

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON TANINOS O DEL MOMENTO DE
PASTOREO SOBRE PARTICION DEL NITROGENO EN VACAS LECHERAS EN
LACTANCIA MEDIA**

“Por”

KETENJIAN GARABEDIAN, Yaneth Andrea
SPRUNCK REGEHR, Andrés Rubén

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

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:

MSc., Ing. Agr. Alejandro Mendoza

Segundo Miembro (Tutor):

DMTV. PhD. Cecilia Cajarville

Tercer Miembro:

DMTV. MSc. Alejandro Britos

Co-tutor:

PhD. Ing. Zoot. Claudio Pozo

Fecha:

15 de noviembre de 2019

Autores:

Br. Yaneth Ketenjian

Br. Andrés Sprunck

AGRADECIMIENTOS:

Agradecemos a nuestras familias por el apoyo brindado durante toda la carrera y a todas las personas que siempre nos alentaron a seguir.

A Claudio Pozo por ayudarnos, enseñarnos y dedicar tiempo a nosotros, para que este trabajo se llevara a cabo.

A Cecilia Cajarville por el apoyo para culminar el trabajo y por la enseñanza brindada.

A todo el personal del campo experimental N° 2 de la facultad de veterinaria, principalmente a Yanela Mena y Walter Machin, por tenernos paciencia y siempre dispuestos a darnos una mano.

A José Luis Repetto y Álvaro Santana por el apoyo durante todo el experimento.

Por último, agradecemos a nuestros compañeros y amigos que de una u otra forma nos han ayudado y han estado presentes.

TABLA DE CONTENIDOS:

	Página
Página de Aprobación	2
Agradecimientos	3
Lista de cuadros y figuras	5
Lista de abreviaturas	6
1. Resumen	8
2. Summary	9
3. Introducción	10
4. Revisión bibliográfica	12
4.1. Metabolismo y excreción de N	12
4.2. Estrategias para mejorar la EUN	13
5. Hipótesis	16
6. Objetivos	17
6.1 Objetivo general	17
6,2 Objetivos específicos	17
7. Materiales y métodos	18
8. Resultados	23
9. Discusión	25
10. Conclusión	27
11. Bibliografía	28

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Pagina
Cuadro 1. Efecto del momento del día sobre el contenido de CS y PB (g/kg MS) en las pasturas.	14
Cuadro 2. Ingredientes de la RTM (% de la MS)	19
Cuadro 3. Composición química de la ración totalmente mezclada (RTM) y el raigrás (\pm desvío estándar) pastoreado por la mañana (am) y por la tarde (pm).	19
Cuadro 4. Composición de la dieta consumida	23
Cuadro 5. Efecto de la inclusión de taninos en la dieta o del manejo del pastoreo sobre la partición del N.	24
Figura 1. Relación entre CS/PB de la dieta y la EUN en vacas lecheras. Adaptado de Keim y Anrique (2011).	15

LISTA DE ABREVIATURAS

AA:	Aminoácidos
AGV:	Ácidos grasos volátiles
AM:	Pastoreo de mañana y RTM de tarde
AMt:	Pastoreo de mañana y RTM de tarde con adición de 15g taninos/kg MS
CS:	Carbohidratos solubles
CNES:	Carbohidratos no estructurales
CO₂:	Dióxido de carbono
EE:	Extracto etéreo
EEM:	Error estándar de la media
ENL:	Energía neta de lactación
EUN:	Eficiencia en la utilización del nitrógeno
FDA:	Fibra detergente ácido
FDN:	Fibra detergente neutro
FDNi:	Fibra detergente neutro indigestible
LDA:	Lignina detergente ácido
MO:	Materia orgánica
MS:	Materia seca
N:	Nitrógeno
NH₃:	Amoníaco
NIDA:	Nitrógeno insoluble en detergente ácido
NIDN:	Nitrógeno insoluble en detergente neutro
NO₂:	Óxido nitroso
NUL	Nitrógeno ureico en leche
NUS:	Nitrógeno ureico en sangre

PB: Proteína bruta
PM: RTM de mañana y pastoreo de tarde
RTM: Ración totalmente mezclada
TA: Taninos

1. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar si la inclusión en la dieta del extracto de tanino de *Acacia mearnsii* (TA) o el cambio del momento de pastoreo de la mañana a la tarde tendría un impacto en la partición de N en las vacas lecheras que pastan raigrás junto con ración totalmente mezclada (RTM). Se utilizaron nueve vacas lecheras de raza Holstein con 197 ± 12 días de lactancia, en un diseño experimental de cuadrado latino 3×3 por triplicado, realizado a lo largo de tres períodos experimentales de 22 días. Los tres tratamientos consistieron en: pastoreo de mañana y RTM de tarde (AM), pastoreo de mañana y RTM de tarde con adición de 15g de TA/kg de MS (AMt), y RTM de mañana y pastoreo de tarde (PM). Los tratamientos no afectaron el consumo de N, la digestibilidad del N, ni las excreciones de N en leche, heces o las excreciones de N total. Sin embargo, tanto AMt como PM redujeron las excreciones urinarias de N en un 8,0 y 7,4 % respectivamente ($P < 0,05$) y a su vez el N ureico en los tratamientos AMt y PM fueron menores que en AM ($P < 0,05$). En consecuencia, la relación N urinario/N fecal fue menor ($P < 0,01$). Se concluye que la inclusión de bajas cantidades de TA en la RTM o el pastoreo por la tarde fueron estrategias efectivas para reducir la excreción de N urinario en vacas lecheras en lactancia media.

2. SUMMARY

The aim of this study was to evaluate whether the including *Acacia mearnsii* tannin extract (TA) in the diet or changing the grazing schedule from morning to afternoon would impact on N partitioning in dairy cows grazing ryegrass combined with total mixed ration (TMR). Nine lactating Holstein cows with 197 ± 12 lactation days were used in a triplicate 3×3 Latin square trial, conducted through three experimental periods of 22 days. The three treatments consisted of: morning grazing and afternoon TMR without TA (AM), morning grazing and afternoon TMR added with 15 g TA/kg of dry matter (DM) (AMt) and morning TMR without TA and afternoon grazing (PM). Treatments did not affect the intake of N, the excretion of N in milk and feces, the N digestibility or total N in manure. However, both AMt and PM reduced the total N urinary excretion by 8.0 and 7.4% respectively ($P < 0.05$) and in turn the urea-N excreted in urine in the treatments AMt and PM were lower than in AM ($P < 0.05$). Consequently, the urinary N to fecal N ratio was lower ($P < 0.01$). It is concluded that the inclusion of low amounts of TA in the TMR or grazing in the afternoon were effective strategies to reduce the excretion of urinary N in dairy cows in middle lactation.

3. INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos de la nutrición de rumiantes es proporcionar la cantidad de nutrientes que el animal necesita para alcanzar un determinado nivel de producción (Keim y Anrique, 2011). Cualquier deficiencia o desequilibrio de nutrientes en la dieta puede provocar una disminución de la producción, mientras que un exceso de los mismos puede implicar pérdidas que afectan los costos de producción, a los animales y a el medioambiente (Pacheco y col., 2008).

En los sistemas lecheros a pastoreo el suministro de nitrógeno (N) es generalmente desbalanceado, y consecuentemente la eficiencia del uso del N alimentario (EUN) para la producción de leche es usualmente inferior al 30% (Powell y col., 2010), lo que representa pérdidas significativas de N a través de las excretas. El N excretado en orina y las heces del ganado lechero contribuye a la contaminación ambiental, como amoníaco (NH_3) y óxido nitroso (NO_2) en el aire, o como nitrato en el suelo y en las aguas subterráneas (Tamminga, 1996). Además, dentro del N excretado, el N urinario es mucho más volátil y susceptible a pérdidas en forma de gas que el N fecal (Dijkstra y col., 2013).

Debido a los efectos negativos de la baja EUN, el sector lechero está bajo una creciente presión para ajustar la alimentación en el ganado, a fin de reducir las pérdidas de nutrientes en el medio ambiente (Wattiaux y Karg, 2004). En consecuencia, en los últimos años ha habido creciente interés en estudiar diferentes estrategias nutricionales y/o de manejo que permitan mejorar la EUN y reducir las excreciones de N en la ganadería lechera.

El ajuste del contenido de proteína a las necesidades de los animales permite mejorar la EUN (Hoekstra y col., 2007), sin embargo, en sistemas lecheros a pasto el ajuste del contenido de proteína del forraje se vuelve difícil, pues implica, consecuentes pérdidas en la calidad del pastoreo. En este sentido, la incorporación de ración totalmente mezclada (RTM) en sistemas pastoriles se ha mostrado como una estrategia de alimentación con potencial para mejorar la EUN aumentando el consumo de nutrientes y la producción individual (Bargo y col., 2002ab). Además, la incorporación de pasturas en la dieta basada en RTM permite niveles de ingesta y producción similares a las dietas RTM sin afectar las respuestas digestivas ni la excreción de N (Santana y col., 2016, Mendoza y col., 2016ab, Dall-Orsolleta y col., 2016; Perez-Ruchel y col., 2017). Sin embargo, en las vacas lecheras alimentadas con dietas que combinan pastos con RTM, la conversión del N alimenticio en N de la leche varía de 19 a 27% (Bargo y col., 2002a; Mendoza y col., 2016b; Pastorini, 2019), valores que se encuentran por debajo del límite superior teórico para la utilización de N en vacas lecheras (43%, Dijkstra y col., 2013). Esto sugiere un margen significativo para mejorar la EUN y reducir las pérdidas urinarias de N. En este sentido, los resultados de estudios previos indican que existen dos alternativas de fácil aplicación en dietas que combinan pastoreo con RTM, que son promisorias para mejorar la EUN de los animales y que no implicarían una reducción en el aporte de N de la dieta: 1) el uso de taninos para reducir la degradabilidad de la proteína en el rumen y aumentar el flujo de proteína alimentaria al duodeno; 2) el manejo del horario de pastoreo para aumentar la oferta de carbohidratos solubles (CS) en el pastoreo y favorecer la síntesis y el flujo de proteína microbiana al duodeno. Sin embargo, la información sobre los efectos de estas estrategias sobre la partición del N es escasa. Además, la mayoría de los experimentos que reportan el uso de estas estrategias fueron conducidos con vacas lecheras bajo dietas RTM o pastoreo con o sin suplementación. Sin embargo, no existen estudios en vacas lecheras

alimentadas con dietas mixtas que combinan pastos con RTM. Siendo así, el foco de estudio de esta tesis será la evaluación de estas dos estrategias con potencial para mejorar la EUN y reducir el impacto ambiental negativo de la ganadería lechera.

4. REVISION BIBLIOGRAFICA

4.1 – Metabolismo y excreción del N en sistemas de producción de leche a base de pasturas templadas:

En sistemas de producción de leche en base a pasturas templadas, usualmente los animales consumen dietas con altos contenidos de proteína bruta, que a su vez presenta una alta solubilidad y degradabilidad a nivel ruminal (Repetto y col., 2005). En esta situación nutricional, la proteína que llega al rumen es rápidamente hidrolizada por proteasas extracelulares a péptidos y a AA para luego entrar en la célula bacteriana. Estos AA pueden ser incorporados en proteínas bacterianas o ser desaminados y metabolizados a AGV, CO₂ y NH₃, que son liberados al medio extracelular (Kozloski, 2011). Sin embargo las bacterias ruminales sintetizan la mayor parte de sus proteínas a partir de AA sintetizados “de nuevo” a partir de NH₃ y α-cetoácidos (AGV de cadena ramificada consecuencia de la desaminación de AA de cadena ramificada).

En la situación nutricional mencionada inicialmente, la producción de NH₃ supera la capacidad de captación por parte de las bacterias, lo que resulta en un aumento de la concentración de NH₃ en el contenido ruminal. El NH₃ se absorbe por difusión pasiva, por lo que este proceso es altamente dependiente de su concentración en el rumen. El NH₃ absorbido pasa a la sangre portal y se conduce al hígado donde se capta y se metaboliza. Ingresa en la mitocondria del hepatocito, donde entra vía carbamoil-fosfato en el ciclo de la urea (Kozloski, 2011). En los sistemas a pasto, alrededor de un 30% del N ingerido se excreta en forma de urea en la orina (Lazzarini, 2010), donde a su vez representa el principal compuesto nitrogenado (Bristow y col., 1992). Entonces, cuando el N se consume por encima de las necesidades de los animales hay un aumento en las excreciones de N principalmente en la forma de urea en la orina (Hoesktra y col., 2007). En un experimento con vacas lecheras en pastoreo (Tas y col., 2006) se reportaron excreciones de N urinario que correspondieron al 57% del N ingerido. En los estudios con vacas lecheras alimentadas con dietas que combinan pastos con RTM, las excreciones de N urinario correspondieron entre el 28 y el 46% del N ingerido (Mendoza y col., 2016b, Pastorini, 2019), valores que ponen de manifiesto a la baja eficiencia del uso del N alimenticio.

Por lo tanto, mejorar el uso de la proteína alimentaria, reduciendo sus pérdidas en forma de N y urea en la orina, es muy importante ya que la proteína es un nutriente con un costo económico comparativamente más elevado que la energía. Además, la transformación de NH₃ a la urea involucra procesos metabólicos que generan un costo de energía para el animal (Reed y col., 2017). Los excesos de N en la dieta también están asociados a problemas reproductivos (Butler, 1998; Gehman y col., 2006), a efectos negativos sobre la calidad de la leche y sus derivados (Martin y col., 1997; Bendall, 2001), y la contaminación del medio ambiente, principalmente a través de las excreciones del N urinario (Pacheco y col., 2008).

4.2. Estrategias para mejorar la EUN

4.2.1. Utilización y mecanismo de acción de Taninos:

Los taninos son compuestos polifenólicos de origen vegetal. Estos compuestos poseen uno o más de un anillo aromático y grupos carboxilos y oxidrilos libres, con los que reaccionan entre ellos y con otros compuestos químicos como por ejemplo las proteínas. (Makkar y col., 2003).

Los principales mecanismos de interacción con proteínas son los siguientes: 1) por enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los restos fenólicos de taninos y oxígenos de acoplamiento de péptidos de las proteínas; 2) por interacciones hidrofóbicas entre los anillos aromáticos de los compuestos fenólicos y las regiones hidrofóbicas de las proteínas (Frutos y col., 2004). Estos complejos taninos-proteínas alteran la estructura secundaria de la proteína dificultando el acceso de las bacterias a la degradación. Además, se citan otros mecanismos para reducir la degradabilidad de la proteína: interactúan con enzimas y afectan el proceso de adhesión de las bacterias. Como ambas interacciones son reversibles a pH mayores que 8 o menores que 3.5, en el abomaso (pH≈2.5) y en el duodeno (pH≈8) estos complejos taninos-proteínas se disocian (Frutos y col., 2004), permitiendo la liberación de AA. Por lo tanto, con esta estrategia se busca reducir la producción de NH₃ en el rumen y aumentar el flujo de proteína alimentaria al duodeno.

En varios ensayos se observaron resultados positivos y negativos con el uso de taninos en la alimentación. Estos resultados, tanto positivos como negativos, dependen principalmente del nivel utilizado en la dieta y el tipo de tanino (Mueller-Harvey, 2006; Waghorn, 2008), pero también de otros componentes de la dieta, de la especie y de la fisiología del animal consumidor (Hagerman y Butler, 1991). En general, entre los principales efectos negativos encontramos la disminución del consumo y de la digestibilidad del alimento, que usualmente afectan negativamente a la producción (Grainger y col., 2009; Gerlach y col., 2018). Entre los efectos positivos de estos aditivos alimentarios se destacan la reducción de la degradabilidad ruminal de la proteína (Carulla y col., 2005) y el aumento del flujo de AA disponibles para el duodeno (Waghorn, 1996, Orlandi y col., 2015).

Los taninos pueden ser utilizados en la alimentación de los rumiantes para disminuir la degradabilidad ruminal de las proteínas, y de esta forma, disminuir las pérdidas urinarias de N y promover el flujo de AA hacia el duodeno. Estos reducen la tasa de NH₃ en el rumen y lleva a una disminución del N excretado por la orina (Scharenberg y col., 2007). Además, la disminución de la digestión intestinal de los compuestos nitrogenados, conduce a un aumento en la excreción de N por las heces, (Deaville y col., 2010), sin afectar el balance de N (Grainger y col., 2009).

Por lo tanto, podemos decir entonces que las excreciones totales de N permanecen inalteradas y hay una partición del N consumido hacia las heces. Sin embargo, hay que ser reservado en el momento de afirmar esto último, ya que entre las consecuencias de la ingestión de taninos se incluyen el aumento de la secreción de proteínas endógenas (glicoproteínas salivares, mucus, enzimas digestivas) y el aumento de la descamación de las células intestinales (Waghorn, 1996). Por lo tanto, este aumento en el N fecal podría estar asociado al aumento de la excreción de N endógeno, que no implicaría una disminución en la cantidad de proteína que se absorbe de los alimentos (Frutos y col., 2004).

Estudios demostraron que la inclusión de taninos en la dieta de bovinos permite reducir las emisiones totales de NH₃ y NO₂ provenientes de las excretas (Sliwinski y col., 2004; Misselbrook y col., 2005; Powell y col., 2011). Esto es debido a que el N fecal es formado por moléculas orgánicas, por lo que es menos volátil, mientras que la mayor parte del N urinario se encuentra formado en parte por urea que es más susceptible a la volatilización como el NH₃ y el NO₂ (Grabber y col., 2002). Además, el complejo tanino-proteína de las heces tendría una degradación más lenta que retardaría la mineralización de la MO (Powell y col., 2011).

4.2.2. Manejo del pastoreo para aumentar el contenido de carbohidratos solubles de las pasturas consumidas

Los CS presentes en las pasturas templadas incluyen fructanos y azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa, etc.). Estos compuestos se encuentran en proporciones muy variables dependiendo de la época del año, de la hora del día (Cajarville y col., 2015) y bajo ciertas condiciones puede alcanzar valores cerca del 30% de la MS (Mc Donald, 2010). Varios estudios demostraron que la concentración de CS es más elevada al final de la tarde en comparación con la mañana (Cuadro 1), Este aumento a lo largo del día se da cuando la tasa de fotosíntesis excede la tasa de respiración y la fijación de carbono (Smith, 1973; Ciavarella y col., 2000). A diferencia de los CS, el contenido de proteína bruta (PB) en las pasturas son más elevados por la mañana.

Cuadro 1. Efecto del momento del día sobre el contenido de CS y PB (g/kg MS) en las pasturas.

Referencia	Pastura	Cambios de mañana a tarde	
		CS	PB
Trevaskis y col. 2004	<i>Lolium multiflorum</i>	74 a 124	328 a 268
Vasta y col., 2012	<i>Lolium perenne</i>	72 a 106	260 a 254
Bryant y col., 2013	<i>Lolium perenne</i>	164 a 174	187 a 171
Pulido y col., 2015	<i>Lolium perenne</i>	60 a 88	272 a 243
Ueda y col., 2016	<i>Lolium perenne</i>	123 a 163	251 a 235
Vibart y col., 2017	<i>Lolium perenne</i>	76 a 109	222 a 205
Chen y col., 2017	<i>Lolium perenne</i>	154 a 179	158 a 151

El concepto de sincronización de nutrientes se refiere a el hecho de ofrecer al sistema ruminal, fuentes de proteína y energía en forma simultánea y en las cantidades necesarias para optimizar su uso por la microbiota asociada (Hall y Huntington, 2008). Considerando que los CS tienen una tasa de fermentación elevada, su aumento en pasturas con alto contenido de N soluble, favorecería la captación del N soluble para la síntesis de biomasa microbiana, lo que se traduciría en un mayor suministro de proteína metabolizable de origen microbiano para el animal (Berchielli y col. 2011). Por lo tanto, en pasturas con altos niveles de PB, el pastoreo por la tarde podría ser considerado como una estrategia para alcanzar un aumento en la relación CS/PB, lo que permitiría mejorar la EUN (Keim y Anrique, 2011).

A partir de los resultados de publicaciones que evaluaron el efecto de pastos con diferentes niveles de CS sobre la EUN en vacas lecheras, Keim y Anrique (2011) ponen de manifiesto que la EUN tiende a aumentar linealmente cuando la relación CS/PB aumenta (figura 1). La relación previamente mencionada coincide con los resultados de estudios donde demostraron que el pastoreo o corte y suministro de pasto de tarde aumentó la EUN (Trevaskys y col., 2004; Brito y col., 2009; Vibart y col., 2017). Estos autores argumentan que esta mejora en la EUN con relación al suministro de pasto por la mañana estaría ligada básicamente a la mejora de la relación CS/PB. Por consiguiente, el aumento de la ingesta de energía rápidamente disponible en estos casos, puede haber aumentado el uso de NH_3 por los microorganismos del rumen. En la mayoría de los casos, se observó una disminución de las concentraciones de NH_3 encontradas en el rumen (Trevaskys y col., 2004, Brito y col., 2009, Ueda y col., 2016), por el aumento del flujo omasal de N bacteriano y por la reducción de los niveles de N ureico en el plasma y en la leche (Brilo y col., 2009). Estos factores explicarían también las reducciones de concentraciones urinarias de N (g/L) y la mejora en el 15% de la EUN para producción de leche reportadas por Vibart y col. (2017). El conjunto de resultados obtenidos sugiere que el pastoreo proporcionado de tarde produce una mejora general en la utilización de N por los animales.

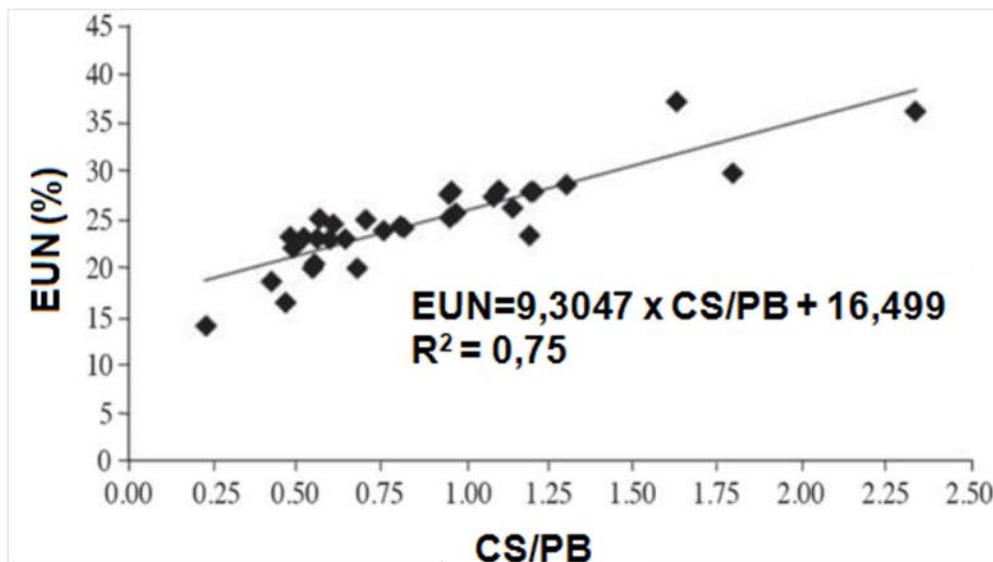


Figura 1. Relación entre CS/PB de la dieta y la EUN en vacas lecheras. Adaptado de Keim y Anrique (2011).

5. HIPOTESIS:

La inclusión de taninos en la dieta o el pastoreo por la tarde en vacas lecheras alimentadas con una dieta mixta que combina pasto con RTM reducirá las excreciones del N urinario.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de dos estrategias con potencial para aumentar la utilización del N sobre la partición del N en vacas lecheras alimentadas con una dieta que combina pasto con RTM.

6.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar los efectos de la inclusión de tanino de *Acacia meamsii* o del horario de pastoreo sobre el consumo y la digestibilidad del N.
- Evaluar los efectos de la inclusión de tanino de *Acacia meamsii* o del horario de pastoreo sobre la partición del N alimentario.

7. MATERIALES Y METODOS

El experimento tuvo lugar en el Campo Experimental N°2 de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (Ruta 1 Km 42, Libertad, San José), entre los meses de setiembre y noviembre del 2015.

El protocolo experimental fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A) de la Universidad de la República (número de protocolo: CEUAFVET-473).

7.1. Animales, diseño experimental y manejo:

Se seleccionaron 9 vacas multíparas de raza Holstein con 546 ± 34 kg de peso vivo, 197 ± 12 días de lactancia, y con una producción de leche en la lactancia previa de 7320 ± 1044 kg. El experimento fue conducido en un diseño experimental de cuadrado latino 3 x 3 por triplicado. Los animales se agruparon en los tres cuadrados según su peso vivo, producción al inicio del experimento y producción en la lactancia previa. Cada periodo experimental tuvo una duración de 22 días, los primeros 14 días fueron de adaptación a la dieta y los 8 días restantes correspondieron al periodo de mediciones. Los animales de cada cuadrado fueron distribuidos aleatoriamente en los siguientes tratamientos:

- AM: pastoreo de mañana y RTM de tarde.
- AMt: pastoreo de mañana y RTM de tarde con adición de 15g de TA/kg de MS.
- PM: RTM de mañana y pastoreo de tarde.

Los animales fueron ordeñados dos veces al día (6.00hs y 15.00h) y luego de cada ordeño accedieron a comederos individuales con RTM o a parcelas individuales con raigrás (*Lolium multiflorum*). Después de 5 h de alimentación (RTM o pastoreo) las vacas se mantuvieron juntas en un área con agua disponible pero sin alimento, hasta el próximo ordeño. La RTM fue ofrecida al 60% del consumo potencial de cada vaca, que se estimó antes del inicio del experimento mediante el modelo propuesto por el NRC (2001). El pasto fue ofrecido en parcelas individuales a razón de 13 kg de MS/vaca, calculada a partir de corte a una altura de 5 cm. La RTM utilizada (Cuadro 2) se formuló de acuerdo a las recomendaciones del NRC (2001) para cubrir los requerimientos de una vaca de 550 kg de peso, con 190 días de lactancia y una producción de 28 kg de leche/d. La composición química de la RTM y el raigrás es presentada en el Cuadro 3.

El TA (Weibull Black, Tanac S.A., Montenegro, Brasil) era el mismo utilizado y descrito anteriormente por Kozloski et al. (2012) y contenía 716, 694 y 156 g/kg de MS de fenoles totales, taninos totales y taninos condensados, respectivamente.

Cuadro 2. Ingredientes de la RTM (% de la MS)

Ingrediente	RTM
Silo de maíz	60,0
Harina de soja	19,5
Ensilado de grano húmedo de maíz	18,5
Urea	0,70
Bicarbonato de Sodio	0,40
Fosfato dicálcico	0,20
Carbonato de Calcio	0,20
Sal	0,20
Vitaminas y minerales premix ¹	0,30

¹Compuesto por (en kg MS): 125 g de Procreatin 7[®], 125 g de Precisión Mix Vacas Lecheras[®], 38 g de Rumensin[®] 200, y 713 g de excipientes.

Cuadro 3. Composición química de la ración totalmente mezclada (RTM) y el raigrás (\pm desvío estándar) pastoreado por la mañana (AM) y por la tarde (PM).

Ítem	RTM	Raigrás	
		AM	PM
MS ¹ , %	41,0	18,6 \pm 2,1	19,6 \pm 2,5
Composición de la MS, %			
MO ²	94,0	87,9 \pm 1,1	88,7 \pm 1,2
CS ³	3,7	6,9 \pm 1,2	8,9 \pm 1,4
FDN ⁴	27,1	45,9 \pm 5,2	43,4 \pm 7,9
FDA ⁵	16,6	27,1 \pm 2,7	26,3 \pm 3,8
LDA ⁶	1,3	3,7 \pm 1,1	3,6 \pm 1,6
CNES ⁷	46,7	28,7 \pm 5,3	33,0 \pm 7,7
EE ⁸	3,7	2,1 \pm 0,04	1,8 \pm 0,16
PB ⁹	16,5	13,3 \pm 1,4	12,3 \pm 1,0
NIDN ¹⁰	0,13	0,28 \pm 0,02	0,24 \pm 0,07
NIDA ¹¹	0,04	0,06 \pm 0,02	0,06 \pm 0,03
ENL ¹² , Mcal/kg de MS	1,87	1,33 \pm 0,08	1,36 \pm 0,13
Relación CS/PB ¹³	0,22	0,53 \pm 0,15	0,73 \pm 0,15

¹Materia seca; ²Materia orgánica; ³Carbohidratos solubles; ⁴Fibra neutro detergente; ⁵Fibra ácido detergente; ⁶Lignina detergente ácido; ⁷Carbohidratos no estructurales; ⁸Extracto etéreo; ⁹Proteína bruta; ¹⁰Nitrógeno insoluble en detergente neutro; ¹¹Nitrógeno insoluble en detergente ácido; ¹²Energía neta de lactación; ¹³Relacion carbohidratos solubles/ proteína bruta.

7.2. Registros y muestreos:

La producción de leche (kg/d) fue registrada diariamente durante los primeros 5 días del periodo de mediciones. En los días 15 y 17 de cada período, se tomaron muestras individuales de leche de dos ordeños consecutivos y se almacenaron a 4°C con conservante bronopol.

Las muestras de alimento se recolectaron diariamente durante cada período de mediciones (del día 15 al 22). Las muestras de RTM se almacenaron inmediatamente a -20°C. Las muestras de pasto fueron colectadas manualmente, 1 h después del comienzo del pastoreo matutino o vespertino (08.00 y 17.00 h). Las

muestras de pasto se colocaron inmediatamente en N líquido y luego se almacenaron a -20°C.

En los días 16, 17 y 19 de cada período, se recolectaron muestras fecales de todas las vacas dos veces al día a las 12.00 y 21.00 hs. Las muestras de materia fecal (≈ 200 g de materia fresca) se recolectaron directamente del recto y se almacenaron a -20°C. En los mismos días y horas de la colecta de muestras fecales, se colectaron muestras de orina de todas las vacas. Cada muestra de 10 ml de orina fresca se acidificó con 1 ml de ácido sulfúrico (20% v/v), se diluyó con 49 ml de agua destilada y se almacenó a -20°C. En el día 22 de cada período, se extrajeron muestras de sangre individuales de la vena coccígea a las 0, 3, 9 y 12 hs en relación con el comienzo de la primera comida (07.00 hs) en tubos heparinizados. Después de la centrifugación (3.000 xg durante 20 min a 20°C), se separó el plasma y se almacenó a -20°C.

7.3. Consumo

El consumo individual de RTM se calculó mediante la diferencia entre la cantidad de alimento distribuido y el rechazo del mismo al final de las 24 hs. El alimento ofrecido y las sobras fueron pesados durante todo el experimento a modo de identificar posibles problemas relacionados a la alimentación. El consumo aparente de pasto se estimó en las parcelas individuales durante los primeros 5 días de mediciones, utilizando un disco medidor de forraje. Las mediciones del disco fueron calibradas seleccionando 6 puntos donde la pastura fuera alta, media y baja. Una vez identificados esos puntos se procedió a cortar un área de 0,1m² correspondiente a cada punto. El pasto de cada punto fue pesado y secado por 24hs a 105°C para obtener la MS del mismo. Las ecuaciones para determinar la masa de forraje se obtuvieron por regresión entre los valores del disco y el peso de la masa de forraje. Este procedimiento fue realizado antes de la entrada de los animales a las parcelas y los valores de disco a la entrada de cada parcela se obtuvieron a partir de la media de 32 mediciones. Estos valores se utilizaron en las ecuaciones de estimación de la masa de forraje de las parcelas antes de la entrada de los animales. Después de la salida de los animales, un área de 10-15% de cada parcela fue cortada a 5 cm para determinar la masa de forraje remanente. Para obtener el contenido de MS del forraje remanente, se obtuvo una muestra de pasto que fue secada durante 24hs a 105°C. Finalmente, el consumo aparente individual de pasto (kg de MS) se obtuvo por la diferencia entre el pasto ofrecido y el pasto remanente en cada parcela.

7.4. Análisis químicos y cálculos:

Las muestras de alimentos y heces, fueron secadas (en estufa a 65°C) y molidas (1 y 2 mm) para su posterior análisis. El contenido de MS total de las muestras de alimentos y heces se determinó por secado en estufa (105°C) durante 24 hs. El contenido de cenizas se determinó por combustión a 600°C durante 4 hs y la materia orgánica (MO) por diferencia de peso (100-% de cenizas). El contenido de PB (N x 6,25) se determinó según los métodos del AOAC (1997). El contenido de N insoluble en detergente neutro (NIDN) e insoluble en detergente ácido (NIDA) se determinó según Licitra y col. (1996). El contenido de FDN y FDA se determinaron según los procedimientos del AOAC (1997), a excepción de que las muestras se pesaron en bolsas de poliéster (porosidad de 16 µm) y se trataron con un detergente neutro o

ácido en un autoclave a 110°C durante 40 minutos (Senger y col., 2008). Para el análisis de lignina (LDA), las bolsas que contenían el residuo de FDA fueron tratadas con 12M H₂SO₄ por 3 horas (Método 973.18 de AOAC, 1997). El extracto etéreo (EE) fue obtenido por extracción con alcohol etílico a 90°C por 1 hora (Extractor ANKOM, modelo XT15, USA). El contenido de CS fue extraído siguiendo la técnica descrita por Hall (2000) y analizado según Dubois y col (1956). Los CNES fueron calculados según lo sugerido por el NRC (2001). La ENL fue calculada de acuerdo con el NRC (2001) a partir de los análisis de alimentos y el consumo de MS.

Luego de terminado el ensayo las muestras de alimentos y heces molidas en un tamiz de 2mm, fueron colocadas en saquitos de Dacron (5x10 cm, porosidad de 16µ). Los saquitos con sus respectivas muestras se incubaron en el rumen de un novillo con cánula ruminal durante 12 días. Luego de la incubación *in situ*, se realizó el análisis de FDN, que se consideró como indigestible (FDNi). Una vez determinado el contenido de FDNi de los alimentos y de las heces, se procedió a estimar la producción total de heces indirectamente (Huhtanen y col., 1994), mediante el siguiente cálculo:

$$\text{Heces (g/d MS)} = \frac{\text{Consumo de FDNi (g/d MS)}}{[\text{FDNi Heces}](\text{g/g MS})}$$

La estimación de la producción de heces, en conjunto con el análisis de N fecal permitió calcular las excreciones fecales de N. La digestibilidad del N fue calculada como:

$$\text{Digestibilidad del N(\%)} = \frac{\text{N ingerido (g/d)} - \text{N eliminado (g/d)}}{\text{N ingerido (g/d)}} \times 100$$

Las muestras de orina se descongelaron a temperatura ambiente, se agruparon por vaca y período, se filtraron a 7,5 µm. Posteriormente, fue analizado el contenido de N (como se describió anteriormente), y las concentraciones de N ureico y creatinina por colorimetría, usando kits comerciales (Bioclin MG, Brasil; Labtest, MG, Brasil). La producción de orina se estimó asumiendo que la excreción de creatinina es constante en función del peso corporal utilizando un factor de excreción diario de creatinina de 21,9 mg/kg de peso vivo (Pacheco y col. 2007):

$$\text{Producción de orina (L/d)} = \frac{\text{Excreción de creatinina (mg/d)}}{[\text{Creatinina}](\text{mg/L})}$$

La excreción de N en leche se calculó a partir de la producción de leche y la concentración de N en la leche (proteína de leche/6.38). El N ureico en leche (MUN) se determinó mediante análisis infrarrojo (modelo 2000, Bentley Instruments Inc., Chaska, MN). La concentración de urea en sangre (NUS) se determinó por colorimetría utilizando un kit comercial (Bioclin, MG, Brasil). La EUN para la producción de leche fue calculada siguiendo la ecuación:

$$\text{EUN (\%)} = \frac{\text{N eliminado por leche (g/d)}}{\text{N ingerido (g/d)}} \times 100$$

7.5. Análisis estadísticos:

Los datos fueron analizados utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS (2009), incluyendo al tratamiento como efecto fijo, y al cuadrado, al periodo y la vaca dentro del cuadrado como efectos aleatorios. Para la variable con medidas repetidas en el tiempo (NUS), fueron incluidos en el modelo los efectos fijos de la hora de medición y su interacción con el tratamiento. Las diferencias entre los tratamientos se expresaron significativas a $P \leq 0,05$ y las tendencias a $0,05 < P \leq 0,10$ utilizando la opción PDIFF.

8. RESULTADOS

En el Cuadro 5 son presentados los resultados del presente experimento. Podemos observar que el consumo de N no hubieron diferencias entre los tratamientos. Igualmente, la digestibilidad aparente del N no fue afectada por la inclusión de TA en la dieta, sin embargo, tiende a ser menor para las vacas en el tratamiento PM ($P < 0,10$).

La concentración final de TA en la dieta para el tratamiento AMt fue de 8,7 g TA/kg de MS.

Por otro lado, las concentraciones de N ureico en sangre y en leche, como así también las excreciones de N en leche y la EUN para la producción de leche no fueron afectadas por los tratamientos. De la misma manera, los tratamientos no afectaron las excreciones fecales de N, sin embargo, el tratamiento AMt aumentó la excreción fecal de NIDA ($P < 0,05$).

Comparados con el tratamiento AM, tanto AMt como PM redujeron las excreciones urinarias de N en un 8,0 y 7,4 % respectivamente ($P < 0,05$). En el mismo sentido, las excreciones de N ureico en los tratamientos AMt y PM fueron 14,3 y 13,3 % menores que en AM ($P < 0,05$). La relación N ureico/N urinario en los tratamientos AMt y PM tendió a ser menor que en AM ($P < 0,10$).

Los tratamientos AMt y PM presentaron una menor relación N urinario/N fecal que el tratamiento AM ($P < 0,05$).

Cuadro 4. Composición de la dieta consumida.

	Tratamientos ¹			EEM ²	P-valor ³
	AM	AMt	PM		
Composición, %					
PB ⁴	15,2 ^a	15,2 ^a	14,7 ^b	0,30	<0,01
FDN ⁵	34,9 ^a	35,0 ^a	34,1 ^b	1,56	0,01
CNES ⁶	39,2 ^b	39,1 ^b	40,7 ^a	1,69	<0,01
CS ⁷	5,0 ^b	5,0 ^b	6,0 ^a	0,32	<0,01
ENL ⁸	1,64	1,64	1,65	0,02	0,49
Relación CS/PB	0.33 ^b	0.33 ^b	0.41 ^a	0.028	<0.01

¹AM= pastoreo de mañana y RTM de tarde; AMt= pastoreo de mañana y RTM de tarde con adición de 15g taninos/kg de MS; PM= RTM de mañana y pastoreo de tarde. ²Error estándar de la media. ³Nivel de significancia para el efecto de los tratamientos; diferentes letras en superíndice dentro de la misma línea indican diferencias significativas (a-c; $P \leq 0,05$). ⁴Proteína bruta; ⁵Fibra neutro detergente; ⁶Carbohidratos no estructurales; ⁷Carbohidratos solubles; ⁸Energía neta de lactación.

Cuadro 5. Efecto de la inclusión de taninos en la dieta o del manejo del pastoreo sobre la partición del N.

	Tratamientos ¹			EEM ²	P-valor ³
	AM	AMt	PM		
Consumo de N, g/d	468	467	459	23,2	0,17
Digestibilidad del N, %	60,2 ^x	60,7 ^x	54,5 ^y	6,25	0,09
NUS ⁴ , mg/DI	13,2	13,3	14,0	1,56	0,47
NUL ⁵ , mg/DI	20,9	18,9	22,6	2,25	0,23
Excreción de N en leche, g/d	119	116	118	9,70	0,55
EUN ⁶ , %	25,4	24,8	25,7	18,0	0,44
Excreción Fecal					
N, g/d	181	182	207	22,0	0,12
NIDA, g/d	8,3 ^b	17,6 ^a	10,3 ^b	1,29	<0,01
Excreción urinaria					
N, g/d	176 ^a	162 ^b	163 ^b	13,6	0,03
N ureico, g/d	105 ^a	90 ^b	91 ^b	16,1	0,01
N ureico/ N urinario	0,59 ^x	0,55 ^y	0,55 ^y	0,060	0,09
Excreción total de N ⁷ , g/d	363	350	376	15,6	0,29
N urinario/N fecal	1,07 ^a	0,93 ^b	0,80 ^c	0,171	<0,01

¹AM= pastoreo de mañana y RTM de tarde; AMt= pastoreo de mañana y RTM de tarde con adición de 15g taninos/kg de MS; PM= RTM de mañana y pastoreo de tarde. ²Error estándar de la media. ³Nivel de significancia para el efecto de los tratamientos; diferentes letras en superíndice dentro de la misma línea indican diferencias significativas (a-c; $P \leq 0,05$) o tendencia (x-z; $P \leq 0,10$). ⁴N ureico en sangre. ⁵N ureico en leche. ⁶Eficiencia del uso del N para la producción de leche. ⁷N urinario (g/d) + N fecal (g/d).

9. DISCUSION

Los tratamientos no afectaron el consumo de MS (19,4 kg MS/d), sin embargo el tratamiento PM presentó una tendencia a aumentar el consumo de pasto, aumentando la proporción de pastura en la dieta. En consecuencia, la composición de la dieta consumida por los animales fue modificada para el tratamiento PM (Cuadro 4). En este sentido, el tratamiento PM proporcionó una dieta con una mayor relación CS/PB ($P < 0,05$).

La inclusión de 15 g TA/kg MS (1,5%) en la TMR no afectó el consumo. Este resultado era esperado debido que la concentración de TA utilizada en la dieta total (8,7 g TA/kg MS, 0.87%) estuvo por debajo de los niveles (≥ 11 g/kg MS) donde fueron reportados efectos negativos sobre el consumo (Grainger y col., 2009).

El uso de TA no afectó el consumo ni la digestibilidad aparente del N. Estudios previos demostraron que niveles crecientes de TA en la dieta reducen linealmente la digestibilidad del N (Kozloski y col., 2012; Orlandi y col., 2015). Sin embargo, los efectos negativos del TA sobre esta variable son observados con niveles de inclusión superiores al 0,9 % de la dieta.

Por otro lado, la inclusión de TA en la dieta redujo las excreciones de N y N ureico en la orina. Esto puede ser consecuencia de la capacidad de los TA en reducir la degradabilidad ruminal de las proteínas (Carulla y col., 2005; Frutos y col., 2004), lo que podría inducir a una reducción en la producción de NH_3 , llevando así a una disminución de las excreciones urinarias de N y promoviendo el flujo de AA de origen alimentario hacia el duodeno (Orlandi y col., 2015).

Los TA aumentaron la excreción fecal de NIDA. Considerando que el consumo de NIDA fue similar entre tratamientos, el aumento de NIDA fecal en el tratamiento AMt, podría sugerir que el complejo proteína-tanino se forma en el rumen, y no sería completamente disociado en su paso a través del tracto gastrointestinal. Además, si el complejo tanino-proteína se disocia en el abomaso, el tanino podría volver a unirse con el alimento o incluso con la proteína endógena en el intestino (Mueller-Harvey, 2006), lo que puede aumentar el NIDA fecal (Makkar y col., 1995). Además, los TA redujeron la proporción de N urinario en las excretas. Estos resultados son importantes por el hecho de que el N contenido en la orina es más volátil que el N contenido en las heces (Powell y col., 2011). Además de esto, el aumento de NIDA indicaría que parte del N fecal está asociado a taninos, lo que induciría a una reducción en la tasa de liberación del N al ambiente (Makkar, 2003), lo que permite reducir el potencial contaminante de las excretas en vacas lecheras.

El cambio de horario de pastoreo de la mañana para la tarde redujo las excreciones urinarias de N y N ureico. De hecho, la dieta consumida por los animales bajo el tratamiento PM presentó una mayor relación CS/PB. Esta dieta permitiría un aumento en la disponibilidad de sustratos energéticos a nivel ruminal, lo que favorecería la captación de NH_3 por parte de las bacterias, reduciendo la concentración ruminal de NH_3 y su posterior absorción. Esto podría explicar las reducciones de excreciones urinarias de N observadas en el tratamiento PM, desde que la excreción de N urinaria está directamente relacionada con la tasa de absorción de NH_3 y la concentración de urea en sangre (Jonker y col., 1998). Por

otro lado, estos resultados también podrían ser explicados por la menor digestibilidad del N observada en el tratamiento PM. De todas formas, el cambio de sitio de excreción del N de la orina para las heces es relevante desde un punto de vista medioambiental.

10. CONCLUSION

La inclusión de 8,7 g de TA/kg de MS o el cambio del momento de pastoreo de la mañana para la tarde fueron estrategias eficaces para reducir la excreción de N urinario, reduciendo el potencial contaminante de las excretas de vacas lecheras consumiendo dietas que combinan pastura con RTM. Son necesarios más estudios para verificar estos efectos en otras condiciones diferentes a las del presente experimento. A modo de ejemplo, no podemos asegurar que el efecto sea similar en vacas al inicio de la lactancia, o consumiendo otro tipo de forraje.

11. BIBLIOGRAFIA

1. AOAC. (1997) Association of official analytical chemists. Official Methods of Analysis, 16th, 3. Ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD.
2. Bargo F, Muller LD, Delahoy JE, Cassidy TW (2002a). Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J Dairy Sci*; 85:2948–2963.
3. Bargo F, Muller LD, Varga GA, Delahoy JE, Cassidy TW (2002b). Ruminant digestion and fermentation of high-producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J Dairy Sci*; 85:2964–2973.
4. Bendall JG (2001). Aroma compounds of fresh milk from New Zealand cows fed different diets. *J Agric Food Chem*; 49:4825-4832.
5. Berchielli TT, Vaz Pieres A, Oliveira SG (2011). *Nutrição de ruminantes*. 2a. Ed. Jaboticabal, Funep, 616 p.
6. Bristow AW, Whitehead DC, Cockburn JE (1992). Nitrogenous constituents in the urine of cattle, sheep and goats. *J Sci Food Agric*; 59:387–394.
7. Brito AF, Tremblay GF, Lapierre H, Bertrand A, Castonguay Y, Bélanger G, Michaud R, Benchaar C, Ouellet DR, Berthiaume R (2009). Alfalfa cut at sundown and harvested as baleage increased bacterial protein synthesis in late-lactation dairy cows. *J Dairy Sci*; 92, 1092–1107.
8. Bryant RH, Gregorini IP, Edwards GR (2013). Effects of N fertilisation, leaf appearance and time of day on N fractionation and chemical composition of *Lolium perenne* cultivars in spring. *Anim Feed Sci Technol*; 173:210–219.
9. Butler WR (1998). Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J Dairy Sci*; 81:2533-2539.
10. Cajarville C, Britos A, Errandonea N, Gutiérrez L, Cozzolino D, Repetto JL (2015). Diurnal changes in water-soluble carbohydrate concentration in lucerne and tall fescue in autumn and the effects on in vitro fermentation. *New Zeal J Agr Res*; 58:281-291.
11. Carulla JE, Kreuzer M, Machmueller A, Hess H (2005). Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Aust J Agr Res*; 56:961–970.
12. Chen A, Bryant RH, Edwards GR (2017). Milk production and composition of dairy cows grazing two perennial ryegrass cultivars allocated in the morning and afternoon. *Anim Prod Sci*; 57:1507–1511.

13. Ciavarella TA, Simpson R, Dove H, Leury B, Sims I (2000). Diurnal changes in the concentration of water-soluble carbohydrates in *Phalaris aquatica* L. pasture in spring, and the effect of short-term shading. *Aust J Agr Res*; 51:749–756.
14. Dall-Orsoletta AC, Almeida JGR, Carvalho PCF, Savian JV, Ribeiro-Filho HMN (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. *J Dairy Sci*; 99:4374–4383.
15. Deaville ER, Givens DI, Mueller-Harvey I (2010). Chesnut and mimosa tannin silages: Effects in sheep differ for apparent digestibility, nitrogen utilisation and losses. *Anim Feed Sci Technol*; 157:129-138.
16. Dijkstra J, Reynolds C, Kebreab E, Bannink A, Ellis J, France J, Van Vuuren AM (2013). Challenges in ruminant nutrition: Towards minimal nitrogen losses in cattle. *Energy and Protein Metabolism and Nutrition in Sustainable Animal Production*. Wageningen Academic Publishers; 134:47-58.
17. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith FF (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem*; 28:350–356.
18. Frutos P, Hervás G, Giráldez FJ, Mantecón AR (2004). Tannins and ruminant nutrition. *Span J Agric Res*; 2 (2): 191-202.
19. Gehman AM, Bertrand JA, Jenkins TC, Pinkerton BW (2006). The effect of carbohydrate source on nitrogen capture in dairy cows on pasture. *J Dairy Sci*; 89:2659 -2667.
20. Gerlach K, Pries M, Tholen E, Schmithausen AJ, Büscher W, Südekum KH (2018). Effect of condensed tannins in rations of lactating dairy cows on production variables and nitrogen use efficiency. *Animal*; 12 (9):1847-1855.
21. Grabber J, Broderick G, Russell M, Powell M, Rotz A, Muck R, Mertens D, Massingill L (2002). Tannin-containing forages crops: A way to improve nitrogen use and profitability of dairy farms? U.S. Dairy Forage Research Center; 20th Anniversary; Informational Disc. <http://www.dfrc.ars.usda.gov/cd/posters/Tannin%20dafosym.pdf>
22. Grainger C, Clarke T, Auldred MJ, Beauchemin KA, McGinn SM, Waghorn GC, Eckard RJ (2009). Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Can J Anim Sci*; 89:241–251.
23. Hagerman AE, Butler LG (1991). Tannins and lignins. En: Rosenthal GA, Berenbaum MR. *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. 2da. New York, Ed. National Academy Press, pp. 355-388.

24. Hall MB (2000). Neutral detergent-soluble carbohydrates: Nutritional relevance and analysis. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Bulletin 339.
25. Hall MB, Huntington GB (2008). Nutrient synchrony: Sound in theory, elusive in practice. *J Anim Sci*; 86:287-292.
26. Hoekstra NJ, Schulte RPO, Struik PC, Lantinga EA (2007). Pathways to improving the N efficiency of grazing bovines. *Europ J Agronomy*; 26:363-374.
27. Huhtanen P, Kaustell K, Jaakkola S (1994). The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Anim Feed Sci Technol*; 48:211-227.
28. Jonker JS, Kohn RA, Erdman RA (1998). Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*; 81:2681-2692.
29. Keim JP, Anrique R (2011). Nutritional strategies to improve nitrogen use efficiency by grazing dairy cows. *Chilean J Agric Res*; 71 (4): 623-633.
30. Kozloski GV (2011). *Bioquímica dos ruminantes*. 3a. ed. Santa Maria, Ed. da Universidade Federal de Santa Maria, 216 p.
31. Kozloski GV, Härter CJ, Hentz F, Capa de Avila S, Orlandi T, Stefanello CM (2012). Intake, digestibility and nutrients supply to wethers fed ryegrass and intraruminally infused with levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. *Small Rum Res*; 106:125–130.
32. Lazzarini MB (2010). Milk production and nitrogen partitioning in dairy cows grazing standard and high sugar perennial ryegrass with and without white clover, during spring and autumn. *Disertación de maestría*. Massey University, New Zealand, 95 p.
33. Licitra G, Hernandez TM, Van Soest PJ (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol*; 57:347-358.
34. Makkar HP, Blummel M, Becker K (1995). Formation of the complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in in vitro techniques. *Br J Nut*; 73:897–913.
35. Makkar HP (2003). Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Rum Res*; 49:241–256.
36. Martin B, Coulon JB, Chamba JF, Bugaud C (1997). Effect of milk urea content on characteristics of matured Reblochon cheeses. *Le Lait*; 77:505-514.

37. McDonald P, Edwards RA, Green halgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA, Wilkinson RG (2010). *Animal Nutrition*. 7a. ed. Canada, Pearson Education, 712 p.
38. Mendoza A, Cajarville C, Repetto JL (2016a). Short communication: Intake, milk production, and milk fatty acid profile of dairy cows fed diets combining fresh forage with a total mixed ration. *J Dairy Sci*; 99:1938–1944.
39. Mendoza A, Cajarville C, Repetto JL (2016b). Digestive response of dairy cows fed diets combining fresh forage with a total mixed ration. *J Dairy Sci*; 99:8779–8789.
40. Misselbrook TH, Powell JM, Broderick GA, Grabber JH (2005). Dietary manipulation in dairy cattle – laboratory experiments to assess the influence on ammonia emissions. *J Dairy Sci*; 88:1765–1777.
41. Mueller-Harvey I (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J Sci Food Agric*; 86: 2010-2037.
42. NRC (2001) National Research Council. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7a. ed. Washington DC, National Academy Press, 381p.
43. Orlandi T, Kozloski G, Alves TP, Mesquita F, Capa de Avila S (2015). Digestibility, ruminal fermentation and duodenal flux of amino acids in steers fed grass forage plus concentrate containing increasing levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. *Anim Feed Sci Technol*; 210:37–45.
44. Pacheco DJ, Burke L, Cosgrove GP (2007). An empirical model to estimate efficiency of nitrogen utilization in cows grazing fresh forages. En: *Aust Dairy Sc Symp. Meeting the Challenges for Pasture-Based Dairying*. Melbourne, pp. 409–416.
45. Pacheco D, Waghorn GC (2008). Dietary nitrogen – definitions, digestion, excretion and consequences of excess for grazing ruminants. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*; 70:107-116.
46. Pastorini M, Pomiés N, Repetto JL, Mendoza A, Cajarville C (2019). Productive performance and digestive response of dairy cows fed different diets combining a total mixed ration and fresh forage. *J Dairy Sci*; 102:4118-4130.
47. Pérez-Ruchel AJ, Repetto JL, Cajarville C (2017). Supplementing high-quality fresh forage to growing lambs fed a total mixed ration diet led to higher intake without altering nutrient utilization. *Animal*; 11:2175-2183.
48. Powell JM, Aguerre MJ, Wattiaux MA (2011). Dietary crude protein and tannin impact dairy manure chemistry and ammonia emissions from incubated soils. *J Environ Qual*; 40:1767-1774.

49. Powell JM, Gourley C, Rotz CA, Weaver D (2010). Nitrogen use efficiency: A potential performance indicator and policy tool for dairy farms. *Environ Sci Poli*; 13(3): 217–228.
50. Pulido RG, Ruiz-Albarrán M, Balocchi O, Nannig P, Wittwer F (2015). Effect of timing of pasture allocation on production, behavior, rumen function, and metabolism of early lactating dairy cows during autumn. *Livest Sci*; 177:43–51.
51. Reed KF, Bonfá HC, Dijkstra J, Casper DP, Kebreab E (2017). Estimating the energetic cost of feeding excess dietary nitrogen to dairy cows. *J Dairy Sci*; 9:7116-7126.
52. Repetto JL, 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 mixture. *Animal*; 54(2):73-80.
53. Santana A, Cajarville C, Mendoza A, Repetto JL (2016). 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*; 11:616-624.
54. SAS. Statistical Analysis Systems Institute (2009). SAS Version 9.2. SAS institute.
55. Scharenberg A, Arrigo Y, Gutzwiller A, Wyss U, Hess HD, Kreuzer M, Dohme F (2007). Effect of feeding dehydrated and ensiled tanniferous sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on nitrogen and mineral digestion and metabolism of lambs. *Arch Anim Nutr*; 61(5):390–405.
56. Senger CCD, Kozloski GV, Sanchez LMB, Mesquita FR, Alves TP, Castagnino DS (2008). Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. *Anim Feed Sci Technol*; 146:169–174.
57. Sliwinski B, Kreuzer M, Sutter F, Machmueller A, Wettstein HR (2004). Performance, body nitrogen conversion and nitrogen emission from manure of dairy cows fed diets supplemented with different plant extracts. *J Anim Feed Sci*; 13:73-91
58. Smith D (1973). The non-structural carbohydrates. En: Bailey RW, Butler GW. *Chemistry and Biochemistry of herbage*. Londres, Ed. Academic Press, pp. 105–155.
59. Tas BM, Taweel H, Smtih HJ, Elgersma A, Dijkstra J, Tamminga S (2006). Utilisation of N perennial ryegrass cultivars by stall-fed lactating dairy cows. *Livest prod sci*; 100: 159-168.
60. Tamminga SA (1996). Review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. *J Anim Sci*; 74: 3112-3124.

61. Trevaskis LM, Fulkerson WJ, Nandra, KS (2004). Effect of time of feeding carbohydrate supplements and pasture on production of dairy cows. *Livest Prod Sci*; 85:275-285.
62. Ueda K, Mitani T, Kondo S (2016). Herbage intake and ruminal digestion of dairy cows grazed on perennial ryegrass pasture either in the morning or evening. *J Anim. Sci*; 87:997–1004.
63. Vasta V, Pagano RI, Luciano G, Scerra M, Caparra P, Foti F, Cilione C, Biondi L, Priolo A, Avondo M (2012). Effect of morning vs. afternoon grazing on intramuscular fatty acid composition in lamb. *Meat Sci*; 90: 93–98.
64. Vibart RE, Tavendale M, Otter D, Schwendel BH, Lowe K, Gregorini P, Pacheco D (2017). Milk production and composition, nitrogen utilization, and grazing behavior of late-lactation dairy cows as affected by time of allocation of a fresh strip of pasture. *J Dairy Sci*; 100:1–14.
65. Waghorn G (1996). Condensed tannins and nutrient absorption from the small intestine. En: Rode, LM. *Proceedings Canadian Society of Animal Science Canada*, pp. 175–194.
66. Waghorn G (2008). Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Anim Feed Sci Technol*; 147:116-139.
67. Wattiaux MA, Karg KL (2004). Protein Level for Alfalfa and Corn Silage-Based Diets: II. Nitrogen Balance and Manure Characteristics. *J Dairy Sci*; 87:3492-3502.