

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**INFLUENCIA DE LA DIETA Y DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN SOBRE LA
LIBERACIÓN *IN SITU* DE MACROMINERALES EN ALFALFA**

por

Rosina DIGENOVA VILLAMIL

**TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2006**

Tesis aprobada por:

Director:
Ing. Agr. Laura Astigarraga

.....
Ing. Agr. Ana Blanco

.....
Ing. Agr. Cristina Cabrera

Fecha: 22 de agosto de 2006

Autor:.....
Rosina Digenova Villamil

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las personas que formaron parte de esta tesis aportando datos, corrigiendo y acompañándome.

También agradezco a mis padres por su apoyo incondicional, y muy especialmente a mi madre, quien me inculcó desde siempre la importancia de tener una profesión.

TABLA DE CONTENIDO

| | Página |
|--|---------------|
| PÁGINA DE APROBACIÓN..... | II |
| AGRADECIMIENTOS | III |
| LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES..... | VI |
| | |
| 1. <u>INTRODUCCIÓN</u> | 1 |
| | |
| 2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> | 2 |
| 2.1. <u>INTRODUCCIÓN</u> | 2 |
| 2.2. <u>LOCALIZACIÓN ANATÓMICA Y FORMA QUÍMICA DE Ca Y Mg</u> <u>EN EL VEGETAL</u> | 3 |
| 2.3. <u>LIBERACIÓN MINERAL EN EL RUMEN Y EFECTO DEL pH</u> <u>RUMINAL SOBRE LA LIBERACIÓN</u> | 6 |
| 2.3.1. <u>Liberación mineral en el rumen</u> | 6 |
| 2.3.2. <u>Efectos del pH ruminal sobre la liberación mineral</u> | 14 |
| 2.4. <u>FACTORES QUE AFECTAN LA CANTIDAD DE MINERALES EN</u> <u>LAS PLANTAS Y SU LIBERACIÓN RUMINAL</u> | 15 |
| 2.4.1. <u>Efecto de la familia: leguminosas y gramíneas</u> | 15 |
| 2.4.2. <u>Estado fenológico</u> | 16 |
| 2.4.3. <u>Disponibilidad mineral del suelo</u> | 19 |
| 2.4.3.1 Efecto de la fertilización | 19 |
| 2.4.3.2 Tipo de suelo | 22 |
| 2.4.3.3 Materia orgánica del suelo | 23 |
| | |
| 3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> | 24 |
| 3.1. <u>LOCALIZACIÓN</u> | 24 |
| 3.2. <u>TRATAMIENTOS</u> | 24 |
| 3.3. <u>PASTURA EVALUADA</u> | 24 |
| 3.4. <u>ANIMALES Y ALIMENTACIÓN</u> | 25 |
| 3.5. <u>INCUBACIÓN <i>IN SITU</i></u> | 25 |
| 3.6. <u>ANÁLISIS QUÍMICOS</u> | 26 |
| 3.7. <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICOS</u> | 26 |
| | |
| 4. <u>RESULTADOS</u> | 28 |
| 4.1. <u>CONCENTRACIÓN INICIAL Y LIBERACIÓN RUMINAL</u> <u>INMEDIATA DE LA ALFALFA</u> | 28 |
| 4.2. <u>EFECTOS DE LA DIETA Y TIEMPO DE INCUBACIÓN EN LA</u> <u>LIBERACIÓN RUMINAL</u> | 28 |
| 4.3. <u>INTERACCIÓN ENTRE DIETA Y TIEMPO DE INCUBACIÓN</u> | 30 |
| 4.4. <u>VARIACIÓN DEL pH RUMINAL</u> | 34 |

| | |
|---|----|
| 5. <u>DISCUSIÓN</u> | 36 |
| 5.1. <u>CONCENTRACIÓN INICIAL Y LIBERACIÓN INMEDIATA DE MINERALES EN LA ALFALFA</u> | 36 |
| 5.1.1. <u>Concentración inicial</u> | 36 |
| 5.1.2. <u>Proporción inmediatamente disponible</u> | 37 |
| 5.2. <u>EFFECTO DIETA Y TIEMPO DE INCUBACIÓN EN LA LIBERACIÓN MINERAL RUMINAL</u> | 38 |
| 5.2.1. <u>Efecto de la composición de la dieta en la liberación de minerales en el rumen (100:0 y 70:30 forraje: concentrado respectivamente)</u> | 38 |
| 5.2.2. <u>Liberación mineral en 8 horas (t_8) y 16 horas (t_{16}) de incubación ruminal</u> | 39 |
| 5.2.3. <u>Tiempo para máxima liberación ruminal de los minerales</u> | 41 |
| 6. <u>CONCLUSIONES</u> | 43 |
| 7. <u>RESUMEN</u> | 44 |
| 8. <u>SUMMARY</u> | 45 |
| 9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 46 |
| 10. <u>ANEXOS</u> | 52 |

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

| Cuadro No. | Página |
|--|--------|
| 1. Composición mineral y porcentaje del total de minerales localizados en las fracciones FDN y FDA del heno de alfalfa (Kincaid y Cronrath, 1983) | 4 |
| 2. Composición mineral y porcentaje del total de minerales localizados en la fracción FDN y en la FDA del silo de pastura (Kincaid y Cronrath, 1983)..... | 5 |
| 3. Proporción del silo de alfalfa que es liberada inmediatamente y a las 72 horas de incubación y tiempo de incubación requerido para la máxima liberación de las distintas fracciones en horas (hs) | 9 |
| 4. Contenido mineral de gramíneas ensiladas después de 48 horas de incubación ruminal en comparación al contenido mineral de las bacterias | 14 |
| 5. Concentración macromineral de <i>Cynodon dactylon</i> en distintas dosis de N cosechada el 30 de mayo y el 18 de agosto. | 20 |
| 6. Contenido porcentual de MS, Cenizas, Ca y Mg de la alfalfa y la proporción desaparecida de estas fracciones en tiempo 0 (t ₀). | 28 |
| 7. Efecto medio de la dieta y efecto medio del tiempo de incubación (tiempo) sobre la desaparición de MS, ceniza y la liberación de Ca y de Mg. | 28 |
| 8. Efecto de la dieta y tiempo de incubación sobre la proporción desaparecida de MS..... | 30 |
| 9. Efecto de la dieta y tiempo de incubación sobre la proporción desaparecida de ceniza. | 31 |
| 10. Efecto de la dieta y tiempo de incubación sobre la proporción desaparecida del Ca. | 32 |
| 11. Efecto de la dieta y tiempo de incubación sobre la proporción desaparecida de Mg..... | 33 |
| 12. Valores de pH del fluido del rumen según el tiempo de incubación y la dieta base ofrecida. | 34 |
| 13. Concentración inicial de Ca y Mg en la alfalfa según diferentes autores en base seca..... | 36 |
| Figura No. | |
| 1. Desaparición del Ca de la alfalfa ensilada según tiempo de incubación..... | 11 |
| 2. Desaparición del Mg de la alfalfa ensilada según tiempo de incubación..... | 12 |
| 3. Efecto de la edad en la concentración de K, Ca, P, Mg y Na en <i>Cynodon dactylon</i> (MS). | 16 |
| 4. Efecto de la edad en la concentración de Fe, Zn, Mn y Cu en <i>Cynodon dactylon</i> (MS). | 17 |
| 5. Desaparición del Ca (g/g de concentración inicial) desde festuca Kentucky 31 festuca Kenhy y trébol rojo a dos estados de crecimiento durante la incubación en el rumen..... | 18 |

| | |
|---|----|
| 6. Desaparición del Mg (g/100g de concentración inicial) desde festuca Kentucky 31, festuca Kenhy y trébol rojo a dos estados de crecimiento durante la incubación en el rumen..... | 18 |
| 7. Cinética de desaparición de la Materia Seca de la alfalfa..... | 30 |
| 8. Cinética de desaparición de las cenizas de la alfalfa..... | 31 |
| 9. Cinética de desaparición del Calcio de la alfalfa..... | 32 |
| 10. Cinética de desaparición del Magnesio de la alfalfa..... | 33 |
| 11. Evolución del pH ruminal según el tipo de dieta..... | 34 |

1. INTRODUCCIÓN

Las producciones de leche y de carne han evolucionado y actualmente se dispone de animales con mayor producción de leche y mayor tasa de crecimiento corporal en el ganado de carne. A esto ha contribuido la aparición de una gran variedad de alimentos de alto valor energético y proteico en cantidad y calidad. Sin embargo, se han detectado síntomas de deficiencia o excesos minerales en el ganado de alta producción, a lo cual se le suma el costo económico elevado de la suplementación mineral que tampoco asegura un adecuado aporte al animal.

Por estas razones se hace indispensable desarrollar técnicas que permitan caracterizar la biodisponibilidad de los minerales contenidos en los alimentos, y particularmente en las pasturas, las cuales suministran gran parte de los minerales en las dietas con que se alimentan a los animales productores de leche y de carne.

Un aspecto importante de la biodisponibilidad mineral es la proporción desaparecida en el rumen, sitio de mayor liberación mineral. Existe información internacional sobre estimaciones de liberación mineral en rumen usando la técnica *in sacco* en forrajes templados en distintas etapas de crecimiento (Playne et al. 1978, Rooke et al. 1983, Van Eys y Reid 1987, Emmanuele y Staples 1990) pero no existen antecedentes de evaluaciones realizadas en Uruguay.

Para estos estudios es necesario ajustar previamente la metodología por lo cual los objetivos de este trabajo fueron evaluar el efecto del tiempo de incubación y el efecto de la dieta sobre la liberación de calcio y magnesio de una alfalfa de primavera.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. INTRODUCCIÓN

La nutrición mineral de los rumiantes es muy importante para una eficiente producción de leche y carne. Para esto, los minerales deben ser provistos en cantidades adecuadas en la dieta y así asegurar la producción, el estado corporal y una alta capacidad reproductiva. En una concepción actualizada de la nutrición mineral del rumiante, los minerales son necesarios además para mantener un adecuado crecimiento de los microorganismos del rumen y un eficiente proceso de fermentación en el marco de una adecuada combinación de energía-proteína. Bajas concentraciones de ciertos minerales en el forraje pueden perjudicar la habilidad de los microorganismos para digerir la fibra y sintetizar proteína. Por lo que los minerales entonces tendrán efecto tanto en el animal en sí mismo como a nivel ruminal en los microorganismos.

Es de interés conocer las características químicas de los minerales dentro de la planta, debido a que ello influye en su disponibilidad durante la degradación por los microorganismos del rumen y posterior absorción por el animal. La ubicación y el estado de los distintos minerales dentro de la estructura de la planta pueden influir en la liberación de estos minerales. Además, existen los factores de variación internos y externos a la planta que influirán en el contenido mineral de éstas. Los minerales que se tratarán con más profundidad en este trabajo son: Calcio (Ca) y Magnesio (Mg).

La variación en la cantidad de minerales presentes en el forraje se asocia con la estación, fertilización, tipo de suelo y el pH del suelo. Aunque el contenido mineral de los forrajes puede determinarse químicamente, la disponibilidad biológica es mucho más difícil de estimar y se define como el grado al cual el mineral ingerido de una fuente cualquiera es absorbido en una forma que puede ser utilizado en el metabolismo del animal o como un valor experimentalmente determinado el cual refleja la absorción y utilización del mineral ingerido en las condiciones del test (Fairweather-Tait, 1986). Debería estrictamente demostrarse la utilización de ese mineral dentro de un proceso metabólico del animal para establecer en términos estrictos el valor de biodisponibilidad. A nivel internacional, la utilización de los minerales de los suplementos ha sido extensamente revisada (Thompson 1978, Ammerman et al.1982), pero han sido pocos los estudios acerca de la utilización de los minerales de los forrajes (Joyce y Rattray 1970, Perdomo et al. 1977, Blaney et al. 1982, Reid et al. 1987, Van Eys y Reid 1987). La utilización que puede hacer un animal de un mineral depende de, al menos, dos procesos: 1) la solubilización o liberación del elemento a partir del alimento, lo cual es examinado en este trabajo y 2) la absorción del mineral liberado (Field, 1981).

2.2. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA Y FORMA QUÍMICA DE Ca Y Mg EN EL VEGETAL

El Magnesio no es casi nunca factor limitante para las plantas, salvo en suelos muy ácidos o arenosos. Se absorbe como ión divalente Mg^{++} y se comporta como un elemento móvil tanto en la planta como en la célula. Las hojas adultas son las primeras en expresar situaciones de deficiencia al emigrar el Mg a las hojas más jóvenes. Aproximadamente el 20% del Mg total de las hojas se encuentra en los cloroplastos, aunque solo entre el 10% y el 20% se presentan en las moléculas de clorofila. El resto se encuentra localizado en forma iónica soluble en el espacio intratilacoidal (Bonilla, 2000).

El Ca es inmóvil en la planta, forma parte de la laminilla media y cuando su contenido en el citoplasma sobrepasa ciertos límites es “bombeado” al exterior o es introducido en la vacuola donde, dado el pH ácido de la misma, puede precipitar como sales de oxalato, fosfato, carbonato y sulfato según las especies. Sin embargo, en el citosol su concentración sigue siendo muy baja, del orden de $1\mu mol$, pues si bien activa algunas enzimas muchas otras son inhibidas por encima de $1\mu mol$ (Bonilla, 2000), por lo que su función en el citosol es reducida y su mayor parte está ubicada en las paredes y en la superficie externa del plasmalema debido a que su permeabilidad es muy baja. Además, el Ca neutraliza los grupos carboxilos de los ácidos poligalacturónicos y da origen a pectatos de Ca (Montaldi et al., 1995), esta es la principal forma química en la cual el Ca se encuentra en la laminilla media (Mackie y Therion 1984, Bonilla 2000).

Usando una medida de análisis de dispersión de rayos X acoplada a un microscopio electrónico de escaneado, McManus et al. (1979) encontraron que el Ca llega a ser cerca de entre un 34 y un 64% del total de minerales encontrados en la pared celular de cinco gramíneas y cinco leguminosas respectivamente.

Los minerales asociados a la pared celular son liberados debido a la actividad celulolítica y proteolítica ruminal, pero más lentamente que los minerales contenidos en la porción soluble de la célula (Bonilla, 2000).

Kincaid y Cronrath (1983) analizaron muestras de heno de alfalfa y silo de pastura compuesta por 70 % de *Cynodom dactylon*, 10 a 15% de trébol y 10 a 15% raigrás anual, para determinar los contenidos de proteínas, fibra detergente neutro y ácido, ceniza y contenido mineral. Posteriormente, las fracciones de detergente neutro y ácido de las fibras fueron analizadas para detectar los minerales que contenían, con el objetivo de correlacionar los cambios en las concentraciones de los elementos minerales con aumentos en el contenido de la fracción “fibra” del forraje y luego determinar la

cantidad de minerales contenida en esta fracción. Los resultados obtenidos para Ca, P, Mg, K, Cu, Zn y Fe se exponen en los Cuadros 1 y 2.

Para el heno de alfalfa el Ca, P, Cu, Zn y Fe en la pared celular representan el 24% o más de cada elemento en el forraje (Cuadro 1). El Ca y Cu en la fracción FDN fue afectada significativamente por la calidad del forraje con coeficientes de correlación para Ca con % PC de 0.60, Ca con % FDN de -0.66, Ca con % FDA de -0.47 y para el Cu con % PC de 0.44 y con % FDN de -0.43. El K y el Mg parecen ser solubilizados rápidamente de la pared celular y solo están presentes en una pequeña cantidad en dicha fracción. Al analizar la fracción FDA, la cual representa la porción relativamente más indigestible del forraje, se obtuvieron las cantidades de cada mineral dentro de dicha fracción (Cuadro 1). Sólo el Cu, Zn y Fe estuvieron en esta fracción en concentraciones similares a las originales (Cuadro 1). El Ca se detectó en baja proporción en la fracción FDA, y el Ca de la fracción FDN puede ser Ca en forma de oxalato que se solubilizó con el tratamiento ácido al cual fue sometida esta fracción en este estudio. El Ca en la fracción FDA se relacionó negativamente con la fracción FDN con un coeficiente de -0.57 y positivamente con la PC con un coeficiente de 0.47.

Cuadro 1. Composición mineral y porcentaje del total de minerales localizados en las fracciones FDN y FDA del heno de alfalfa (Kincaid y Cronrath, 1983).

| Minerales | FDN | | FDA | |
|-----------------------|------------------|-------------|------------------|-------------|
| | Contenido X (DE) | | Contenido X (DE) | |
| Macrominerales | % de MS | % del total | g/100g de MS | % del total |
| Ca | 0,33 (0,06) | 24 | 0,04 (0,001) | 3 |
| P | 0,09 (0,06) | 31 | sd | sd |
| K | 0,04 (0,02) | 1 | 0,08 (0,04) | 3 |
| Mg | 0,016 (0,005) | 5 | 0,005 (0,001) | 2 |
| N | | | 0,6 (0,12) | |
| Microminerales | µg/g de MS | % del total | µg/g de MS | % del total |
| Cu | 3 (1) | 29 | 4 (1) | 43 |
| Zn | 9 (8) | 31 | 7 (2) | 23 |
| Fe | 295 (209) | 77 | 72 (44) | 19 |

X: promedio. DE: desvío estándar. N: nitrógeno. sd: sin dato

Cuadro 2. Composición mineral y porcentaje del total de minerales localizados en la fracción FDN y en la FDA del silo de pastura (Kincaid y Cronrath, 1983).

| | FDN | | FDA | |
|----------------|------------------|-------------|------------------|-------------|
| Minerales | Contenido X (DE) | | Contenido X (DE) | |
| Macrominerales | % MS | % del total | g/100g de MS | % del total |
| Ca | 0,26 (0,06) | 24 | 0,03 (0,007) | 3 |
| P | 0,07 (0,05) | 22 | sd | sd |
| K | 0,03 (0,01) | 1 | 0,09 (sd) | 3 |
| Mg | 0,013 (0,007) | 5 | 0,004 (0,09) | 2 |
| N | | | 0,8 (0,0009) | |
| Microminerales | µg/g de MS | % del total | µg/g de MS | % del total |
| Cu | 3 (1) | 46 | 4 (1) | 62 |
| Zn | 7 (5) | 28 | 6 (2) | 24 |
| Fe | 249 (256) | 45 | 85 (109) | 17 |

X: promedio. DE: desvío estándar. N: nitrógeno. sd: sin dato.

Las concentraciones minerales del silo de pastura en las fracciones FDN y FDA fueron similares a las descritas para el heno de alfalfa (Cuadro 2). El porcentaje del total para estos minerales también fue similar para la alfalfa como para el silo de pastura (Cuadro 2). Cantidades significativas de Ca, P, Cu, Zn y Fe estaban en la fracción FDN, y la fracción FDA tuvo cantidades más pequeñas de Ca y Fe.

En suma, el contenido mineral del heno de alfalfa y del silo de pastura es variable: cuando la calidad del forraje declina (como se indica por variación de los porcentajes de PC, FDN y FDA) las proporciones de Ca, Mg y Cu en el heno de alfalfa y P, K, Mg, Cu y Zn en el silo de pastura tienden a decrecer. En particular, el Ca y el Cu en las fracciones FDN y FDA decrecen cuando aumenta la cantidad de pared celular y lignina, lo cual sugiere una parcial dilución o un efecto de traslocación. La biodisponibilidad de los minerales asociada a las fracciones FDN y FDA es poco conocida.

Otro factor que puede afectar la disponibilidad de los minerales para los rumiantes es la asociación del mineral con compuestos insolubles. Jones (1978) propone que los cationes metálicos forman complejos en la pared celular principalmente con grupos carboxilos del ácido urónico y grupos carboxilos e hidroxilos de los compuestos fenólicos.

Los forrajes, con la posible excepción del maíz, usualmente contienen una adecuada cantidad de calcio para los vacunos y ovinos. Aunque la disponibilidad del

mismo en algunos forrajes puede ser baja por la presencia de oxalatos de calcio. Según el trabajo de Blaney et al. (1982) en gramíneas tropicales que contienen cristales de oxalato de calcio estos presentan una disponibilidad de calcio de 20% menos que en aquellos con poco oxalato. Los rumiantes pueden degradar oxalatos solubles en el rumen, esta degradación es facilitada por la adaptación de la microflora ruminal a incrementos en la concentración de oxalato. Ward et al. (1979) reportaron que cristales de $\text{Ca}(\text{COO})_2$ presentes en alfalfa fueron solamente degradados en forma parcial en el rumen del ganado. Este estudio sugiere que del 20 al 33% del calcio de la alfalfa se encontraba en forma de $\text{Ca}(\text{COO})_2$ y, aparentemente, no estaba disponible para los rumiantes.

En otro estudio (Negi, 1971) se encontró que cuando se suministraba al ganado un suplemento de $\text{Ca}(\text{COO})_2$ solamente un 29% del oxalato se excretaba en heces. Los datos de este estudio muestran que la disponibilidad de Ca del $\text{Ca}(\text{COO})_2$ es aproximadamente 16% para el ganado que se encuentra en balance positivo de Ca a un máximo de alrededor de 26% para el ganado en balance negativo de Ca. Allison et al. (1977) reportan la existencia de una adaptación por parte de la microflora ruminal al consumo de oxalatos.

La diferencia entre los resultados de Ward et al. (1979) y los de Blaney et al. (1982), entre las magnitudes que alcanza la disponibilidad de Ca como oxalato podría explicarse por las diferencias en la estructura anatómica de las paredes celulares entre gramíneas y leguminosas además del posible efecto de la adaptación del rumen a la degradación de $\text{Ca}(\text{COO})_2$ de los animales utilizados en los dos estudios.

Otra barrera para la utilización de cristales de $\text{Ca}(\text{COO})_2$ presentes en el forraje es la pared celular que los retiene y ésta debe romperse por acción mecánica o microbiana antes de que los cristales puedan ser degradados (Blaney et al., 1982).

2.3. LIBERACIÓN MINERAL EN EL RUMEN Y EFECTO DEL pH RUMINAL SOBRE LA LIBERACIÓN

2.3.1. Liberación mineral en el rumen

La asociación de ciertos minerales con la fibra o con otros componentes insolubles de la planta puede disminuir la cantidad de minerales liberados desde el forraje en el tracto gastrointestinal. La habilidad de los forrajes de proveer a los animales una adecuada cantidad de minerales depende del contenido mineral y de la biodisponibilidad de los minerales.

Porque es difícil medir la utilización de varios minerales por los rumiantes, la investigación frecuentemente ha usado el criterio de absorción aparente, balance

mineral, concentración mineral tisular o solubilización de los minerales del forraje en rumen usando técnicas *in situ* para estimar la biodisponibilidad. En mediciones de absorción aparente es cuestionable la valoración de los minerales absorbidos y la información de absorción verdadera en rumiantes consumiendo forraje es limitada ya que es difícil medir los componentes endógenos fecales.

Un requisito previo para la absorción mineral es la liberación de los minerales desde el forraje en una forma soluble. Los minerales pueden ser absorbidos en forma iónica o como complejos solubles o quelatos dependiendo del mineral en particular, pero los minerales no son absorbidos cuando están unidos a sustancias insolubles.

Un número de estudios reportan la liberación de minerales del forraje en el rumen usando procedimientos *in situ* y la proporción solubilizada en el rumen ha sido generalmente alta para la mayoría de los minerales (Playne et al. 1978, Rooke et al. 1983, Van Eys y Reid 1987, Emanuele y Staples 1990, Ledoux y Martz 1991, Puoli et al. 1991).

Estudios *in situ* han mostrado que los minerales en los forrajes se presentan en: 1) una fracción que es muy soluble y de rápida liberación, 2) otra fracción que es liberada más lentamente, 3) una fracción que no es liberada. La mayor proporción del Mg, K, P, y Cu en el forraje aparece en el residuo de la fracción rápidamente liberada (Playne et al. 1978, Van Eys y Reid 1987, Emanuele y Staples 1990).

Emanuele et al. (1991), midieron la solubilidad de los macrominerales desde el forraje dentro del rumen, abomaso e intestino usando la técnica de las bolsitas de nylon. Después de una incubación ruminal de 24 horas, las bolsas fueron incubadas por una hora en una solución de pepsina ácida que simulaba un medio ambiente abomasal. Las bolsitas luego eran colocadas en el duodeno de una vaca con cánula y se recolectaban en las heces. La mayor proporción liberada de calcio y magnesio ocurrió en el rumen. La liberación total de calcio en el tracto digestivo varió de 47 a 91% dependiendo de la especie forrajera, mientras que la liberación total del Mg fue alta para todos los forrajes evaluados, con un rango de liberación de 84% a 100%.

La liberación de los minerales al medio ruminal no significa necesariamente que serán absorbidos. Minerales solubles interactúan con bacterias, otros minerales u otros componentes del forraje formando compuestos insolubles. Por otro lado, la técnica *in situ* para estimar la liberación mineral de forrajes tiene limitaciones. Pueden ocurrir errores debidos a la acumulación de residuos bacterianos en las bolsitas y a los minerales solubles entrando a las mismas desde el medio ruminal y uniéndose con el forraje, por lo que se estarían subestimando las cantidades de minerales liberadas dentro de las bolsitas (Emanuele et al., 1991).

Emanuele y Staples (1990), midieron la liberación de Ca, Mg, P y Zn de seis especies forrajeras, alfalfa (ensilada) y cinco gramíneas tropicales, con una técnica *in vitro* y una técnica *in situ*. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) evaluar las técnicas *in vitro* e *in situ* para medir la liberación de minerales desde los forrajes, 2) medir la solubilidad en el rumen y el grado de liberación de Ca, Mg, P, K, Cu, y Zn a partir de seis especies forrajeras, 3) determinar si la concentración de pared celular de un forraje influye sobre la cantidad de mineral liberado del mismo.

La técnica *in situ* utilizada por estos autores permitió separar en tres el contenido mineral de los forrajes: fracción liberada inmediatamente, fracción liberada con dependencia del tiempo y la fracción no liberada. La fracción inmediatamente liberada (lo soluble más partículas pequeñas que caben a través de los poros de la bolsa) fue estimada a partir del lavado en agua de las muestras (en bolsas de polifilamento) y se calculó como la cantidad inicial presente en la muestra menos la cantidad remanente en el residuo en el tiempo 0. La fracción cuya liberación depende del tiempo de incubación fue la liberada durante el proceso de digestión en el rumen, y es la cantidad inicial menos la cantidad no liberada. La cantidad de mineral no disponible fue la que permaneció en el residuo luego de alcanzarse el máximo tiempo de incubación ruminal de las bolsas.

Para Emanuele y Staples (1990) el porcentaje de minerales inmediatamente liberado varía según la especie forrajera y según el mineral considerado. En el caso de la alfalfa ensilada (cortada en 50% de floración), las proporciones desaparecidas se presentan en el Cuadro 3. El orden de la liberación inmediata de los minerales en el rumen promediado entre los forrajes fue K(100%)>Mg(82%)>Cu(71%)>P(66%)>Ca(29%)>Zn(26%). Con la excepción del P, estos valores son ligeramente superiores a los que obtuvieron Van Eys y Reid (1987) en festuca y trébol rojo cosechado en julio-agosto después de tres horas de incubación ruminal (tiempo que dichos autores tomaron para medir la desaparición inmediata); sin embargo, cuando la cosecha fue más temprana (mayo) los valores y el ordenamiento de la desaparición inmediata mineral fueron: K(90%)>P(82%)>Mg(75%)>Ca(45%), las proporciones inmediatamente liberadas de K y Mg siguieron siendo ligeramente mayores en el trabajo de Emanuele y Staples (1990) mientras que las proporciones de Ca y P liberados dentro de las tres horas de incubación fueron ampliamente mayores en festuca y trébol rojo en estado vegetativo. Si observamos solamente los valores reportados para la alfalfa ensilada las proporciones inmediatamente liberadas de Mg y Ca fueron similares a las reportadas por Van Eys y Reid (1987) (promediando entre todos los forrajes y estados de crecimiento) y en cuanto a los restantes minerales las diferencias en las proporciones liberadas no fueron pronunciadas.

Cuadro 3. Proporción del silo de alfalfa que es liberada inmediatamente y a las 72 horas de incubación y tiempo de incubación requerido para la máxima liberación de las distintas fracciones en horas (hs).

| Alfalfa (silo) | Fracción inmediatamente disponible (% inicial) | Fracción liberada después de las 72 hs de incubación | Tiempo de incubación (hs) requerido para la máxima liberación |
|----------------|--|--|---|
| MS | 36,1 | 77,8 | 36-72 |
| FDN | - | 61,0 | 36-72 |
| Ca | 46,7 | 59,3 | 12-18 |
| Mg | 71,8 | 95,2 | 12-30 |
| K | 99,8 | 99,9 | 2 |
| P | 75,9 | 85,1 | 4-6 |
| Cu | 88,9 | 92,9 | 4-12 |
| Zn | 25,8 | 79,4 | 12-18 |

Fuente: Emanuele y Staples (1990)

Los anteriores ordenamientos minerales en términos de su fracción inmediatamente disponible están de acuerdo, en parte, con los resultados hallados por Rooke et al. (1983), donde se ordenó la liberación mineral inmediata en alfalfa (ensilada) y de raigrás (ensilado) del siguiente modo: Na>Mg>K>Cu>Ca>Zn>P.

A partir de los anteriores estudios puede concluirse que un gran porcentaje del K, Mg y Na serán rápidamente liberados de los forrajes, en tanto que un menor porcentaje de Ca y Zn se encuentran inmediatamente disponibles.

La técnica *in situ* es un buen estimador del método de separación mecánica de los forrajes en fracciones “pared celular” y “contenido celular” utilizando cilindros rotativos empleados por Whitehead et al. (1985). Esta técnica elimina la posibilidad de contaminación celular causada por los microorganismos del rumen. Estos autores ordenaron la liberación de los minerales contenidos en la fracción pared celular y en la fracción contenido celular de dos leguminosas y dos gramíneas sobre la base de su solubilidad en agua. El orden fue: K>P>Mg>Cu>Ca>Zn, promedio para las leguminosas y gramíneas estudiadas, lo cual avalaría lo reportado por los autores antes mencionados.

Aunque presumiblemente, los minerales de los forrajes de alta calidad serían liberados ampliamente para ser metabolizados por el animal la magnitud de la liberación de Ca en el silo de alfalfa en el estudio de Emanuele y Staples (1990) fue la menor de todos los forrajes evaluados, pudiendo haber sido la causa la presencia de oxalatos ya

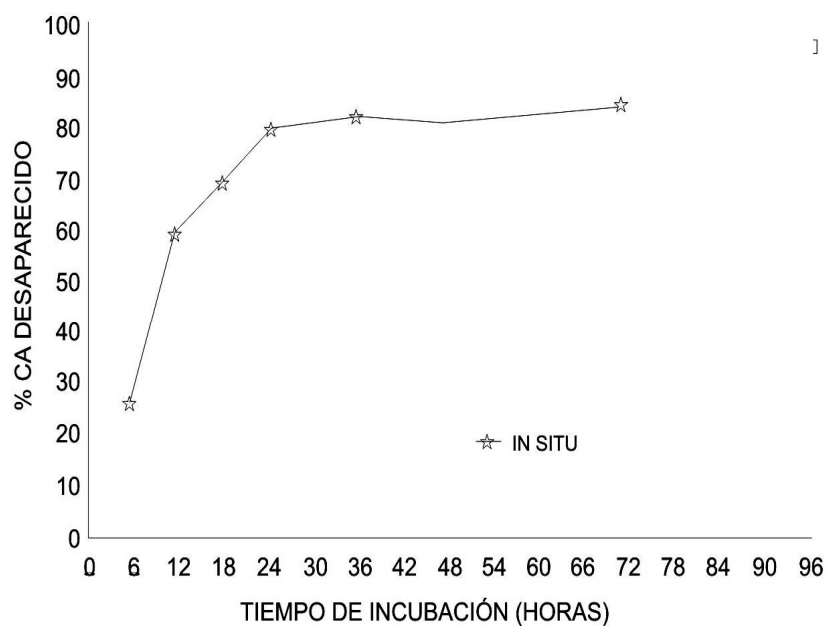
mencionada por Ward et al. (1979), quienes encontraron que hasta un 33% del Ca en la alfalfa estaba unido a oxalatos que rodean los haces vasculares y, por lo tanto, no estaban disponibles para los rumiantes. También el efecto de la etapa de crecimiento de la alfalfa ensilada sobre la liberación mineral necesita ser examinada ya que ésta estaba en una etapa de madurez fisiológica diferente a las otras forrajeras (florecedo vs. vegetativo). Las tasas de liberación en el trabajo de Emanuele y Staples (1990) para el Ca, Mg y K, fueron similares entre los forrajes de mayor y menor calidad.

Las proporciones entre todos los forrajes evaluados de minerales liberados lentamente en el trabajo de Emanuele y Staples (1990) fueron: 13 a 74% para el Ca, 4 a 23% para Mg, 0 a 49% para P, 0 a 39% para Cu y 19 a 68% para Zn. Valores similares han sido reportados para la porción mineral asociada con la pared celular vegetal (Whitehead et al., 1985). De todos los forrajes evaluados solo una pequeña cantidad de Mg (>23%), P (>15%) y Cu (>19%) se liberaron lentamente, y nada de K. Esto podría indicar, que dichos minerales estaban dentro del contenido celular o que son partes de componentes hidrosolubles de la planta. También podrían estar contenidos en una parte de la pared celular altamente digerible como el mesófilo o el floema (Akin y Burdick, 1975). Un 38% del calcio liberado y un 44% del zinc liberado (promedio entre los forrajes), estuvieron en la fracción lentamente liberada, posiblemente indicando su asociación con la pared celular.

La liberación máxima de Ca y Mg, por lo general, requirió que el tiempo de incubación fuera más largo que para el K, P, Cu o Zn. Para el caso del silo de alfalfa el tiempo de incubación para la máxima liberación (Cuadro 5), fue para el Ca de 12 a 18 horas y para el Mg entre 12 y 30 horas (Figura 1 y 2). En el trabajo de Van Eys y Reid (1987) se observó que la mayoría de los minerales alcanzaban su máxima proporción de desaparición antes de las 24 horas de incubación aun en estados más avanzados de madurez. Para los minerales N, K, P y Mg los cambios en la proporción desaparecida después de las 12 horas de incubación fueron pequeños, especialmente en etapas tempranas de crecimiento. Para el caso del Ca a las 20 horas de incubación ya se había alcanzado su máxima liberación en ambos estados de crecimiento tanto para el trébol rojo como para la festuca Kenhy; no sucedió así para la festuca Kentucky 31 cuando su estado de crecimiento era avanzado; su máxima liberación se obtuvo a las 48 horas de incubación ruminal. Playne et al. (1978) también encontraron que se requería un mayor tiempo de incubación para la liberación máxima de Ca (48 horas). El mayor tiempo requerido por el Ca para su liberación podría estar explicado por la función que tiene este mineral en la planta, ya que es importante para la estabilidad de la pared celular y membranas. Por lo tanto, a medida que la pared celular es digerida, mayores cantidades de Ca pueden ser liberadas. Para Rooke et al. (1983) no hubo cambios en la proporción mineral liberada en las gramíneas ensiladas después de las 24 horas de incubación ruminal.

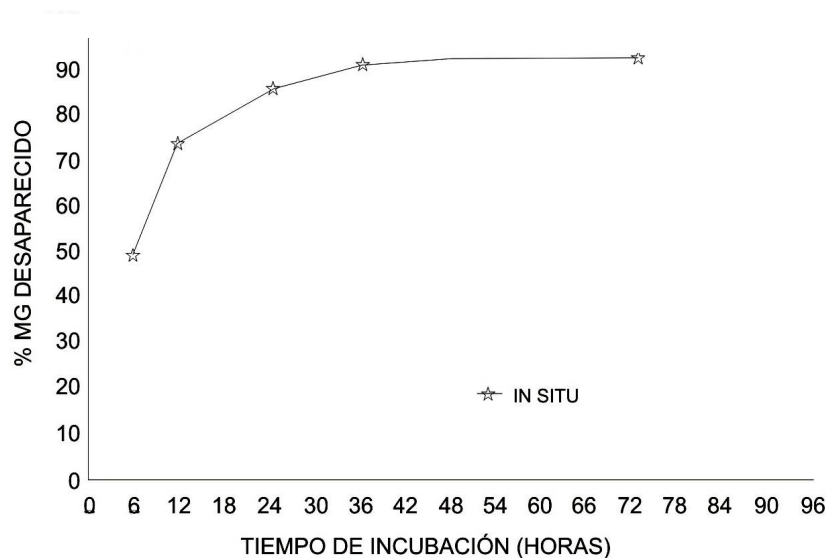
En el trabajo de Rooke et al. (1983), también se utilizó la técnica de bolsitas y éstas contenían muestras de gramíneas ensiladas y fueron incubadas en el rumen de vacas para determinar la liberación mineral. Las tasas de desaparición mineral desde las bolsitas fueron más rápidas que la tasa de desaparición de la materia seca. La desaparición de cada elemento mineral desde las bolsitas ubicadas en el rumen fue caracterizada por una rápida liberación de minerales dentro de las dos horas, seguida por una lenta liberación extendiéndose hasta las 48 horas de incubación en el rumen.

Figura 1. Desaparición del Ca de la alfalfa ensilada según tiempo de incubación.



Fuente: Emanuele y Staples (1990)

Figura 2. Desaparición del Mg de la alfalfa ensilada según tiempo de incubación.



Fuente: Emanuele y Staples (1990)

Los minerales fueron ordenados por Rooke et al. (1983) de acuerdo a su patrón de liberación en la etapa de rápida liberación, encontrándose lo siguiente: $P < Zn < Ca < Cu < K < Mg < Na$. No se encontraron diferencias en las tasas de liberación de cada mineral en la fase lenta.

Los autores anteriormente citados ordenaron la proporción remanente de cada mineral en las bolsitas de la siguiente manera: $Na < Mg < K < Cu < Ca < Zn < P$ y fue esencialmente mantenida en todos los tiempos de incubación del rumen, con la excepción del K, el que presentó mayor proporción remanente que el Cu después de 12, 24 y 48 horas de incubación y el Na que presentó mayor proporción remanente que el Mg después de 24 horas de incubación. Sin embargo, las diferencias entre minerales disminuyen a medida que el tiempo de incubación ruminal aumenta. El orden anteriormente descrito, como es de esperar, es al revés del orden establecido en la fase de liberación rápida.

Estos resultados reportados por Rooke et al. (1983) pueden compararse con los hallados por Playne et al. (1978) quienes evaluaron con la técnica *in sacco* el rango de desaparición de cuatro henos tropicales, de dos gramíneas y dos leguminosas. Haciendo esta comparación hay que destacar que, los henos usados por Playne et al. (1978),

probablemente tuvieron más lignificada la pared celular. La mayor diferencia entre los resultados de estos dos trabajos fueron después de las 12, 24 y 48 horas de incubación en el rumen; el Ca, Na, P y Mg remanentes en las bolsas conteniendo henos tropicales (Playne et al., 1978) fueron mayores que las bolsas conteniendo silo; para el K la proporción remanente fue similar en los dos experimentos.

Existen dos factores que pueden contribuir a la diferencia entre los dos trabajos anteriormente citados. El primero, como ya se mencionó, es la presencia de mayor cantidad de lignina en la pared celular de los henos tropicales que pueden retener los minerales y dejarlos no disponibles para su liberación en el rumen. El segundo factor que puede estar influyendo en las diferencias es el procedimiento de lavado usado para remover las partículas contaminantes del fluido ruminal y las bacterias ruminales del residuo de MS de las bolsas después de la incubación ruminal. En el trabajo de Rooke et al. (1983) se utilizó un lavado a mano y en máquina lavadora seguido de una inmersión en agua destilada, lo que parece ser un método más profundo que el usado en el experimento de Playne et al. (1978), donde se utilizó un lavado a mano. El lavado mecánico remueve sustancialmente más N (nitrógeno) de las bolsas conteniendo heno después de la incubación ruminal que lo hecho por el lavado a mano (Paine et al., 1982). En el cuadro 4, se presenta la proporción residual de diferentes minerales liberados desde gramíneas ensiladas después de 48 horas de incubación ruminal y el contenido mineral de las bacterias. A partir de los resultados del Cuadro puede observarse que todo el Na y el P en las bolsas pueden provenir de la contaminación microbiana después de 48 horas de incubación, mientras que el Ca remanente en las bolsas y aproximadamente la mitad del K y el Mg pueden ser del alimento original (Rooke et al., 1983).

Por otro lado, las proporciones minerales liberadas rápidamente de las especies forrajeras pueden no estar ampliamente disponibles para la absorción en el rumen. La actividad bacteriana puede dejar minerales no disponibles en el rumen. Las superficies de las paredes celulares bacterianas están cargadas negativamente a pH neutro (Mackie y Therion, 1984). Las paredes celulares de las bacterias Grampositivas pueden intercambiar rápidamente iones metálicos con el ambiente circundante. Las paredes celulares de las bacterias Gramnegativas contienen magnesio y calcio como componentes importantes de su membrana externa y ayudan a mantener la estructura de la membrana externa (Mackie y Therion, 1984). El Ca, Mg, Zn y Cu, pueden acumularse en las paredes celulares bacterianas. Aumentar la cantidad de estos minerales en solución o en la dieta ha incrementado su concentración en la pared celular bacteriana (Fitt y Hutton 1974a, Fitt et al. 1974b, Durand y Kawashima 1980). Las concentraciones de Zn y Cu, de los microorganismos del rumen pueden ser de dos a cuatro veces mayores que las de la dieta (Durand y Kawashima, 1980). La población microbiana del rumen podría ser responsable de la reducida disponibilidad del Mg de la dieta observada en las especies de rumiantes en comparación con las especies no rumiantes (Fitt et al., 1974b).

Cuadro 4. Contenido mineral de gramíneas ensiladas después de 48 horas de incubación ruminal en comparación al contenido mineral de las bacterias.

| | Contenido mineral de la MS residual después de 48 horas de incubación ruminal | Contenido mineral de las bacterias |
|-----------|---|------------------------------------|
| Mineral | g/Kg de MS residual | g/Kg de MS Bacteriana |
| K | 4,9 | 38,8 |
| Ca | 2,2 | 3,0 |
| Na | 0,88 | 47,9 |
| P | 1,2 | 28,5 |
| Mg | 0,31 | 2,6 |

Fuente: Rooke et al. (1983)

Por otra parte, se ha mostrado que la pared celular de las bacterias del rumen son capaces de quelatinizar Mg en su superficie (Fitt y Hutton, 1974b). Un estudio más reciente (MacGregor, 1980) en ovejas recibiendo 1.25 g de Mg por día en su dieta reporta que 0.49 a 0.65g de Mg por día fue asociado con la biomasa microbiana que abandona el rumen.

2.3.2. Efectos del pH ruminal sobre la liberación mineral

Estudios más recientes como el de Guimarães et al. (2001), donde se evaluaron dietas con distintas relaciones forraje-concentrado (70:30 y 30:70) encontraron que el pH es un factor importante en la actividad proteolítica del rumen; el valor óptimo de pH sería entre 6 y 7, siendo que para un gran número de microorganismos la actividad máxima se sitúa en torno a un pH de 6,5 (Coelho Da Silva y Leâfo, 1979). Con reducciones moderadas de pH ruminal de hasta 6, la digestión de la fibra decrece sin influenciar el número de microorganismos celulolíticos. Cuando las reducciones de pH están dentro de la faja de 5,5 a 5, ocurre una disminución del número de microorganismos celulolíticos, como también en la tasa de crecimiento, pudiendo causar inhibiciones en la digestión de la fibra (Hoover, 1986). Merchen et al. (1986), Cecava et al. (1991) encontraron influencia del nivel energético sobre la eficiencia microbiana. Al contrario de estos autores (Carvalho et al. 1997, Cardoso et al. 2000) verifican que la eficiencia microbiana no fue afectada por los distintos niveles de concentrado de la dieta.

2.4. FACTORES QUE AFECTAN LA CANTIDAD DE MINERALES EN LAS PLANTAS Y SU LIBERACIÓN RUMINAL

2.4.1. Efecto de la familia: leguminosas y gramíneas

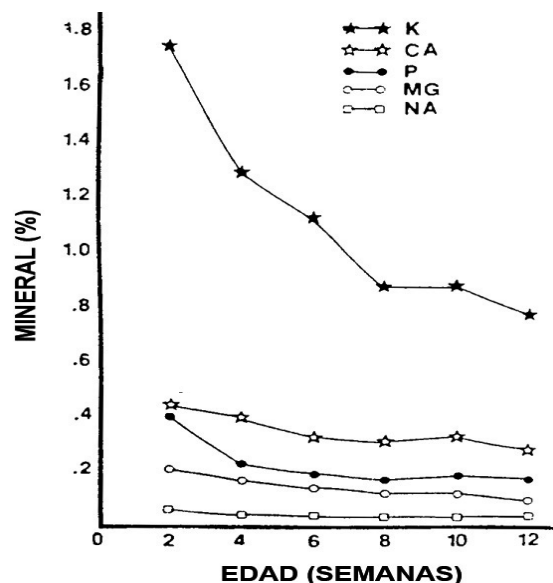
Generalmente, las leguminosas tienen mayores concentraciones de Ca, Mg, K, Cu, Zn y Co que las gramíneas, así como existen también diferencias en la misma especie (Odom et al., 1980). Tanto Todd (1961) como Kincaid y Cronrath (1983) reportan valores mayores de Ca y Mg en leguminosas que en gramíneas. Según el trabajo de Emanuele y Staples (1990) donde se evalúan 6 especies forrajeras, solo el caso del Ca fue considerablemente mayor en las leguminosas que en las gramíneas. Un patrón similar fue observado por Reid et al. (1987) en alfalfa, trébol rojo, *Cynodom dactilon* y raigrás. Diferencias en concentraciones minerales entre especies y variedades forrajeras también se han visto en condiciones subtropicales (Rojas-Osechas, 1985) y tropicales (Gomide 1978, Reid y Horvath 1980). En su trabajo, Van Eys y Reid (1987), al igual que los autores anteriores, reportaron mayores concentraciones minerales en las leguminosas que en las gramíneas, independientemente del factor año. También analizaron la correlación entre la velocidad de desaparición y la concentración inicial del forraje, encontrando que el coeficiente de correlación no reportaba diferencias significantes para la mayoría de los elementos minerales después de 3, 6 y 12 horas de incubación ruminal. Con respecto a la proporción liberada después de tres horas de incubación ruminal entre los forrajes evaluados se observaron diferencias: la festuca Kenhy tuvo las mayores desapariciones (promedios) para el N, P, K y S y la menor en Ca, mientras que el trébol rojo obtuvo la mayor desaparición de Mg en este tiempo. Las proporciones desaparecidas después de las 48 horas de incubación también fueron diferentes para los distintos forrajes: el trébol rojo obtuvo los mayores valores de desaparición en Ca (80.08%), Mg (95.05%), P (91.1%) y S (86.5%) y las menores proporciones de desaparición para estos minerales se reportaron para la festuca Kentucky 31 que fueron Ca (71%), Mg (91.9%), P (88.25%) y S (81.2%) mientras que la festuca Kenhy obtuvo valores intermedios de desaparición.

Whitehead et al. (1985) reportan que las diferencias en la proporción de Ca en la fracción rápidamente disponible entre gramíneas y leguminosas probablemente es resultado del mayor contenido de pectinas en leguminosas y, por lo tanto, refleja una mayor asociación de Ca con la pared celular en forma de pectatos.

2.4.2. Estado fenológico

El estado de madurez de la planta también influye en su contenido mineral. La etapa de mayores contenidos minerales es generalmente durante los primeros estadios de crecimiento. Cuando avanza la maduración de las plantas, aumenta la materia seca más rápidamente que la cantidad de minerales, causando la disminución de la concentración mineral (Fleming, 1973). Particularmente, el P y el K disminuyen marcadamente cuando la maduración avanza mientras el Ca no es muy afectado por el estado de maduración (Fleming 1973, Underwoods 1981, Ammerman et al. 1982). Garate y Bonilla (2000) mencionan el caso del K, evaluado en cebada cultivada en campo con un suministro adecuado de K, el cual se presenta en una proporción de 5 a 6% en la planta joven y baja a una proporción de 1% en la maduración, atribuyéndolo exclusivamente a un efecto de dilución, ya que la concentración de K en el extracto acuoso (jugo vacuolar) permanece constante a lo largo del ciclo. La disminución de la concentración de Co, Cu, Fe, Mb y Zn también ocurre con el avance del estado fenológico (Underwoods, 1981). Ammerman et al. (1982), evaluaron la concentración mineral con el avance de la edad (en semanas) del heno de *Cynodon dactylon*, encontrando que todos los minerales decrecían ($P < 0.01$) cuando la edad del heno se incrementaba (Figura 3 y 4). La mayor disminución ocurrió para el Mn, aunque todos los minerales evaluados decrecían aproximadamente 57% cuando el heno pasó de 2 semanas a 12 semanas de edad.

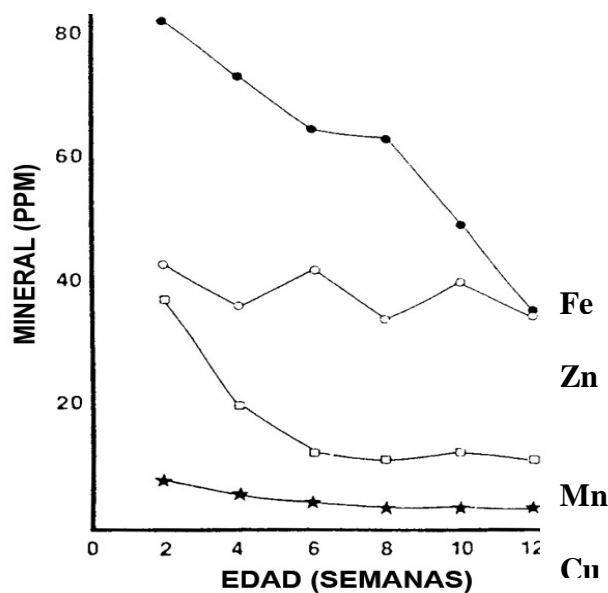
Figura 3. Efecto de la edad en la concentración de K, Ca, P, Mg y Na en *Cynodon dactylon* (MS).



Fuente: Ammerman et al. (1982)

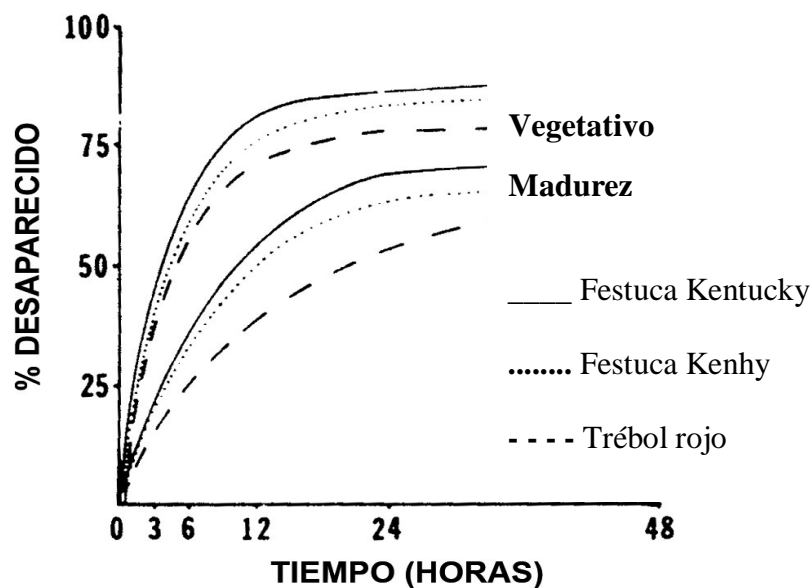
Además, Van Eys y Reid (1987) evaluaron las correlaciones entre las proporciones desaparecidas a diferentes tiempos de incubación ruminal y el avance de la edad de la planta (Figura 4 y 5). Utilizando dos variedades de festuca y una de trébol rojo a diferentes estados de crecimiento se encontró que, después de 3 horas de incubación ruminal, existía un efecto de la edad de la pastura significativo para todos los minerales, siendo más pronunciado en el caso del K y Ca ($P < 0.001$). La tendencia general fue hacia una disminución de la proporción desaparecida con la madurez de la pastura. Después de las 48 horas de incubación ruminal el promedio en las cantidades desaparecidas decrece si se pasa del estado vegetativo a la madurez: los valores promedios de desaparición obtenidos disminuyen para las festucas en 5% para P, 3% para K, 26% para Ca y 4% para Mg y para el trébol rojo, decrece en 7% para P, 5% para K, 13% para Ca y 4% para Mg. En cuanto a la velocidad de desaparición constante se encontraron correlaciones significativas de ésta con el estado de crecimiento para el Ca, Mg y S. Mientras que los demás elementos minerales no mostraron cambios consistentes en la velocidad de desaparición mineral con los cambios de estado de crecimiento de la pastura. Durante los primeros estados de crecimiento la velocidad de desaparición del Ca y S generalmente decrece con el aumento en la edad de la pastura. La velocidad de desaparición del Mg muestra una tendencia hacia un incremento entre el primer y el segundo corte pero decrece en los cortes subsecuentes.

Figura 4. Efecto de la edad en la concentración de Fe, Zn, Mn y Cu en *Cynodon dactylon* (MS).



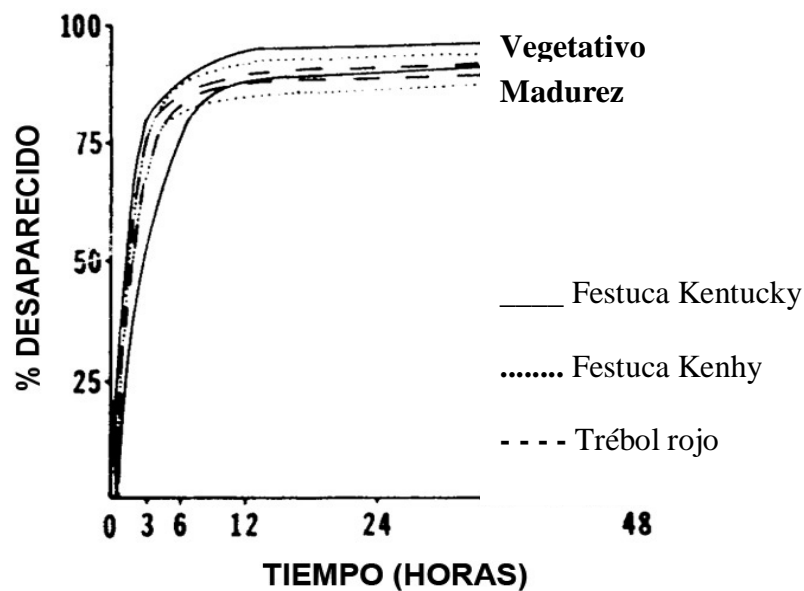
Fuente: Ammerman et al. (1982)

Figura 5. Desaparición del Ca (g/g de concentración inicial) desde festuca Kentucky 31, festuca Kenhy y trébol rojo a dos estados de crecimiento durante la incubación en el rumen.



Fuente: Van Eys y Red (1987)

Figura 6. Desaparición del Mg (g/100g de concentración inicial) desde festuca Kentucky 31, festuca Kenhy y trébol rojo a dos estados de crecimiento durante la incubación en el rumen.



Fuente: Van Eys y Reid (1987)

2.4.3. Disponibilidad mineral del suelo

La disponibilidad en el suelo para la planta muchas veces es un porcentaje menor de los minerales totales, y ello varía con el tipo de suelo. Hay que considerar la roca madre de la cual es originario el suelo, la pérdida de suelo por erosión y el aporte mineral por fertilizantes, así como lo que aporta el agua. La concentración de minerales en el suelo disponible para las plantas es dependiente del pH del suelo, humedad y condiciones de drenaje. Los macrominerales son menos afectados por los cambios en el pH que los microminerales.

2.4.3.1 Efecto de la fertilización

Numerosos estudios indican que, el incremento en la concentración de ciertos minerales vía fertilización, puede afectar la calidad del forraje, y este efecto es diferente del que tiene la suplementación mineral al animal consumiendo el mismo forraje sin fertilizar. La fertilización con calcio en *Digitaria decumbens* creciendo en suelos deficientes en calcio, reduce el contenido de fibra detergente ácido e incrementa el calcio desde 2.2 a 3.8 g/Kg (Rees y Minson, 1976). En este estudio, la digestibilidad de la MS fue 4.6 puntos porcentuales más alta y el consumo voluntario fue 11.3% mayor en ovejas comiendo forraje fertilizado con Ca en comparación al mismo forraje sin fertilizar. Sin embargo, la suplementación animal con Ca cuando se consumió el forraje no fertilizado, no tuvo efecto en la digestibilidad y el consumo (Rees y Minson, 1976).

La fertilización de la alfalfa con magnesio, reduce los constituyentes de la pared celular (Reid et al., 1979). El tratamiento con la mayor cantidad de fertilización con Mg evaluado (448 Kg/ha) incrementó el consumo en corderos del heno cosechado en los primeros dos años después de la fertilización. Incrementos en el contenido de Mg en *Phleum pratense* desde 0.8 a 1.6 g/Kg MS vía fertilización con Mg no afectó el consumo de ovejas pero redujo la digestibilidad de la MS en un 3.5% (Reid et al., 1984). Reid y Jung (1991), obtuvieron resultados en su estudio que indican que, la concentración de Mg del forraje tiene un efecto negativo en la digestibilidad, pero un efecto positivo en el consumo.

La fertilización fosfatada, generalmente incrementa el P vegetal si el stock en el suelo es bajo, pero generalmente no afecta la disponibilidad de otros elementos minerales. Sin embargo, la fertilización con K puede afectar negativamente la concentración de Mg en la planta, especialmente cuando es aplicado en altas proporciones (Fleming, 1973).

Galdámez-Cabrera et al. (2004), evaluaron en *Cynodon dactylon* con una fertilización con nitrato de amonio en tres dosis diferentes (0,56, 112 y 168 Kg N/ha) aproximadamente un mes antes del primer y tercer corte (30 de mayo y 18 de agosto, respectivamente) sobre la concentración del forraje y la desaparición ruminal de Ca, P, Mg y K. Estos autores encontraron respecto a la concentración inicial en el forraje, que el Ca aumentaba linealmente cuando se incrementaban las dosis de N vía fertilización (Cuadro 5).

Cuadro 5. Concentración macromineral de *Cynodon dactylon* en distintas dosis de N cosechada el 30 de mayo y el 18 de agosto.

| | | Dosis N (kg/ha) | | | |
|---------|-----------|------------------------------------|-----|-----|-----|
| | | 0 | 56 | 112 | 168 |
| Mineral | Cosecha | Concentración mineral (g/Kg de MS) | | | |
| Ca | 30 mayo | 6,9 | 7,1 | 6,9 | 7,2 |
| | 18 agosto | 6,3 | 7,0 | 7,9 | 7,7 |
| Mg | 30 mayo | 1,9 | 2,2 | 2,2 | 2,3 |
| | 18 agosto | 2,0 | 2,1 | 2,4 | 2,4 |

Fuente: Galdámez-Cabrera et al. (2004)

En el caso del Mg también hubo un incremento lineal a medida que aumentaban las dosis de fertilización con N, en ambas fechas de cosecha (30 de mayo y 18 agosto): la concentración de Mg en *Cynodon dactylon* fertilizada con 168 Kg N/ha fue 21 y 20% más en cada fecha de corte con respecto a la misma gramínea sin fertilizar. Edwards et al. (1977), reportan que el *Cynodon dactylon* fertilizado con 165 y 504 Kg N/ha tuvo 14 y 25% más concentración de Mg respecto al *Cynodon dactylon* no fertilizado.

Con respecto a la cinética de desaparición evaluada por Galdámez-Cabrera et al. (2004), encontraron que el Ca inmediatamente disponible no variaba a través de las distintas dosis de fertilización con N cuando la fecha de cosecha fue 30 de mayo, pero sí aumentaba en forma cuadrática para la cosecha del 18 de agosto. La proporción del total del Ca en la planta que se encuentra en la fracción rápidamente disponible en este estudio es menor a la reportada en alfalfa por Ledoux y Martz (1991). Estas diferencias pueden estar asociadas a la presencia del Ca en diferentes formas químicas y físicas (Puoli et al., 1991). Sin embargo, Edwards et al. (1977) reportan que no más del 20g/Kg del total del Ca está asociado a la pared celular en *Cynodon dactylon*.

Galdámez-Cabrera et al. (2004) reportan que la velocidad de desaparición del Ca no fue afectada por las distintas dosis de fertilización nitrogenada en ambas fechas de

cosecha. El promedio de las tasas de desaparición fue 6.8 %/hs, el cual es mayor al que reportaron Rooke et al. (1983) para silo de pastura (4.7%/hs), pero a su vez está dentro del rango de lo encontrado por Van Eys y Reid (1987) para festuca y trébol rojo cosechadas a distintos niveles de maduración.

En el estudio de Van Eys y Reid (1987) no se encontró una correlación significativa entre la concentración mineral de los forrajes que analizaron y la proporción desaparecida después de 3, 6 o 12 horas de incubación ruminal.

Para estos autores, la desaparición efectiva de Ca no fue afectada por la fertilización nitrogenada cuando la cosecha fue el 30 de mayo, pero se incrementó cuadráticamente cuando la cosecha se realizó el 18 de agosto. El valor promedio de la desaparición efectiva de Ca de este estudio fue 741 g/Kg MS y fue similar al encontrado por Emanuele et al. (1991) en *Cynodon dactylon* (726 g/Kg MS). La desaparición efectiva de Ca es la menor en comparación con la desaparición para Mg, K y P. Esto se debe probablemente a los enlaces del Ca con moléculas indigestibles en forma de cristales de oxalato de Ca, o al Ca dentro de la fibra indigestible (Playne et al., 1978).

El Mg en la fracción inmediatamente disponible aumenta linealmente en 12 y 25% por cada 100 Kg N/ha que aumenta la fertilización en ambas fechas de cosecha (30 de mayo y 18 de agosto, respectivamente). La proporción de Mg en dicha fracción fue en este estudio 793-834 g/Kg, valores más altos que lo reportado en otros estudios previos (500-741 g/Kg) para varios forrajes y silo de maíz (Whitehead et al. 1985, Ledoux y Martz 1991). Lo desaparecido de Mg a cada dosis de N fue disminuyendo a medida que la fertilización aumentaba en ambas fechas de cosecha, pero decreció en menor proporción cuando se cosechó el 30 de mayo respecto al 18 de agosto. El Mg residual o no disponible disminuye en forma cuadrática cuando la dosis de N se incrementaba en ambas fechas de cosecha en similar proporción. Una muy baja proporción del Mg total es no disponible (37-54 g/Kg MS). Otros han reportado un rango de 35 a 109 g/Kg MS del total en la planta de Mg remanente en las bolsas después de 48 horas de incubación ruminal de gramíneas ensiladas (Rooke et al. 1983, Ledoux y Martz 1991). El Mg es el único mineral de este estudio cuya tasa de desaparición fue afectada por la fertilización nitrogenada, disminuyendo de manera cuadrática a mayores dosis de N en ambas fechas de cosecha. La velocidad de desaparición fue en este estudio 17,6% mayor el 18 de agosto que el 30 de mayo. La tasa de desaparición promedio fue 12%/hs a través de las dos fechas de cosecha, y es la tercera tasa mayor después de los valores para K y P, respectivamente. En el trabajo de Van Eys y Reid (1987) se reportan menores velocidades de degradación de Mg (8.6%/hs) para gramíneas templadas y leguminosas que las reportadas en el estudio de Galdámez-Cabrera et al. (2004).

2.4.3.2 Tipo de suelo

Los nutrientes minerales que toman las raíces de las plantas se encuentran en disolución y en equilibrio con los nutrientes de la fase coloidal del suelo, compuesta, sobre todo, por las arcillas y las sustancias húmicas. Por lo que va a depender de estos y sus proporciones en el suelo (tipo de suelo), la capacidad que tenga cada suelo para reponer lo extraído de su solución (Del Pino s.f.). En un suelo con alta capacidad de retención puede haber alta cantidad de minerales, pero ser baja la cantidad en solución; por lo tanto, menos disponible para las plantas (Garate y Bonilla, 2000).

El aporte de nutrientes de cada suelo es determinado por los minerales primarios (a largo plazo) como Cuarzo, Biotita, Turmalina, etc. y secundarios (a corto plazo) como Caolinita, Illita, Vermiculita, que lo componen. De su estructura y estabilidad es de lo que va a depender la capacidad catiónica que tenga cada suelo para intercambiar y poder luego ser absorbidos por la planta (Fassbender, 1975).

Suelos con mayor porcentaje de arcilla son los que tendrán más cantidad de minerales para la nutrición mineral. Cuantitativamente, la mayor parte de la capacidad iónica intercambiable (CIC) en la naturaleza radica en los minerales arcillosos; a su vez, la CIC depende del tipo de arcilla que el suelo contenga y en la proporción en que se encuentre. Las arcillas de mayor CIC son las Vermiculitas (100 a 220 meq/100g), Esmectita (60 a 180 meq/100g), Illita (10 a 40 meq/100g) y Cloritas. Se podría decir, entonces, que los suelos en general deficitarios en minerales (baja CIC) son los suelos arenosos, o sea, los poco desarrollados, con textura gruesa, arenosa o arenosa franca (Fassbender, 1975), como los integrantes de las formaciones Tacuarembó, Rivera, Las Toscas, Aparicio Saravia y Tres Islas (Bossi y Navarro, 1988).

Se destacan como suelos con mayor cantidad de Ca los que corresponden a la Formación Libertad y Fray Bentos los que tienen como valor promedio de CO_3Ca de 20% (Bossi y Navarro, 1988).

Suelos con altos contenidos de Al^{+3} son deficientes en Ca y Mg ya que el Al^{+3} compite por los sitios de absorción en las plantas con el Ca y Mg. Por otra parte, suelos con bajo pH afectan mayormente al P, en este caso el P es mayormente retenido y, por lo tanto, menos disponible. También existe una interacción negativa dentro de la planta entre el P y Al^{+3} (asociados a suelos de pH más bajos de 5.3 como pueden ser las areniscas de Tacuarembó y Rivera) afectando la traslocación del P. La fijación de N también se ve afectada por la acidez, como en el caso de la alfalfa donde la asociación rizobio leguminosa es muy sensible a estas condiciones. También afecta condicionando la disponibilidad de elementos esenciales para la fijación, como en el caso del Ca el cual es primordial en el proceso de infestación del P determinante para la división celular y crecimiento de la raíz y del Mo que afecta el propio proceso de fijación actuando a nivel enzimático.

2.4.3.3 Materia orgánica del suelo

La materia orgánica (MO) en el suelo actúa como reserva de nutrientes, en ella quedan retenidos los minerales que luego irán abasteciendo las posiciones intercambiables. En suelos donde la MO es baja, los minerales serán más fácilmente lavados. Los suelos de orden Melánicos son los que presentan mayor porcentaje de MO. Son suelos donde ha habido descomposición y acumulación de MO, que poseen texturas medias o finas con predominio de arcillas siendo el Ca el catión dominante en el complejo de intercambio. El nivel de bases (cationes) en el horizonte superficial es alto, lo que indica posiblemente una alta reposición de cationes por alteración química de los minerales primarios y reciclaje lo suficientemente rápidos para compensar las pérdidas por lixiviación. La saturación en bases de los horizontes inferiores también es alta, generalmente superior a 50 % a pH 7 (Altamirano et al., 1978). En su conjunto, este orden (Melánico) agrupa suelos de mayor productividad agrícola del país, y comprende dos grandes grupos de suelos: los Brunosoles y los Vertisoles (Durán, 1991).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACIÓN

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Centro Regional Sur de la Facultad de Agronomía, en Progreso, departamento de Canelones, y se realizó en dos etapas: la primera de ellas durante el mes de mayo y la segunda en el mes de julio de 2003.

3.2. TRATAMIENTOS

El objetivo del presente trabajo fue determinar la influencia de la dieta y del tiempo de incubación sobre la liberación *in situ* del Calcio (Ca) y del Magnesio (Mg) en una alfalfa cortada en primavera.

Los tratamientos en cuanto a dieta constan de dos etapas: en la etapa uno se les suministró una dieta base constituida por 100 % heno de alfalfa (100) en dos comidas diarias (8 y 16 horas) de 5.5 Kg de heno por comida. En la segunda etapa, la dieta base se cambió a 70 % de heno de alfalfa y 30 % grano de maíz (70/30), suministrada de igual forma que la anterior.

En cuanto al tiempo, se evaluaron dos tiempos de incubación ruminal, t_8 que corresponde a las 8 horas de incubación y, por último, el tiempo que corresponde a las 16 horas de incubación t_{16} .

3.3. PASTURA EVALUADA

La pastura estudiada fue una alfalfa (*Medicago sativa*, cv. Estanzuela Chaná) cortada en octubre (período 2, del 13/19 al 18/10) de 1997, en estado prefloración-vegetativo. Para la alfalfa usada en la presente tesis y en cuanto a sus características físicas, su biomasa total fue 3886 Kg/MS/ha con una altura promedio de planta en este período de 47.5 cm, la altura de corte se realizó a 4.1 cm del suelo. Su composición morfológica fue 49.8% de tallos, 43.2% de hojas y 7.1% de restos secos, con una relación hoja/tallo de 0.87. La composición química de la alfalfa fue 22.4% de MS, 89.7% de MO, 17.2% de PC, 56.4% de FDN, 31.8% de FDA, 29.5% de FC y 6.5% de LDA.

La muestra de alfalfa colectada fue posteriormente secada a 60 °C en estufa de aire forzado y molida con un tamiz de 2 mm.

3.4. ANIMALES Y ALIMENTACIÓN

Se utilizaron tres vacas Holando secas con fístula ruminal permanente; una de ellas presentaba además fístula duodenal. Los animales tenían un peso aproximado de 550 kg de peso vivo (PV). Los mismos fueron ubicados en jaulas de digestibilidad, con el fin de evaluar el efecto de las dos dietas bases diferentes anteriormente descritas sobre la cinética de liberación de los minerales. Las vacas fueron adaptadas a la dieta base 20 días previos al inicio de las evaluaciones. Los animales tuvieron acceso continuo a agua y sales minerales en bloque.

3.5. INCUBACIÓN *IN SITU*

La liberación mineral en el rumen se estimó con la técnica *in sacco* (Michalet-Doreau et al., 1987). Se utilizaron bolsas de material sintético de polifilamento (6x7 cm y con diámetro de poro de 50 μ m), conteniendo 1,5g de MS de material a evaluar. Se prepararon 15 bolsas por vaca para cada período; estas bolsas se incubaron en el rumen de las tres vacas durante los tiempos 0, 8 y 16 horas.

Previo a la introducción de las bolsas en el rumen, las mismas se colocaron 15 minutos en agua a 39°C aproximadamente, en este momento se retiraron 2 bolsas/vaca/período; las evaluaciones de estas corresponden al t_0 . El resto de las bolsas se colocaron en el rumen previo a la primera comida del día (8 am), retirándose a las 16 horas (8 horas de incubación) 3 bolsas de cada vaca y luego se retiran las últimas 12 bolsas por vaca a las 24 horas (16 horas de incubación). De estas, 9 bolsas fueron utilizadas en un estudio de digestibilidad intestinal cuyos datos no forman parte de este trabajo. Debido a que la actividad de la microflora no es uniforme en el rumen y la degradación más activa ocurre en el saco ventral, las bolsas se anclaron en el mismo mediante una pesa de 700 g sostenida por un cordón que se ató al tapón de la fístula. Con este sistema, las bolsas acompañaron libremente los movimientos del contenido ruminal y se mantuvieron próximas al saco ventral del rumen. Previo a la colocación de las bolsas, en la mañana, y previo a cada extracción, se tomó una muestra de líquido ruminal y se midió el pH con un pHímetro digital.

Luego de la extracción de las bolsas, en cada tiempo de incubación se sumergieron en un recipiente con agua a baja temperatura para detener la actividad microbiana, se conservaron en freezer a -20 °C y trasladaron al laboratorio para su posterior procesamiento. Allí fueron lavadas en lavarropas semiautomáticos de 30 l de capacidad, en dos ciclos de dos minutos cada uno. Se mantuvo una relación de 1 l de agua por bolsa y se secaron en estufa de aire forzado a 60 °C por 48 horas. Tanto en el forraje inicial

como en los residuos luego de la incubación, se determinaron los contenidos de materia seca (a 105 °C) de Ca y Mg por Espectrofotometría de Absorción Atómica.

3.6. ANÁLISIS QUÍMICOS

Los análisis químicos se realizaron en el laboratorio de Fisiología de la Facultad de Ciencias. Para realizar los análisis químicos las muestras se agruparon según período y tiempo de incubación. Los residuos de las incubaciones ruminales, así como el material inicial se analizaron para MS, Ceniza, Ca y Mg.

El primer procedimiento fue secar las muestras antes y después de la incubación a 105 °C e incinerarlas a 520 °C durante 16 horas en mufla. Luego son solubilizadas con el agregado sucesivo de HCl 6 N y HNO₃ 0.1 N, en placa caliente a punto inferior al grado de ebullición hasta evaporación no completa. Se lleva luego a volumen conocido (25ml) en matraz aforado con H₂O bidestilada (< 18 Ω).

Para las lecturas de Ca y Mg se realizaron las diluciones correspondientes de forma de lograr cantidades equivalentes a la mitad de cada una de las curvas estándar para Ca y Mg teniendo en cuenta que la última dilución debe ser con lantano al 0.2% para evitar las interferencias con el P (fósforos) de las muestras. Con cada grupo de muestra se prepara un blanco que incluye solamente los ácidos. Las lecturas se realizaron en Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer Analyst 300 en llama de aire/acetileno.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El modelo experimental usado fue un factorial (2*2) en bloques completos al azar con tres bloques. Se usó el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS v 6.12, considerando el efecto de la vaca como aleatorio (SAS, 2001). Los datos de pH se analizaron usando el procedimiento GLM del mismo paquete.

El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ij} = \alpha D_i + \beta T_j + \alpha D_i * \beta T_j + \epsilon_{ij}$$

Y_{ij} = características estudiadas

αD_i = efecto de la dieta

βT_j = efecto del tiempo de incubación

$\alpha D_i * \beta T_j$ = efecto de la interacción

ϵ_{ij} = error experimental

El test de comparación de medias utilizado fue el de la Diferencia Mínima Significativa.

4. RESULTADOS

4.1. CONCENTRACIÓN INICIAL Y LIBERACIÓN RUMINAL INMEDIATA DE LA ALFALFA

En t_0 se observó una liberación elevada de cenizas, desapareciendo más del 50% de Mg y más del 30% del Ca (Cuadro 6).

Cuadro 6. Contenido porcentual de MS, Cenizas, Ca y Mg de la alfalfa y la proporción desaparecida de estas fracciones en tiempo 0 (t_0).

| | MS | Cenizas (base MS) | Ca % (base MS) | Mg % (base MS) |
|---|--------|----------------------|-------------------|-------------------|
| Contenido inicial (%) | 90,000 | 9,190 | 0,988 | 0,184 |
| Desaparecido en t_0 (%) | 36,96 | 70,02 | 32,41 | 53,27 |

4.2. EFECTOS DE LA DIETA Y TIEMPO DE INCUBACIÓN EN LA LIBERACIÓN RUMINAL

La MS desaparecida en la dieta 100 fue significativamente mayor ($P = 0.0003$) que la MS desaparecida cuando la dieta fue 70:30 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto medio de la dieta y efecto medio del tiempo de incubación (tiempo) sobre la desaparición de MS, ceniza y la liberación de Ca y de Mg.

| | MS desaparecido | Cenizas desaparecido | Ca desaparecido | Mg desaparecido |
|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Dieta (forraje: concentrado) | | | | |
| 100 | 65,91 a | 82,48 a | 76,68 a | 79,10 |
| 70:30 | 42,87 b | 62,24 b | 70,11 b | 73,73 |
| Tiempo de incubación | | | | |
| t₈ | 48,72 a | 69,60 a | 68,03 a | 71,75 a |
| t₁₆ | 60,06 b | 75,12 b | 78,76 b | 81,08 b |

Valores con letra minúscula diferente en la misma columna difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

Para lo observado en la fracción ceniza también se reportan valores de desaparición significativamente mayores ($P \leq 0.0001$) cuando la dieta es 100 que cuando la dieta es 70:30. Esta variación es similar para el caso del Ca, donde lo desaparecido con la dieta 100 fue significativamente mayor ($P = 0.0160$) al valor observado con la dieta 70:30. Para el Mg la tendencia fue diferente y se observa que no hubo diferencias significativas ($P = 0.2061$) entre el Mg desaparecido con la dieta 100 que con la dieta 70:30.

En cuanto al tiempo, la MS desaparecida a las 8 horas de incubación ruminal fue significativamente menor ($P = 0.0114$) si lo comparamos con lo que desapareció de MS luego de 16 horas de incubación. Para la fracción ceniza también fue significativamente menor ($P = 0.0328$) la proporción desaparecida a las 8 horas de incubación que la proporción desaparecida a las 16 horas de incubación; al igual que las fracciones anteriores la proporción desaparecida de Ca a las 8 horas en el rumen es significativamente menor ($P = 0.0016$) que el valor reportado a las 16 horas en el rumen. Si observamos el comportamiento del Mg en cuanto al tiempo de incubación, el Mg desaparecido se comportó igual que el resto de las fracciones evaluadas siendo menor significativamente ($P = 0.0489$) a las 8 horas de incubación que a las 16 horas de incubación ruminal.

4.3. INTERACCIÓN ENTRE DIETA Y TIEMPO DE INCUBACIÓN

Cuadro 8. Efecto de la dieta y tiempo de incubación sobre la proporción desaparecida de MS.

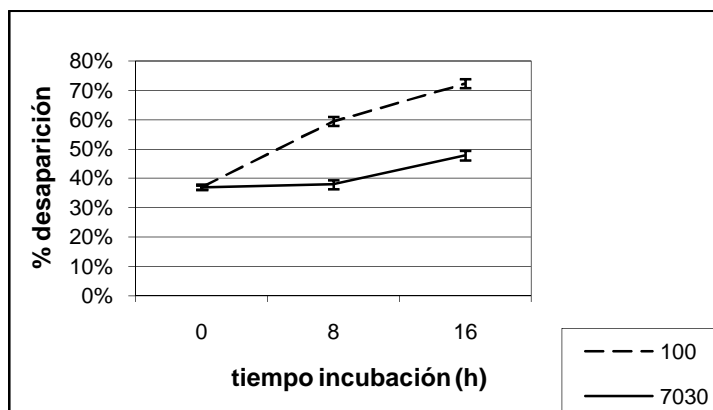
| <i>I.</i> Tiempo | Dieta | |
|---------------------|----------|----------|
| | 100 | 70:30 |
| 8 | 59,49 Aa | 37,94 Ab |
| 16 | 72,32 Ba | 47,67 Bb |

Valores con letra mayúscula en la misma columna difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

Valores con letra minúscula diferente en la misma fila difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

No hubo interacción entre dieta y tiempo de incubación para la proporción de MS desaparecida ($P = 0.6536$) (Cuadro 8 y Figura 7).

Figura 7. Cinética de desaparición de la Materia Seca de la alfalfa.



En la dieta 100, la cantidad de MS desaparecida a las 16 horas fue mayor que la cantidad desaparecida a las 8 horas de incubación ($P = 0.0273$) y en la dieta 70:30 también la cantidad desaparecida de MS a las 16 horas de incubación fue mayor que a las 8 horas de incubación ($P = 0.0713$).

En cuanto al tiempo de incubación observamos que, tanto para las 8 horas ($P = 0.2230$) como para las 16 horas ($P = 0.0160$) de incubación, la proporción desaparecida de MS fue mayor cuando la dieta fue 100 que cuando fue 70:30 ($P = 0.028$).

Cuadro 9. Efecto de la dieta y tiempo de incubación sobre la proporción desaparecida de ceniza.

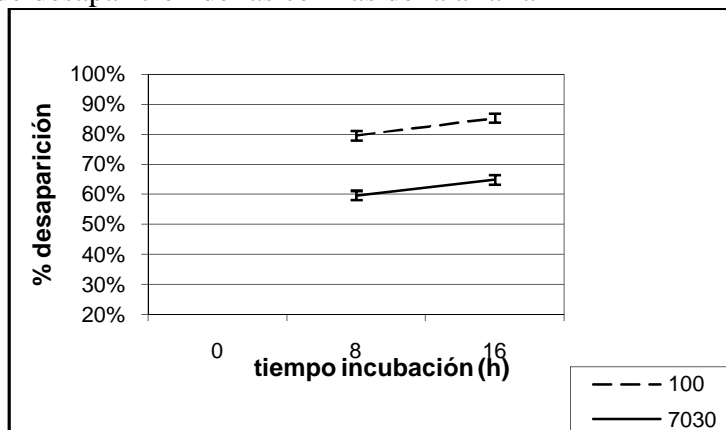
| Tiempo | Dieta | |
|--------|----------|---------|
| | 100 | 70:30 |
| 8 | 79,56 Aa | 59,64 b |
| 16 | 85,41 Ba | 64,84 b |

Valores con letra mayúscula en la misma columna difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

Valores con letra minúscula diferente en la misma fila difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

No hubo interacción entre dieta y tiempo de incubación para la proporción de ceniza desaparecida ($P = 0.8768$) (Cuadro 9 y Figura 8).

Figura 8. Cinética de desaparición de las cenizas de la alfalfa



En la dieta 100 se observó que la proporción de ceniza desaparecida a las 16 horas de incubación fue mayor que la proporción de ceniza desaparecida a las 8 horas de incubación; sin embargo, en la dieta 70:30 no se observaron diferencias significativas entre la proporción de ceniza desaparecida a 8 horas de incubación y a 16 horas de incubación ($P = 0.1264$).

En cuanto al tiempo de incubación de 8 horas el mayor valor de desaparición de ceniza se dio con la dieta 100 ($P = 0.0003$) y también fue mayor la ceniza desaparecida en la dieta 100 cuando el tiempo de incubación fue 16 horas ($P = 0.0004$).

No existió interacción entre dieta y tiempo de incubación para el caso del Ca desaparecido ($P = 0.2720$) (Cuadro 10 y Figura 9).

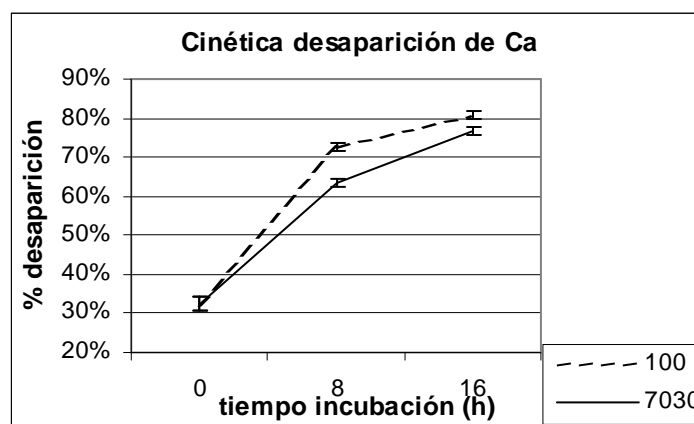
Cuadro 10. Efecto de la dieta y tiempo de incubación sobre la proporción desaparecida del Ca.

| Tiempo | Dieta | |
|--------|----------|----------|
| | 100 | 70:30 |
| 8 | 72,51 Aa | 63,55 Ab |
| 16 | 80,85 Ba | 76,67 Bb |

Valores con letra mayúscula en la misma columna difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

Valores con letra minúscula diferente en la misma fila difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

Figura 9. Cinética de desaparición del Calcio de la alfalfa



La proporción desaparecida de Ca en la dieta 100 es mayor a las 16 horas de incubación que la desaparecida a las 18 horas de incubación en el rumen ($P = 0.0218$) al

igual que en la dieta 70:30 donde también se observa una mayor desaparición a las 16 horas (mayor valor) que a las 8 horas de incubación ($P = 0.0039$).

A las 8 horas de incubación la proporción de Ca desaparecido con la dieta 100 fue mayor que la proporción de Ca desaparecido con la dieta 70:30 ($P = 0.0163$) y a las 16 horas de incubación también se observa una mayor proporción de Ca desaparecido con la dieta 100 que con la dieta 70:30 ($P = 0.1974$).

Cuadro 11. Efecto de la dieta y tiempo de incubación sobre la proporción desaparecida de Mg.

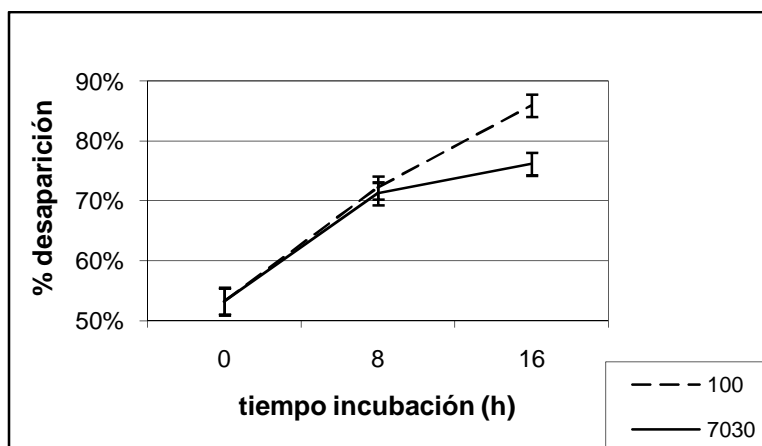
| 2. <u>Tiempo</u> | Dieta | |
|------------------|---------|-------|
| | 100 | 70:30 |
| 8 | 72,24 A | 71,25 |
| 16 | 85,96 B | 76,21 |

Valores con letra mayúscula diferentes en la misma columna difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

No hubo interacción entre dieta y tiempo de incubación para la proporción de Mg desaparecida ($P = 0.2913$) (Cuadro 11 y Figura 10).

En la dieta 100, la proporción de Mg desaparecido a las 16 horas fue significativamente mayor ($P = 0.0429$) que a las 8 horas de incubación, sin embargo, en la dieta 70:30, los valores de Mg desaparecido no difieren entre tiempos de incubación ($P = 0.3911$).

Figura 10. Cinética de desaparición del Magnesio de la alfalfa



Tampoco se observó un efecto significativo de la dieta a un mismo tiempo de incubación ($P = 0.8598$ para t_8 y $P = 0.1186$ para t_{16})

4.4. VARIACIÓN DEL pH RUMINAL

No se reportó interacción entre dieta y tiempo de incubación para el pH del fluido ruminal ($P = 0.3010$) (Cuadro 12 y Figura 11).

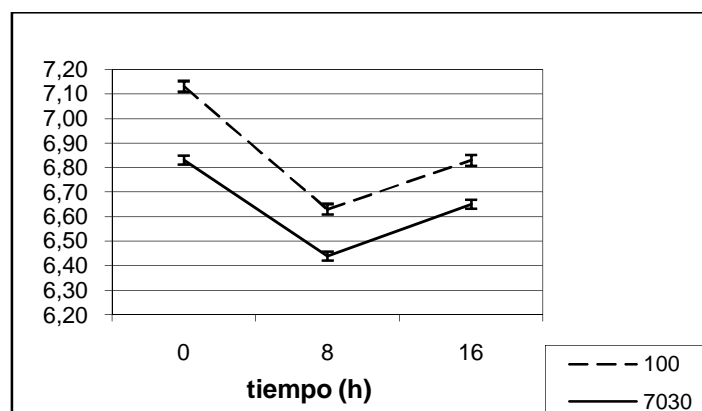
Cuadro 12. Valores de pH del fluido del rumen según el tiempo de incubación y la dieta base ofrecida.

| Tiempo | Dieta | | pH promedio |
|--------------------|---------|---------|-------------|
| | 100 | 70:30 | |
| 0 | 7,13 Aa | 6,83 Ab | 6,98 A |
| 8 | 6,63 Ca | 6,44 Cb | 6,54 C |
| 16 | 6,83 Ba | 6,65 Bb | 6,74 B |
| pH promedio | 6,86 a | 6,64 b | 6,73 |

Valores en letra mayúscula diferente en la columna difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

Valores en letra minúscula diferente en la fila difieren significativamente ($P \leq 0.05$)

Figura 11. Evolución del pH ruminal según el tipo de dieta



En la dieta 100, el pH menor se registró a las 8 horas de incubación ($P \leq 0.001$ a t_0 y $P \leq 0.001$ con respecto a t_{16}). A su vez, el pH medido a t_{16} fue inferior al medido a t_0 ($P \leq 0.001$). En la dieta 70:30 se observaron las mismas variaciones del pH que en la dieta 100, es decir, que el pH a t_8 fue el menor ($P = 0.001$ con respecto a t_0 , $P = 0.003$ con respecto a t_{16}). El pH medido a t_{16} fue inferior al medido a t_0 ($P = 0.006$).

En cuanto al tiempo de incubación, los valores menores de pH se registraron con la dieta 70:30 con respecto a la dieta 100. A t_0 , se observó una diferencia significativa ($P \leq 0.001$) de 0.3 puntos de pH menor en la dieta 70:30 con respecto a la dieta 100; a t_8 esta diferencia fue de 0.2 puntos menor en la dieta 70:30 ($P = 0.009$) y a t_{16} la diferencia fue 0.18 puntos ($P = 0.0125$).

5. DISCUSIÓN

5.1. CONCENTRACIÓN INICIAL Y LIBERACIÓN INMEDIATA DE MINERALES EN LA ALFALFA

5.1.1. Concentración inicial

Como se puede apreciar en el Cuadro 13, la concentración inicial del Ca en el presente trabajo obtuvo valores similares a los que mencionan Emanuele y Staples (1990), Garate y Bonilla (2000) para los valores correspondientes a la parte aérea superior del forraje). Mientras que el Mg fue menor a lo reportado por dichos autores tanto para la alfalfa como para las gramíneas.

Cuadro 13. Concentración inicial de Ca y Mg en la alfalfa según diferentes autores en base seca.

| | Ca (% MS) | Mg (% MS) |
|---|--------------|--------------|
| Alfalfa (experimental) | 0,99 | 0,18 |
| Alfalfa fresca (Garate y Bonilla 2000) | 1 a 2,5 | 0,3 a 0,8 |
| Alfalfa ensilada (Emanuele y Staples 1990) | 1,46 | 0,39 |

El Ca es un elemento más fijo en la planta al estar retenido en la fracción “pared celular”, mientras que el Mg es un mineral más lábil ya que se localiza dentro de la fracción más soluble de las células de las plantas. Esto podría explicar las diferencias citadas en el contenido de Mg y las similitudes en cuanto al contenido de Ca inicial, ya que en el proceso de henificación hay mayores pérdidas de agua.

A su vez, se podría decir que las diferencias en las concentraciones minerales entre el presente trabajo y el de Emanuele y Staples (1990) no se explicarían por los distintos estados fenológicos de la pastura ya que la alfalfa del trabajo de Emanuele y Staples (1990) fue analizada en un estadio de crecimiento más avanzado (50% de floración) que

la alfalfa correspondiente al presente trabajo (cortada en prefloración-vegetativo), por lo que la alfalfa más madura debería haber presentado valores de concentraciones minerales menores que estarían explicados por el efecto de dilución mencionado por Fleming (1973). Según este autor, las concentraciones minerales aumentarían más lentamente con respecto a la MS cuando la edad de la planta avanza, lo que estaría respaldado por las correlaciones del Ca y del Mg positivas con PC y negativas con FDA que reportan Kincaid y Cronrath (1983).

Por otro lado, las diferencias podrían deberse también a otros factores como disponibilidad mineral, características del suelo o fertilización específica del ambiente donde cada una de las alfalfas fue sembrada.

5.1.2. Proporción inmediatamente disponible

La proporción liberada inmediatamente (correspondiente a t_0) fue para la MS 36.93%, para el Ca 32.41% y para el Mg 53.27%. Los valores hallados por Emanuele y Staples (1990) en t_0 para la alfalfa ensilada fueron: 36.1 % de MS, 46.7 % de Ca y 71.8 % de Mg. Los valores de MS entre ambos trabajos son similares. La proporción de Ca desaparecida en t_0 está dentro del rango de valores de desaparición de Ca en este tiempo que reportan Emanuele y Staples (1990) para las seis especies forrajeras evaluadas en dicho trabajo.

Por el contrario, la proporción de Mg desaparecida en t_0 fue menor a la proporción de Mg desaparecida en ese tiempo reportada por Emanuele y Staples (1990) en alfalfa ensilada.

Por otra parte, Van Eys y Reid (1987) reportan que no habría efecto de la concentración mineral original del alimento y la liberación de éstos en el rumen.

En el presente trabajo, el orden de la liberación inmediata de los minerales en el rumen fue de mayor a menor: Mg > Ca. Este ordenamiento está de acuerdo con lo reportado por Rooke et al. (1983) trabajando con alfalfa ensilada y raigrás ensilado y Van Eys y Reid (1987), Emanuele y Staples (1990) en festuca y trébol rojo. También Playne et al. (1978), Whitehead et al. (1985) al ordenar la liberación inmediata colocaron al Mg en una posición más soluble que el Ca.

La mayor liberación del Mg con respecto al Ca sería el resultado de la diferente localización de cada uno de estos dos minerales en la planta. El Mg se encuentra en un 20% en los cloroplastos y el resto se encuentra en forma iónica soluble en el espacio intratilacoidal (Bonilla, 2000); por lo tanto, el Mg sería un elemento fácilmente liberado por la célula ya que el contenido celular es altamente disponible para los

microorganismos del rumen. El Ca que se encuentra en el citosol (o contenido celular) lo hace en muy bajas concentraciones y se localiza mayormente en la laminilla media de la pared celular (Mackie y Therion 1984, Bonilla 2000). Además, el Ca forma oxalatos que lo hacen aún menos disponible para la microflora ruminal. En la alfalfa, la proporción de Ca que estaría bajo la forma de oxalatos podría llegar al 20 o al 33% (Ward et al., 1979).

5.2. EFECTO DIETA Y TIEMPO DE INCUBACIÓN EN LA LIBERACIÓN MINERAL RUMINAL

5.2.1. Efecto de la composición de la dieta en la liberación de minerales en el rumen (100:0 y 70:30 forraje: concentrado respectivamente)

La MS y las cenizas desaparecidas fueron siempre mayores cuando la dieta fue 100% forraje (100). Esto estaría asociado al mayor pH ruminal detectado con la dieta 100 que fue en promedio de 6.9 mientras que el pH promedio observado con la dieta 70:30 fue 6.6. Esto se daría porque los microorganismos celulolíticos tendrían su máxima actividad a un valor de pH cercano a la neutralidad y, por lo tanto, sería el punto donde se degradaría en mayor medida la MS, cenizas y minerales de los tejidos celulares. Guimarães et al. (2001) evaluaron dietas 70:30 y 30:70 (forraje: concentrado) y encontraron que el pH es un factor importante en la actividad proteolítica del rumen, reportando que el valor óptimo de pH estaría entre 6 y 7.

Coelho Da Silva y Leão (1979) ubican el valor óptimo de pH en alrededor a 6.5 para la mayoría de los microorganismos. Hoover (1986) reporta que, con reducciones moderadas de pH ruminal desde 6.8 hasta un valor de pH 6, la digestión de la fibra decrece sin afectar la población celulolítica mientras que, con reducciones de pH menores a 6, provocaría una severa inhibición. Con pH de entre 5.5 a 5 habría una disminución tanto en el número de microorganismos como en la tasa de crecimiento que inhibiría la digestión de la pared celular (Coelho Da Silva y Leão, 1979).

Emanuele y Staples (1990) evaluaron el efecto del pH en la desaparición de los minerales y observan una menor desaparición al pasar de una dieta 100% forraje a una dieta 70% forraje y 30% de concentrado tanto para el Ca como para el Mg.

Los resultados de liberación mineral en el presente trabajo dieron significativamente diferentes ($P = 0.0016$) para el Ca y fueron: 76.68 % con la dieta 100 y 70.11% con la dieta 70:30. Para el caso del Mg las diferencias en cuanto a la liberación mineral no fueron significativas entre dietas ($P=0.2061$) con valores de 79.10% para la dieta 100 y de 73.73% para la dieta 70:30 (valores promedios de los tiempos de incubación t_8 y t_{16}).

El Mg es altamente disponible por encontrarse mayormente en el contenido celular por lo cual será más independiente de los microorganismos celulolíticos, mientras que el Ca que se encuentra mayormente en la pared celular (Bonilla, 2000) depende más de que los microorganismos celulolíticos degraden la fibra para ser liberado, por lo que con un pH menor (dieta 70:30) existirá una menor liberación del Ca al ser afectada por la actividad de las bacterias celulolíticas.

Carvahlo et al. (1997), Cardoso (2000) avalan la idea de que las diferencias significativas existentes entre los valores de desaparición ruminal de las diferentes dietas sería debido a diferentes pH ruminales, mientras que diferencias en el valor energético entre dietas no influirían en forma considerable en la actividad celulolítica.

5.2.2. Liberación mineral en 8 horas (t_8) y 16 horas (t_{16}) de incubación ruminal

La proporción del total de minerales solubilizados en el rumen generalmente es alta para la mayoría de los minerales. Estudios *in situ* como el presente demuestran que los minerales en el forraje consisten en 1) fracción inmediatamente disponible, 2) otra fracción que es más lentamente liberada (período en el cual la pared celular y las proteínas son degradadas) y 3) fracción no disponible (Playne et al. 1978, Van Eys y Reid 1987, Emanuele y Staples 1990).

La desaparición mineral en el presente trabajo después de las 8 horas de incubación ruminal expresada en porcentaje de la concentración mineral original de la alfalfa fue para el Ca 68.03% y para el Mg 71.75%. Ambos minerales sobrepasan el 60% de liberación ruminal después de las 8 horas de incubación. La desaparición de cenizas correspondiente a t_8 fue 69.6%, mientras que el valor de liberación de MS fue menor siendo de 48.72%. En el trabajo de Van Eys y Reid (1987) se utilizó el método *in situ* con una dieta 100% forraje para determinar la liberación ruminal mineral a diferentes tiempos de incubación evaluando trébol rojo y dos variedades de festuca. Los valores de liberación ruminal que obtuvieron para el trébol rojo (valores que se eligieron para comparar con la alfalfa de nuestro trabajo por ser ambas leguminosas) en t_8 fueron aproximadamente para el Ca 61.50% y para el Mg 88.50% (valores promedios entre los obtenidos en estado temprano y avanzado de maduración). La proporción de Ca desaparecida en t_8 del trabajo de Van Eys y Reid (1987) fue similar (aproximadamente 7% menor a la liberación de este mineral en el presente trabajo mientras que la proporción de Mg fue aproximadamente 17% superior al encontrado en el nuestro). Según estos autores, a las 3 horas de incubación ruminal ya había desaparecido el 72% del Mg, por lo que la desaparición en nuestro trabajo correspondiente a t_8 para el caso del Mg ya se había alcanzado a las 3 horas de incubación en el trabajo de estos autores.

Cuando la incubación ruminal tuvo un tiempo de 16 horas, en el presente trabajo las proporciones desaparecidas (promedios entre dietas) fueron para el Ca 78.76% y para el Mg 81.08%. La misma tendencia observan Van Eys y Reid (1987) a las 16 horas de incubación ruminal donde la liberación mineral para el trébol rojo fue para el Ca 73.50% y para el Mg 94.90% (valores promedios entre distintos estadios de madurez vegetal); por lo tanto, se mantiene la tendencia que se reportó en t_8 ya que el Ca liberado a este mismo tiempo fue similar en el presente trabajo al que reportaron Van Eys y Reid (1987), mientras que la proporción de Mg liberada fue mayor en dicho trabajo.

Si se comparan los valores anteriores con los obtenidos por Emanuele y Staples (1990) al evaluar la liberación mineral ruminal *in situ* con una dieta 100% forraje, que fueron de aproximadamente 67% y 79% para el Ca y Mg respectivamente a las 16 horas de incubación ruminal, se observa que estos valores son menores tanto a los de nuestro trabajo como a los de Van Eys y Reid (1987), lo que estaría explicado por el estado de madurez más avanzado (50% de floración) de la alfalfa utilizada por Emanuele y Staples (1990) cuando fue ensilada. Incluso en el caso del Ca el cual se encuentra mayormente en pared celular, lo que explicaría junto al concepto de Van Eys y Reid (1987), mencionado anteriormente, el comportamiento de liberación mineral reportado en el trabajo de Emanuele y Staples (1990).

La proporción desaparecida de MS fue 60.06% a las 16 horas de incubación por lo que la velocidad de desaparición mineral *in situ* en nuestro trabajo fue mayor que la velocidad de desaparición de MS tanto en t_8 como en t_{16} . Rooke et al. (1983) también reporta en silo de gramínea una velocidad de liberación mineral mayor comparado con la velocidad de desaparición de MS. Emanuele y Staples (1990) encuentra una proporción de liberación de MS a las 8 horas de incubación ruminal de 41% y de 52% a las 16 horas de incubación ruminal en alfalfa ensilada, que también es menor a la liberación tanto de Ca como de Mg en 8 y 16 horas de incubación. En su estudio, estos autores reportan que los forrajes que tenían mayor proporción de FDN tuvieron las menores tasas de desaparición de MS y de FDN comparado con las otras fracciones evaluadas. La MS desaparecida de nuestro trabajo es mayor en ambos tiempos (t_8 y t_{16}) que las que reportaron Emanuele y Staples (1990), probablemente asociado a la mayor proporción de FDN en la alfalfa ensilada que utilizaron estos autores (alfalfa en estado fenológico más avanzado).

El valor de desaparición a las 16 horas de incubación para todas las fracciones siempre fue mayor que a las 8 horas de incubación ruminal. A su vez, la proporción de la desaparición de Ca siempre fue menor que la proporción de la desaparición de Mg tanto a t_8 como a t_{16} , por lo tanto, ambos minerales fueron dependientes del tiempo de incubación aunque en diferente medida: mientras el Mg tuvo la mayor liberación en la fracción inmediatamente disponible y menor en la fase de lenta liberación (t_8 y t_{16}), el Ca tuvo la mayor liberación en la fase de lenta liberación. Este comportamiento estaría explicado por su función en la planta. El Ca es importante para la estabilidad de la pared

de la célula y las membranas, es el mayor catión encontrado en la laminilla media (Mackie y Therion, 1984). McManus et al. (1979) reportan que el Ca podría ser alrededor de 34% a 61% del total de minerales que se encuentran en la pared celular de cinco gramíneas y cinco leguminosas respectivamente; por lo tanto, a medida que la pared celular es digerida se incrementan las cantidades de Ca que pueden ser liberadas, por lo que, cuanto más tiempo esté el forraje en el rumen, mayores serán las posibilidades de que el Ca desaparezca del residuo. En cuanto al Mg como ya se ha mencionado, se localiza en el contenido celular, lo que explicaría su mayor liberación y su menor dependencia del tiempo de incubación.

5.2.3. Tiempo para máxima liberación ruminal de los minerales

En el presente trabajo se utilizó un tiempo máximo de incubación ruminal de 16 horas, lo que parecería ser acertado por lo anteriormente citado por otros autores y por los valores de desaparición que se alcanzaron a las 16 horas de incubación. El Ca podría haberse liberado en mayor proporción si se hubiera incubado por un tiempo mayor a 16 horas, pero tomando en cuenta el Tiempo Medio de Retención de 16 horas utilizados en algunos sistemas de predicción de aportes de nutrientes (Jarrige, 1981), y el hecho de que el Ca no se encuentra en su totalidad disponible para los microorganismos del rumen podría pensarse que la proporción desaparecida de este mineral, más allá de las 16 horas de incubación, no tendría relevancia a nivel nutricional (para los microorganismos del rumen y pared del huésped).

Además, Van Eys y Reid (1987) graficaron las proporciones de desaparición de Ca y Mg en una curva exponencial (exponencial negativa), donde en la etapa de rápida liberación mineral los incrementos son cada vez más grandes y luego caracterizan una fase de lenta liberación entre las 3 y 48 horas de incubación ruminal donde los incrementos son cada vez menores hasta que se hacen constantes. La mayoría de los minerales en dicho trabajo alcanzaron su máxima proporción de desaparición antes de las 24 horas de incubación, inclusive para los forrajes en estado de madurez avanzado. Para el Mg (además del N, K y P) los cambios después de las 12 horas de digestión fueron pequeños, especialmente a estados tempranos de crecimiento. El Ca alcanzó su máxima proporción de desaparición a las 16 horas de incubación ruminal, con una proporción de 88.45% para el TR en estado temprano de crecimiento.

Emanuele y Staples (1990) también graficaron la desaparición de Ca y Mg ruminal del silo de alfalfa y se encontró la misma curva que Van Eys y Reid (1990) reportando que el tiempo para la máxima liberación ruminal para el Ca fue entre 12 y 18 horas, mientras que para el Mg fue entre 12 y 30 horas en el caso del silo de alfalfa.

Stark (1980) determinó los valores de composición mineral de la MS bacteriana del rumen lo cual fue usado para calcular la posible contribución de las bacterias al remanente mineral en las bolsas después de 48 horas de incubación ruminal. Rooke et al. (1983) tomando en cuenta estos datos señala que en su estudio la proporción de Ca remanente de origen bacteriano sería muy pequeña, mientras que el riesgo de contaminación bacteriana para el caso del Mg y el K podría ser mayor, siendo aproximadamente un 50% del Mg y K encontrados en el residuo de origen bacteriano luego de 48 horas de incubación.

En el presente trabajo, se realizó al igual que en la técnica *in situ* de Emanuele y Staples (1990) un lavado con agua fría de las bolsitas post incubación ruminal, por lo que se esperaba en nuestro trabajo una menor incidencia aunque no nula de la contaminación microbiana del residuo de forraje, ya que el agua helada provocaría un shock en las bacterias lo que determinaría una separación de éstas del residuo de las bolsitas.

6. CONCLUSIONES

Las liberaciones de Ca y Mg de la alfalfa alcanzaron valores mayores al 75% durante la incubación ruminal, siendo significativamente mayores las proporciones liberadas a las 16 horas.

El tipo de dieta tuvo un efecto significativo para la liberación del Ca, siendo menor en la dieta con concentrado, explicado por su localización en la planta (asociado a la pared celular), y la disminución en el pH ruminal medido en esta dieta que puede haber deprimido la celulólisis en este tratamiento.

El tipo de dieta no tuvo efecto en la proporción de Mg liberado entre 8 o 16 horas, ya que este mineral se localiza principalmente en el citosol de las plantas.

Se concluye, que la evaluación de la liberación de los minerales de los forrajes debe tener en cuenta este efecto, siendo posiblemente más adecuado apuntar a evaluaciones *in situ* con dietas mixtas si se pretende realizar una caracterización de la disponibilidad mineral de los forrajes para animales de alta producción (leche y carne).

7. RESUMEN

Durante el invierno del 2002, en el Centro Regional Sur de la Facultad de Agronomía se evaluó la influencia del tipo de dieta y el tiempo de incubación en la liberación *in situ* de Ca y Mg en alfalfa. La alfalfa utilizada fue secada artificialmente, molida e incubada en bolsitas de nylon en el rumen de tres vacas Holando. Estos animales se encontraban confinados en jaulas de digestibilidad durante dos períodos de siete días cada uno, separados por 21 días, que fue el tiempo de adaptación que se tomó para pasar de una dieta 100% forraje a una dieta 70% forraje y 30% concentrado. La liberación del Ca fue significativamente influenciada por el tiempo de incubación ruminal. La proporción del Ca liberada aumenta proporcionalmente con el tiempo de incubación ($P = 0.0016$). También fueron significativamente diferentes ($P = 0.0160$) las proporciones liberadas según la dieta, siendo mayor la proporción desaparecida del Ca en la dieta 100 que en la dieta 70:30 en todos los tiempos de incubación ruminal. La liberación del Mg también fue influenciada significativamente por el tiempo de incubación ruminal en la dieta 100, siendo la proporción del Mg liberada mayor con el tiempo de incubación ($P = 0.0429$). Cuando la dieta fue 70:30 la proporción liberada del Mg en t_0 fue significativamente menor que la proporción liberada en t_8 . En cambio, la proporción liberada del Mg no fue significativamente diferente después de las 8 horas de incubación ruminal ($P = 0.3911$) con respecto a las 16 horas. La liberación del Mg no estuvo influenciada significativamente por la dieta ($P = 0.8598$ para t_8 y $P = 0.1186$ para t_{16}). El interés de la técnica *in situ* para la determinación de la liberación de macrominerales es discutido.

Palabras Clave: Biodisponibilidad; Minerales; Alfalfa; Degradabilidad.

8. SUMMARY

During the winter of 2002, the Southern Regional Center College of Agriculture evaluated the influence of diet and incubation time on in situ release of Ca and Mg in alfalfa. The alfalfa used was artificially dried, ground and incubated in nylon bags in the rumen of three Holstein cows. These animals were confined in digestibility cages for 2 periods of 7 days each, separated by 21 days, which was the adaptation time that it took to move from a 100% forage diet to a diet 70% forage and 30% concentrate. The release of Ca was significantly influenced by ruminal incubation time. The proportion of Ca released increases proportionally with the incubation time ($P = 0.0016$). They were also significantly different ($P = 0.0160$) proportions released as diet, disappeared with a higher proportion of dietary Ca in the diet 100 70:30 in all rumen incubation times. The release of Mg was also significantly influenced by ruminal incubation time on the diet 100, where the proportion of Mg released increased with the incubation time ($P = 0.0429$). When the diet was 70:30 ratio of Mg released at t0 was significantly lower than the proportion released in t8. In contrast, the proportion of Mg released was not significantly different after 8 hours of incubation in the rumen ($P = 0.3911$) for 16 hours. The release of Mg was not influenced significantly by diet ($P = 0.8598$ to 0.1186 and $P = t8$ to $t16$). The interest of the in situ technique for determining the release of macro is discussed.

Keywords: Bioavailability; Minerals; Alfalfa; Degradability.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. AKIN, D. E.; BURDICK, D. 1975. Percentage of tissue types in tropical and temperate grass leaf blades and degradation of tissue by rumen microorganism. *Crop Sci.* 15(5):661-668.
2. ALTAMIRANO, A.; DA SILVA, H.; DURÁN, A.; ECHEVERRÍA, A.; PANARIO, D.; PUENTES, R. 1978. Carta de reconocimiento de suelos del Uruguay; clasificación de suelos. Montevideo, MAP. DSF. t.1, 96 p.
3. ALLISON, M. J.; LITLEDIKE, E. T.; JAMES, L. F. 1977. Changes in ruminal oxalate degradation rate associated with adaptation to oxalate ingestion. *J. Anim. Sci.* 45 (5):1173-1179.
4. AMMERMAN, C. B.; MOORE, J. E.; HENRY, P. R.; MILLER, S. M.; MARTIN, F. G. 1982. Effect of age and sample preparation on mineral concentration of bermudagrass hay. *J. Dairy Sci.* 65 (7):1329-1333.
5. BLANEY, B.J.; GARTNER, R. J. W.; HEAD, T. A. 1982. The effect and of oxalate in tropical grasses on calcium, phosphorus and magnesium availability to cattle. *J. Agric. Sci. (Camb).* 99:533-539.
6. BONILLA, I. 2000. Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. In: Azcón-Bieto, J.; Talón, M. eds. *Fundamentos de fisiología vegetal.* Madrid, Mc Graw-Hill Interamericana. pp. 83-91.
7. BOSSI, J.; NAVARRO, R. 1988. *Geología del Uruguay.* Montevideo, Facultad de Agronomía. 970 p.
8. CARDOSO, R. C. 2000. Consumo e digestibilidade aparente em dietas com diferentes proporções de volumoso e concentrado. *R. Bras. Zootec.* 29(6):1832-1843.
9. CARVALHO, A. U.; DE CAMPOS VALDADARES FILHO, S.; COELHO DA SILVA, J. F.; CECON, P. R.; FERREIRA DINIZ VALADARES, R.; GOUVEIA, R. 1997. Níveis de concentrado em dietas de zebuínos. 4 Concentrações ruminais de amônia e pH, taxa de passagem da digesta ruminal e degradação in situ dos alimentos. *R. Bras. Zootec.* 26(5):1016-1024.
10. CASANOVA, O. 1991. Acidez y encalado en suelos del Uruguay. Montevideo, Facultad de Agronomía. 17 p.

11. CECAVA, M. J.; MERCHEN, N. R.; BERGER, L. L.; MAKIE, R. I.; FAHEY, JR G. C. 1991. Effects of dietary energy level and protein source on nutrient digestion and ruminal nitrogen metabolism in steers. *J. Anim. Sci.* 69(5):2230-2243.
12. COELHO DA SILVA, J. F.; LEÂFO, M. I. 1979. Fundamentos de nutrição de ruminantes. Piracicaba, Livroceres. 380 p.
13. DEL PINO, A. s.f. Nutrición catiónica. Montevideo, Facultad de Agronomía. 30 p.
14. DURÁN, A. 1991. Los suelos del Uruguay. Montevideo, Hemisferio Sur. 398 p.
15. DURAND, M.; KAWASHIMA, R. 1980. Influence of minerals in rumen microbial digestion. In: Ruckebusch, Y.; Thivend, P. eds. Digestive physiology and metabolism in ruminants. Lancaster, MTP. pp. 375- 408.
16. EDWARDS, J. H.; JACKSON, W. A.; BEATY, E. R.; MC CREERY, R. A. 1977. Element concentration of forage and non-soluble cell wall fraction of costal bermudagrass. *Agron. J.* 69 (4):617-619.
17. EMANUEL, S. M.; STAPLES, C. R. 1990. Ruminal release of minerals from six forage species. *J. Anim. Sci.* 68(7):2052-2060.
18. _____., _____., WILCOX, C. J. 1991. Extent and site of mineral release from six forage species incubates in mobile dacron bags. *J. Anim. Sci.* 69(2):801-810.
19. FAIRWEATHER-TAIT, S. J. 1996. Bioavailability of dietary minerals. *Bioch. Soc. Trans.* 24:775-780.
20. FASSBENDER, H. W. 1975. Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina. Turrialba, Costa Rica, IICA. 398 p. (Serie Libros y Materiales Educativos N.º24)
21. FIELD, A. C. 1981. Some thoughts on dietary requirements of macro-elements for ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* 40(3):267-272.
22. FITT, T. J.; HUTTON, K. 1974a. Effect of potassium ions on the uptake of magnesium by isolated cell wall of rumen bacteria. *Proc. Nutr. Soc.* 33(3):107A-109A.

23. _____, _____.; OTTO, W. R. 1974b. Relative affinities of isolated cell walls of rumen bacteria for calcium and magnesium ions. *Pro. Nutr. Soc.* 33 (3):106A-107A.
24. FLEMING, G. A. 1973. Mineral composition of herbage. 529-566 pp. In Butler, G. W.; Bailey R. W. eds. *Chemistry and biochemistry of herbage*. New York, Academic Press. pp.529-566.
25. GALDAMEZ-CABRERA, N. W.; COFFEY, K. P.; COBLENTZ, W. K.; SCARBROUGH, D. A.; TURNER, J. E.; KEGLEY, E. B.; JOHNSON, Z. B.; KELLOGG, D. W.; GUNSAULIS, J. L.; DANIELS, M. B. 2004. Sulfur concentration and in situ solubility of selected microminerals from common bermudagrass fertilized with different nitrogen rates and harvested on two dates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 111: 223-237.
26. GARATE, A; BONILLA, I. 2000. Nutrición mineral y producción vegetal. In: Azcón-Bieto, J.; Talón, M. eds. *Fundamentos de la fisiología vegetal*. Madrid, McGraw-Hill. pp. 113-130.
27. GOMIDE, J. A. 1978. Mineral composition of grasses and tropical leguminous forages. In: *Latin American Symposium of Mineral Nutrition Research with Grazing Ruminants (1976, Belo Horizonte, Brazil)*. Proceedings. Gainesville, Florida, University of Florida. pp. 32-40.
28. GUIMARAES, K. C.; FERRARI BRANCO, A.; ZEULA, L. M.; ALCALDE, C. R.; FREGADOLLI, F. L.; FERREIRA CALDAS NETO, S. 2001. Efeito do período experimental sobre a fermentação ruminal e eficiencia de síntese microbiana em bovinos alimentados com dois níveis de volumosos. *R. Bras. Zootec.* 30(3):880-887.
29. HOOVER, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69 (10):2755-2766.
30. JARRIGE, R. 1981. Alimentación de los rumiantes: principios de nutrición y alimentación de los rumiantes. Madrid, Mundi Prensa. 697 p.
31. JONES, L. H. 1978. Mineral components of plant cell wall. *Am. J. Clin. Nutr.* 31(Supl 10):S94-S98.
32. JOYCE, J. P.; RATTRAY, P. V. 1970. Nutritive value of white clover and perennial ryegrass. III. Intake and utilization of calcium, phosphorus and magnesium. *N. Z. J. Agric. Res.* 13(4):800-807.

33. KINCAID, R. L.; CRONRATH, J. D. 1983. Amount and distribution of minerals in Washington forages. *J. Dairy Sci.* 66(4):821-824.
34. LEDOUX, D. R.; MARTZ, F. A. 1991. Ruminal solubilization of selected macrominerals from forages and diets. *J. Dairy Sci.* 74(5):1654-1661.
35. MACKIE, R. I.; THERION, J. J. 1984. Influence of mineral interactions on growth and efficiency of rumen bacteria. In: Gilchrist, F.M.C.; Mackie, R. I. eds. *Hervibore nutrition in the subtropics and tropics*. Craighall, South Africa, Science Press. pp. 455-477.
36. MCGREGOR, R. C. 1980. Studies on the absorption of magnesium from the ovine digestive tract. Ph. D. Thesis, Newcastle upon Tyne, England, University of Newcastle upon Tyne. s.p.
37. MCMANUS, W. R.; ANTHONY, R. G.; GROUT, L. L.; MALIN, A. S.; ROBINSON V. N. E. 1979. Biocrystallization of mineral material on forage plant cell wall. *Aust. J. Agric. Res.*, 30(4):635-649.
38. MERCHEN, N. R.; FIRKINS, J. L.; BERGER, L. L. 1986. Effect of intake and forage level on ruminal turnover fates, bacterial protein synthesis and duodenal amino acid flows in sheep. *J Anim. Sci.* 62(1):216-225.
39. MICHALET-DOREAU B.; VERITE R.; CHAPOUTOT P. 1987. Méthodologie de mesure de la dégradabilité in sacco de l'azote des aliments dans le rumen. *Bulletin Technique C.R.Z.V. de Thies, (INRA).* 69: 5-7.
40. MONTALDI, E. R.; CASCO, O. H.; SIVORI, E. M. 1995. Fisiología vegetal. Buenos Aires. Hemisferio Sur. 681 p.
41. NEGI, S. S. 1971. Calcium assimilation in relation to metabolism of soluble and insoluble oxalates in the ruminant system: a reappraisal. *Indian J. Anim. Sci.* 41(10):913-921.
42. ODOM, J. W.; HAALAND, R. L.; HOVELAND, C. S.; ANTHONY, W. B. 1980. Forage quality response of tall fescue, orchardgrass and *Phalaris* to soil fertility level. *Agron. J.* 72(2):401-402.
43. PAINE, C. A.; CRAWSHAW, R.; BARBER W. P. 1982. A complete exchange method for the in sacco estimation of rumen degradability on a routine basis. In: Thompson, D. J.; Beever, D. E.; Gunn, R. G. eds. *Forage protein in*

ruminant animal production. Thames Ditton, United Kingdom, British Society of Animal Science. pp 177- 178. (Occasional Publication N.º 6)

44. PERDOMO, J. T; SHIRLEY, R. L.; CHICO, C. F. 1977. Availability of nutrient minerals in four tropical forages fed freshly chopped to sheep. *J. Anim. Sci.* 45(5):1114-1119.
45. PLAYNE, M. J.; ECHEVERRIA, M. G.; MEGARRITY R. G. 1978. Release of nitrogen, sulfur, phosphorus, calcium, magnesium, potassium and sodium from four tropical hays during their digestion in nylon bags in the rumen. *J. Sci. Food Agric.* 29(6):520-526.
46. PUOLI, J. R.; JUNG, G. A.; REID, R. L. 1991. Effect of nitrogen and sulfur on digestion and nutritive quality of warm-season grass hays for cattle and sheep. *J. Anim. Sci.* 69 (2):843-852.
47. REES, M. C.; MINSON, D. J. 1976. Fertilizer calcium as a factor affecting the voluntary intake, digestibility and retention time of pangola grass (*Digitaria documbens*) by sheep. *Br. J. Nutr.* 36(2):179-187.
48. REID, R. L.; JUNG, G. A.; WOLF, C. H.; KOCHER, R. E. 1979. Effect of magnesium fertilization on mineral utilization and nutritional quality of alfalfa for lambs. *J. Anim. Sci.* 48(5):1191-1201.
49. _____; HORVATH, D. J. 1980. Soil Chemistry and mineral problems in farm livestock; a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 5(2):95-167.
50. _____; BAKER, B. S.; VONA, L. C. 1984. Effect of magnesium sulfate supplementation and fertilization on quality and mineral utilization of timothy hays by sheep. *J. Anim. Sci.* 59(6):1403-1410.
51. _____; TEMPLETON, W. C. JR.; RANNEY, T. S.; THAYNE, W. V. 1987. Digestibility, intake and mineral utilization of combination of grasses and legumes by lambs. *J. Anim. Sci.* 64(6):1725-1734.
52. _____; JUNG, G. A. 1991. Plant/soil interaction in nutrition of the grazing animal. In: *Grazing Livestock Nutrition Conference (2nd 1991, Steamboat Springs, Colorado, USA). Proceedings.* Stillwater, Agricultural Experiment Station, Division of Agriculture, Oklahoma State University. pp. 48-63.
53. ROJAS-OSECHAS, D. 1985. Mineral concentration of tropical grasses as affected by maturity and effect of storage on forage organic components. M. S. Thesis. Gainesville, Florida, USA. University Florida. 195 p.

54. ROOKE, J. A.; AKINSOYINU, A. O.; ARMSTRONG, D. G. 1983. The release of mineral elements from grass silage incubated in sacco in the rumen of Jersey cattle. *Grass Forage Sci.* 38(4):311-316.
55. STARK, B. A. 1980. Aspects of mineral nutrition in sheep with particular reference to phosphorus. Ph. D. Thesis. Newcastle upon Tyne, England. University of Newcastle upon Tyne. s.p.
56. THOMPSON, T. J. 1978. Biological availability of macroelements. In: *Latin American Symposium on Mineral Nutrition Research with Grazing Ruminants.* (1976, Belo Horizonte, Brazil). Proceedings. Gainesville, Florida. University of Florida. pp 127-135.
57. TOOD, J. R. 1961. Magnesium in forage plants. II. Magnesium distribution in grasses and clovers. *J. Agric. Sci.* 57(1):35-38.
58. UNDERWOODS, E. J. 1981. *The mineral nutrition of livestock.* 2nd ed. Slough, UK. Commonwealth Agricultural Bureaux (CAB). 180 p.
59. VAN EYS, J. E.; REID, R. L. 1987. Ruminal solubility of nitrogen and minerals from fescue and fescue-red clover herbage. *J. Anim. Sci.* 65(4):1101-1112.
60. WHITEHEAD, D. C.; GOULDEN, K. M.; HARTLEY, R. D. 1985. The distribution of nutrient elements in the cell wall and other fractions of the herbage of some grasses and legumes. *J. Sci. Food Agric.* 36(5):311-318.
61. WILSON, G. F. 1980. Effects of magnesium supplements on the digestion of forages and milk production of cows with hypomagnesaemia. *Anim. Prod.* 31(2):153-157.

10. ANEXOS

options ps=500 ls=90 nocenter;

data bolmin; input bolsa vaca tiempo trat MSperd cenperd Caperd Mgperd Pperd;

cards;

| | | | | | | | | |
|------|---|----|------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1400 | 1 | 8 | 100 | 0.7072 | 0.8470 | 0.6846 | 0.7323 | 0.7969 |
| 1402 | 1 | 8 | 100 | 0.6955 | 0.8406 | 0.6846 | 0.7323 | 0.7969 |
| 1410 | 1 | 8 | 100 | 0.6286 | 0.8062 | 0.6846 | 0.7323 | 0.7969 |
| 227 | 1 | 8 | 7030 | 0.4294 | 0.6320 | 0.6509 | 0.7444 | 0.7761 |
| 228 | 1 | 8 | 7030 | 0.4236 | 0.6285 | 0.7611 | 0.7520 | 0.7851 |
| 230 | 1 | 8 | 7030 | 0.4055 | 0.6102 | 0.6027 | 0.7399 | 0.7520 |
| 1405 | 1 | 16 | 100 | 0.7630 | 0.8802 | 0.8085 | 0.8596 | 0.8484 |
| 1408 | 1 | 16 | 100 | 0.7887 | 0.8800 | 0.8085 | 0.8596 | 0.8484 |
| 1414 | 1 | 16 | 100 | 0.4142 | 0.6448 | 0.8085 | 0.8596 | 0.8484 |
| 231 | 1 | 16 | 7030 | 0.5176 | 0.6674 | 0.7910 | 0.7721 | 0.7422 |
| 233 | 1 | 16 | 7030 | 0.5003 | 0.6557 | 0.7910 | 0.7721 | 0.7422 |
| 234 | 1 | 16 | 7030 | 0.4971 | . | . | . | . |
| 1427 | 2 | 8 | 100 | 0.5298 | 0.7526 | 0.7626 | 0.8423 | 0.9127 |
| 1428 | 2 | 8 | 100 | 0.5852 | 0.7815 | 0.7626 | 0.8423 | 0.91 |
| 1429 | 2 | 8 | 100 | 0.5299 | 0.7521 | 0.7626 | 0.8423 | 0.9127 |
| 266 | 2 | 8 | 7030 | 0.3311 | 0.5617 | 0.5810 | 0.6773 | 0.8107 |
| 267 | 2 | 8 | 7030 | 0.3287 | 0.5575 | 0.4874 | 0.6664 | 0.7942 |
| 270 | 2 | 8 | 7030 | 0.3273 | 0.5822 | 0.6794 | 0.6666 | . |
| 1415 | 2 | 16 | 100 | 0.7707 | 0.8799 | 0.8085 | 0.8596 | 0.8484 |
| 1416 | 2 | 16 | 100 | 0.7417 | 0.8804 | 0.8085 | 0.8596 | 0.8484 |
| 1425 | 2 | 16 | 100 | 0.7084 | 0.8801 | 0.8085 | 0.8596 | 0.8484 |
| 256 | 2 | 16 | 7030 | 0.4171 | 0.5877 | 0.7373 | 0.7570 | 0.7575 |
| 258 | 2 | 16 | 7030 | 0.5032 | 0.6793 | 0.7373 | 0.7570 | 0.7575 |
| 99 | 2 | 16 | 7030 | . | . | . | . | . |
| 1439 | 3 | 8 | 100 | 0.5766 | 0.8013 | 0.7282 | 0.5927 | 0.8010 |
| 1441 | 3 | 8 | 100 | 0.5295 | 0.7794 | 0.7282 | 0.5927 | 0.8010 |
| 1442 | 3 | 8 | 100 | 0.5720 | 0.7999 | 0.7282 | 0.5927 | 0.8010 |
| 242 | 3 | 8 | 7030 | 0.3676 | 0.5747 | 0.5937 | 0.7050 | 0.7706 |
| 243 | 3 | 8 | 7030 | 0.4063 | 0.6221 | 0.6830 | 0.7341 | 0.7706 |
| 244 | 3 | 8 | 7030 | 0.3953 | 0.5986 | 0.6800 | 0.7273 | 0.7475 |
| 1435 | 3 | 16 | 100 | 0.7780 | 0.8805 | 0.8085 | 0.8596 | 0.8484 |
| 1443 | 3 | 16 | 100 | 0.7744 | 0.8806 | 0.8085 | 0.8596 | 0.8484 |
| 1444 | 3 | 16 | 100 | 0.7702 | 0.8801 | 0.8085 | 0.8596 | 0.8484 |
| 245 | 3 | 16 | 7030 | 0.5139 | 0.6697 | 0.7718 | 0.7571 | 0.7048 |
| 250 | 3 | 16 | 7030 | 0.4562 | 0.6304 | 0.7718 | 0.7571 | 0.7048 |
| 251 | 3 | 16 | 7030 | 0.4251 | . | . | . | . |

```
proc mixed noitprint; class vaca tiempo trat;  
model msperd = tiempo trat tiempo*trat;  
random vaca vaca*tiempo*trat;  
lsmeans trat/pdiff adj=tukey;  
lsmeans tiempo/pdiff adj=tukey;  
lsmeans tiempo*trat/pdiff adj=tukey;  
title 'BOLSAS MINERALES CON MIXED VAR=msperd';
```

```
proc mixed noitprint; class vaca tiempo trat;  
model cenperd= tiempo trat tiempo*trat;  
random vaca vaca*tiempo*trat;  
lsmeans trat/pdiff adj=tukey;  
lsmeans tiempo/pdiff adj=tukey;  
lsmeans tiempo*trat/pdiff adj=tukey;  
title 'BOLSAS MINERALES CON MIXED VAR=cenperd';
```

```
proc mixed noitprint; class vaca tiempo trat;  
model caperd = tiempo trat tiempo*trat;  
random vaca vaca*tiempo*trat;  
lsmeans trat/pdiff adj=tukey;  
lsmeans tiempo/pdiff adj=tukey;  
lsmeans tiempo*trat/pdiff adj=tukey;  
title 'BOLSAS MINERALES CON MIXED VAR=caperd';
```

```
proc mixed noitprint; class vaca tiempo trat;  
model mgperd= tiempo trat tiempo*trat;  
random vaca vaca*tiempo*trat;  
lsmeans trat/pdiff adj=tukey;  
lsmeans tiempo/pdiff adj=tukey;  
lsmeans tiempo*trat/pdiff adj=tukey;  
title 'BOLSAS MINERALES CON MIXED VAR=mgperd';
```

```
proc mixed noitprint; class vaca tiempo trat;  
model pperd= tiempo trat tiempo*trat;  
random vaca vaca*tiempo*trat;  
lsmeans trat/pdiff adj=tukey;  
lsmeans tiempo/pdiff adj=tukey;  
lsmeans tiempo*trat/pdiff adj=tukey;  
title 'BOLSAS MINERALES CON MIXED VAR=pperd';  
run;  
BOLSAS MINERALES CON MIXED VAR=msperd
```

The MIXED Procedure

Class Level Information

Class Levels Values

| | | | |
|--------|---|-----|------|
| VACA | 3 | 1 | 2 3 |
| TIEMPO | 2 | 8 | 16 |
| TRAT | 2 | 100 | 7030 |

Covariance Parameter Estimates (REML)

| Cov Parm | Estimate |
|------------------|------------|
| VACA | 0.00000000 |
| VACA*TIEMPO*TRAT | 0.00141234 |
| Residual | 0.00456602 |

Model Fitting Information for MSPERD

| Description | Value |
|--------------------------------|----------|
| Observations | 35.0000 |
| Res Log Likelihood | 32.6469 |
| Akaike's Information Criterion | 29.6469 |
| Schwarz's Bayesian Criterion | 27.4959 |
| -2 Res Log Likelihood | -65.2938 |

Tests of Fixed Effects

| Source | NDF | DDF | Type III F | Pr > F |
|-------------|-----|-----|------------|--------|
| TIEMPO | 1 | 6 | 12.92 | 0.0114 |
| TRAT | 1 | 6 | 53.29 | 0.0003 |
| TIEMPO*TRAT | 1 | 6 | 0.22 | 0.6536 |

Least Squares Means

| Effect | TIEMPO | TRAT | LSMEAN | Std Error | DF | t | Pr > t |
|-------------|--------|------------|------------|------------|-------|-------|---------|
| TRAT | 100 | 0.65908889 | 0.02211466 | 6 | 29.80 | | 0.0001 |
| TRAT | 7030 | 0.42869189 | 0.02251846 | 6 | 19.04 | | 0.0001 |
| TIEMPO | 8 | 0.48717222 | 0.02211466 | 6 | 22.03 | | 0.0001 |
| TIEMPO | 16 | 0.60060856 | 0.02251846 | 6 | 26.67 | | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 0.59492222 | 0.03127485 | 6 | 19.02 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 7030 | 0.37942222 | 0.03127485 | 6 | 12.13 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 16 | 100 | 0.72325556 | 0.03127485 | 6 | 23.13 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 16 | 7030 | 0.47796157 | 0.03240691 | 6 | 14.75 | 0.0001 |

Differences of Least Squares Means

| Effect | TIEMPO | TRAT | _TIEMPO | _TRAT | Difference | Std Error | DF | t |
|-------------|--------|------|---------|-------|-------------|------------|----|-------|
| TRAT | 100 | 7030 | | | 0.23039700 | 0.03156167 | 6 | 7.30 |
| TIEMPO | 8 | 16 | | | -0.11343634 | 0.03156167 | 6 | -3.59 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 8 | 7030 | 0.21550000 | 0.04422932 | 6 | 4.87 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 16 | 100 | -0.12833333 | 0.04422932 | 6 | -2.90 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 16 | 7030 | 0.11696066 | 0.04503692 | 6 | 2.60 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 7030 | 16 | 100 | -0.34383333 | 0.04422932 | 6 | -7.77 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 7030 | 16 | 7030 | -0.09853934 | 0.04503692 | 6 | -2.19 |
| TIEMPO*TRAT | 16 | 100 | 16 | 7030 | 0.24529399 | 0.04503692 | 6 | 5.45 |

Differences of Least Squares Means

Pr > |t| Adjustment Adj P

0.0003 Tukey-Kramer 0.0003
0.0114 Tukey-Kramer 0.0114
0.0028 Tukey-Kramer 0.0110
0.0273 Tukey-Kramer 0.0968
0.0408 Tukey-Kramer 0.1398
0.0002 Tukey-Kramer 0.0010
0.0713 Tukey-Kramer 0.2285
0.0016 Tukey-Kramer 0.0064

BOLSAS MINERALES CON MIXED VAR=cenperd

The MIXED Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|--------|--------|----------|
| VACA | 3 | 1 2 3 |
| TIEMPO | 2 | 8 16 |
| TRAT | 2 | 100 7030 |

Covariance Parameter Estimates (REML)

| Cov Parm | Estimate |
|------------------|------------|
| VACA | 0.00000000 |
| VACA*TIEMPO*TRAT | 0.00040201 |
| Residual | 0.00212550 |

Model Fitting Information for CENPERD

| Description | Value |
|--------------------------------|----------|
| Observations | 33.0000 |
| Res Log Likelihood | 42.2193 |
| Akaike's Information Criterion | 39.2193 |
| Schwarz's Bayesian Criterion | 37.1684 |
| -2 Res Log Likelihood | -84.4386 |

Tests of Fixed Effects

| Source | NDF | DDF | Type III F | Pr > F |
|-------------|-----|-----|------------|--------|
| TIEMPO | 1 | 6 | 7.63 | 0.0328 |
| TRAT | 1 | 6 | 102.56 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 1 | 6 | 0.03 | 0.8768 |

Least Squares Means

| Effect | TIEMPO | TRAT | LSMEAN | Std Error | DF | t | Pr > t |
|--------|--------|------|------------|------------|----|-------|---------|
| TRAT | | 100 | 0.82484444 | 0.01360457 | 6 | 60.63 | 0.0001 |
| TRAT | | 7030 | 0.62237778 | 0.01464941 | 6 | 42.48 | 0.0001 |

| | | | | | | | |
|-------------|----|------|------------|------------|---|-------|--------|
| TIEMPO | 8 | | 0.69600556 | 0.01360457 | 6 | 51.16 | 0.0001 |
| TIEMPO | 16 | | 0.75121667 | 0.01464941 | 6 | 51.28 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 0.79562222 | 0.01923977 | 6 | 41.35 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 7030 | 0.59638889 | 0.01923977 | 6 | 31.00 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 16 | 100 | 0.85406667 | 0.01923977 | 6 | 44.39 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 16 | 7030 | 0.64836667 | 0.02209643 | 6 | 29.34 | 0.0001 |

Differences of Least Squares Means

| Effect | TIEMPO | TRAT | _TIEMPO | _TRAT | Difference | Std Error | DF | t |
|-------------|--------|------|---------|-------|-------------|------------|----|-------|
| TRAT | | 100 | 7030 | | 0.20246667 | 0.01999224 | 6 | 10.13 |
| TIEMPO | 8 | | 16 | | -0.05521111 | 0.01999224 | 6 | -2.76 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 8 | 7030 | 0.19923333 | 0.02720915 | 6 | 7.32 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 16 | 100 | -0.05844444 | 0.02720915 | 6 | -2.15 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 16 | 7030 | 0.14725556 | 0.02929883 | 6 | 5.03 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 7030 | 16 | 100 | -0.25767778 | 0.02720915 | 6 | -9.47 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 7030 | 16 | 7030 | -0.05197778 | 0.02929883 | 6 | -1.77 |
| TIEMPO*TRAT | 16 | 100 | 16 | 7030 | 0.20570000 | 0.02929883 | 6 | 7.02 |

Differences of Least Squares Means

Pr > |t| Adjustment Adj P

0.0001 Tukey-Kramer 0.0001
0.0328 Tukey-Kramer 0.0328
0.0003 Tukey-Kramer 0.0014
0.0753 Tukey-Kramer 0.2396
0.0024 Tukey-Kramer 0.0095
0.0001 Tukey-Kramer 0.0003
0.1264 Tukey-Kramer 0.3682
0.0004 Tukey-Kramer 0.0017

BOLSAS MINERALES CON MIXED VAR=caperd

The MIXED Procedure

Class Level Information

Class Levels Values

VACA 3 1 2 3

TIEMPO 2 8 16
 TRAT 2 100 7030

Covariance Parameter Estimates (REML)

| Cov Parm | Estimate |
|-----------------|------------|
| VACA | 0.00000000 |
| VACA*TIEMPO*TRA | 0.00052455 |
| Residual | 0.00173473 |

Model Fitting Information for CAPERD

| Description | Value |
|--------------------------------|----------|
| Observations | 33.0000 |
| Res Log Likelihood | 44.4244 |
| Akaike's Information Criterion | 41.4244 |
| Schwarz's Bayesian Criterion | 39.3734 |
| -2 Res Log Likelihood | -88.8488 |

Tests of Fixed Effects

| Source | NDF | DDF | Type III F | Pr > F |
|-------------|-----|-----|------------|--------|
| TIEMPO | 1 | 6 | 29.39 | 0.0016 |
| TRAT | 1 | 6 | 11.03 | 0.0160 |
| TIEMPO*TRAT | 1 | 6 | 1.46 | 0.2720 |

Least Squares Means

| Effect | TIEMPO | TRAT | LSMEAN | Std Error | DF | t | Pr > t |
|-------------|--------|------|------------|------------|----|-------|---------|
| TRAT | | 100 | 0.76681667 | 0.01355722 | 6 | 56.56 | 0.0001 |
| TRAT | | 7030 | 0.70108333 | 0.01441845 | 6 | 48.62 | 0.0001 |
| TIEMPO | 8 | | 0.68030000 | 0.01355722 | 6 | 50.18 | 0.0001 |
| TIEMPO | 16 | | 0.78760000 | 0.01441845 | 6 | 54.62 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 0.72513333 | 0.01917281 | 6 | 37.82 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 7030 | 0.63546667 | 0.01917281 | 6 | 33.14 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 16 | 100 | 0.80850000 | 0.01917281 | 6 | 42.17 | 0.0001 |

TIEMPO*TRAT 16 7030 0.76670000 0.02153997 6 35.59 0.0001

Differences of Least Squares Means

| Effect | TIEMPO | TRAT | _TIEMPO | _TRAT | Difference | Std Error | DF | t |
|-------------|--------|------|---------|-------|-------------|------------|----|-------|
| TRAT | 100 | | 7030 | | 0.06573333 | 0.01979116 | 6 | 3.32 |
| TIEMPO | 8 | 16 | | | -0.10730000 | 0.01979116 | 6 | -5.42 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 8 | 7030 | 0.08966667 | 0.02711445 | 6 | 3.31 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 16 | 100 | -0.08336667 | 0.02711445 | 6 | -3.07 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 16 | 7030 | -0.04156667 | 0.02883691 | 6 | -1.44 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 7030 | 16 | 100 | -0.17303333 | 0.02711445 | 6 | -6.38 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 7030 | 16 | 7030 | -0.13123333 | 0.02883691 | 6 | -4.55 |
| TIEMPO*TRAT | 16 | 100 | 16 | 7030 | 0.04180000 | 0.02883691 | 6 | 1.45 |

Differences of Least Squares Means

Pr > |t| Adjustment Adj P

0.0160 Tukey-Kramer 0.0160
 0.0016 Tukey-Kramer 0.0016
 0.0163 Tukey-Kramer 0.0598
 0.0218 Tukey-Kramer 0.0787
 0.1995 Tukey-Kramer 0.5212
 0.0007 Tukey-Kramer 0.0028
 0.0039 Tukey-Kramer 0.0152
 0.1974 Tukey-Kramer 0.5171
 BOLSAS MINERALES CON MIXED VAR=mgperd

The MIXED Procedure

Class Level Information

Class Levels Values
 VACA 3 1 2 3
 TIEMPO 2 8 16
 TRAT 2 100 7030

Covariance Parameter Estimates (REML)

| Cov Parm | Estimate |
|------------------|-------------|
| VACA | -0.00000000 |
| VACA*TIEMPO*TRAT | 0.00429408 |
| Residual | 0.00002933 |

Model Fitting Information for MGPERD

| Description | Value |
|--------------------------------|----------|
| Observations | 33.0000 |
| Res Log Likelihood | 82.0486 |
| Akaike's Information Criterion | 79.0486 |
| Schwarz's Bayesian Criterion | 76.9977 |
| -2 Res Log Likelihood | -164.097 |

Tests of Fixed Effects

| Source | NDF | DDF | Type III F | Pr > F |
|-------------|-----|-----|------------|--------|
| TIEMPO | 1 | 6 | 6.07 | 0.0489 |
| TRAT | 1 | 6 | 2.01 | 0.2061 |
| TIEMPO*TRAT | 1 | 6 | 1.34 | 0.2913 |

Least Squares Means

| Effect | TIEMPO | TRAT | LSMEAN | Std Error | DF | t | Pr > t |
|-------------|--------|------|------------|------------|----|-------|---------|
| TRAT | | 100 | 0.79101667 | 0.02678262 | 6 | 29.53 | 0.0001 |
| TRAT | | 7030 | 0.73731111 | 0.02679023 | 6 | 27.52 | 0.0001 |
| TIEMPO | 8 | | 0.71749444 | 0.02678262 | 6 | 26.79 | 0.0001 |
| TIEMPO | 16 | | 0.81083333 | 0.02679023 | 6 | 30.27 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 0.72243333 | 0.03787635 | 6 | 19.07 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 7030 | 0.71255556 | 0.03787635 | 6 | 18.81 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 16 | 100 | 0.85960000 | 0.03787635 | 6 | 22.69 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 16 | 7030 | 0.76206667 | 0.03789785 | 6 | 20.11 | 0.0001 |

Differences of Least Squares Means

| Effect | TIEMPO | TRAT | _TIEMPO | _TRAT | Difference | Std Error | DF | t |
|-------------|--------|------|---------|-------|-------------|------------|----|-------|
| TRAT | 100 | 7030 | | | 0.05370556 | 0.03788172 | 6 | 1.42 |
| TIEMPO | 8 | 16 | | | -0.09333889 | 0.03788172 | 6 | -2.46 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 8 | 7030 | 0.00987778 | 0.05356524 | 6 | 0.18 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 16 | 100 | -0.13716667 | 0.05356524 | 6 | -2.56 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 16 | 7030 | -0.03963333 | 0.05358045 | 6 | -0.74 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 7030 | 16 | 100 | -0.14704444 | 0.05356524 | 6 | -2.75 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 7030 | 16 | 7030 | -0.04951111 | 0.05358045 | 6 | -0.92 |
| TIEMPO*TRAT | 16 | 100 | 16 | 7030 | 0.09753333 | 0.05358045 | 6 | 1.82 |

Differences of Least Squares Means

Pr > |t| Adjustment Adj P

0.2061 Tukey 0.2061
0.0489 Tukey 0.0489
0.8598 Tukey-Kramer 0.9975
0.0429 Tukey-Kramer 0.1460
0.4874 Tukey-Kramer 0.8779
0.0335 Tukey-Kramer 0.1169
0.3911 Tukey-Kramer 0.7940
0.1186 Tukey-Kramer 0.3497

BOLSAS MINERALES CON MIXED VAR=pperd

The MIXED Procedure

Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|--------|--------|----------|
| VACA | 3 | 1 2 3 |
| TIEMPO | 2 | 8 16 |
| TRAT | 2 | 100 7030 |

Covariance Parameter Estimates (REML)

| Cov Parm | Estimate |
|------------------|------------|
| VACA | 0.00050604 |
| VACA*TIEMPO*TRAT | 0.00084590 |

Residual 0.00005139

Model Fitting Information for PPERD

| Description | Value |
|--------------------------------|----------|
| Observations | 33.0000 |
| Res Log Likelihood | 81.3727 |
| Akaike's Information Criterion | 78.3727 |
| Schwarz's Bayesian Criterion | 76.3218 |
| -2 Res Log Likelihood | -162.745 |

Tests of Fixed Effects

| Source | NDF | DDF | Type III F | Pr > F |
|-------------|-----|-----|------------|--------|
| TIEMPO | 1 | 6 | 0.90 | 0.3791 |
| TRAT | 1 | 6 | 25.59 | 0.0023 |
| TIEMPO*TRAT | 1 | 6 | 2.65 | 0.1545 |

Least Squares Means

| Effect | TIEMPO | TRAT | LSMEAN | Std Error | DF | t | Pr > t |
|-------------|--------|------|------------|------------|----|-------|---------|
| TRAT | | 100 | 0.84263333 | 0.01767815 | 6 | 47.67 | 0.0001 |
| TRAT | | 7030 | 0.75672222 | 0.01769833 | 6 | 42.76 | 0.0001 |
| TIEMPO | 8 | | 0.80773889 | 0.01767815 | 6 | 45.69 | 0.0001 |
| TIEMPO | 16 | | 0.79161667 | 0.01769833 | 6 | 44.73 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 0.83686667 | 0.02136247 | 6 | 39.17 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 7030 | 0.77861111 | 0.02136247 | 6 | 36.45 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 16 | 100 | 0.84840000 | 0.02136247 | 6 | 39.71 | 0.0001 |
| TIEMPO*TRAT | 16 | 7030 | 0.73483333 | 0.02142919 | 6 | 34.29 | 0.0001 |

Differences of Least Squares Means

| Effect | TIEMPO | TRAT | _TIEMPO | _TRAT | Difference | Std Error | DF | t |
|-------------|--------|------|---------|-------|-------------|------------|----|-------|
| TRAT | | 100 | | 7030 | 0.08591111 | 0.01698205 | 6 | 5.06 |
| TIEMPO | 8 | | 16 | | 0.01612222 | 0.01698205 | 6 | 0.95 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 8 | 7030 | 0.05825556 | 0.02398650 | 6 | 2.43 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 16 | 100 | -0.01153333 | 0.02398650 | 6 | -0.48 |

| | | | | | | | | |
|-------------|----|------|----|------|-------------|------------|---|-------|
| TIEMPO*TRAT | 8 | 100 | 16 | 7030 | 0.10203333 | 0.02404594 | 6 | 4.24 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 7030 | 16 | 100 | -0.06978889 | 0.02398650 | 6 | -2.91 |
| TIEMPO*TRAT | 8 | 7030 | 16 | 7030 | 0.04377778 | 0.02404594 | 6 | 1.82 |
| TIEMPO*TRAT | 16 | 100 | 16 | 7030 | 0.11356667 | 0.02404594 | 6 | 4.72 |

Differences of Least Squares Means

| Pr > t | Adjustment | Adj P |
|---------|--------------|--------|
| 0.0023 | Tukey-Kramer | 0.0023 |
| 0.3791 | Tukey-Kramer | 0.3791 |
| 0.0513 | Tukey-Kramer | 0.1713 |
| 0.6477 | Tukey-Kramer | 0.9606 |
| 0.0054 | Tukey-Kramer | 0.0210 |
| 0.0270 | Tukey-Kramer | 0.0959 |
| 0.1185 | Tukey-Kramer | 0.3496 |
| 0.0032 | Tukey-Kramer | 0.0128 |