cis-9</b>	1,948	1,904	1,979	0,149	0,9338
<b>C17:0</b>	0,524 <sup>x</sup>	0,446 <sup>y</sup>	0,461 <sup>y</sup>	0,026	0,0891
<b>C18:0</b>	7,939	8,077	8,086	0,5626	0,98
<b>C18:1 trans 9</b>	0,139	0,132	0,098	0,0222	0,4219
<b>C18:1 11 trans</b>	0,96 <sup>b</sup>	1,67 <sup>a</sup>	1,22 <sup>b</sup>	0,1879	0,0381
<b>C18:1cis9</b>	17,9	18,1	18,8	0,9146	0,7753
<b>C18:2</b>	1,610	1,223	1,417	0,1164	0,1089
<b>C18:2 cis9,11trans</b>	0,391 <sup>y</sup>	0,605 <sup>x</sup>	0,467 <sup>xy</sup>	0,0745	0,099
<b>C18:3 cis-9, cis-12, cis-15</b>	0,212	0,246	0,271	0,0436	0,6503
<b>C20:0</b>	0,137	0,244	0,085	0,075	0,3589
<b>Suma por saturación (%)</b>					
<b>SFA</b>	75,1	74,3	73,9	1,162	0,776
<b>MUFA</b>	22,6	23,5	23,8	1,0165	0,6841
<b>PUFA</b>	2,219	2,072	2,142	0,182	0,8585
<b>Relación : Saturados - Insaturados</b>	3,122	3,043	2,882	0,1804	0,6561
<b>Relación : n-6 : n 3<sup>2</sup></b>	10,1	9,3	7,6	2,767	0,815
<b>Indice de Δ9-desaturasa</b>	0,054	0,056	0,059	0,0033	0,5837
<b>Indice de aterogenicidad <sup>3</sup></b>	4,115	4,046	3,538		0,295
<b>Ácidos grasos trans (%)</b>					
<b>C18:1 11trans</b>	1,76 <sup>b</sup>	2,75 <sup>a</sup>	2,10 <sup>b</sup>	0,2442	0,0273
<b>C18:2 9cis,11trans</b>	0,95 <sup>b</sup>	1,67 <sup>a</sup>	1,22 <sup>ab</sup>	0,1879	0,0381
<b>C18:2 9cis,11trans</b>	0,391 <sup>y</sup>	0,605 <sup>x</sup>	0,467 <sup>xy</sup>	0,0739	0,099

<sup>a, b</sup> Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

<sup>x, y</sup> Letras diferentes en una misma fila indican tendencia ( $0,05 > p < 0,10$ ).

<sup>1</sup> Tratamientos: RTM + 0h: 22 h de acceso a RTM; RTM + 8h: 14 h de acceso a RTM más 8 h de acceso a pastura de alfalfa; RTM + 2x4h: 14 h de acceso a RTM más dos sesiones de pastoreo de 4 h.

<sup>2</sup> Calculado como:  $(14:1 \text{ cis-9} + 16:1 \text{ cis-9} + 18:1 \text{ cis-9} + 18:2 \text{ cis-9,trans-11}) / (14:0 + 16:0 + 18:0 + 18:1 \text{ trans-11} + 14:1 \text{ cis-9} + 16:1 \text{ cis-9} + 18:1 \text{ cis-9} + 18:2 \text{ cis-9,trans-11})$ .

<sup>3</sup> Calculado como:  $(12:0 + 4 \times 14:0 + 16:0) / (\text{MUFA} + \text{PUFA})$ .

En relación al perfil de AG de la grasa láctea, el tratamiento con dos sesiones de pastoreo presentó un mayor contenido de ácidos grasos trans (insaturados de cadena larga), 36% y 24% superior al de la leche de las vacas que consumieron únicamente RTM y aquellas con una sola sesión de pastoreo, respectivamente ( $p < 0,05$ ) (Tabla 6). Sin embargo, no se observó diferencia en el contenido de ácidos grasos trans entre RTM + 0h y RTM + 8h. El tratamiento con dos sesiones de pastoreo, presentó un contenido de AV (C: 18:1 11 trans) 43% y 27% superior a solo RTM y al tratamiento con una sesión de pastoreo, respectivamente ( $p < 0,05$ ). No se encontraron diferencias entre RTM + 0h y RTM + 8h. Existió una tendencia a un mayor contenido de AR (C18:2 cis 9, 11trans) en la leche de las vacas con dos sesiones de pastoreo de alfalfa ( $p < 0,10$ ). Se observó una tendencia ( $p < 0,10$ ) a un mayor contenido de AG saturados de cadena larga (C: 16:0 y C: 17:0) en el tratamiento que consumió únicamente RTM respecto a los tratamientos con inclusión de pastura en la dieta, aunque no se encontraron diferencias en el contenido de AG saturados totales (SFA) entre los tratamientos.

No se observaron diferencias en el contenido total de MUFA y PUFA en la leche entre los tratamientos.

## 9. DISCUSIÓN

La distribución del tiempo de acceso al pastoreo en dos sesiones de 4 horas (RTM+2x4h) contribuyó a mantener el CMS total respecto a una dieta exclusivamente RTM, cumpliéndose así parte de la hipótesis planteada.

Las vacas en RTM+2x4h lograron mantener el CMS total gracias a un mayor CMS de la pastura, ya que consumieron 9,75 kg/MS de RTM menos que RTM+0h ( $p < 0,05$ ). Las vacas con una sesión de pastoreo y RTM consumieron 10,83 kg/MS menos que RTM+0h pero no lograron compensar ese menor consumo de RTM a través del consumo de pastura. En este sentido, para el tratamiento con dos sesiones de pastoreo de alfalfa el CMS de pastura fue 1,2 kg/MS/d (15%) superior respecto al tratamiento con una sesión de pastoreo ( $p < 0,05$ ). Estos resultados concuerdan con los reportados por Dall-Orsoletta y col. (2016), que al comparar una sesión de 6 h de acceso al pastoreo vs dos sesiones de 3 h encontraron un aumento del CMS de 1,4 kg de MS/vaca/día para el tratamiento con distribución del tiempo de pastoreo. Otros autores han reportado incrementos de 2 kg de MS/vaca/día al distribuir el acceso al pastoreo en dos sesiones de 4 h en comparación con una sesión de 8 h (Clark y col., 2010).

En nuestro experimento, el mayor CMS de pastura en RTM+2x4h pudo deberse a que las vacas tuvieron su primera sesión de pastoreo durante la mañana iniciando a las 0700 am y la segunda sesión luego del ordeño de la tarde, por lo que tuvieron mayor acceso a horas luz, donde se desarrolla el 65 a 100% de la actividad de pastoreo (Krysl y Hess, 1993). A diferencia de RTM+2x4h, las vacas en RTM+8h

comenzaron su única sesión de pastoreo luego del ordeño de la tarde, momento del día en el que los animales aumentan su actividad de pastoreo. Sin embargo, durante la noche, esta actividad disminuye, predominando la rumia y el descanso (Chilibroste, 2002). Como parte de otra tesis dentro del mismo experimento, se evaluó el comportamiento ingestivo de los animales, y se observó que las vacas en RTM+2x4h dedicaron más tiempo a pastorear (32,6%) que las vacas en RTM+8h (27,4%) (López, 2016, sin publicar).

Según el modelo propuesto por Buckmaster y col. (1997) y Delagarde y col. (2004), 8 horas de acceso al pastoreo es suficiente para alcanzar un CMS similar al de aquellos animales a los que no se les restringe el tiempo de acceso a la pastura. Esto sugiere que en el presente estudio las vacas que tuvieron acceso a una sesión de pastoreo de 8 h no estuvieron limitadas en términos de tiempo de acceso a la pastura, pero pudieron estar limitadas por otros factores, como el bajo contenido de MS de la pastura (18,39% MS) (Cabrera y col., 2004; Mendoza y col., 2016b), que podría no haber permitido compensar y alcanzar el CMS total de RTM+0h. Además, el CMS pudo verse afectado por el requisito de rumiar y descansar, en conflicto con su necesidad de aumentar su tasa de CMS mientras se encontraban en pastoreo (Clark et al. 2010). En este sentido, en nuestro experimento se observó que el tiempo dedicado a desplazarse tuvo una tendencia mayor en RTM+8h (0,029 vs 0,021,  $p=0,06$ ), así como el tiempo de rumia fue mayor que en RTM+2x4h (0,333 vs 0,313,  $p=0,01$ ) (López, 2016, sin publicar).

En nuestro experimento, la oferta de pastura fue de 14 kg/MS/vaca/d, lo que pudo haber contribuido al menor CMS en RTM + 8h, ya que según Bargo y col. (2002), para maximizar el consumo de pastura se debería ofrecer dos veces el CMS de pastura objetivo. En este sentido, Bargo y col. (2002) reportaron que las vacas alimentadas con una dieta mixta con una oferta de pastura de 15 kg de MS/v/d, consumieron 1,5 kg/MS/día menos que las vacas en el tratamiento RTM. Así mismo, en otro estudio donde se utilizó una pradera mezcla y esa misma oferta de pastura, se reportó una disminución en el CMS total de 4,5 kg/MS/día en el tratamiento con dieta mixta, respecto a una dieta RTM (Fajardo y col., 2015).

En nuestro experimento, al incluir una pastura de alfalfa de buena calidad en una dieta mixta, se logró que los animales del tratamiento RTM+2x4h consumieran un 38% de la MS de pastura sin deprimir el CMS total respecto a una dieta exclusivamente RTM. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Morales-Almaráz y col. (2010), quienes reportaron un CMS total similar al incluir un 37% de la MS de una pastura de alta calidad en comparación con una dieta exclusivamente RTM. En un trabajo nacional, Pastorini y col. (2019) reportaron un 29% como inclusión óptima de pastura en una dieta mixta sin causar una depresión en el CMS total. Otros trabajos han reportado CMS de pastura de 41% y 46% en dietas mixtas sin afectar el CMS total (Vibart y col., 2008; Dall-Orsoletta y col., 2016).

Una de las limitantes para lograr altos CMS de pastura es el llenado físico del rumen, determinado por el consumo de FDN en función del PV que, según Mertens (1994) ocurre cuando éste supera el 1,25% en vacas lecheras. Bargo y col. (2002) reportaron un consumo de FDN de 1,38% del PV en el tratamiento con dieta mixta,

lo que podría haber limitado el CMS total. En nuestro experimento, los tratamientos RTM+0h, RTM+2x4h y RTM+8h tuvieron un consumo de FDN de 1,28%, 1,25% y 1,12% del PV, respectivamente. Por lo tanto, el menor CMS total que presentó RTM+8h respecto a RTM+0h no podría explicarse por un llenado físico del rumen.

Las vacas con acceso al pastoreo, en una o dos sesiones, mantuvieron una producción láctea similar a aquellas que consumieron RTM exclusivamente. En otros experimentos se han reportado resultados similares en cuanto a producción láctea entre tratamientos con RTM y dietas mixtas con inclusión de pastura de alrededor de 30% de la MS total (Morales- Almaráz y col., 2010; Dall-Orsoletta y col., 2016, Pastorini y col., 2019).

En este sentido, varios autores afirman que cuando no existe diferencia en CMS y consumo de nutrientes entre los tratamientos con RTM y dietas mixtas, no se observan diferencias en producción de leche (Vibart y col., 2008; Mendoza y col., 2016a). Esto podría explicar la ausencia de diferencias entre RTM+0h y RTM+2x4h, ya que ambos tratamientos presentaron un CMS total similar. A su vez RTM+2x4h y RTM+8h tampoco mostraron diferencias en CMS total, pudiendo explicar esto la ausencia de diferencia en producción de leche entre estos tratamientos. Sin embargo, a pesar de que las vacas en RTM+8h consumieron 16,5% menos MS que las vacas en RTM+0h, no se encontraron diferencias en producción de leche entre estos tratamientos.

Estos resultados son opuestos a los reportados por Bargo y col. (2002), quienes al comparar el CMS y la producción de leche entre vacas consumiendo RTM o una dieta mixta, observaron que las vacas del tratamiento 100% RTM produjeron 19% más leche que las vacas que consumieron una dieta mixta y esta diferencia la atribuyeron a un mayor CMS en RTM vs RTM más acceso al pastoreo (26,7 vs 25,2 kg/MS,  $p=0,01$ ).

Uno de los factores más críticos que explican las diferencias en producción de leche es la calidad de las pasturas (Kennedy y col., 2009). En nuestro experimento se utilizó una pastura de buena calidad, que pudo contribuir a mantener la producción láctea a pesar del menor CMS. Cuando Vibart y col. (2008) utilizaron una pastura en un estado de madurez mayor y con menor contenido de PB que en un experimento previo donde no reportaron diferencias en producción de leche, observaron una disminución lineal de la producción a medida que aumentó la proporción de pastura en la dieta.

Respecto al consumo de ENL (Mcal/d) (Tabla 5), fue mayor para las vacas en RTM+0h y RTM+2x4h respecto a RTM+8h. Esta diferencia es resultado de un mayor CMS, ya que la variación en el consumo de ENL (Mcal/kg MS) entre los tratamientos es mínima. Dall-Orsoletta y col. (2016) también atribuyen la ausencia de diferencias en producción de leche entre los tratamientos RTM, RTM+6h y RTM+2x3h a un adecuado y similar consumo de ENL entre ellos.

A diferencia de lo reportado por Dall-Orsoletta y col. (2016), en nuestro experimento el BE no varió entre los tratamientos, pero presentó una tendencia mayor ( $p=0,07$ ) en RTM+0h y RTM+2x4h. Las vacas en RTM+8h tuvieron un BE cercano a 0 Mcal/d, indicando que tanto el CMS como el de ENL fueron apenas suficientes para cubrir los requerimientos de mantenimiento y producción de las vacas en ese tratamiento.

Las vacas en el tratamiento RTM+0h presentaron el mayor BE, pero esto no tuvo como respuesta una mayor producción de leche. El mantenimiento de la producción de leche con la inclusión de pasturas en la dieta está estrechamente relacionado no solo con el CMS y energía, sino también con la etapa de lactancia y el potencial de producción de los animales (Dall-Orsoletta y col., 2016). En lactancias avanzadas (mayores a 100 días en leche) una porción de la energía consumida se usa para recuperar reservas corporales (Yan y col., 2006). Según Kirkland y Gordon (2001), la ENL excretada en leche en relación a la ENL consumida muestra disminuciones significativas con el avance de la lactancia (proporcionalmente 44,3 vs 22,1 y 12,4% para vacas en lactancia temprana, media y tardía, respectivamente). En nuestro experimento, las vacas se encontraban en lactancia media (193 días en leche), lo que explica parcialmente la falta de respuesta entre los tratamientos en la Eficiencia aparente de utilización de la ENL consumida para producción de leche.

Otros autores tampoco han reportaron diferencias en la Eficiencia aparente de utilización de la ENL para producción de leche al comparar dietas RTM vs dietas mixtas (Bargo y col., 2002; Vibart y col., 2008), lo que sugiere que una pastura de buena calidad puede incluirse en la dieta de vacas de alta producción sin afectar esta variable (Mendoza y col., 2016a).

Al igual que lo ocurrido con la producción láctea, no se encontraron diferencias en la composición de la leche entre tratamientos. Esto concuerda con lo reportado por otros autores, que también utilizaron pasturas de buena calidad (Vibart y col., 2008; Pastorini y col., 2019) y no observaron una respuesta sobre la producción ni composición láctea con inclusión de pastura de 30% de la MS total.

En otros trabajos se ha reportado una disminución en el contenido de grasa en la leche al incluir pastura en la dieta, y ha sido atribuido a un menor contenido de FDN en la dieta mixta respecto a RTM (Dall-Orsoletta y col., 2016). A su vez, se ha reportado menor contenido de proteína en la leche de las vacas con acceso al pastoreo cuando el contenido de PB de la pastura es menor al de la RTM (Vibart y col., 2008) o cuando el tiempo de acceso al pastoreo es de 6 horas o menor no permitiendo un adecuado CMS (Kennedy y col., 2009).

Como se muestra en la Tabla 5, no hubo efecto del tratamiento sobre la ECA, pero fue numéricamente más baja para el tratamiento RTM+0h, en el que las vacas no lograron transformar el alto CMS en más producción de leche. El estado avanzado en la lactancia de las vacas en nuestro experimento pudo afectar la ECA de la MS consumida a leche, ya que en lactancias medias a tardías una alta proporción de los nutrientes de la dieta son utilizados para el mantenimiento de la preñez y el aumento de la condición corporal, en detrimento de la ECA (Britt y col., 2003).

Al igual que como ocurre con las otras variables mencionadas, el estado de lactación tiene una fuerte influencia sobre la EUN para producción de leche (Huhtanen y col., 2008). No se observaron diferencias en la excreción de N en leche entre los tratamientos ni en la EUN para producción de leche, lo que concuerda con lo reportado por Mendoza y col. (2016a). Por el contrario, Pastorini y col. (2019) encontraron una tendencia mayor en la EUN para producción de leche en las vacas en lactancia temprana ( $90 \pm 22$  días) que consumieron una dieta mixta con una

proporción de pastura del 50% respecto a las que consumieron la misma dieta pero con 75% de pastura o exclusivamente RTM.

La inclusión de pastura en la dieta y la distribución del pastoreo en dos sesiones de 4h resultó en un mayor contenido de AG trans en la leche respecto a una sesión de pastoreo o consumiendo exclusivamente RTM. Estos resultados concuerdan con los reportados por Vibart y col. (2008), Morales-Almaráz y col. (2010), Mendoza y col. (2016b) y Pastorini y col. (2019), quienes observaron que incluir pasturas en dietas RTM aumentó el contenido de AR y AV en la grasa láctea.

Este aumento en el contenido de AG trans en RTM + 2x4h está dado principalmente por un mayor contenido de AV (C: 18:1 11 trans), que resultó 43% superior a RTM+0h. Al igual que lo reportado por Bargo y col. (2006), el contenido de AV aumentó a medida que el CMS de pastura fue mayor. Es por esto que la leche de las vacas con dos sesiones de pastoreo presentó un 27% más AV que la leche de las vacas con una sesión de pastoreo de alfalfa.

Esta modificación en el perfil lipídico de la leche de las vacas con acceso a pastura puede deberse a un alto contenido de AL (C18:3 cis-9, cis-12, cis-15) en la pastura (Elgersma y col., 2006). La ingestión de AL aumenta la síntesis de AV en el rumen que es convertido en CLA en la glándula mamaria por la  $\Delta 9$ -desaturasa (Bauman y col., 2008).

A pesar de que el AL representa el 50 a 75% de los AG insaturados de cadena larga presentes en las pasturas (Dewhurst y col., 2006), en nuestro experimento no se observaron diferencias en su contenido en leche entre los tratamientos con acceso al pastoreo y el que consumió únicamente RTM.

De manera similar a lo reportado por Barca y col. (2018) no se observó un efecto del tratamiento sobre el contenido total de SFA, MUFA y PUFA en la leche. Sin embargo, se encontró una tendencia a un menor contenido de AG saturados de cadena larga (C: 16:0 y C: 17:0) en la leche de las vacas con acceso a pastura respecto a las que consumieron RTM exclusivamente. Esto, sumado al mayor contenido de AG trans, otorga a la leche de las vacas con acceso al pastoreo características más saludables, con efectos anticancerígenos y antiaterogénicos, entre otros (Elgersma y col., 2006).

## **10. CONCLUSIONES**

La distribución del pastoreo en dos sesiones de 4 horas diarias como parte de una dieta mixta para vacas lecheras, permitió mantener el consumo de materia seca total y la producción láctea respecto a una dieta exclusivamente de ración totalmente mezclada. Es posible incluir una pastura de alfalfa de buena calidad en una dieta mixta para vacas en lactancia media, sin afectar la producción de sólidos lácteos, la eficiencia de conversión del alimento en leche, el balance de energía, la eficiencia aparente de utilización de la energía y la eficiencia de utilización del nitrógeno para producción de leche.

El acceso a 8 horas de pastoreo de alfalfa como parte de una dieta mixta para vacas lecheras, llevó a que el consumo de materia seca de la pastura fuera 38% de la materia seca total consumida. Las vacas que consumieron una dieta mixta tuvieron una producción y composición láctea similar a las vacas que consumieron únicamente una ración totalmente mezclada.

La grasa láctea producida por las vacas que tuvieron acceso a dos sesiones de pastoreo de alfalfa presentó un nivel nutracéutico superior, con un mayor contenido de ácidos grasos trans, cuyos efectos beneficiosos para la salud humana son conocidos.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. A.O.A.C., (1995). Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of analysis. 15a ed. AOAC, Arlington VA, (1): 684 p.
2. Arelovich, H. M., Abney, C. S., Vizcarra, J. A., Galyean, M. L. (2008). Effects of dietary neutral detergent fiber on intakes of dry matter and net energy by dairy and beef cattle: analysis of published data. *The Professional Animal Scientist*, 24(5): 375-383.
3. Arndt, C., Powell, J. M., Aguerre, M. J., Crump, P. M., Wattiaux, M. A. (2015). Feed conversion efficiency in dairy cows: Repeatability, variation in digestion and metabolism of energy and nitrogen, and ruminal methanogens. *Journal of Dairy Science*, 98(6): 3938-3950.
4. Barca, J., Carriquiry, M., Olazabal, L., Fajardo, M., Chilbroste, P., Meikle, A. (2018). Milk fatty acid profile from cows fed with mixed rations and different access time to pastureland during early lactation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(3): 620-629.
5. Bargo, F. (2014). Eficiencia de utilización del nitrógeno en sistemas lecheros pastoriles. IAH15, p. 11-14. Disponible en: [http://www.ipni.net/publication/ia-lacs.nsf/0/3A721D9F8A377D9585257D55006A88C7/\\$FILE/11.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-lacs.nsf/0/3A721D9F8A377D9585257D55006A88C7/$FILE/11.pdf). Fecha de consulta: 10, 06, 2019.
6. Bargo, F., Delahoy, J. E., Schroeder, G. F., Baumgard, L. H., Muller, L. D. (2006). Supplementing total mixed rations with pasture increase the content of conjugated linoleic acid in milk. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3-4): 226-240.
7. Bargo, F., Muller, L. D., Delahoy, J. E., Cassidy, T. W. (2002). Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *Journal of Dairy Science*, 85(11): 2948-2963.
8. Bauman, D. E., Perfield, J. W., Harvatine, K. J., Baumgard, L. H. (2008). Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: Lactation and the ruminant model. *The Journal of Nutrition*, 138:403-409.
9. Beever, D. E., Doyle, P. T. (2007). Feed conversion efficiency as a key determinant of dairy herd performance: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 47(6): 645-657.
10. Britt, J. S., Thomas, R. C., Speer, N. C., Hall, M. B. (2003). Efficiency of converting nutrient dry matter to milk in Holstein herds. *Journal of Dairy Science*, 86(11): 3796-3801.
11. Buckmaster, D. R., Holden, L. A., Muller, L. D., Mohtar, R. H. (1997). Modeling intake of grazing cows fed complementary feeds. Proc. 18a International Grassland Congress, Winnipeg, Canada, 2(9): 134-139.
12. Cabrera Estrada, J. I., Delagarde, R., Faverdin, P., Peyraud, J. L. (2004). Dry matter intake and eating rate of grass by dairy cows is restricted by internal, but not external water. *Animal Feed Science and Technology*, 114(1-4): 59-74.
13. Cajarville C., Aguerre M., Echarri V., Repetto J.L. (2003). Ruminal degradation of cellwall constituents of lucerne as fresh forage and lucerne ensiled with different doses of fresh cheese whey as additive. Proc. of the IX World Conference on Animal Production, p. 26.
14. Cajarville C., Aguerre M., Repetto J.L. (2006a). Rumen pH, NH<sub>3</sub>-N concentration and forage degradation kinetics of cows grazing temperate

- pastures and supplemented with different sources of grain. *Animal Research*, 55: 511-520 12.
15. Cajarville C., Pérez A., Aguerre M., Britos A., Repetto J.L. (2006b). Effect of the timing of cut on ruminal environment of lambs consuming temperate pastures. *Journal of Dairy Science* (89), (Suppl. 1): 103.
  16. Cajarville, C., Britos, A., Caramelli, A., Antúnez, M., Zanoniani, R., Boggiano, P., Repetto, J. L. (2007). El horario de corte y el tipo de metabolismo fotosintético afectan la relación azúcares/nitrógeno de las pasturas. Departamento de Nutrición Animal, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, p. 2-5.
  17. Calsamiglia, S., Ferret, A., Reynolds, C. K., Kristensen, N. B., Van Vuuren, A. M. (2010). Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. *Animal*, 4(7): 1184-1196.
  18. Castillo, A. R., Kebreab, E., Beever, D. E., France, J. (2000). A review of efficiency of nitrogen utilisation in lactating dairy cows and its relationship with environmental pollution. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 9(1): 1-32.
  19. Chilbroste, P., (1998). Integración de patrones de consumo y oferta de nutrientes. Jornadas Uruguayas de Buiatría (26as., 1998, Paysandú, Uruguay). Trabajos presentados. Paysandú, Centro Médico Veterinario de Paysandú. s.p.
  20. Chilbroste, P., Soca, P., Mattiauda, D. (2012). Estrategias de alimentación en Sistemas de Producción de Leche de base pastoril. Pasturas 2012: Hacia una ganadería competitiva y sustentable. Balcarce: INTA, p. 91-100.
  21. Chilbroste, P., Soca, P., Mattiauda, D. A., Bentancur, O., Robinson, P. H. (2007). Short term fasting as a tool to design effective grazing strategies for lactating dairy cattle: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 47(9): 1075-1084.
  22. Chouinard, P. Y., Corneau, L., Barbano, D. M., Metzger, L. E., Bauman, D. E. (1999). Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *The Journal of Nutrition*, 129(8): 1579-1584.
  23. Clark, C. E. F., McLeod, K. L. M., Glassey, C. B., Gregorini, P., Costall, D. A., Betteridge, K., Jago, J. G. (2010). Capturing urine while maintaining pasture intake, milk production, and animal welfare of dairy cows in early and late lactation. *Journal of Dairy Science*, 93(5): 2280-2286.
  24. Clark, D. A., Kanneganti, V.R. (1998) Grazing management systems for dairy cattle. En: Cherney, JH; Cherney, DJR. *Grass for Dairy Cattle*. Oxon, CAB, p. 311-334
  25. Coppock, C. E., Bath, D. L., Harris Jr, B. (1981). From feeding to feeding systems. *Journal of Dairy Science*, 64(6): 1230-1249.
  26. Dall-Orsoletta, A. C., Almeida, J. G. R., Carvalho, P. C., Savian, J. V., Ribeiro-Filho, H. M. (2016). Ryegrass pasture combined with partial total mixed ration reduces enteric methane emissions and maintains the performance of dairy cows during mid to late lactation. *Journal of Dairy Science*, 99(6): 4374-4383.
  27. Delagarde, R., Faverdin, P., Baratte, C., Peyraud, J. L. (2004). Prévoir l'ingestion d'herbe et la production des vaches laitières: GrazeIN, un modèle pour raisonner l'alimentation au pâturage. *Renc. Rech. Rum*, 11: 295-298.
  28. Delagarde, R., O Donovan, M. (2005). Les modèles de prévision de l'ingestion journalière d'herbe et de la production laitière des vaches au pâturage. *Productions Animales-paris-institut National de la Recherche Agronomique*, 4(18): 241-253.

29. Dewhurst, R. J., Shingfield, K. J., Lee, M. R., Scollan, N. D. (2006). Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3-4): 168-206.
30. Dhiman, T. R., Anand, G. R., Satter, L. D., Pariza, M. W. (1999). Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *Journal of Dairy Science*, 82(10): 2146-2156.
31. DIEA. (2017). Anuario Estadístico Agropecuario. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/diea-anuario2017web01a.pdf>. Fecha de consulta: 02, 06, 2019.
32. DIEA. (2018). Anuario Estadístico Agropecuario. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias. Disponible en: [https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2018/Anuario\\_2018.pdf](https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2018/Anuario_2018.pdf). Fecha de consulta: 02, 06, 2019.
33. Dixon, R. M., Stockdale, C. R. (1999). Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilisation. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50(5): 757-774.
34. Doyle, P. T., Stockdale, C. R., Wales, W. J., Walker, G. P., Heard, J. W. (2001). Limits to optimising milk production and composition from pastures. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*, 13: 9-17. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1002.8045&rep=rep1&type=pdf>. Fecha de consulta: 06, 06, 2019.
35. Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T., Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 72(1): 68-78.
36. Elgersma, A. (2015). Grazing increases the unsaturated fatty acid concentration of milk from grass-fed cows: A review of the contributing factors, challenges and future perspectives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117: 1345–1369.
37. Elgersma, A., Tamminga, S., Ellen, G. (2006). Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3-4): 207-225.
38. Fajardo, M., Mattiauda, D. A., Motta, G., Genro, T. C., Meikle, A., Carriquiry, M., Chilbroste, P. (2015). Use of mixed rations with different access time to pastureland on productive responses of early lactation Holstein cows. *Livestock Science*, 181: 51-57.
39. Félix, A., Repetto, J. L., Hernández, N., Pérez-Ruchel, A., Cajarville, C. (2017). Restricting the time of access to fresh forage reduces intake and energy balance but does not affect the digestive utilization of nutrients in beef heifers. *Animal Feed Science and Technology*, 226: 103-112.
40. Feng S., Lock A.L., Garnsworthy P.C. (2004). Technical Note: A Rapid Lipid Separation Method for Determining Fatty Acid Composition of Milk. *Journal of Dairy Science*, 87: 3785-3788.
41. Garcia, S.C., Fulkerson, W.J. (2005). Opportunities for future Australian dairy systems a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45: 1041-1055.
42. Gekara, O. J., Prigge, E. C., Bryan, W. B., Nestor, E. L., Seidel, G. (2005). Influence of sward height, daily timing of concentrate supplementation, and

- restricted time for grazing on forage utilization by lactating beef cows. *Journal of Animal Science*, 83(6): 1435-1444.
43. Gibb, M. J., Huckle, C. A., Nuthall, R., Rook, A. J. (1997). Effect of sward surface height on intake and grazing behaviour by lactating Holstein Friesian cows. *Grass and Forage Science*, 52(3): 309-321.
  44. Gill, M., Romney, D. (1994). The relationship between the control of meal size and the control of daily intake in ruminants. *Livestock Production Science*, 39:13-18.
  45. Gregorini, P., Clark, C. E. F., Jago, J. G., Glassey, C. B., McLeod, K. L. M., Romera, A. J. (2009). Restricting time at pasture: effects on dairy cow herbage intake, foraging behavior, hunger-related hormones, and metabolite concentration during the first grazing session. *Journal of Dairy Science*, 92(9): 4572-4580.
  46. Griinari, J. M., Corl, B. A., Lacy, S. H., Chouinard, P. Y., Nurmela, K. V. V., Bauman, D. E. (2000). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta 9$ -desaturase. *The Journal of nutrition*, 130(9): 2285-2291.
  47. Hodgson J. (1990). *Grazing management; science into practice*. New York, Longman, 203 p.
  48. Hugly, S., Somerville, C. (1992). A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature. *Plant Physiology*, 99(1): 197-202.
  49. Huhtanen, P., Hristov, A. N. (2009). A meta-analysis of the effects of dietary protein concentration and degradability on milk protein yield and milk N efficiency in dairy cows. *Journal of dairy science*, 92(7), 3222-3232.
  50. Huhtanen, P., Nousiainen, J. I., Rinne, M., Kytölä, K., Khalili, H. (2008). Utilization and partition of dietary nitrogen in dairy cows fed grass silage-based diets. *Journal of Dairy Science*, 91(9): 3589-3599.
  51. Iba, L. (2002). Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 25–245.
  52. Jenkins, T. C., Wallace, R. J., Moate, P. J., Mosley, E. E. (2008). Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science*, 86(2): 397-412.
  53. Jonker, J. S., Kohn, R. A., Erdman, R. A. (1998). Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 81(10): 2681-2692.
  54. Kelly, M.L., Kolver, E.S., Bauman, D.E., Van Amburgh, M.E., Muller, L.D. (1998). Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 81: 1630–1636.
  55. Kelsey J.A., Corl, B.A., Collier, R.J., Bauman, D.E. (2003). The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86: 2588–2597.
  56. Kennedy, E., McEvoy, M., Murphy, J. P., O'donovan, M. (2009). Effect of restricted access time to pasture on dairy cow milk production, grazing behavior, and dry matter intake. *Journal of Dairy Science*, 92(1): 168-176.
  57. Kirkland, R. M., Gordon, F. J. (2001). The effects of stage of lactation on the partitioning of, and responses to changes in, metabolisable energy intake in lactating dairy cows. *Livestock Production Science*, 72(3): 213-224.

58. Kolver, E.S., Muller, L.D. (1998). Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, 81: 1403–1411.
59. Krysl, L. J., Hess, B. W. (1993). Influence of supplementation on behavior of grazing cattle. *Journal of Animal Science*, 71(9): 2546-2555.
60. Laca, E. A., Demment, M. W. (1996). Foraging strategies of grazing animals. En: Hodgson, J.; Illius, A. W. eds. *Ecology and Management of Grazing Systems*, p. 137-158.
61. Leddin, C.M., Stockdale, C.R., Hill, J., Heard, J.W., Doyle, P.T. (2010) Increasing amounts of crushed wheat fed with Persian clover herbage reduced ruminal pH and dietary fibre digestibility in lactating dairy cows. *Animal Production Science*, 50: 837–846.
62. Lock, A.L., Garnsworthy, P.C. (2002). Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. *Animal Science* 74: 163-176.
63. Lyons, R. K., Machen, R. V. (2000). Interpreting grazing behavior. Texas Agricultural Extension Service. Range Detect Series no 5385, p. 1-6.
64. Mendoza, A., Cajarville, C., Repetto, J. L. (2016a). Digestive response of dairy cows fed diets combining fresh forage with a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, 99(11): 8779-8789.
65. Mendoza, A., Cajarville, C., Repetto, J. L. (2016b). Short communication: Intake, milk production, and milk fatty acid profile of dairy cows fed diets combining fresh forage with a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, 99(3): 1938-1944.
66. Mertens, D.R. (1994) Regulation of forage intake. En: Fahey, G. Forage quality, evaluation and utilisation. Wisconsin, American Society of Agronomy, p. 450-493.
67. Morales-Almaráz, E., Soldado, A., González, A., Martínez-Fernández, A., Domínguez-Vara, I., de la Roza-Delgado, B., Vicente, F. (2010). Improving the fatty acid profile of dairy cow milk by combining grazing with feeding of total mixed ration. *Journal of Dairy Research*, 77(2): 225-230.
68. National Research Council. (2001). Nutrient requirements of dairy cattle. 7a ed. Washington, National Academy Press, 381 p.
69. Oetzel, G. (1998). Troubleshooting the High Intake Herd. DHMCP, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, p.18- 22.
70. Pariza, M. W. (1999). The biological activities of conjugated linoleic acid. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, 1: 12-20.
71. Pariza, M. W., Park, Y., Cook, M. E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*, 40(4): 283-298.
72. Pastorini, M., Pomiés, N., Repetto, J. L., Mendoza, A., Cajarville, C. (2019). Productive performance and digestive response of dairy cows fed different diets combining a total mixed ration and fresh forage. *Journal of Dairy Science*, 102(5): 4118-4130.
73. Pérez-Ramírez, E., Peyraud, J. L., Delagarde, R. (2009). Restricting daily time at pasture at low and high pasture allowance: effects on pasture intake and behavioral adaptation of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(7): 3331-3340.

74. Phoung H.N., Friggens N.C., de Boer I.J.M., Schmidely P. (2013). Factors affecting energy and nitrogen efficiency of dairy cows: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 96: 7245-7259.
75. Repetto J.L., Cajarville C., D'Alessandro J., Curbelo A., Soto C., Garín D. (2005). Effect of wilting and ensiling on ruminal degradability of temperate grass and legume mixtures. *Animal Research*. 54: 73-80
76. Robertson, J.B., Van Soest, P.J. (1981). The detergent system of analysis and its application to human foods. En: James, WPT; Theander, O. *The analysis of dietary fiber in food*. Nueva York, Dekker, p.123-158.
77. Rook, A. J., Huckle, C. A., Penning, P. D. (1994). Effects of sward height and concentrate supplementation on the ingestive behaviour of spring-calving dairy cows grazing grass-clover swards. *Applied Animal Behaviour Science*, 40(2): 101-112.
78. Routaboul, J., Skidmore, C., Wallis, J. G., Browse, J. (2012). Arabidopsis mutants reveal that short- and long-term thermotolerance have different requirements for trienoic fatty acids. *Journal of experimental botany*, 63: 1435–1443.
79. Santana, A. (2012) Inclusión de pastura templada en una dieta completamente mezclada en vaquillonas: efectos sobre el consumo, el aprovechamiento digestivo y metabólico. Tesis de Maestría en Nutrición de Rumiantes, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, 44 p.
80. Santana, A., Cajarville, C., Mendoza, A., Repetto, J. L. (2017). Combination of legume-based herbage and total mixed ration (TMR) maintains intake and nutrient utilization of TMR and improves nitrogen utilization of herbage in heifers. *Animal*, 11(4): 616-624.
81. SAS. 2002. Statistical Analysis Systems Institute. SAS Version 9. SAS.
82. Schroeder, G. F., Couderc, J. J., Bargo, F., Rearte, D. H. (2005). Milk production and fatty acid profile of milkfat by dairy cows fed a winter oats (*Avena sativa* L.) pasture only or a total mixed ration. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 48(2), 187-195.
83. Schroeder, G. F., Gagliostro, G. A., Bargo, F., Delahoy, J. E., Muller, L. D. (2004). Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: a review. *Livestock Production Science*, 86(1-3): 1-18.
84. Smith, D.G., Cuddeford, D., Pearson, A.J. (2006). The effect of extended grazing time and supplementary forage on the dry matter intake and foraging behaviour of cattle kept under traditional African grazing systems. *Tropical Animal Health Production*, 38: 75–84.
85. Soca, P. (2000). Efecto del tiempo de pastoreo y nivel de suplementación sobre el consumo, conducta y parámetros productivos de vacas lecheras. Tesis. M.Sc. Santiago de Chile, Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas, 98 p.
86. Soriano, F. D., Polan, C. E., Miller, C. N. (2001). Supplementing pasture to lactating Holsteins fed a total mixed ration diet. *Journal of Dairy Science*, 84(11): 2460-2468.
87. Sprunck, M., Mattiauda, D.A., Motta, G., Fajardo, M., Chilbroste, P., (2012). Response of postpartum dairy cows to contrasting feeding strategies: grazing plus supplements vs confinement on milk and solids production. *Journal of Dairy Science*, 95 (Suppl. 2): 486.

88. Stockdale, C.R., Callaghan, A., Trigg, T.E. (1987). Feeding high energy supplements to pasture-fed dairy cows, effects of stage of lactation and level of supplement. *Australian Journal of Agricultural Research* 38: 927–940.
89. Tozer, P. R., Bargo, F., Muller, L. D. (2003). Economic analyses of feeding systems combining pasture and total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, 86(3): 808-818.
90. Trevaskis, L. M., Fulkerson, W. J., Gooden, J. M. (2001). Provision of certain carbohydrate-based supplements to pasture-fed sheep, as well as time of harvesting of the pasture, influences pH, ammonia concentration and microbial protein synthesis in the rumen. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41(1): 21-27.
91. Tyrrell, H. F., Reid, J. T. (1965). Prediction of the energy value of cow's milk. *Journal of Dairy Science*, 48(9): 1215-1223.
92. Ulbricht, T.L.V., Southgate D.A.T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet*, 338: 985–992.
93. USDA (2013). *Agricultural Statistics*. National Agricultural Statistics Service. United States Government Printing Office Washington. Disponible en: [https://www.nass.usda.gov/Publications/Ag\\_Statistics/2013/Agricultural\\_Statistics\\_2013.pdf](https://www.nass.usda.gov/Publications/Ag_Statistics/2013/Agricultural_Statistics_2013.pdf). Fecha de consulta: 10, 06, 2019.
94. Vibart, R. E., Burns, J. C., Fellner, V. (2010). Effect of replacing total mixed ration with pasture on ruminal fermentation. *The Professional Animal Scientist*, 26(4): 435-442.
95. Vibart, R. E., Fellner, V., Burns, J. C., Huntington, G. B., Green, J. T. (2008). Performance of lactating dairy cows fed varying levels of total mixed ration and pasture. *Journal of Dairy Research*, 75(4): 471-480.
96. Wales, W.J., Doyle, P.T. (2003) Effect of grain and straw supplementation on marginal milk production responses and rumen function of cows grazing highly digestible subterranean clover pasture. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 43: 467–474.
97. Wales, W.J., Stockdale, C. R., Doyle, P. T. (2005). Plant and sward characteristics to achieve high intake in ruminants. *Proceedings of a Satellite Workshop of the XX International Grassland Congress*, p. 37-47.
98. Wales, WJ; Marret, LC; Greenwood, JS; Wright, MM; Thornhill, JB; Jacobs, JL; C.K.M.Ho; Auld, MJ. (2013) Use of partial mixed rations in pasture based dairying in temperature regions of Australia. *Animal Production Science*, 53: 1167-1178.
99. Walker, G.P., Stockdale, C.R., Wales, W.J., Doyle P.T., Dellow, D.W. (2001). Effect of level of grain supplementation on milk production responses of dairy cows in mid-late lactation when grazing irrigated pastures high in paspalum. *Paspalum dilatatum* Poir. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41: 1–11.
100. Weiss, W. P., W. L. Shockey. (1991). Value of orchardgrass and alfalfa silages fed with varying amounts of concentrates to dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 74: 1933.
101. Yan, T., Mayne, C. S., Keady, T. W. J., Agnew, R. E. (2006). Effects of dairy cow genotype with two planes of nutrition on energy partitioning between milk and body tissue. *Journal of Dairy Science*, 89: 1031–1042.