

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EFFECTO DEL USO DE ADITIVOS SOBRE EL METABOLISMO  
RUMINAL Y LA UTILIZACIÓN DIGESTIVA DE ALIMENTOS  
UTILIZADOS PARA PRODUCCIÓN DE LECHE**

**por**

**Ana Belén CÁCERES PELLETTI  
Yoselin Carolina DORAO RODRÍGUEZ**

**Trabajo final de grado  
presentado como uno de los  
requisitos para obtener el  
título de Ingeniero Agrónomo**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2023**

**Página de aprobación**

Trabajo final de grado aprobado por:

Director/a:

\_\_\_\_\_  
Ing. Agr. (MSc.) María de los Ángeles Bruni Borrone

Director/a:

\_\_\_\_\_  
Ing. Agr. (Dr.) Diego Antonio Mattiauda Mele

Tribunal:

\_\_\_\_\_  
DMV. (PhD.) Alberto Casal

\_\_\_\_\_  
Ing. Agr. Catalina Rivoir

\_\_\_\_\_  
Ing. Agr. (Dra.) Ana Inés Trujillo

Fecha: 9 de marzo de 2022

Estudiante:

\_\_\_\_\_  
Ana Belén CÁCERES PELLETTI

\_\_\_\_\_  
Yoselin Carolina DORAO RODRÍGUEZ

## **Agradecimientos**

En primer lugar, agradecemos a nuestros tutores María de los Ángeles Bruni y Diego Mattiauda por ayudarnos, guiarnos en este proceso, pero sobre todo por hacer de cada paso una enseñanza. A la empresa CCPA por el financiamiento del proyecto.

A Alberto Casal por el apoyo y conocimiento transmitido. A Lucas González y Agustina Rivoir por acompañarnos en todo el proceso y dejarnos grandes conocimientos. A todo el personal de la EEMAC que siempre estuvo a disposición. A Anaclara, Tomas, Santiago, Lucia, tesistas con lo que compartimos este proyecto, por el compañerismo e imprescindible ayuda. A todos aquellos que estuvieron para dar una mano cuando lo necesitábamos.

A todos los compañeros de vida que te regala esta carrera.

A mis padres, Andrea y Daniel, mi hermana Milagros y mis abuelas Lila y Mirtha, les agradezco y dedico este trabajo, por el apoyo incondicional y porque sin ellos no hubiera alcanzado esta meta. A mis tíos y mis primas, por haberme acompañado a lo largo de la carrera.

Especialmente agradezco a mis padres, Julio y Claudia por darme la oportunidad de estudiar y acompañarme en este camino. A mi hermana Soledad y mi amiga Luciana, por nunca dudar que este día llegaría. Sin ustedes esto no sería posible.

¡Muchas gracias!

## Tabla de contenido

Página de aprobación .....	2
Agradecimientos .....	3
Resumen.....	6
Abstract .....	8
1. Introducción .....	10
2. Revisión Bibliográfica .....	12
<b>2.1 Alimentación de la Vaca Lechera .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.1 Alimentos.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Metabolismo Ruminal.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.1 Técnicas para el Estudio del Metabolismo Ruminal. ....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Uso de Aditivos para la Modulación de la Fermentación Ruminal.....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.1 Efecto de los Antibióticos como Aditivo en la Dieta. ....</b>	<b>27</b>
<b>2.3.2 Alternativas al Uso de Antibióticos. ....</b>	<b>30</b>
3. Materiales y Métodos.....	35
<b>3.1 Localización y Período Experimental.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Diseño Experimental, Animales y Tratamientos .....</b>	<b>35</b>
<b>3.3 Manejo .....</b>	<b>35</b>
<b>3.4 Determinaciones .....</b>	<b>38</b>
<b>3.4.1. En los alimentos. ....</b>	<b>38</b>
<b>3.4.2 En los animales.....</b>	<b>39</b>
<b>3.4.3 Parámetros que Caracterizan el Ambiente Ruminal. ....</b>	<b>42</b>
<b>3.5 Análisis Estadístico.....</b>	<b>44</b>
4. Resultados y Discusión .....	45
<b>4.1 Efecto del Uso de Aditivos en la Digestibilidad. ....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.2 Efecto del Uso de Aditivos Sobre la Cinética de Degradación del Heno de alfalfa. ....</b>	<b>48</b>
<b>4.1.3 Efecto del Uso de Aditivos Sobre los Parámetros Ruminales.....</b>	<b>52</b>
5. Conclusiones .....	60
6. Bibliografía .....	61

### Lista de tablas y figuras

Tabla 1. Proporción de cada alimento en dieta totalmente mezclada (DTM) y dieta parcialmente mezclada (DPM).....	36
Tabla 2. Composición química, de las dietas totalmente mezcladas y parcialmente mezclada ofrecidas en el pre y posparto, según tratamiento.....	37
Tabla 3. Composición química de Festuca Arundinacea (Fest), Medicago Sativa (AA), Cichorium intybus (Ach), y Avena sativa (AV) y heno de alfalfa estándar (HAAE). .....	38
Tabla 4. Composición de la dieta posparto, compuesta por una dieta parcialmente mezclada (DPM) y pastura de alfalfa (AA), según tratamiento.....	41
Tabla 5. Efectos de la adición de monensina y extractos vegetales sobre la digestibilidad ruminal de los alimentos evaluados.....	46
Tabla 6. Efecto de la adición de monensina y extractos vegetales sobre la cinética de degradación del heno de alfalfa.....	50
Tabla 7. Efecto de la adición de monensina y extractos vegetales sobre los parámetros ruminales (pH, amonio, ácidos grasos volátiles totales con sus proporciones molares y protozoarios).....	53
Figura 1. Cinética de degradación de la Materia Seca (MS) de del heno de alfalfa según tratamiento. ....	49
Figura 2. Proporciones (%) de los diferentes ácidos grasos volátiles según tratamientos. ....	55
Figura 3. Evolución de pH en el transcurso del tiempo según tratamientos.....	57
Figura 4. Evolución de la concentración de amonio (NH <sub>3</sub> ) en el transcurso del tiempo, según tratamiento. ....	58
Figura 5. Evolución de la concentración de ácidos grasos totales (AGV totales) en el transcurso del tiempo, según tratamientos. ....	59

## Resumen

En los sistemas de producción de leche es común el uso de aditivos, principalmente monensina. Actualmente, se cuestiona su uso por la aparición de cepas bacterianas resistentes y por la posibilidad de residuos en productos para consumo humano. Se han desarrollado investigaciones en búsqueda de alternativas sobre sistemas estabulados e *in vitro*, pero no en sistemas pastoriles como los del Uruguay. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de compuestos bioactivos derivados de plantas en la utilización ruminal de los nutrientes de diferentes alimentos (A): pasturas y dietas mezcladas, en comparación a la monensina. Nueve vacas Holando-americano, de  $618 \pm 13,5$  kg de PV, con cánula ruminal fueron asignadas al azar a uno de tres tratamientos (T): Control (TC; sin aditivo), Monensina (Tmon; 300 mg/vaca/día) y Extractos bioactivos derivados de plantas (TexV;  $50 \times 10^3$  mg/vaca/día). En la mañana, las vacas pastoreaban alfalfa (Aa) a una asignación de 30kg MS/vaca/d y por la tarde recibían una dieta parcial mezclada (DPM) que contenía o no el aditivo en el concentrado. Entre los 50-60 días de lactancia, mediante la técnica *in situ* propuesta por Ørskov et al. (1980), se determinó la cinética de degradación de la materia seca (MS), materia orgánica (MO) y fibra detergente neutro (FDN) del heno de alfalfa estándar (HAAE) y la digestibilidad del HAAE, Aa, achicoria (Ach), festuca (Fest), avena (Av), dieta total mezclada (DTM), DPM y DPM+Aa. Por 2 días consecutivos, se muestreó líquido ruminal antes del acceso a la alimentación y a las 4, 8, 16, 24 h post alimentación para medir pH, NH<sub>3</sub>, AGV y protozoarios. Los datos de cinética y digestibilidad se analizaron con un diseño aleatorizado utilizando el procedimiento MIXTO, e incluyendo T, A y su interacción como efectos fijos y vaca como efecto aleatorio. Para los parámetros ruminales se utilizó un modelo de medidas repetidas incluyendo T, h y sus interacciones como efectos fijos y vaca como efecto aleatorio. Respecto a la cinética de degradación de la MS y MO, los aditivos no afectaron la tasa de degradación del HAAE ( $p > 0,05$ ), Tmon presentó mayor fracción soluble, pero una fracción insoluble potencialmente degradable menor al TexV y TC ( $p < 0,05$ ). La degradabilidad potencial de la FDN no se vio afectada por los aditivos, pero redujeron la tasa de degradación de la FDN respecto a TC ( $p < 0,05$ ). Únicamente DTM redujo su digestibilidad *in situ* a las 48 horas con el uso de aditivos ( $p < 0,05$ ). El TexV redujo la concentración de NH<sub>3</sub> respecto a Tmon y TC.

El uso de aditivos disminuyó la población de protozoarios, aumentó la producción de propiónico y disminuyó la relación acético: propiónico ( $p < 0,05$ ). El efecto encontrado sobre los protozoarios y la disminución en la tasa de degradación de la fibra al utilizar aditivos, podrían verse acentuada en la DTM que utilizan mayor cantidad de alimentos fibrosos. Menor concentración de amonio, mejor proporción acético: propiónico y estabilidad del ambiente ruminal son resultados alentadores respecto a una mejor eficiencia de utilización de los alimentos en el rumen.

*Palabras Clave:* vaca lechera, aditivos, parámetros ruminales, utilización de alimentos, *in situ*

### Abstract

In milk production systems the use of additives, mainly monensin, is common. Currently, its use is questioned due to the emergence of resistant bacterial strains and the possibility of residues in products for human consumption. Research has been developed in search of alternatives on stabled and in vitro systems, but not in grazing systems as in Uruguay. The objective of this work was to determine the effect of plant-derived bioactive compounds on the rumen utilization of nutrients from different foods (A): pastures and mixed diets, in relation to monensin and a control. Nine Holando-American cows, with  $618 \pm 13,5$  kg of LW, with rumen cannula; were randomly assigned to one of three treatments (T): Control (TC; no additive), Monensin (Tmon; 300 mg/cow/day) and Bioactive extracts derived from plants (TexV;  $50 \times 10^3$  mg/cow/day). In the morning, they grazed alfalfa (Aa) with an allocation of 30kg DM/a/d and in the afternoon they received a partial mixed diet (PMD) that contained or did not the additive in the concentrate. Between 50-60 days of lactation, using the *in situ* technique proposed by Ørskov et al. (1980), the degradation kinetics of dry matter (DM), organic matter (OM) and neutral detergent fiber (NDF) of standard alfalfa hay (HAAE) and the digestibility of HAAE, Aa, chicory (Ach), fescue (Fest), oats (Av), total mixed diet (TMD) were determined, PMD and PMD+Aa. For 2 consecutive days, rumen fluid was sampled before access to food and at 4, 8, 16, 24 h post feeding to measure pH, NH<sub>3</sub>, VFA and protozoa. Kinetic and digestibility data were analyzed with a randomized design using the MIXED procedure, and including T, A and their interaction as fixed effects and cow as a random effect. For rumen parameters; was used a repeated measures model including T, h and their interactions as fixed effects and cow as random effect. Regarding the degradation kinetics of DM and OM, additives did not affect the degradation rate of alfalfa hay ( $p > 0,05$ ), Tmon presented higher soluble fraction, but a potentially degradable insoluble fraction lower than TexV and TC. The potential degradability of NDF was not affected by additives, but they reduced the rate of degradation of NDF respect to TC ( $p < 0,05$ ). Only TMD reduced its *in situ* digestibility at 48 hours due to the use of additives ( $p < 0,05$ ). TexV reduced the concentration of NH<sub>3</sub> with respect to Tmon and TC. The use of additives decreased the protozoa population and increased propionic production ( $p < 0,05$ ). The effect on protozoa and the decrease in the rate of fiber utilization when



using additives, could be accentuated in TMDs that use more amount of fibrous foods. Lower ammonium concentration, better acetic:propionic ratio and stability of the rumen environment are encouraging results regarding a better efficiency of food utilization in the rumen.

*Key words:* dairy cow, additives, ruminal parameters, foods utilization, *in situ*

## 1. Introducción

Los rumiantes establecen una relación simbiótica con los microorganismos, que habitan en su tracto gastro-intestinal, los primeros facilitan un ambiente adecuado y nutrientes, mientras que los segundos proveen de proteína microbiana y energía a través de la degradación de la fibra. Sin embargo, este proceso fermentativo presenta ineficiencias energéticas por pérdidas de metano y nitrógeno, resultando en una ineficiencia en el uso de los nutrientes con consecuencias sobre el ambiente como gases con efecto invernadero y de nutrientes contaminantes.

Ante esta perspectiva, la investigación en el área de producción lechera y nutrición animal apunta a la búsqueda de alternativas que permita mejorar la eficiencia en la utilización de energía y nutrientes por el animal. Existen diferentes estrategias en el manejo de la alimentación, como la combinación de diferentes alimentos, la secuencia de suministro y el uso de aditivos dietarios, entre otras. Éstos últimos son capaces de mejorar la conversión alimenticia y productividad animal a través de la modificación del metabolismo ruminal (Pordomingo et al., 2010). En Uruguay está difundido el uso de antibióticos ionóforos, como monensina y lasalocid (Colombatto, 2012).

Sin embargo, el uso extendido de monensina a nivel mundial ha tenido como consecuencia la aparición de cepas bacterianas resistentes y se han encontrado residuos en los productos animales, provocando una discusión a nivel social sobre su aceptación y determinando así la prohibición de su uso en enero de 2006 por la Comisión Europea (Reglamento (CE) n° 1831/2003). Debido a ello y teniendo en cuenta que Uruguay exporta el 70% de la producción láctea (Instituto Nacional de la Leche [INALE], s.f.), y que por lo tanto es dependiente de estándares de calidad del comercio exterior, la búsqueda de posibles sustitutos naturales a los antibióticos, como levaduras, probióticos, ácidos orgánicos, aceites esenciales y extractos de plantas es muy relevante. Éstos han sido evaluados mayormente en sistemas *in vitro* (Geraci et al., 2012) y estabulados obteniendo resultados alentadores, sin embargo, es escasa la información en sistemas mixtos de base pastoril.

Bajo este contexto, el objetivo de este trabajo es determinar el impacto del uso de aditivos - compuestos bioactivos derivados de plantas y monensina- en la utilización ruminal de nutrientes en vacas lecheras, en sistemas pastoriles-mixtos.

Como objetivos específicos, se plantean evaluar:

el efecto de los aditivos sobre la degradabilidad de un heno de alfalfa y la digestibilidad *in situ* de las dietas y alimentos ofrecidos a los animales;

el efecto de los parámetros de fermentación ruminal y su evolución en el transcurso del día.

## 2. Revisión Bibliográfica

### 2.1 Alimentación de la Vaca Lechera

En Uruguay, en los últimos años se ha dado una intensificación de los sistemas de producción de leche, dándose un aumento en la producción total explicado principalmente por incrementos en la productividad (litros/ha/año), basado en una mayor producción individual (litros/VO/día y litros/VM/año) y eficiencia del rodeo (VO/VM), asimismo se han dado decrementos en las cabezas de ganado y en la superficie total destinada al rubro, el número de productores y de pequeñas industrias de procesamiento en el período 2014/15 – 2019/20 (Oficina de Estadísticas Agropecuarias, 2021; Chilibroste, 2021).

Los sistemas de producción en Uruguay se caracterizan por una productividad media anual de 8831 L y 624 kg de sólidos por hectárea de plataforma de pastoreo, con una carga animal de 1,15 animal/ha. Los partos se dan todo el año, pero tienden a concentrarse en otoño e invierno (65%), dándose la mayor producción anual en primavera (litros remitidos a industria). En cuanto a los sistemas de alimentación, están constituidos principalmente por una base pastoril (3944 kg MS/ha/año), un nivel intermedio de uso de suplementos (1831 kg MS/ha/año), reservas forrajeras y cultivos cosechados mecánicamente (1367 kg MS/ha/año) (Fariña & Chilibroste, 2019), y en menor medida minerales, vitaminas y aditivos. El “Proyecto de producción competitiva”, que integra a más de 400 productores y actúa como herramienta de monitoreo mensual de los principales indicadores productivos para la gestión de las empresas, presentó valores similares: un consumo de forraje de 8,9 kg MS/VO/día, 4,7 kg MS/VO/día de suplementos y 3,8 kg MS/VO/día de forraje conservado, ratificando los valores antes expuestos (50% del consumo total de alimentos explicado por cosecha directa de forraje, 25% por consumo de reservas de forraje y 25% por aporte de concentrados). La eficiencia de conversión promedio, entendiéndose esta como la cantidad de materia seca (MS) consumida necesaria para producir una unidad de producto, es de 1,08 kg MS/L (Chilibroste & Battegazore, 2014). Esto ubica a Uruguay como el país con menor costo promedio de producción (U\$S/L) a nivel internacional, haciéndolo competitivo en el mercado exterior dada la alta flexibilidad, ya que más del 70% de la dieta es producida en el predio.

Otra forma de caracterizar los sistemas de producción y la diversidad de los mismos en el país, es a través del proyecto de Conaprole ya mencionado, donde se clasificaron las empresas según su nivel de productividad (baja, media baja, media alta y alta) en el período 2011 – 2013, con niveles contrastantes en litros/ha/año de 3661, 5288, 6648 y 8801 L/ha respectivamente, la carga animal varió de 0,78 a 1,36 VM/ha VM en las diferentes productividades y la producción individual fue 16,3, 18,5, 19,8 y 21,7 L/VO respectivamente, el indicador de eficiencia del rodeo (VO/VM) fue mayor para alta con respecto a baja (84,1 vs 79,5%). Estos datos fueron analizados por Chilibroste, el cual observó mayor consumo (kg MS/VO/día) en productividad alta respecto a baja, explicado principalmente por un mayor consumo de reservas y concentrados (+44 y +53% respectivamente, alta vs baja), con una leve reducción en el consumo de pasturas (-6% alta vs baja). El consumo de forraje directo y cosechado mecánicamente oscilo de 12 a 13 kg MS/VO/día. Cuando los datos se expresan en hectárea VM, el consumo de forraje directo es 65% mayor en alta respecto a baja, resultando en una mayor utilización del forraje en estos sistemas debido a una mayor carga animal. Debido a la mayor carga animal y mayor producción individual, los sistemas más intensivos presentaron los mejores márgenes de alimentación (US\$/haVM/día) (Chilibroste, 2015a), duplicando el valor de los sistemas menos intensivos.

El uso de suplementos se vuelve necesario en la medida que el objetivo sea mantener altas producciones y eludir el desbalance entre la oferta y demanda de nutrientes de los animales, que se da debido al desfase entre la estacionalidad de crecimiento del forraje y la estructura de partos (Fariña & Chilibroste, 2019). Especialmente en otoño e invierno, el desbalance se agrava por la fecha de siembra de las pasturas en otoño que reduce la superficie efectiva de pastoreo. A esto se suma que, la mayoría de los partos se dan en ese período y que los animales en las últimas semanas de gestación y en lactancia temprana experimentan una depresión del consumo de hasta 30%; a la vez aumentan sus requerimientos por el crecimiento final del feto y el inicio de la lactancia (Adrien Delgado, 2006), lo que promueve la movilización de reservas corporales y resulta en un balance energético negativo que impide alcanzar el potencial productivo (Chilibroste, 2015b). En el período de transición, de vaca seca a vaca en producción, se dan cambios relacionados a la adaptación del sistema digestivo y al metabolismo, dependiendo del equilibrio con el que el animal logre sobrepasar ese período quedará determinada la producción

de leche, las enfermedades metabólicas y el desempeño reproductivo (Meikle et al., 2013).

De este modo surgen diferentes estrategias de alimentación para vacas lecheras de alta producción. Mientras que en el hemisferio norte (Europa y EE.UU.) la oferta de nutrientes en calidad y cantidad se manipula a través de la modificación del nivel y tipo de suplemento, en el hemisferio sur por ser la pastura el componente principal de la base alimenticia, la oferta de nutrientes se manipula a través del control del pastoreo, pudiendo lograrse cambios en la cantidad y calidad de producto sin cambios significativos en los costos de producción (Chilibroste, 2002, 2012). El proceso de pastoreo puede controlarse a través del manejo de la pastura (disponibilidad y altura de forraje), de los animales (rutinas diarias) y de la alimentación (ya sea a través de la ubicación y duración de la sesión de pastoreo y/o suplementación) (Chilibroste, 2015b). Mattiauda et al. (2013) evaluaron los efectos del tiempo de acceso -4 y 8 horas- y momento -matutino o vespertino- al pastoreo sobre el consumo de MS, producción y composición de la leche entre otras variables. La producción de leche fue mayor con 8 que con 4 horas de acceso a la pastura y no se encontró efecto del turno de pastoreo. La proteína de la leche fue superior para el mayor tiempo de acceso y el pastoreo vespertino. La mayor producción de leche puede ser atribuida al mayor consumo de MS de pastura.

Diferentes autores observaron una respuesta directa en producción de leche y sólidos, frente a una mejora en el plano de alimentación en lactancia temprana o media, ya que los animales no son capaces de alcanzar los altos potenciales de producción únicamente con pastoreo porque el consumo de MS es limitante (Kolver & Muller, 1998). Cuando los animales pastorean, los requerimientos de mantenimiento resultan mayores por la actividad de caminar y pastar, lo que explica la respuesta en leche a los diferentes niveles de suplementación, con mayores respuestas a la suplementación con tipos restringidos de acceso a la pastura (4h) (Bargo et al., 2002; Fajardo Sokol, 2013; Soriano et al., 2001).

### **2.1.1 Alimentos.**

Un alimento puede definirse como cualquier producto o preparado artificial con valor nutritivo para la dieta cuando es empleado en forma apropiada (Crampton & Harris, 1969). En base a sus características nutricionales se clasifican en las siguientes 8 clases: forrajes secos, forrajes húmedos, ensilados, energéticos,

proteicos, suplementos minerales, suplementos vitamínicos y aditivos (enzimas, hormonas, antibióticos, etc.) (National Research Council [NRC], 1978, 1996).

En relación a los forrajes, de las 756,8 miles de hectáreas de establecimientos con lechería comercial, en el período 2019 – 2020, el 37% corresponde a praderas plurianuales, 18% a verdeos y 32% a campo natural y rastrojos (Oficina de Estadísticas Agropecuarias, 2021). Las especies más utilizadas en el país son alfalfa, festuca, raigrás anual, avena, lotus, dactylis, trébol rojo, trébol blanco y achicoria (Berretta, 2003).

En general, las pasturas tienen variación en su valor nutritivo según especie, fracción de la planta y estado fenológico, además de las variaciones debido a las condiciones ambientales como suelo, fertilización y clima, y el manejo que se realice. En una revisión realizada por Trujillo y Uriarte (2015) sobre los valores nutritivos para pasturas se expone que, en términos generales, las especies templadas presentan mayor valor nutritivo respecto a las tropicales, mayor digestibilidad y menor resistencia a la aprehensión por parte del animal, resultando en mayor nivel de consumo. Las pasturas leguminosas, respecto a las gramíneas, son superiores en contenido de proteína cruda (con valores promedios 14,6 vs 22,6%), menor contenido de fibra detergente neutro (FDN) (54,9 vs 45,7%) y mayor digestibilidad de las hojas respecto a las láminas de gramíneas (55-88% y 41-81% para leguminosas y gramíneas respectivamente). A su vez, a medida que avanza la madurez tanto para leguminosas como para gramíneas, se da un decremento del valor nutritivo a causa de un incremento en el contenido de pared celular y una disminución en la digestibilidad. En las gramíneas la digestibilidad de las hojas y el contenido de proteína cruda (PC) disminuye a medida que la planta madura, mientras que en las leguminosas la digestibilidad de las hojas permanece igual y la reducción en el contenido de proteína se da en menor grado. En relación al estado fenológico y estaciones del año, particularmente en gramíneas templadas anuales en estado vegetativo, durante otoño se dan altas digestibilidades, altos contenidos de nitrógeno y bajo aporte de energía que conllevan a un desbalance en la dieta de los animales. Sin embargo, en primavera, el contenido de carbohidratos soluble aumenta y se revierte el desbalance. Hacia el verano, cuando la planta se encuentra en estado reproductivo, disminuye la digestibilidad y calidad nutricional debido al aumento en la proporción de pared celular y a la disminución en el porcentaje de

proteína cruda en láminas, vainas y tallos (Cotro Souto, 1999; Pirela, 2005; Trujillo & Uriarte, 2015).

Con el propósito de conocer las principales características de pasturas y alimentos utilizados se realiza una breve descripción de estos.

*Medicago sativa* (Alfalfa) tiene una producción media en el total de 3 años de 43.677 kg MS/ha (Instituto Nacional de Semillas [INASE] & Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria [INIA], 2021). Esta leguminosa se utiliza en asociación con gramíneas para uniformar la distribución estacional de la producción de forraje, disminuir la variabilidad interanual y disminuir el riesgo de empaste en bovinos (Romero et al., 1995). Los valores reportados por Mieres (2004), muestran promedios de 26% MS, 10% cenizas, 22% PC, 43% FDN y 60% de digestibilidad de la materia orgánica. En cuanto a especies de gramíneas perennes, según Perrachon Ariztia (2020) las más utilizadas son *Dactylis glomerata* (dactylis) y *Festuca arundinacea* (festuca), tienen una producción media en total de 3 años de 24.157 y 29.750 kg MS/ha respectivamente (INASE & INIA, 2021). Festuca se caracteriza por promedios de 18 – 24% MS, 12 – 13% cenizas, 14 – 21% PC, 39 – 59% FDN y 69 – 61% digestibilidad de MO, cada valor se corresponde a invierno y verano respectivamente, representándose los estados vegetativo y reproductivo (Mieres, 2004).

*Chichorium intybus* (achicoria) es una especie de la familia de las compuestas, con un porcentaje promedio de 11 – 27% MS, 15 – 20% PC, 33 – 43% FDN, valores para invierno y otoño respectivamente, y una digestibilidad de la MO de 56% en otoño y 69% en primavera (Mieres, 2004).

En relación con los forrajes anuales, *Avena sativa* (avena) destaca por su precocidad pudiendo ser sembrada en febrero y siendo pastoreada antes que raigrás, tiene una producción media total anual de 10.279 kg MS/ha (INASE & INIA, 2021). Se presentan la composición química para invierno y primavera respectivamente: 19 – 35% MS, 11 % cenizas, 13 – 17% PC, 50 – 51% FDN y 65 – 67% digestibilidad de MO (Mieres, 2004), y en cuanto a parámetros de degradación ruminal, presenta valores de 64, 24 y 0,012h<sup>-1</sup> para los parámetros fracción soluble, fracción insoluble potencialmente degradable y tasa de degradación ruminal (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal [FEDNA], 2016).



Los forrajes secos, comprenden a los henos y pajas, ambos poseen altas concentraciones de fibra y la calidad de estos depende de las características de digestión de la fibra.

El proceso de henificación se basa en la conservación por deshidratación de forraje en rollo o fardos con 80 – 85% MS, la calidad nutricional y la digestibilidad de los henos es inferior al forraje fresco por los cambios físicos y químicos debido al manejo y almacenado de los mismos (Cattani, 2011). Según las condiciones climáticas, las pérdidas de nutrientes pueden ser elevadas durante los procesos de cosecha, manipulación, transporte y almacenamiento que conllevan a cambios en la composición y valor nutricional del forraje, siendo la principal pérdida debido a la respiración de las plantas luego de ser cortadas. En alfalfa particularmente, las hojas se secan más rápido que los tallos por la diferencia en la relación superficie/volumen y además ocurren importantes pérdidas de hojas durante la henificación que hace variar más aún la relación hoja/tallo y por tanto la calidad en relación al forraje fresco (Bragachini et al., 1995; Bobadilla, 2003). Cozzi et al. (2005) estudiaron el heno de alfalfa y demostraron que la calidad del mismo depende del estado fenológico al momento de realizar el corte, el contenido de proteína cruda disminuyó 5% y la FDN aumentó 11% en floración total, en cambio, no hubo una variación en el consumo ni en la degradabilidad medida in situ. Sin embargo, Kalu y Fick (1983) como se cita en Basigalup (2007), estimaron una disminución promedio de 4% en la digestibilidad de la MS por cada unidad de disminución del estado de madurez según su escala, que incluye tres estados vegetativos (dos de botón floral, dos de floración y tres de semillazón). La digestibilidad también puede variar en función de la temperatura que se alcance durante el proceso de henificación y almacenado, ya que en este proceso pueden ocurrir reacciones indeseables como la reacción de Maillard. Asimismo, la temperatura ambiental también puede incidir, a mayor temperatura se da un proceso de lignificación en la planta que disminuye su digestibilidad (Bragachini et al., 1995).

En cuanto al rastrojo de cebada, el valor nutritivo de la misma depende de la proporción de hojas y tallos, el diámetro del tallo y la altura de la planta. Se caracteriza por valores medios de 72% FDN que explican una digestibilidad baja, del orden de 50% a las 72 horas de la ingesta (FEDNA, 2016).

El proceso de ensilaje se basa en el almacenamiento de forraje verde en condiciones anaeróbicas y a un pH bajo, con transformaciones bioquímicas en la masa de forraje llevadas a cabo por microorganismos epifitos (Zubizarreta et al., 2006). En nuestro país el ensilaje de maíz de planta entera tiene mucha difusión debido al esquema de rotación de cultivos y pastura y su calidad está relacionada con la composición química, contenido de grano y la digestibilidad. La composición química de un cultivar de ciclo medio, presenta valores promedio de 28% MS, 6% PC y 73% digestibilidad de la MO (Cozzolino & Fassio, 1995).

Los concentrados pueden ser energéticos o proteicos, y como ya fue mencionado anteriormente, debido a la alta disponibilidad de nutrientes en reducido volumen tienen un rol importante en la dieta de animales. Los primeros tienen menos de 20% de proteína cruda y menos de 18% de fibra cruda o menos de 35% y 22% de FDN y fibra detergente ácido (FDA) respectivamente, ejemplo de ellos son granos de cereales y subproductos agro industriales. Otros alimentos que integran los energéticos son los subproductos de la industria molinera como el afrechillo de arroz y trigo, generalmente está compuesto por las cubiertas externas del grano, germen y parte del endosperma. En el caso del afrechillo de trigo, en general, tienen niveles medios de energía de 2,2 a 2,6 Mcal de EM/kg MS, un contenido proteico de 13,9%, contenido de fibra alrededor de 25 a 35% FDN en base seca y una digestibilidad promedio de 70 a 75% (Mieres, 2004).

Los proteicos tienen 20% o más de proteína cruda en base seca. Por ejemplo: burlandas, harina de soja y expeller de girasol, entre otros. En el país las harinas de oleaginosas son la fuente comercial más importante, proceden de harinas y tortas de soja, girasol y subproductos de la industria del maíz como gluten meal y gluten feed, entre otros. La harina de soja es considerada la mejor fuente de proteína de origen vegetal, con un contenido de proteína cruda promedio de 50% (Mieres, 2004).

En el último grupo de clasificación de los alimentos se encuentran los aditivos. Estos productos son utilizados con el fin de promover la calidad de los alimentos o promover el rendimiento de los animales y su salud. Los ionóforos, como la monensina, son un grupo muy difundido comercialmente, pero la problemática actual sobre su uso ha determinado que la investigación busque nuevas alternativas, como los aditivos naturales. Dentro de estos se pueden encontrar levaduras, hongos y ácidos orgánicos que estimulan el crecimiento

microbiano, y los anticuerpos específicos para microorganismos ruminales y los extractos de plantas que lo inhiben. Por ser los aditivos un tema de especial interés en esta investigación, se desarrolla más intensamente en el punto 2.3 de la revisión bibliográfica.

## **2.2 Metabolismo Ruminal**

Según Hungate (1984) como se cita en Yokoyama y Johnson (1993), la relación entre el rumiante y los microorganismos representa un modelo cooperativo, dado que el primero ofrece en el rumen las condiciones fisiológicas óptimas para el desarrollo de éstos y estos últimos proporcionan los productos finales como fuente de energía y proteína a través de la biosíntesis de proteína y fermentación de la fibra. La fisiología del animal debe mantener un ambiente que permita el crecimiento, multiplicación y actividad de dichas poblaciones para que las mismas puedan llevar a cabo la fermentación de los alimentos.

La flora microbiana del rumen se compone de bacterias, protozoos, hongos y virus. En términos generales, los microorganismos que predominan en el rumen son anaerobios obligados y bacterias anaerobias facultativas, siendo estas las más vulnerables a las condiciones fisicoquímicas y adaptados a una temperatura de entre 38 – 42°C y pH de 5,5 – 7,2 (Yokoyama & Johnson, 1993; McDonald, 2006), con fluctuaciones en los rangos óptimos, dependiendo de la especie de microorganismo. Valores entre 6 – 6,5 permiten el óptimo crecimiento y actividad de bacterias celulolíticas y metanogénicas, mientras que pH menores a 6 inhiben estas poblaciones (Van Lier & Regueiro, 2008). El sistema animal a través de la generación de saliva permite regular este parámetro ya que este posee capacidad buffer y en función del tipo y nivel de consumo de alimentos, producción y absorción de ácidos grasos de cadena corta, nivel NH<sub>3</sub> e intercambio de bicarbonatos y fosfatos, se mantiene constante. Las bacterias pueden clasificarse según el sustrato que atacan y el producto final que producen, es así que se pueden identificar bacterias celulíticas, hemicelulolíticas, amilolíticas, aquellas que utilizan azúcares simples o ácidos intermedios, proteolíticas, lipolíticas y productoras de metano (Yokoyama & Johnson, 1993). En cambio, los hongos no dominan en el rumen dada su baja tasa de multiplicación, pero su población aumenta con dietas fibrosas y con alta permanencia en el rumen. Por último, los protozoarios representan la microfauna ruminal y son muy sensibles a los cambios en la dieta,

aumentando rápidamente la población ante aumentos de azúcares y almidones de alta digestibilidad. A partir de esto es que es posible modificar la composición de la flora microbiana con la dieta ofrecida (Yokoyama & Johnson, 1993; McDonald, 2006).

Otros parámetros que mantienen constantes las condiciones del rumen son: el potencial redox y la presión osmótica, con valores de  $-350\text{mV}$  y  $260\text{-}340\text{ mOs}$  moles/L de líquido ruminal respectivamente.

Para que el proceso de fermentación de los alimentos y nutrientes contenidos en ellos por parte de los microorganismos se lleve a cabo, es necesario reducir el tamaño de partícula del alimento a través de la masticación y remasticación en el proceso de rumia, permitiendo una superficie de contacto que sea adecuada para que suceda el acoplamiento y acción del microorganismo sobre el sustrato en el rumen. Como resultado se rompe la membrana celular permitiendo la solubilización del contenido celular primeramente y el acceso de las enzimas microbianas para la posterior utilización de la pared celular y demás componentes de la célula.

Como productos finales de la fermentación de los esqueletos carbonados provenientes de carbohidratos y proteínas, se obtienen ácidos grasos volátiles (AGV) absorbidos y/o metabolizados por las paredes del rumen, dióxido de carbono, metano y  $\text{NH}_3$ . Este último es utilizado por los microorganismos para su propio crecimiento y desarrollo, lo que representa una fuente de proteína de alto valor biológico para el hospedero, una vez que estos abandonan el rumen y son digeridos y absorbidos en el intestino delgado. Cuando la proteína de la dieta es excesiva, se da un desequilibrio entre la concentración de  $\text{NH}_3$  en rumen, la energía y esqueletos carbonados que permiten la síntesis de proteína microbiana. Ante esta situación, aumenta la concentración de  $\text{NH}_3$  en rumen, se absorbe y transporta al hígado, donde es transformado en urea para su posterior excreción en la orina; proceso no deseado dado que representa un aumento de los requerimientos energéticos y contaminación del ambiente. Esta es una situación habitual en animales alimentados frecuentemente con pasturas jóvenes y de buena calidad (Correa & Cuéllar, 2004). En cambio, ante bajos niveles de nitrógeno en la dieta, se da un reciclaje del mismo a través de la saliva o directamente por las paredes del rumen como NNP (Van Soest, 1994; Calsamiglia et al., 2005). Las concentraciones de amoníaco ruminal varían según el tiempo transcurrido post alimentación, siendo

máximas 3-5 horas post consumo y volviéndose tóxico con niveles superiores a 100 mg/dL (Owens & Zinn, 1993). Pérez Ruchel (2006) reporta que el óptimo crecimiento microbiano se obtiene con concentraciones de 5-20 mg/dL de  $\text{NH}_3$ .

El proceso de fermentación ruminal tiene ineficiencias en cuanto a la retención de energía y proteína. La metanogénesis provoca pérdidas de 2 – 12% de la energía bruta consumida (Johnson et al., 2000; Anderson et al., 2003; Nkrumah et al., 2006; como se cita en Galindo y Marrero, 2005). Mientras que la proteólisis de la proteína consumida y la desaminación disminuyen la eficiencia de uso del nitrógeno para el crecimiento microbiano y por ende el aporte de proteína microbiana (Owens & Zinn, 1993).

Los AGV son los principales productos finales de la fermentación anaerobia de carbohidratos y la principal fuente de energía para los procesos metabólicos de los rumiantes. Acético, propiónico y butírico conforman el 95% de los ácidos producidos en el rumen y cubren entre el 60 – 80% de los requerimientos energéticos del rumiante (Temez, 2022). La producción de los mismos depende del nivel, frecuencia y composición de la dieta consumida, actividad y tipo de microorganismos y del pH ruminal, así como también de condiciones del alimento como tamaño de picado, grado de madurez y tipo de forraje. En términos generales, la producción de AGV se ve reducida ante dietas basadas en forrajes, aumentando ante incrementos de concentrado y proteína rápidamente fermentable en la dieta. La relación entre los tres principales AGV también se ve afectada ante diferentes composiciones de la dieta, aumentando la proporción de acético ante dietas basadas en forrajes en detrimento de los otros dos ácidos. A pesar de las variaciones en las proporciones, se pueden establecer rangos de proporciones molares generales en las que se encuentran dichos ácidos: 60 – 75%, 15 – 19% y 8 – 16% de acético, propiónico y butírico respectivamente (Zavaleta, 1998). Por lo contrario, dietas con mayor proporción de concentrados incrementan la concentración de ácido propiónico. Este conocimiento es de gran importancia productiva dado que aumentos en el consumo de concentrados determinan un aumento en la producción de AGV totales y modifican la relación acético:propiónico, a favor de este último. Esto determina un aumento de uno de los principales precursores de glucosa mediante gluconeogénesis, que al llegar a la glándula mamaria favorece la síntesis de lactosa y consecuentemente determina un aumento en la producción en litros de leche. Una proporción de este AGV entra en el ciclo de Krebs como succinil-CoA,

siendo oxidado hasta CO<sub>2</sub> y adenosín trifosfato (ATP). Este último producto es utilizado por el animal para cubrir requerimientos de energía. Además, el ácido propiónico contribuye en la producción de NADPH, a través de la vía de las pentosas, necesario para la producción de ácidos grasos (Zavaleta, 1998). Dietas con mayor proporción de forrajes por el contrario permiten una mayor producción de ácido acético y butírico, principales precursores de ácidos grasos corporales y de la leche.

Acético, propiónico y butírico son los tres AGV principales, producto de la degradación de los carbohidratos, pero en menor proporción también se producen otros AGV de cadena corta ramificada como valerato, isobutirato e isovalerato. Son producidos por desaminación y descarboxilación de aminoácidos de cadena ramificada por la microflora del rumen (Roman-Garcia et al., 2021). Estos ácidos grasos tienen características específicas para ser utilizados por *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, y *Ruminococcus flavefaciens*, bacterias críticas en la degradación de celulosa y hemicelulosa (Roman-Garcia et al., 2021).

### ***2.2.1 Técnicas para el Estudio del Metabolismo Ruminal.***

Los rumiantes pueden aprovechar los nutrientes provenientes del forraje dado que poseen microorganismos ruminales que lo hacen posible. Estos alimentos se caracterizan por poseer una alta proporción de carbohidratos estructurales. La calidad de estos y las condiciones del medio ambiente ruminal pueden limitar la utilización digestiva de los alimentos y la performance animal. Esto explica el interés del estudio del metabolismo ruminal y la eficiencia de utilización de los alimentos por parte del animal.

La degradación de dichos alimentos es resultado de la fermentación, llevada a cabo por diferentes microorganismos que habitan el rumen y que a su vez dependen de las características ambientales que se desarrollan dentro de éste, como ya se mencionó en el punto 2.2 de esta revisión. Es por esto que se han desarrollado diferentes métodos para determinar la digestibilidad y degradabilidad de los alimentos y estudios de los parámetros ruminales que favorecen o no a determinadas poblaciones microbianas y por ende explican este proceso.

La digestibilidad es un aspecto cuantitativo del valor nutritivo del alimento y las técnicas que se utilicen para determinarla está sujeta al objetivo del

investigador, recursos disponibles y costos que la misma conlleva. El valor real del alimento, para aportar nutrientes al animal, sólo se determinará después de tener en cuenta las pérdidas inevitables que se dan en la digestión, absorción y metabolismo (McDonald, 2006). Bajo este concepto, el mismo autor define la digestibilidad como la diferencia entre la cantidad de nutriente consumido y la cantidad de este nutriente en heces, con respecto a la cantidad de nutriente consumido. En este concepto se asume que la cantidad de nutrientes que no fue excretado en heces fue absorbida por el animal. A la vez dicho supuesto es puesto en discusión debido a que se sobrestima la digestibilidad dada la producción de metano, que no es absorbido; y se subestima la misma al no tener en cuenta que las heces no solo están formadas por restos de alimento. De lo expuesto anteriormente es que mediante esta técnica se puede definir lo que se conoce como digestibilidad aparente. Al igual que el método descrito anteriormente, otra técnica *in vivo*, es decir mediciones realizadas directamente en el animal, es el uso de marcadores, sustancias indigestibles que permiten determinar la digestibilidad ante el aumento o no de la concentración de dicha sustancia en la materia seca de heces. Dicho método es utilizado, por ejemplo, en condiciones de pastoreo, situaciones en las que el control de la ingestión no es posible.

Otra técnica que permite estudiar la digestibilidad, degradabilidad y los procesos a los que el alimento es sometido dentro del animal, es la técnica *in situ*, realizada en el animal, pero específicamente en el lugar que se quiera estudiar. La misma será desarrollada más adelante en esta revisión.

Otra forma de obtener esta información es a través de prácticas llevadas a cabo en el laboratorio, denominadas técnicas *in vitro*, en las cuales se estima la digestibilidad verdadera del alimento. En las mismas se intenta reproducir procesos digestivos llevados a cabo en el animal. Sin embargo, el alimento no sufre el proceso de descomposición mecánica por masticación y rumia. La digestibilidad de los alimentos obtenida mediante esta técnica de laboratorio tiene una alta correlación con los obtenidos por técnicas *in vivo* (Giraldo et al., 2007).

Típicamente la estimación de digestibilidad *in vitro* e *in vivo* se realiza a las 48 horas de incubación (McDonald, 2006).

### 2.2.1.1 Digestibilidad y Cinética de Degradación *in situ*.

La técnica de estimación de la digestibilidad *in situ* o *in sacco*, es una técnica *in vivo*, es decir se realiza directamente en el animal. Consiste en la suspensión de bolsas porosas sintéticas que contengan el alimento en estudio, en el rumen durante diferentes tiempos de incubación. De esta forma se obtiene una estimación rápida de la tasa y extensión de la degradación del alimento en el rumen, con solo conocer la diferencia de peso de la muestra.

Esta técnica tiene algunas limitaciones planteadas por Ørskov et al. (1980). La primera es que las muestras de alimento no son expuestas a la rumia ni masticación por lo que no sufre una descomposición mecánica, como si lo hiciera en situaciones en el que el alimento es ingerido. También se debe tener en cuenta que, en condiciones usuales una vez que el alimento alcanza un tamaño determinado sale del rumen y no permanece allí, como si lo hace en esta determinación. Por último, se debe tener en cuenta que se obtiene la reducción del tamaño del material en un determinado tiempo de incubación y no la descomposición completa del mismo en compuestos químicos. De esta manera se asume que la cantidad de muestra desaparecida es igual a la cantidad de muestra degradada en cierto periodo de tiempo.

Los resultados de degradabilidad de los alimentos en rumen, obtenidos con la técnica de la bolsa de nylon, pueden ser afectados por diferentes factores que se describirán a continuación según la publicación realizada por Villalobos González et al. (2000) y Ørskov et al. (1980). La porosidad de la bolsa es uno de los factores que debe considerarse primeramente, ya que determina la posibilidad de perder alimento en el rumen, entrada de contenido ruminal y la entrada y salida de líquido ruminal. Teniendo en cuenta el flujo microbial y de líquidos, entre 40 y 60 micras es adecuado, pero debe ser corroborado de acuerdo con el tamaño de partícula del alimento, naturaleza y tipo de este.

En cuanto al alimento es importante que el tamaño de partícula sea lo más similar posible a situaciones donde se da masticación y rumia del mismo. En el caso de forrajes se considera adecuado que se someta a molienda de 5 mm. Teniendo en cuenta el tiempo de incubación y que se debe lograr un adecuado mezclado del alimento con el líquido ruminal es que se define el tamaño de muestra. Se debe considerar que el residuo de muestra debe ser suficiente para realizar análisis



posteriores y que con una relación 10-20 mg/cm<sup>2</sup> de bolsa, se logra un adecuado mezclado del líquido ruminal con la mayoría de los forrajes y concentrados (Villalobos González et al., 2000).

Para poder estimar la digestibilidad y degradabilidad de un alimento, es importante que el animal reciba una dieta lo más similar posible a la cual se pretende estudiar. En casos donde se estudia más de un alimento a la misma vez, el animal debe recibir una dieta donde se incluya variedad de ingredientes con el fin de lograr una población microbiana diversa que no sesgue la tasa y el grado de digestión del alimento (Elizondo-Salazar & Monge, 2020).

Ørskov et al. (1980) también resaltan que se debe de tomar en cuenta la posición de las bolsas en el rumen. Rodríguez (1986) como se cita en Ørskov et al. (1980) sugirió que una cuerda de 50 cm logra un adecuado movimiento de las bolsas dentro del rumen, minimizando las variaciones de los resultados respecto a la posición de las bolsas. Dado que además de conocer la digestibilidad del alimento, es de interés conocer su tasa de degradación, un aspecto de gran relevancia son los tiempos de incubación, que dependen directamente del tipo de alimento incubado. Concentrados, forrajes de buena y mala calidad requieren de 36, 60 y hasta 72 horas respectivamente, para poder alcanzar la degradación potencial. No obstante, los tiempos de incubación son definidos por el investigador. Un aspecto que debe de ser tenido en cuenta es el número de repeticiones por tiempo de incubación. En base a experimentos realizados, Ørskov et al. (1980) establecieron que con dos bolsas por tiempo de incubación es suficiente dado la escasa variación en los resultados. En vacas fistuladas, incubando dos bolsas por vaca en dos vacas se logra un error estándar de 0,8 – 1,0% para la digestibilidad *in situ* de la MS y FDN respectivamente. Utilizando cuatro vacas el error en la estimación de esos parámetros se reduce a 0,3% (Romero, 1990). En estudios de digestión *in situ* se recomienda la utilización de tres animales, en dos periodos con una bolsa por muestra (González et al., 1990).

La degradabilidad de un alimento en el rumen posee un valor relativo, ya que depende de las condiciones de evaluación. La velocidad con la se utiliza está sujeta a la solubilidad y estructura de las moléculas que determinan el ataque de los microorganismos. A la vez puede verse afectada por el tamaño de la partícula, relación forraje: concentrado de la dieta, consumo y pH del rumen (Mirabá Rosales,

2015). Conocer la cinética de degradación de los alimentos es importante para poder conocer y manipular los procesos digestivos.

Diversos autores han propuesto diferentes modelos matemáticos para describir dicha cinética de degradación y de esta manera tener conocimiento sobre los parámetros que describen la naturaleza intrínseca de los alimentos y las interacciones de los nutrientes que limitan su digestión. Las fracciones solubles son la fracción fermentada en las primeras horas de digestión, pero estos constituyen sólo una parte del material que potencialmente puede ser degradado. Con el transcurso del tiempo de incubación del alimento en el rumen y a medida que el proceso fermentativo avanza se van estableciendo diferentes tasas de degradación, dependiendo del alimento y las condiciones del ambiente ruminal.

Trujillo (2006) y Enríquez Espinoza y Huamán Vilca (2022) estudiaron la cinética de degradación de la MS y FDN del heno de alfalfa, en ovejas y cabras respectivamente, obteniendo valores de los parámetros de la fracción soluble, insoluble, potencialmente degradable y de la tasa de degradación considerablemente diferentes a pesar de que la composición química de los materiales utilizados fue similares a los valores de referencia consultados por dichos autores. Jalilvand et al. (2008) también llevaron el estudio de la cinética de degradación del heno de alfalfa tratada con enzimas fibrolíticas, en ovejas, obteniendo que el 39% de la MS del heno es insoluble potencialmente degradable, porcentaje similar al reportado por Trujillo (2006), (44%), pero con grandes diferencias en la fracción soluble (28% vs 40%) y la tasa de degradación ( $0,042 \text{ h}^{-1}$  vs  $0,0687 \text{ h}^{-1}$ ).

### **2.3 Uso de Aditivos para la Modulación de la Fermentación Ruminal**

El uso de aditivos para la modulación de la fermentación ruminal es ampliamente reconocido, se pueden obtener nuevos beneficios que permitan levantar algunas de las ineficiencias producidas en la simbiosis ruminal y de este modo obtener beneficios a nivel productivo (Calsamiglia et al., 2005).

Un adecuado proceso de glucólisis, el cual finalmente resulta en producción de energía para los microorganismos del rumen, requiere de una adecuada velocidad de reducción del NAD a  $\text{NADH}_2$ , como forma de mantener la formación y utilización de hidrógenos metabólicos equilibrada. Dichos hidrógenos también son retenidos por los ácidos grasos insaturados mediante el proceso de

biohidrogenación, los AGV y el metano. La formación de este último gas o la liberación de los hidrógenos al medio ambiente ruminal representan una pérdida de energía para el animal.

Otra ineficiencia que puede ser reducida mediante la modulación ruminal son las pérdidas de nitrógeno consecuencia de alta degradación proteica. Estudios demuestran que el control de bacterias desaminadoras puede ser una alternativa viable para permitir una velocidad de producción de  $\text{NH}_3$  adecuada a la velocidad de utilización (Calsamiglia et al., 2005).

Los objetivos que se deben plantear los investigadores al intentar modular la fermentación ruminal son aumentar la degradabilidad de la fibra y el almidón aumentando la producción de AGV, estimular la producción de ácido propiónico (dado que posee la mayor capacidad de retención de  $\text{H}_2$ , en comparación a los otros dos ácidos grasos de cadena corta de relevancia energética y metabólica para el rumiante), inhibir la producción de metano (disminuir pérdidas energéticas) y controlar la concentración de lactato y con ella el pH ruminal (Calsamiglia et al., 2005). Desde hace muchos años, estas ineficiencias del proceso de fermentación ruminal han sido reducidas por la utilización de antibióticos ionóforos en la dieta de los rumiantes, pero actualmente, y desde hace unos años, los antibióticos sufren problemas de aceptación social dado el surgimiento de cepas bacterianas resistentes a los mismos y la aparición de residuos en los alimentos. Es por esta razón que actualmente y desde hace años se investigan y utilizan nuevas alternativas como los extractos de plantas, levaduras y ácidos orgánicos, entre otras opciones de origen natural.

### ***2.3.1 Efecto de los Antibióticos como Aditivo en la Dieta.***

Los antibióticos ionóforos son estructuras lineales con grupos funcionales de oxígeno, carboxilo, hidroxilo y amino. Dentro de una gran variedad de ionóforos, los carboxílicos, como monensina, son los que se utilizan con mayor frecuencia en la alimentación de rumiantes (Pinos Rodríguez & González Muñoz, 2000). Estos compuestos poseen la habilidad de introducirse en las membranas celulares, actuando como transportadores de membranas interrumpiendo el intercambio iónico y consecuentemente modificando el gradiente iónico. Esta alteración dentro

de la célula resulta en un cambio de concentraciones intracelulares, dado la reducción de  $K^+$  y aumento de  $Na^+$  e  $H^+$ , provocando consecuentemente reducción del pH y pérdida del gradiente químico transmembrana. Como forma de mantener el gradiente y equilibrio de pH, las bacterias inician un bombeo activo de protones al espacio intercelular. Dicha reacción tiene un costo energético elevado que limita el crecimiento y metabolismo, que ocasionalmente determina la muerte de estos microorganismos.

Dada la naturaleza hidrofóbica de los ionóforos, estos antibióticos causan un mayor efecto sobre bacterias gram positivas que sobre gram negativas. Las primeras, además de no poseer membrana externa, lo que las hace más susceptibles a la acción de estos compuestos lipofílicos, también dependen de la fosforilación de sustratos para la generación de energía como ATP; por lo que ante la alteración de este proceso la energía obtenida por la fuerza motriz de protones, que naturalmente es utilizada para el crecimiento y metabolismo celular, es empleada en contrarrestar esta disfunción, determinando la reducción de estos procesos como ya fue mencionado. En ciertas condiciones experimentales, también se han observado efectos de estos antibióticos sobre protozoarios y hongos ruminales, aunque Benchaar et al. (2006) no detectan efecto de la monensina sobre el conteo de protozoarios medido en rumen de vacas Holstein estabuladas.

Los ionóforos, en especial uno de gran relevancia en este trabajo: monensina, genera diversos efectos sobre los parámetros ruminales y la degradación de los nutrientes. Según Pinos Rodríguez y González Muñoz (2000), la selección biológica de microorganismos generada por la acción de estos compuestos ocasiona cambios significativos en la proporción de AGV, resultando en mayor proporción de propionato y succinato y menor concentración de acetato, butirato y metano; sin embargo, Benchaar (2016) y Geraci et al. (2012) reportan que el uso de monensina no genera efectos sobre la producción de AGV totales, ni sobre las proporciones molares de los mismos. En cuanto al pH ruminal, la inhibición de bacterias gram positivas determina inhibición de la mayoría de las bacterias productoras de lactato, lo cual permite la regulación de este parámetro ruminal y control de la acidosis láctica (Pinos Rodríguez & González Muñoz, 2000). Observaciones sobre la producción de metano reflejan que la acción de monensina sobre este gas es indirecta ya que el efecto directo es generado sobre las bacterias productoras de  $H^+$ , necesario para la reducción de  $CO_2$  y

consecuentemente producción de metano (Calsamiglia et al., 2005), pero experimentalmente Benchaar (2016) no observó modificaciones en la producción de metano ante el uso de este ionóforos. El proceso por el cual la monensina afecta negativamente la concentración de  $\text{NH}_3$  no es del todo claro, dado que algunos autores lo relacionan a la reducción de la metanogénesis que, determina un descenso en la tasa de reducción del  $\text{NAD}^+$ , aspecto negativo para la desaminación de aminoácidos y otros lo asocian a una reducción de la población de bacterias hiperamonificantes, productoras de  $\text{NH}_3$ . Benchaar et al. (2006) no reportan efectos del uso de monensina sobre la retención de nitrógeno en vacas lecheras, a pesar de que en ese mismo estudio se reportan mejoras en la digestibilidad de la proteína cruda.

En cuanto a la digestibilidad de los diferentes nutrientes, en base a diferentes autores, Pinos Rodríguez y González Muñoz (2000) exponen que los ionóforos, principalmente los carboxílicos, no cambian la digestibilidad ruminal de carbohidratos estructurales como la FDN ni la FDA. Los mismos resultados exponen Benchaar et al. (2006) y Fierros Rodríguez (2019) donde no encuentran un efecto significativo de la monensina sobre la digestibilidad aparente de FDN, así como Benchaar (2016), tampoco detectan dicho efecto sobre la digestibilidad *in situ* de dicha fracción. Por el contrario, Plaizier et al. (2000) reporta aumentos en la digestibilidad de FDN y FDA en el preparto de vacas lecheras. Benchaar et al. (2006) y Fierros Rodríguez (2019) reportan que no se generan efectos del uso de monensina sobre la digestibilidad del almidón. Respecto a la cinética de degradación, Benchaar et al. (2006) observaron que el uso de monensina en la dieta de vacas Holstein determinó una disminución de la fracción potencialmente degradable y un aumento en la fracción soluble y en la tasa de degradación del grano de maíz. Resultados similares fueron reportados por Hernández Martínez et al. (2017), tras evaluar el uso de monensina, levaduras y sustratos gluconeogénicos sobre la cinética de degradación de distintos suplementos, hasta doce horas post ingesta y encontraron que el uso de monensina determinaba aumento de aproximadamente 1,5% en la tasa de degradación. Los efectos de los antibióticos sobre la digestibilidad, degradabilidad, concentraciones de  $\text{NH}_3$ , AGV, pH y protozoarios, en los rumiantes son diversos y variables, dependiendo del tipo de animal, dietas, etapa de lactación, número de partos y condición corporal.

### 2.3.2 Alternativas al Uso de Antibióticos.

La modulación ruminal puede ser realizada por diferentes alternativas: aditivos microbianos y ácidos orgánicos que estimulan el crecimiento microbiano y los extractos de plantas y anticuerpos específicos que inhiben el crecimiento de los microorganismos ruminales. Los aditivos microbianos son levaduras vivas, cultivos de levaduras y extracto del hongo *Aspergillus oryzae*. A pesar de que los datos publicados sobre la acción de este tipo de aditivos son muy variables, dado que depende del producto utilizado lo cual determina el efecto en el animal, diversos autores plantean que las levaduras por su capacidad respiratoria y el aumento de pH benefician la actividad de bacterias fibrolíticas, favoreciendo la degradabilidad de la fibra y aumentando el consumo, resultando en aumentos en la producción; sin embargo estos efectos no provocaron una mejora en la utilización de los alimento (Acedo & González, 1998; Calsamiglia et al., 2005; Elizalde et al., 2008; Suárez-Machín & Guevara-Rodríguez, 2017). Algo similar genera el uso del *Aspergillus Oryzae*, el cual también aumenta la degradabilidad de la fibra al abrir caminos estratégicos en las paredes celulares para permitir el acceso de las bacterias que se encargan de dicho proceso de degradación (Acedo & González, 1998; Calsamiglia et al., 2005; Casas Rodríguez, 2018).

También los ácidos orgánicos tales como aspártico, málico y fumárico, estimulan las poblaciones microbianas de bacterias que utilizan como sustrato el ácido láctico y producen propiónico, de esta manera se infiere que producen cambios en el pH ruminal, producción de metano y AGV. A pesar de esto, la información sobre los efectos de estos compuestos sobre la producción animal aún no es muy extensa. A diferencia de los aditivos microbianos y ácidos orgánicos, los anticuerpos específicos para microorganismos ruminales inhiben el crecimiento de estos. El uso de estos ha generado resultados alentadores que abren líneas de investigación a esta alternativa.

Los metabolitos secundarios de plantas denominados extractos de plantas, a pesar de la diversidad de su naturaleza, se ha comprobado que modifican la actividad microbiana, con resultados muy variables, dependiendo de la dieta, del compuesto que se utilice, su origen geográfico, la concentración, las condiciones del cultivo y el método de procesamiento del mismo. Dentro de la gran cantidad de metabolitos secundarios que producen las plantas se ha generado información sobre

los efectos generados por cuatro grupos mayoritarios: saponinas, taninos, aceites esenciales y organosulfurados (Martínez Fernández, 2013).

### **2.3.2.1 Saponinas.**

Alfalfa, especie forrajera muy conocida en nuestro país, así como otras menos conocidas como Quillajaceae y *Yucca shidigera*, entre otras, son portadoras de saponinas. Dichos glucósidos pueden ser extraídos de órganos vegetativos y reproductivos de estas especies. De acuerdo con la bibliografía revisada, estos compuestos producen varios efectos, pero de pequeñas dimensiones y muy variables, dada la variabilidad de dosis y tipos aplicados. Varios autores que han estudiado el efecto de estos compuestos coinciden en que su mecanismo de acción es la generación de inestabilidad celular, causando reducción en la población de protozoarios, lo que reduce la degradabilidad de la proteína en el rumen, aumentando el flujo duodenal de aminoácidos y por ende su disponibilidad para cubrir las necesidades del animal (Calsamiglia et al., 2005).

### **2.3.2.2 Taninos.**

El término “tanino” no refiere a un solo compuesto y estructura, refiere a un grupo de sustancias similares de naturaleza vegetal, que a pesar de tener característica en común son diferentes en estructura y composición entre sí (Nogueira, 2011). Químicamente son compuestos polifenólicos capaces de formar complejos con las proteínas, evitando la degradación de las mismas en el rumen, aumentando el flujo hacia el abomaso e intestino delgado, donde el complejo tanino- proteína deja de ser estable y por ende se da una mayor utilización de las proteínas por parte del animal (Carro et al., 2014). Este efecto, al igual que la reducción en producción de metano resultan beneficiosos, pero la acción antimicrobiana de estos compuestos también puede resultar contraproducente dado que la reducción de crecimiento bacteriano, principalmente de bacterias celulolíticas, puede disminuir la digestibilidad de la fibra. Al igual que las saponinas, los efectos producidos son variados y contradictorios, principalmente a causa de las dosis utilizadas. Concentraciones moderadas son beneficiosas pero altas concentraciones afectan de forma negativa el comportamiento productivo, reduciendo el consumo de materia seca por parte de los animales (Volpi-Lagreca et

al., 2013). Además, se debe de tener especial cuidado dado que pueden resultar tóxicos para los animales ante altos niveles de consumo.

El efecto de los taninos sobre las proteínas fue constatando por Nogueira (2011) al evaluar el efecto de cuatro dosis del tanino comercial ByPro® de *Schinopsis balansae* (quebracho) y *Castanea dentata* (castaño) y observar una disminución lineal en la cantidad de NH<sub>3</sub> con aumentos en la concentración de taninos, sin efectuar cambios en el pH ruminal. Rufino et al. (2021) en la revisión de numerosos experimentos concluyen que el efecto generado por estos compuestos es muy dependiente de la dosis, estructura química del tanino y la especie de rumiante en la que sea empleado.

### **2.3.2.3 Compuestos Organosulfurados.**

Especies pertenecientes a las familias *Alliaceae* y *Cruciferae*, como el ajo, cebolla y coliflor respectivamente poseen este tipo de extractos en los cuales su grupo sulfuro es activo ante un amplio espectro de microorganismos (Martínez Fernández, 2013). Los resultados obtenidos en diferentes experimentos, *in vivo* e *in vitro*, sobre estos compuestos son muy contradictorios principalmente debido al origen y concentraciones de estos, pero en la mayoría de estos trabajos se resalta que los mismos actúan sobre las arqueas metanogénicas, inhibiendo la principal enzima de sus membranas y por ende inhibiendo la metanogénesis. Un aspecto no menor es que estas contradicciones también son atribuidas a la posible adaptación de los microorganismos ruminales a la presencia de estos aditivos (Martínez Fernández, 2013).

### **2.3.2.4 Aceites Esenciales.**

Se denomina aceites esenciales a la mezcla de metabolitos secundarios de las diversas plantas y diferentes órganos de estas, obtenidos principalmente por destilación a vapor (Calsamiglia et al., 2007; Benchaar et al., 2006; Barrientos Hirschfeld, 2013). Estos metabolitos se caracterizan, al igual que los demás extractos de plantas ya mencionados, por su gran diversidad de composición, naturaleza y actividad. Los compuestos más importantes se agrupan en dos grupos químicos: fenilpropanoides y terpenoides. El primer grupo está compuesto de tres carbonos unidos a un anillo aromático de seis carbonos y el segundo grupo contiene cinco átomos de carbono y posee la mayor cantidad de



compuestos y los más diversos (Calsamiglia et al., 2007; Barrientos Hitschfeld, 2013; Fierros Rodríguez, 2019).

Gracias a su naturaleza hidrofóbica que les permite interactuar con la membrana celular, estos compuestos presentan similar modo de acción que los ionóforos. Provocan cambios en la población microbiana del rumen y modifican el proceso de fermentación ruminal. Al igual que ante los antibióticos, las bacterias gram positivas se ven más afectadas ante su acción. Hay casos en los que el bajo peso molecular de los compuestos los hace menos selectivos entre bacterias gram negativas y gram positivas, pudiendo actuar sin dificultar en los dos grupos a la vez. Timol es un ejemplo de estos compuestos particulares (Calsamiglia et al., 2007; Martínez Fernández, 2013; Barrientos Hitschfeld, 2013).

Existen numerosas publicaciones sobre el efecto de estos compuestos, pero los resultados obtenidos son muy variables, dependientes de la especie vegetal utilizada, dosis en la que se utiliza dicho compuesto, combinación o no de los mismos, especie y/o raza animal e incluso estado fisiológico del animal en el que se investiga, entre otras variables. Son de importancia para este trabajo el aceite de ajo (cinamaldehído), de menta (*Mentha piperita*) y de cúrcuma (curcuminoides). Los estudios *in sacco* realizados por Tager y Krause (2011), Fierros Rodríguez (2019) y Benchaar (2016) no obtuvieron efecto del cinamaldehído en diferentes mezclas y dosis, sobre ninguna de las variables analizadas. Sin embargo, aumento del consumo de materia seca, mayor fermentación de la materia orgánica y menor digestibilidad de los compuestos nitrogenados fueron reportados por Yang et al. (2010) ante la investigación del efecto de diferentes dosis de cinamaldehído. Este autor concluye que los efectos de este extracto de planta sobre algunas de las variables medidas depende de la dosis. Geraci et al. (2012), en un experimento donde evaluaron el efecto del uso de una mezcla de cinamaldehído, eugenol y oleoresina de *Capsicum* vs monensina, en novillos Aberdeen Angus, no encuentra efectos de los aditivos sobre el consumo de MS ni sobre la producción de AGV de cadena corta, pero si obtuvo una reducción de hasta el 50%, en la producción de  $\text{NH}_3$  y una menor producción de isovalérico atribuida a una menor desaminación de aminoácidos, ante el uso de aceites esenciales. En dicha oportunidad este autor reporta una reducción del 50% de la producción de nitrógeno amoniacal ante el uso de aceites esenciales, relativo al uso de monensina. Agarwal et al. (2009) realizaron un experimento *in vitro* con tres dosis incrementales de aceite de menta (0; 0,33; 1,0 y

2,0 µl/mL de líquido ruminal de búfalo) y reportaron que se detectó una reducción en la producción de AGV y aumentos en la relación acético: propiónico, a dosis altas.

En la bibliografía consultada no se reportan datos experimentales sobre los efectos del aceite de cúrcuma en la alimentación de rumiantes. Por el contrario, si existen numerosos reportes de los efectos generados por otros o combinación de otros compuestos, sobre las variables de interés en esta investigación. Es así que Fernández et al. (1997) evaluaron el efecto de dos dosis de una mezcla comercial de aceites esenciales y especias (CRINA®) y observaron respuesta negativa de la digestibilidad de MS y efectos en el pH ruminal, en función de la dosis, en diferentes alimentos evaluados. Castillejos et al. (2005) no encontraron efecto de una mezcla de timol, limoneno y guayacol sobre la concentración de nitrógeno amoniacal, pero sí variaciones en las proporciones molares de los principales AGV, obteniendo un aumento de la relación acético: propiónico, por aumento en la concentración de acético, en detrimento de propiónico y butírico. Benchaar et al. (2006) evaluaron el efecto de una mezcla de aceites esenciales (timol, eugenol, vainillina y limoneno) y monensina sobre vacas Holstein canuladas y estabuladas, obteniendo como resultado un aumento en la digestibilidad del almidón y del pH ruminal, pero no reportan cambios en los demás parámetros evaluados. Por su parte, Tekippe et al. (2011) evaluaron el uso de *Origanum vulgare* en vacas lecheras Holstein estabuladas, observando que dicha sustancia genera mejoras en la producción y composición de la leche, reducción en la generación de metano a las 8 horas post ingesta y un aumento en las concentraciones de NH<sub>3</sub>, pero no se modifican parámetros ruminales como pH, AGV, así como tampoco las poblaciones de protozoarios, consumo de materia seca ni su digestibilidad. Otro aporte a la investigación es realizado por Rueda Camero (2019), cuando evalúa el efecto del aceite de ajo y orégano en ovejas, mediante el uso de jaulas metabólicas. Obteniendo como resultado un aumento en el consumo de materia seca ante la incorporación de estas sustancias a la dieta, hasta una dosis de 0,5 ml/a/d, a partir de la cual los efectos se tornan negativos. De la misma manera Tekeli et al. (2015) evaluaron el uso de diferentes extractos de plantas (*T. vulgaris*, *O. vulgare*, *S. aromaticum*, *Z. officinale*) y diferentes alimentos en vacas lecheras, determinando que el efecto de los aceites esenciales es dependiente del tipo de especie vegetal, la dosis y el alimento utilizado.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 Localización y Período Experimental

El ensayo se desarrolló en el marco de un experimento desde el 18 de febrero hasta el 10 de junio de 2022, en la plataforma experimental de lechería, de la Estación Experimental de Investigación “Dr. M.A Cassinoni (EEMAC) de la Facultad de Agronomía en Paysandú, Uruguay.

#### 3.2 Diseño Experimental, Animales y Tratamientos

Este trabajo estuvo comprendido dentro de un experimento que engloba el estudio del periodo de transición de la vaca lechera. Se utilizaron 60 vacas Holando – americano (24 primíparas y 36 multíparas), 9 de las cuales estaban provistas de cánulas ruminales (Kell ®, Brasil). Los animales tenían como fecha promedio de parto el día 28 de marzo y  $618 \pm 13,5$  kg de PV y fueron asignadas al azar a los tratamientos.

Los tratamientos planteados se diferencian en el aditivo utilizado, incluido en el concentrado, mientras que el resto de la dieta y el manejo se mantienen constantes.

Tratamiento Control (TC): sin consumir aditivos.

Tratamiento con monensina como aditivo (TMon): consumo de 300 mg /vaca/día

Tratamiento con extractos vegetales (TexV) (CCPA, France): consumo de aditivo c/ base a aceites esenciales a razón de  $50 \times 10^3$  mg/vaca/día.

#### 3.3 Manejo

Durante el parto (30 días antes del parto) los animales fueron estabulados en un sistema de cama caliente, ofreciéndoles 12,6 y 15,4 kg MS/vaca/día de una dieta totalmente mezclada (DTM) a primíparas y multíparas respectivamente. La dieta contenía sales aniónicas para prevenir trastornos metabólicos entorno al parto, con un control de efectividad de éstas a través de mediciones de pH en orina. La composición de la DTM se presenta en la Tabla 1.

Durante el post parto los animales fueron manejados en un sistema mixto con estabulación, en el cual también se ordeñaban dos veces al día (4:00 y 16:00) pero luego del ordeño am las vacas se trasladaban a la pastura, pastoreando entre las 7:30 y 15:30. El pastoreo se realizaba en franjas semanales con una asignación

de forraje de 30kg MS/vaca/día. Se les suministro 13,2 y 15,3 kg MS/vaca/día, a primíparas y múltiparas respectivamente, de dieta parcial mezclada (DPM) post ordeño de la tarde. La composición de la DPM se presenta en la Tabla 1.

A continuación, se presenta la formulación de las dietas mezcladas pre y posparto (Tabla 1) y la composición química en base seca de las mismas según tratamiento (Tabla 2).

**Tabla 1**

*Proporción de cada alimento en dieta totalmente mezclada (DTM) y dieta parcialmente mezclada (DPM).*

Alimento	DTM	DPM
	% de MS	% de MS
Paja de cebada	31,4	
Ensilaje de Maíz	38,7	30,9
Heno de alfalfa		13,7
Concentrado*	29,8	55,4

*Nota.* \*Contiene vitaminas y minerales con aditivo o no, según tratamiento.

**Tabla 2**

*Composición química, de las dietas totalmente mezcladas (DTM) y parcialmente mezclada (DPM) ofrecidas en el pre y posparto, según tratamiento.*

Componente (%)	DTM			DPM		
	TC	Tmon	TexV	TC	Tmon	TexV
MS	43,0	43,6	42,0	45,5	46,6	46,9
MO	91,5	91,6	90,2	89,9	91,3	90,7
FDN	42,8	43,3	40,7	28,2	30,1	28,5
FDA	28,6	27,8	26,4	12,0	15,9	13,7
PC	13,1	13,2	13,3	15,7	16,3	15,7
CNF*	33,9	33,7	34,2	43,9	42,5	44,1
EE	1,61	1,43	2,01	2,03	2,39	2,40

*Nota.* Valores expresados en base seca. TC: tratamiento control, Tmon: tratamiento monensina y TexV: tratamiento extractos vegetales. \*Carbohidratos no fibrosos: CNF = 100- (FDN+PC+ EE+ CC). MS: Materia seca. Mo: Materia orgánica. CC: Cenizas. FDN: Fibra detergente neutro. FDA: Fibra detergente ácido. PC: Proteína cruda. CNF: Carbohidratos no fibrosos. EE: Extracto etéreo.

En la Tabla 3 se presenta la composición química de los recursos forrajeros utilizados en el posparto: festuca (Fest), alfalfa (Aa), achicoria (Ach), y avena (Av). A su vez se presenta la composición química del heno de alfalfa estándar (HAAE).

**Tabla 3**

*Composición química de Festuca (Fest), alfalfa (Aa), achicoria (Ach), avena (Av) y heno de alfalfa estándar (HAAE).*

Componente (%)	HAAE	Aa	Ach	Fest	Av
MS	92,9	20,0	11,8	18,9	15,0
MO	91,6	90,1	85,7	88,0	88,1
FDN	36,9	28,7	26,3	43,5	36,6
FDA	27,3	20,0	18,1	25,4	20,9
PC	18,1	24,5	24,0	17,3	20,1
CNF*	34,3	35,8	32,9	26,2	28,1
EE	2,31	1,05	2,46	1,10	3,32

*Nota.* Valores expresados en base seca. \* Carbohidratos no fibrosos: CNF = 100-(FDN+PC+ EE+ CC) MS: Materia seca. Mo: Materia orgánica. FDN: Fibra detergente neutro. FDA: Fibra detergente ácido. PC: Proteína cruda. CNF: Carbohidratos no fibrosos. EE: Extracto etéreo.

En el parto, el consumo de MS en los comederos fue monitoreado diariamente mediante el control de la oferta-rechazo y desperdicios. En el postparto esto fue realizado semanalmente.

Los procedimientos realizados en los animales fueron aprobados por el CHEA (Comisión Honoraria de Experimentación Animal) de la Universidad de la República, expediente número 1273.

### **3.4 Determinaciones**

#### **3.4.1. En los alimentos.**

Se tomaron muestras semanales de las dietas ofrecidas y rechazadas en comederos y de las pasturas que consumieron en el postparto, y se realizaron muestras compuestas de DTM (TC, Tmon y TexV); DPM (TC, Tmon y TexV); avena (Av); alfalfa (Aa); achicoria (Ach); festuca (Fest) y heno de alfalfa estándar (HAAE)

Las muestras de alimentos fueron secadas a 60 °C en estufa de aire forzado hasta obtener peso constante. Una submuestra de estos fue molida en molino Willey® (malla de 1 mm) para determinar el contenido de MS (105 °C), cenizas para obtener el contenido de materia orgánica (MO), extracto al éter (EE) y nitrógeno total (Kjeldahl) según Association of Official Analytical Chemists

(AOAC, 2000). Los contenidos de FDN y FDA fueron determinados con tecnología Ankom (Fiber Analyzer 200, Ankom Technology Corporation, Fairport, N.Y) de forma secuencial y libres de cenizas (FDN<sub>mo</sub> y FDA<sub>mo</sub>, Van Soest et al., 1991). Los carbohidratos no fibrosos (CNF) se estimaron según NRC (2001). Así mismo otra submuestra de los alimentos fue molida a 5 mm y se utilizaron para los estudios *in situ*.

### **3.4.2 En los animales.**

#### **5.4.2.1 Degradabilidad y Digestibilidad *in situ*.**

A los 60 días promedio postparto se incubaron muestras de HAAE – alimento estándar- para estimar la cinética de degradación *in situ* de la MS, MO y FDN. Adicionalmente muestras de todos los alimentos utilizados en el experimento se incubaron para estimar la digestibilidad *in situ* de la MS y MO (DISMS y DISMO) para los diferentes tratamientos.

Para estimar la degradabilidad y la digestibilidad de los alimentos a las 48 horas, se utilizó la técnica de la bolsa de nylon descrita por Ørskov et al. (1980). Las muestras de alimentos utilizados y el heno de alfalfa fueron incubados en bolsas de tela de serigrafía libre de N con un tamaño de poro promedio de 45 micrones, de 10 x 20 cm, con costura de hilo de poliéster. Se respetó una relación-tamaño de muestra y área de bolsa de aproximadamente 18 mg/cm<sup>2</sup> (Ørskov et al., 1980). Una vez cargadas las bolsas con el alimento problema, se cerraron con precinto de plástico y se unieron a una línea de nylon de entre 0,75 y 1 m de longitud, en los eslabones de una cadena galvanizada. La línea se introdujo en una bolsa malla para asegurar la permanencia de las bolsas en caso de desligarse de la línea y se utilizó una pesa de 0,4 kg para asegurar que las bolsas permanezcan en la parte ventral del rumen.

#### **a. Momento de Incubación y Alimentos Incubados.**

Previo a la incubación, las bolsas cargadas con los diferentes alimentos fueron dispuestas en el dispositivo de incubación descrito anteriormente, fueron sumergidas en agua limpia a 39°C por 15 minutos con el propósito de ser pre-hidratadas.

Las bolsas cargadas con heno de alfalfa para la estimación de la cinética de degradación fueron extraídas del rumen a las 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96 horas de incubación, incubándose cada tiempo por duplicado en cada uno de los animales fistulados sometidos a los tratamientos. Luego de retiradas del rumen, se sumergieron en agua fría para detener la fermentación, y se almacenaron a -20°C para su posterior lavado, secado y análisis químico (MO y FDNmo). Ocho bolsas cargadas con HAAE no fueron incubadas en el rumen, y se manipularon de forma similar a las incubadas para obtener lo desaparecido en el tiempo cero de incubación.

Para la estimación de la digestibilidad *in situ* de cada alimento: DTM, DPM; dieta utilizada en el posparto (DPM + Aa), Av, Ach, Fest, y HAAE, se incubaron bolsas por duplicado por animal, y fueron retiradas a las 48 horas de incubación y manipuladas de igual forma que lo descrito para la determinación de la cinética de degradación expresado en el párrafo anterior. La dieta utilizada en el posparto (DPM + Aa) fue simulada en el laboratorio, de acuerdo con las proporciones presupuestadas de acuerdo a los requerimientos animales (60% de DPM y 40% de la pastura). La composición química de esta dieta se presenta la Tabla 4.



**Tabla 4**

*Composición de la dieta posparto, compuesta por una dieta parcialmente mezclada (DPM) y pastura de alfalfa (Aa), según tratamiento.*

Componente (%)	DPM + Aa		
	TC	Tmon	TexV
MS	35,3	36,0	35,8
MO	82,7	82,2	83,6
FDN	26,0	28,1	26,7
FDA	23,4	23,2	22,6
PC	15,7	15,7	15,7
CNF*	40,0	37,2	39,8
EE	1,27	1,20	1,43

*Nota.* Valores expresados en base seca. TC: tratamiento control, Tmon: tratamiento monensina y TexV: tratamiento extractos vegetales. \*Carbohidratos no fibrosos: CNF = 100- (FDN+PC+ EE+ CC). MS: Materia seca. MO: Materia orgánica. FDN: Fibra detergente neutro. FDA: Fibra detergente ácido. PC: Proteína cruda. CNF: Carbohidratos no fibrosos. EE: Extracto etéreo.

Las bolsas con los residuos no digeridos se descongelaron y fueron lavadas de a 30 bolsas por ciclo de lavado, en una máquina automática con tambor vertical, capacidad de 45 litros y realizando 3 cambios de agua, durante 3 minutos y sin centrifugado.

Terminado el proceso de lavado, las bolsas y sus residuos no digeridos, se secaron en estufa de aire forzado a 60°C hasta peso constante. La materia seca desaparecida por tiempo de incubación fue computada como la diferencia entre el peso de la muestra antes y después de ser incubada, expresado como proporción del peso inicial. Con el objetivo de determinar la desaparición de la FDN, a los residuos no digeridos en cada tiempo de incubación se determinó el contenido de FDN según la técnica de Van Soest et al. (1991). La FDN desaparecida a cada tiempo de incubación, resulta de la relación entre el peso inicial de FDN previo a la incubación y el peso de FDN luego de la incubación expresado como proporción del peso inicial incubado.

Los datos de la desaparición de la MS, MO y FDN en los diferentes tiempos se ajustaron al modelo exponencial propuesto por Ørskov y McDonald (1979) (sin

lag time), utilizando el procedimiento PROC NLIN del paquete estadístico SAS On Demand for Academics, versión 9.04.

$$Y(t) = a + b(1 - e^{-ct}), t \geq 0$$

Donde Y(t)= desaparición al tiempo t de MS, MO y FDN

a: fracción soluble o rápidamente degradable (%);

b: fracción insoluble pero potencialmente degradable (%);

c: tasa de degradación ( $h^{-1}$ ).

En el caso de FDN, el modelo que mejor ajusto no detecto fracción soluble.

La degradabilidad efectiva (DE) de la MS, MO y FDN se calculó en base a la siguiente ecuación:  $DE = a + bc / (c+k)$ , propuesta por Ørskov y McDonald (1979) y utilizando una tasa de pasaje (k) de 5%/h.

### ***3.4.3 Parámetros que Caracterizan el Ambiente Ruminal.***

Para caracterizar el ambiente ruminal, se tomaron muestras de líquido ruminal durante 2 días consecutivos, antes del suministro de la alimentación de la mañana (0 h), y a las 4, 8, 16, 24 h posteriores al ingreso de la pastura, con una bomba de vacío manual. Las muestras fueron colectadas en frasco copro-estéril para la determinación de pH, AGV, y nitrógeno amoniacal (N-  $NH_3$ ). El pH se midió, inmediatamente al extraer y filtrar la muestra de líquido ruminal, con un pH-metro portátil (Milwaukee® modelo MW102, China).

#### **3.4.3.1 Procesamiento de Muestras y Determinación de los Parámetros Ruminales.**

Una submuestra de líquido ruminal (20 ml) se acidificó con 1 ml de 85% ácido ortofosfórico ( $H_3PO_4$ ), se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 rpm (IEC Centra-M, International Equipment Company, USA) y fue conservada a  $-20^{\circ}C$  para posterior determinación de AGV. La concentración de ácido acético, propiónico, butírico valérico, isobutírico e isovalérico, fueron por cromatografía de gases en un cromatógrafo Agilent modelo 8860, con inyección automática, detector FID (detector de ionización de llama), Columna: HPINNOWAX (0.53  $\mu m$  \* 30 m), usando como carrier nitrógeno y un detector de temperatura de  $240^{\circ}$ .

Para el análisis de  $\text{NH}_3$ , la submuestra de líquido ruminal (20 ml) fue acidificada con 20 ml de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5N), se centrifugó como fue descrito anteriormente y conservado a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su determinación. La concentración de  $\text{NH}_3$  se midió según la metodología de Chaney y Marbach (1962).

Una submuestra de 5 ml de líquido ruminal fue conservada sobre 5 ml de una solución de formol al 10% y conservada en refrigeración a  $4^\circ\text{C}$  para el posterior recuento de protozoarios en cámara de Neubauer (Neubauer improved, Marienfeld Superior, Alemania) con 0,1 mm de profundidad y una superficie del cuadrado más pequeño de  $0,025 \text{ mm}^2$ . Para el recuento se utilizó una muestra compuesta por 0,5 ml de líquido ruminal y 0,5 ml de formol, con 3 gotas de Lugol al 5% diluidos en 9 ml de Glicerol al 30% (Cedrola et al., 2015; D'Agosto & Carneiro, 1999); se observaron en microscopio óptico (CxL, Labomed, EE.UU.) con 10x de aumento. Se tomó el promedio de conteo en ambos lados de la cámara, contabilizándose únicamente en los 4 cuadrantes mayores de la grilla y realizando un recorrido visual por los 9 cuadrados interiores de cada uno. Cuando el coeficiente de variación entre réplicas era mayor a 10% se contó una tercera muestra. Y los datos se expresan en número de protozoos por mL. Para la estimación de la población de protozoarios se utilizó el siguiente cálculo.

$$\text{Superficie contada 4 cuadrados} = 4 \times 1 \text{ mm}^2 = 4 \text{ mm}^2$$

$$\text{Profundidad de la cámara} = 0,1 \text{ mm}$$

$$\text{Dilución 1:20 (1:2 con formol x 1:10 con glicerol)}$$

$$\text{Factor de conversión de mm}^3 \text{ a ml} = 10^3$$

$$\begin{aligned} & \text{Protozoarios/ml liq rumnial} \\ & = \frac{\text{celulas contadas}}{\text{sup contada x profcamara x dulucion}} 10^3 \end{aligned}$$

### **3.5 Análisis Estadístico**

Los parámetros de la cinética de degradación de la MS, MO y FDN del heno de alfalfa fueron analizadas con un modelo mixto que incluyó el tratamiento como efecto fijo y la vaca como efecto aleatorio. Las variables pH, NH<sub>3</sub>, AGV totales y acético, propiónico, butírico, valérico, isobutírico e isovalérico, así como la relación entre AGV acético: propiónico se analizaron utilizando medidas repetidas en el tiempo con un modelo mixto que incluyó el tratamiento, la hora de muestreo y la interacción entre tratamiento y hora de muestreo como efectos fijos y la vaca como efecto aleatorio. La separación de medias se realizó mediante test de Tukey con  $p < 0,05$ . Todos los análisis fueron analizados usando el paquete estadístico SAS.

## **4. Resultados y Discusión**

### **4.1 Efecto del Uso de Aditivos en la Digestibilidad.**

En la Tabla 5 se presentan los valores de digestibilidad *in situ* del heno de alfalfa, de los diferentes forrajes y de las dietas mezcladas ofrecidos a vacas lecheras alimentadas según tratamientos.

**Tabla 5**

*Efectos de la adición de monensina y extractos vegetales sobre la digestibilidad ruminal de los alimentos evaluados.*

Alimento	Digestibilidad de la MS (%)			
	Tratamiento		p-valor	
	TC	Tmon TexV	°EE	Alimento
HAAE	70,8	70,6	70,1	1,64
Aa	83,7	84,1	82,6	0,94
Ach	92,8	93,8	94,3	<0,001
Fest	73,6	78,0	75,0	<0,001
Av	85,3	87,6	89,4	
DTM	75,6 a	65,3 b	65,1 b	
DPM	82,0	83,4	83,2	
DPM + Aa	77,4	82,8	82,3	

Alimento	Digestibilidad de la MO (%)			
	Tratamiento		p-valor	
	TC	Tmon TexV	°EE	Alimento
HAAE	62,7	62,5	61,9	1,36
Aa	96,6	96,8	96,5	0,91
Ach	92,8	93,7	94,2	<0,001
Fest	73,6	77,9	74,9	
Av	97,3	98,1	98,1	
DTM	75,5 a	65,2 b	66,9 b	
DPM	81,9	84,4	83,1	
DPM + Aa	77,5	83,7	82,7	

*Nota.* Medias de mínimos cuadrados con letras comunes no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). TC: tratamiento control, Tmon: tratamiento monensina y TexV: tratamiento extractos vegetales. °EE: Error estándar de la media. HAAE: Heno de alfalfa estándar. Aa: alfalfa. Ach: achicoria. Fest: festuca. Av: avena. DTM: dieta total mezclada. DPM: dieta parcial mezclada. DPM+ Aa: dieta parcial mezclada más alfalfa.

Los tratamientos no afectaron la digestibilidad de la MS y MO, pero si se encontraron diferencias por los diferentes tipos de alimentos ( $p < 0,001$ ). Teniendo en cuenta los tipos de alimentos analizados, los forrajes se encuentran dentro de los rangos de digestibilidad esperados para este tipo de alimento (Van Soest, 1994; Trujillo & Uriarte, 2015). La DISMS de los forrajes fueron diferentes entre ellos ( $p < 0,05$ ). Achicoria posee el mayor valor de DISMS con una media de mínimos cuadrados de  $(93,6 \pm 0,96)$ , seguida por avena  $(87,5 \pm 0,95)$ , alfalfa  $(83,3 \pm 0,95)$ , festuca  $(75,5 \pm 0,95)$  y heno de alfalfa estándar  $(70,5 \pm 0,95)$ . En cuanto a la DISMO, la media de mínimos cuadrados de avena  $(97,7 \pm 0,79)$  y alfalfa  $(96,6 \pm 0,79)$  no difieren entre si ( $p > 0,05$ ), siendo estos dos diferentes ( $p < 0,05$ ) de achicoria  $(93,6 \pm 0,08)$ , festuca  $(75,5 \pm 0,79)$  y heno de alfalfa estándar  $(75,5 \pm 0,79)$ .

La digestibilidad es producto de la interacción entre el animal y las características intrínsecas de los alimentos. Los valores de composición química de los alimentos analizados (Tablas 2, 3 y 4), se encuentran dentro de los rangos reportados en tablas de alimentos para rumiantes (Van Soest, 1994; Mieres, 2004; Trujillo & Uriarte, 2015). Cuando analizamos los forrajes, el estado fenológico y la edad que presenta al momento de corte determinan la calidad, encontrándose a veces, mayor variación entre los diferentes estados de una pastura que entre diferentes pasturas en un mismo estado (Methol, 1997). Teniendo en cuenta el periodo en el que se realizó el presente experimento, los valores presentados en la Tabla 3 son acordes a la estación del año en la que se encontraban las pasturas. Festuca es la pastura que presenta menor DISMS y DISMO  $(75,5 \pm 0,95$  y  $75,5 \pm 0,79$  respectivamente), pudiendo explicar estos valores la edad avanzada en la que se encontraba la pastura y la presencia de especies espontáneas y malezas.

Las dietas mezcladas difieren en su digestibilidad. La DPM presenta DISMS y DISMO  $(82,8 \pm 0,95$  y  $83,1 \pm 0,79)$  mayores a DTM  $(68,7 \pm 0,95$  y  $69,2 \pm 0,79)$ . Esto se debe a que, la DPM posee alimentos de mejor calidad debido a que estas dietas fueron formuladas para vacas de alta producción a inicios de lactancia, donde las vacas requieren una mayor entrega de energía y nutrientes por parte de los alimentos que se les ofrecen. Al igual que los forrajes, los valores de digestibilidad obtenidos para estas dietas mezclas son representativos del tipo de alimento que las componen. En la Tabla 2, se observa que la composición química de las dietas mezcla se encuentra dentro de los rangos esperados, teniendo en cuenta los ingredientes que las componen y la composición química de estos reportada por

Mieres (2004) y la Cooperativa Nacional de Productores de Leche (Conaprole, 2009). Es así que se puede observar una mayor concentración de carbohidratos no fibrosos en las DPM, en comparación a las DTM, dado que, en el posparto el concentrado representa más del 57,9 % de la dieta y se sustituye la paja de cebada por heno de alfalfa de mayor calidad (Tabla 1). La digestibilidad de la DPM+Aa no se diferencia estadísticamente de la digestibilidad de DPM dado que la mayor proporción de esta dieta es de DPM.

La digestibilidad de DTM, se vio afectada por los tratamientos ( $p < 0,0001$ ), cuando se utilizaron aditivos se redujo la digestibilidad, obteniendo así una DISMS de 65,1; 65,3 y 75,6% y una DISMO de 66,9; 65,2; 75, 5 % para TexV, Tmon y TC respectivamente. Se dio una reducción de un 14% y 11 – 13% de la digestibilidad de la MO y MS, respectivamente. Los resultados encontrados en el presente trabajo coinciden con los obtenidos por Fernández et al. (1997), donde la digestibilidad del heno de hierba, paja de cebada y un concentrado compuesto por harina de soja y cebada disminuye ante el uso de la mezcla comercial de aceites esenciales y especias (CRINA®). Sin embargo, ni Tmon ni TexV tuvieron efecto en los otros alimentos evaluados, siendo coincidente con los resultados obtenidos por varios autores: Tager y Krause (2011), Benchaar (2016), Fierros Rodríguez (2019) en trabajos *in situ*, Fernández et al. (2005), Ornaghi et al. (2017) *in vitro* y Benchaar et al. (2006) en un experimento donde evalúa la digestibilidad aparente en vacas lecheras. Por otro lado, Rueda Camero (2019) difiere de dichos autores, dado que reporta que los aceites esenciales de orégano y ajo aumentaron la digestibilidad de la DTM, constituida en una proporción 60:40 por ensilaje de maíz y un concentrado energético-proteico, suministrada a ovinos. Las comparaciones deben de ser analizadas con precaución, dado que los trabajos consultados no son realizados en condiciones de pastoreo.

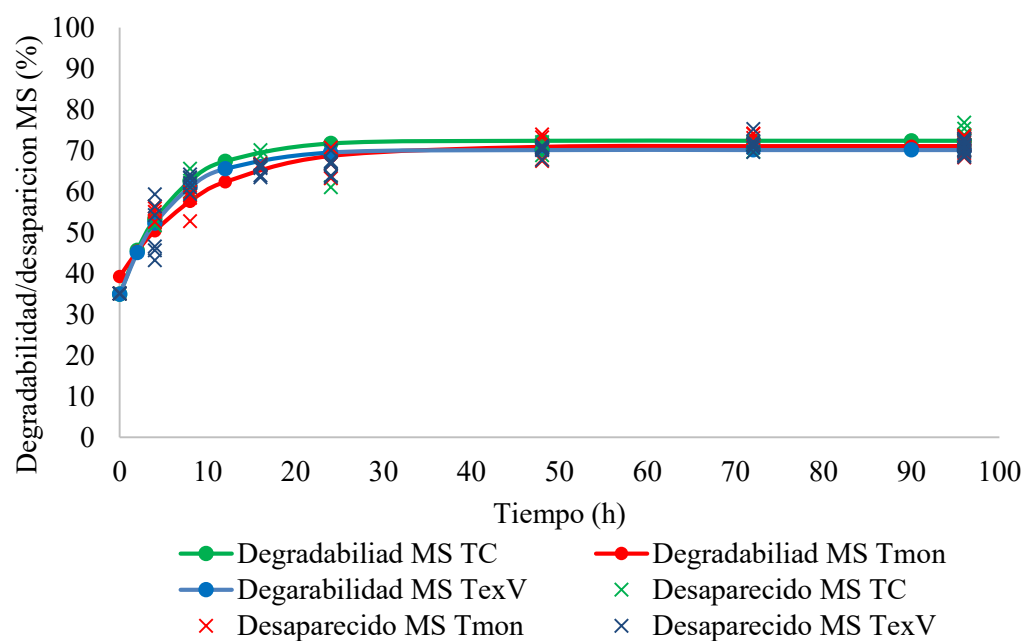
#### ***4.1.2 Efecto del Uso de Aditivos Sobre la Cinética de Degradación del Heno de alfalfa.***

En la Figura 1, se presenta, el comportamiento de los datos de desaparición y cinética de degradación obtenidos por el ajuste del modelo “ $Y(t) = a + b(1 - e^{-ct})$ ,  $t \geq 0$ ” para el heno de alfalfa estándar (HAAE) a través de los diferentes tratamientos.



**Figura 1**

*Cinética de degradación de la Materia Seca (MS) del heno de alfalfa según tratamiento.*



*Nota.* TC: tratamiento control, Tmon: tratamiento monensina y TexV: tratamiento extractos vegetales.

La gráfica permite observar el ajuste del modelo de cinética de utilización de la MS con los datos de desaparición obtenidos. Igualmente, los modelos utilizados para MO y FDN, fueron muy significativos ( $p < 0,001$ ).

En la Tabla 6 se presentan los datos de desaparición y cinética de degradación obtenidos a través de los diferentes tratamientos para el HAAE.

**Tabla 6**

Efecto de la adición de monensina y extractos vegetales sobre la cinética de degradación del heno de alfalfa estándar.

Parámetros <sup>a</sup> de cinética de degradación					
	a (%)	b (%)	c (h <sup>-1</sup> )	a+b	<sup>b</sup> DE
<b>Materia seca</b>					
TC	35 b	37 a	0,17	72	73,9
Tmon	39 a	32 b	0,11	71	72,6
TexV	35 b	35 ab	0,17	70	71,8
Significancia	0,05	0,07	0,45		
<sup>c</sup> EE	0,01	0,01	0,04		
<b>Materia orgánica</b>					
TC	25 b	40	0,17	65	67,0
Tmon	30 a	32	0,12	63	63,6
TexV	26 ab	36	0,17	62	63,8
Significancia	0,06	0,11	0,49		
<sup>c</sup> EE	0,01	0,02	0,03		
<b>Fibra detergente neutro</b>					
TC		42	0,07 a		44,1
Tmon		43	0,06 b		45,2
TexV		39	0,06 b		41,0
Significancia		0,21	0,03		
<sup>c</sup> EE		0,01	0,01		

*Nota.* Medias dentro de cada columna con igual subíndice (a, b, c) no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ). TC: tratamiento control, Tmon: tratamiento monensina y TexV: tratamiento extractos vegetales. <sup>a</sup>Parámetros: a: fracción soluble (%); b: fracción insoluble potencialmente degradable (%); c: tasa fraccional de degradación (h<sup>-1</sup>). a+b: degradabilidad potencial (%). <sup>b</sup>DE estimada con tasa de pasaje: 5 %/h. <sup>c</sup>EE: error estándar de la media.

El uso de aditivos no afectó la tasa de degradación de la MS del heno de alfalfa estándar, pero si la fracción soluble y tiende a tener un efecto sobre la fracción insoluble potencialmente degradable. Tmon presenta una mayor fracción soluble (39%) que TexV y TC (35%), en cambio para la fracción insoluble potencialmente degradable Tmon tiende a presentar menor valor que TC y no se diferencia de TexV, que tampoco difiere del TC. Estos resultados coinciden con los publicados por Jalilvand et al. (2008) al evaluar el efecto de enzimas fibróticas sobre

el heno de alfalfa en ovinos, pero obteniendo valores de la fracción soluble menores (28%) y una mayor coincidencia en los otros dos parámetros de la cinética de degradación. Sin embargo, Hernández Martínez et. al (2017) encuentran que, en la evaluación de diferentes aditivos sobre dietas totalmente mezcladas, el uso de monensina en la dieta de novillos aumentó la tasa de degradación. También difieren de Benchaar et al. (2006), los cuales encuentran tendencias de aumento en la tasa de degradación de la MS del ensilaje de maíz ante el uso de ionóforos. Por el contrario, en el mismo experimento, este autor reporta una fracción soluble y una fracción insoluble potencialmente degradable para el ensilaje de forraje muy similares a los obtenidos en este trabajo (39% y 32%), pero con una tasa de degradación muy inferior ( $0,07 \text{ h}^{-1}$ ). Por otro lado, Trujillo (2006) al caracterizar la cinética de degradación del heno de alfalfa, a pesar de obtener potenciales de degradación altos al igual que en nuestro caso, difiere en la tasa de degradación y la fracción soluble, obteniendo valores de  $0,08 \text{ h}^{-1}$  y 18,8 % respectivamente. La diferencia entre valores de “c” reportados por esta última autora y los actuales se pueden explicar por la diferencia en los valores de la fracción “a”, “b” y su consecuente cambio en la tasa de degradación, determinando en nuestro trabajo un valor de “c” mayor. Esta diferencia entre fracciones solubles puede explicarse tanto por diferencias en las concentraciones de carbohidratos como variaciones en los componentes nitrogenado del alimento, dado que los alimentos con mayores contenidos de proteína soluble determinan una fracción “a” mayor, tal como se obtuvo en este experimento. Los menores porcentajes de fracción soluble publicados por Trujillo (2006) determinan que, en un mismo alimento, la autora obtuviera una degradabilidad efectiva menor (39% vs 73%).

En cuanto a la degradabilidad de la MO, a diferencia de la degradabilidad de la MS el uso de los aditivos presenta una tendencia a ser diferentes sin embargo la fracción soluble “a”, de TexV es igual al TC.

Respecto a la utilización/degradación de la FDN, el uso de aditivos determina una menor tasa de degradación que TC, no observando diferencias entre estos (Tmon y Texv). A diferencia de Enríquez Espinoza y Huamán Vilca (2022), en este experimento los datos se ajustaron a un modelo exponencial simple sin presencia de fracción soluble, obteniéndose valores de la fracción “b” y “c” muy similares a los reportados por estos autores (34% y  $0,05 \text{ h}^{-1}$ ), en el estudio del uso de levaduras en la cinética de degradación de heno de alfalfa. Por otro lado,

Benchaar et al. (2006) no detectan efectos del uso de aditivos, específicamente monensina y una mezcla de timol, eugenol, vainillina y limoneno sobre la cinética de degradación de FDN ni FDA del ensilaje de pasto, obteniendo valores muy similares a los encontrados en este experimento (37% y 0,05-0,06 h<sup>-1</sup>) y a la caracterización de la cinética de la FDN del heno de alfalfa realizada por Trujillo (2006) (49% y 0,06 h<sup>-1</sup>) a pesar de que esta última utilizó heno con mayor contenido de FDA (38%).

#### ***4.1.3 Efecto del Uso de Aditivos Sobre los Parámetros Ruminales.***

La Tabla 7 muestra los valores de pH, amonio, AGV totales con sus respectivas proporciones y protozoarios, según cada tratamiento.

**Tabla 7**

*Efecto de la adición de monensina y extractos vegetales sobre los parámetros ruminales (pH, amonio, ácidos grasos volátiles totales con sus proporciones molares y protozoarios).*

	Tratamientos				p-valor			
	TC	Tmon	TexV	°EE	Tratamiento	Tiempo	Tratamiento *	Tiempo
pH ruminal	6,37	6,31	6,355	0,02	0,061	<0,001	<0,001	<0,001
Amonio (ppm)	74,1 a	80,7 a	57,7 b	1,02	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
AGV totales (mmol/L)	111,6	115,1	113,09	3,49	0,802	<0,001	0,572	0,572
Acético (%)	62,5	60,3	60	0,75	0,552	0,001	0,939	0,939
Propiónico (%)	23,4 b	26,3 a	27,3 a	0,66	0,001	0,107	0,738	0,738
Butírico (%)	12,2 a	11,0 ab	9,87 b	0,33	0,001	<0,001	0,159	0,159
Isobutírico (%)	0,35	0,30	0,29	0,11	0,284	<0,001	0,1556	0,1556
Valérico (%)	1,40	1,29	1,34	0,06	0,489	0,655	0,691	0,691
Isovalérico (%)	0,88	0,67	0,67	0,12	0,502	0,002	0,594	0,594
Acético: Propiónico	2,69 a	2,30 b	2,22 b	1,04	0,003	0,025	0,841	0,841
Protozoarios cel/mL x 10 <sup>4</sup>	11,0 a	5,70 b	3,30 b	1,33	0,003	0,967	0,833	0,833

*Nota.* Medias de mínimos cuadrados con letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). TC: tratamiento control, Tmon: tratamiento monensina y TexV: tratamiento extractos vegetales. ° EE: Error estándar de la media.

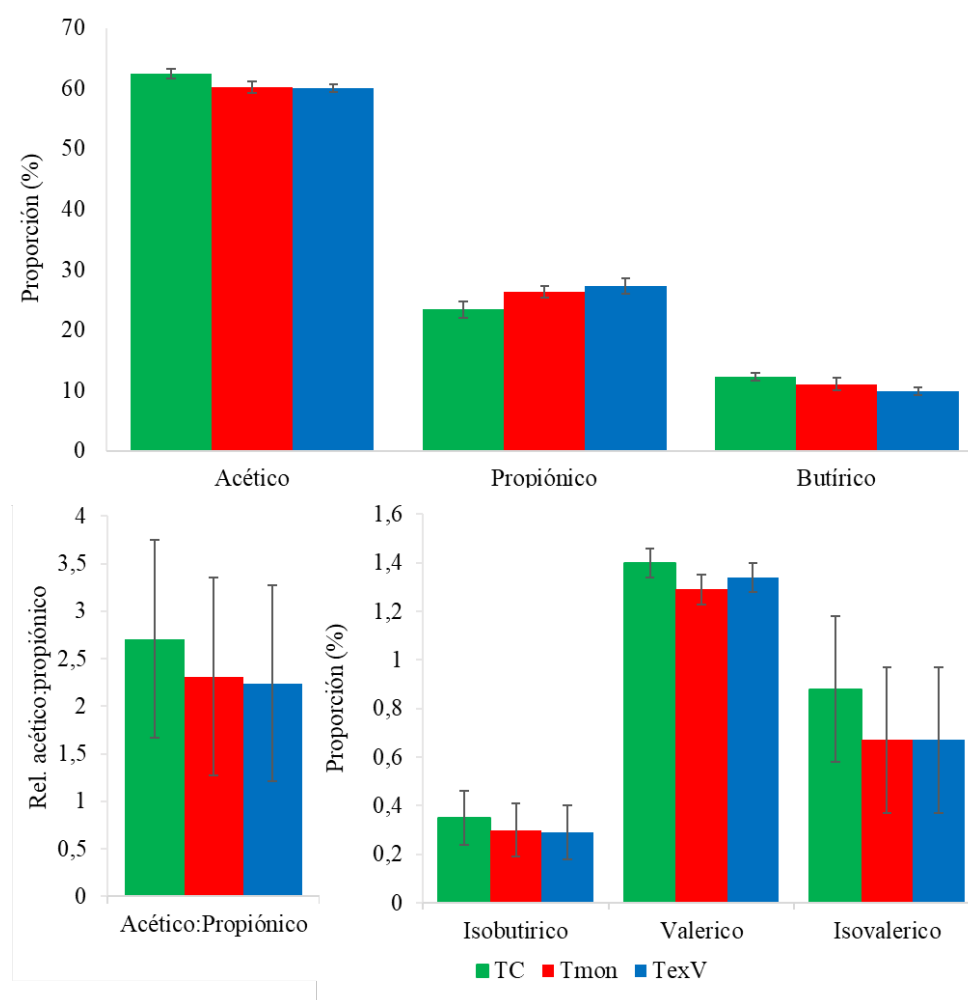
El uso de aditivos modificó los parámetros ruminales, detectando diferencia significativa entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) en amonio, ácido propiónico, ácido butírico, relación acético: propiónico y protozoarios.

TC y Tmon, presentan mayor concentración de  $\text{NH}_3$  ( $74,1 \pm 1,03$  y  $80,7 \pm 1,02$ ), que TexV ( $57,7 \pm 1,02$ ). Los tratamientos no generan un efecto significativamente diferente en la concentración de AGV total. En relación al ácido propiónico, TexV y Tmon no presentan diferencias significativas en la concentración del mismo, como se observa en la Figura 2 (A), TC se diferencia estadísticamente de ambos tratamientos y presenta la menor. TexV presenta una menor concentración de ácido butírico ( $9,87 \pm 0,29$ ) que TC ( $12,2 \pm 0,35$ ), pero no se diferencia estadísticamente del Tmon ( $11,0 \pm 0,35$ ), a su vez Tmon y TC no presentan diferencias estadísticamente significativas. Como se observa en la Figura 2 (B) la relación acético: propiónico determinada por TC ( $2,71 \pm 0,10$ ) fue significativamente mayor que Tmon ( $2,31 \pm 0,10$ ) y TexV ( $2,24 \pm 0,08$ ), éstos últimos no presentan diferencias significativas.

En cuanto a los protozoarios, TC ( $11,5 \pm 0,14$ ) muestra significativamente mayor concentración que los tratamientos con aditivos, Tmon ( $10,9 \pm 0,17$ ) y TexV ( $10,5 \pm 0,14$ ).

**Figura 2**

*Proporciones (%) de los diferentes ácidos grasos volátiles según tratamientos.*



*Nota.* (A): acético, propiónico y butírico; (B): relación acético: propiónico; (C): isobutírico, valérico e isovalérico. TC: tratamiento control, Tmon: tratamiento monensina y TexV: tratamiento extractos vegetales.

Amonio, pH, AGV totales, acético, butírico y la relación acético: propiónico presentan diferencias estadísticas entre las horas de muestreo ( $p < 0,05$ ). Mientras que solo pH y amonio presentan una interacción tratamiento x tiempo significativa. El ingreso de los animales a la pastura determina un aumento en las concentraciones de amonio. En la Figura 3 se presenta el efecto del tiempo y de la interacción tratamiento x tiempo, sobre el pH tomando como referencia ( $h=0$ ) la oferta de ración mezclada en los comederos. En los tiempos 0, 4, 8 y 24 no hay diferencias significativas en el pH entre tratamientos, sin embargo, en el tiempo 16 TexV ( $5,66 \pm 0,036$ ) determina menor pH que TC con diferencias significativas, pero sin

diferencias estadísticas significativas con Tmon, mientras que Tmon y TC no presentan diferencias significativas estadísticamente. En la Figura 4, donde se representa la evolución en la concentración de amonio durante el transcurso del tiempo, tomando como referencia (h=0) la oferta de ración mezclada en los comederos; los tratamientos TC y Tmon tienen un aumento inicial marcado en la concentración de amonio y presentan máximas concentraciones en los tiempos 4 y 8, mientras que el tratamiento TexV tiene un aumento inicial leve y la máxima concentración se alcanza en el tiempo 8 únicamente. Tanto en el segundo como en el tercer tiempo de muestreo, las concentraciones de amonio registradas en TC y Tmon son superiores a las de TexV. Luego del ingreso a la DPM, las concentraciones de este parámetro se vuelven indiferentes entre tratamientos. La Figura 5 refleja el efecto significativo del tiempo de muestro sobre la concentración de AGV totales ( $p < 0,001$ ). Se observa que el muestreo posterior al ingreso a la DPM registra los máximos valores AGV totales, sin diferencias entre tratamientos.

Estos resultados de pH y AGV totales coinciden con los encontrados por Tekippe et al. (2011) y Benchaar (2016). Flores et al. (2013) tampoco reporta efecto de una mezcla de eugenol y cinamaldehido sobre el pH ruminal, pero si encuentra una tendencia de aumento en la concentración de AGV totales cuando se agregan altas dosis de esta mezcla a la dieta de vacas lecheras. Por el contrario, Benchaar et al. (2006) y Agarwal et al. (2009) reportan reducción en la concentración de AGV totales, ante una mezcla comercial de timol, eugenol, giayacol y limoneno y el uso de altas dosis de aceite de menta, respectivamente.

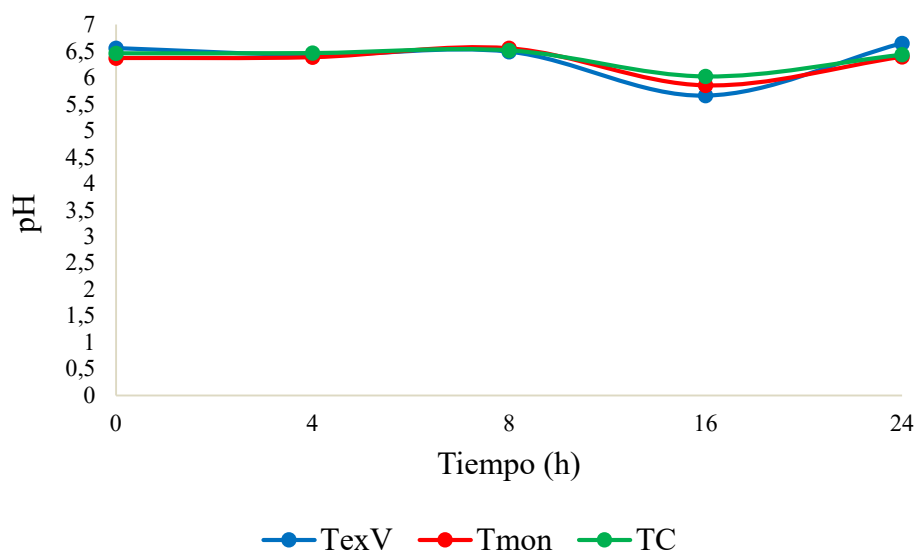
La menor concentración de amonio obtenida en este trabajo ante el uso de extracto vegetal respecto al control, coincide con lo reportado por Nogueira (2011) al evaluar el efecto de diferentes dosis de taninos en vacas lecheras, pero difiere de los resultados publicados por Flores et al. (2013), los cuales no encuentran un efecto significativo de la mezcla de eugenol y cinamaldehido sobre este parámetro. El aumento en la proporción de propiónico ante el uso de aditivos reportado en este trabajo coincide con la tendencia encontrada por Tekippe et al. (2011) al evaluar el efecto del aceite de orégano, pero difiere de lo publicado por Agarwal et al. (2009), los cuales observan una reducción en la proporción de propiónico ante altas dosis de aceite de menta.



A diferencia de los resultados presentados, en la bibliografía consultada ningún autor reporta efecto de los aceites esenciales sobre la población de protozoarios.

### Figura 3

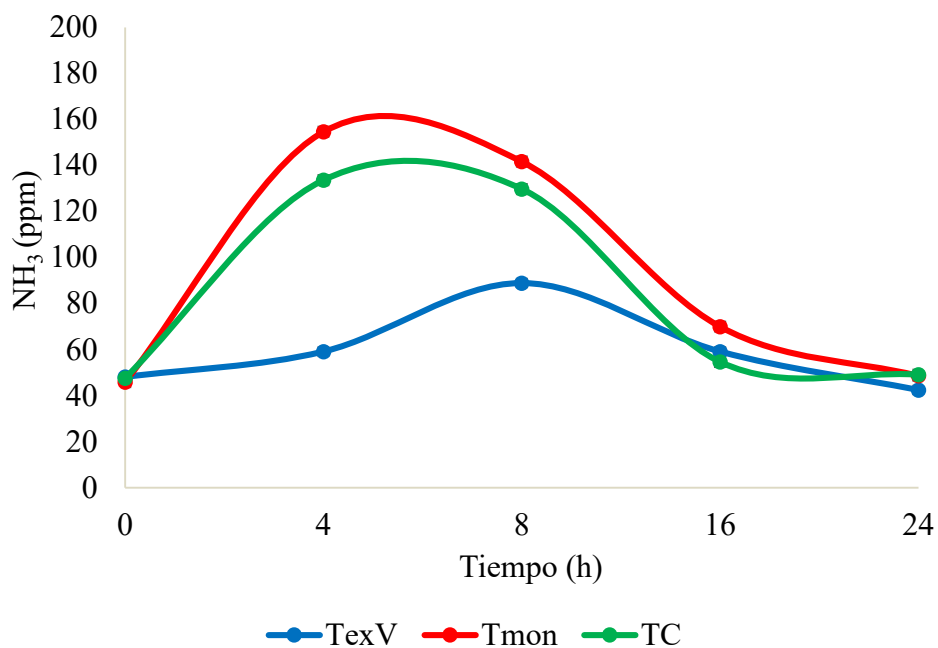
*Evolución de pH en el transcurso del tiempo según tratamientos.*



*Nota.* TC: tratamiento control, Tmon: tratamiento monensina y TexV: tratamiento extractos vegetales.

**Figura 4**

*Evolución de la concentración de amonio ( $\text{NH}_3$ ) en el transcurso del tiempo, según tratamiento.*

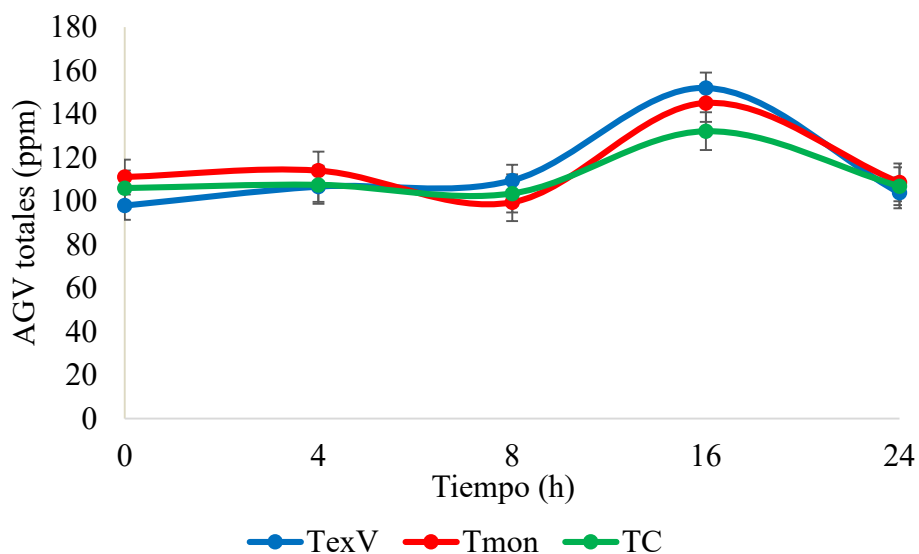


*Nota.* TC: tratamiento control, Tmon: tratamiento monensina y TexV: tratamiento extractos vegetales.

En la Figura 5 se representa la evolución de la concentración de AGV en el tiempo, tomando como referencia el tiempo 0, antes del ingreso al pastoreo.

**Figura 5**

*Evolución de la concentración de ácidos grasos totales (AGV totales) en el transcurso del tiempo, según tratamientos.*



*Nota.* TC: tratamiento control, Tmon: tratamiento monensina y TexV: tratamiento extractos vegetales.

En términos generales, la adición de aditivos a la dieta generó cambios en los parámetros ruminales. La concentración de  $\text{NH}_3$  se vio reducida con el uso de extractos vegetales respecto a control y monensina, en un 26,6 y 38,5% respectivamente. La población de protozoarios se vio reducida en un 4,8 y 8,3% en Tmon y TexV respectivamente, en comparación a TC. La digestibilidad de la mayoría de los alimentos evaluados no se vio afectada, en cambio, en la DTM la inclusión de aditivos generó una disminución de la digestibilidad de MS y MO.

La concentración de AGV totales no se vio afectada por el uso de aditivos. No obstante, se modificaron las proporciones molares, reduciendo la relación acético: propiónico, dado por un aumento en la concentración de propiónico.

## 5. Conclusiones

Los cambios hallados en el metabolismo ruminal por el uso de aditivos no se vieron reflejados en la digestibilidad de la mayoría de los alimentos, sin embargo, la digestibilidad de la DTM se redujo. La menor tasa de degradación de la fibra mencionada y la composición de la DTM podrían provocar un cambio en la población microbiana responsable de la utilización de los componentes fibrosos de este alimento.

Los resultados obtenidos, sumado a la reducción en la concentración de  $\text{NH}_3$  como indicador de una mejor eficiencia de utilización del nitrógeno, supone que esta mezcla de extractos vegetales puede ser utilizada como alternativa a monensina.

## 6. Bibliografía

- Acedo, J., & González, R. (1998). *Utilización de aditivos en piensos para rumiantes: Minerales forma orgánica, levaduras, enzimas, ionóforos y otros*. Sitio Argentino de Producción Animal. <https://rb.gy/ykadbf>
- Adrien Delgado, M. L. (2006). *Efecto de las cantidades crecientes de forraje sobre la performance productiva y reproductiva en vacas lecheras en condiciones pastoriles* [Trabajo final de grado]. Universidad de la República.  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19319/1/FV-26758.pdf>
- Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L. C., & Kamra, D. N. (2009). Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on in vitro methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Animal Feed Science and Technology*, 148(2-4), 321-327.  
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.04.004>
- Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official Methods of Analysis*. (17th ed.).
- Bargo, F., Muller, L. D., Delahoy, J. E., & Cassidy, T. W. (2002). Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *Journal of dairy science*, 85(11), 2948-2963. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74381-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74381-6)
- Barrientos Hitschfeld, L. A. (2013). *Evaluación de la adición de aceites esenciales en la ración de vacas lecheras en pastoreo estival* [Tesis de magíster]. Universidad Austral de Chile. <https://rb.gy/zd9yll>
- Basigalup, D. (Ed.). (2007). *El cultivo de la Alfalfa en la Argentina*. INTA.  
<https://rb.gy/rbvp3t>
- Benchaar, C. (2016). Diet supplementation with cinnamon oil, cinnamaldehyde, or monensin does not reduce enteric methane production of dairy cows. *Animal*, 10(3), 418-425.  
<https://doi.org/10.1017/S175173111500230X>

- Benchaar, C., Petit, H. V., Berthiaume, R., Whyte, T. D., & Chouinard, P. Y. (2006). Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. *Journal of dairy science*, 89(11), 4352-4364.  
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72482-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72482-1)
- Berretta, E. J. (2003). *Perfiles por país del recurso pastura/forraje: Uruguay*. FAO. <https://studylib.es/doc/4449366/perfiles-por-país-del-recurso-pastura-forraje-uruguay>
- Bobadilla, S. (2003). *Producción de heno de alfalfa*. Sitio Argentino de Producción Animal. [https://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_reservas/reservas\\_henos/29-heno\\_de\\_alfalfa.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_henos/29-heno_de_alfalfa.pdf)
- Bragachini, M., Cattani, P., Ramírez, E., Ruiz, S., Ustarroz, E., Pozzo, L., Granada, J., & Bonetto, L. (1995). *Heno de calidad*. Sitio Argentino de Producción Animal. <https://rb.gy/7kvoe2>
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*, 90(6), 2580-2595.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>
- Calsamiglia, S., Castillejos, L., & Busquet, M. (2005). *Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno lechero*. Sitio Argentino de Producción Animal. <https://rb.gy/nnwzyr>
- Carro, M. D., Saro, C., Mateos, I., Díaz, A., & Ranilla, M. J. (2014). Perspectivas y retos de los extractos vegetales como aditivos alimentarios en rumiantes. *Albóitar*, 179, 4-6. <https://rb.gy/0ec7vi>
- Casas Rodríguez, S. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus oryzae*: Estimuladores y modificadores de la fermentación y crecimiento microbiano ruminal. *Revista de Producción Animal*, 30(2), 1-8.  
<https://rb.gy/9awviq>

- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Losa, R. (2005). Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Animal Feed Science and Technology*, 119(1-2), 29-41.  
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.12.008>
- Cattani, P. (2011). *Henificación, conservación de forrajes*. Sitio Argentino de Producción Animal. <https://rb.gy/xick9q>
- Cedrola, F., Rossi, M., Dias, R. J. P., Martinele, I., & D'Agosto, M. (2015). Methods for Taxonomic Studies of Rumen Ciliates (Alveolata: Ciliophora): A Brief Review. *Zoological Science*, 32(1), 8-15.  
<https://doi.org/10.2108/zs140125>
- Chaney, A. L., & Marbach, E. P. (1962). Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin Chem*, 8, 130.
- Chilibroste, P. (2002). Integración de patrones de consumo y oferta de nutrientes para vacas lecheras en pastoreo durante el período otoño-invernal. En Centro Médico Veterinario de Paysandú, *XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría* (pp. 90-96).  
[https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/465/JB20\\_02\\_90-96.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/465/JB20_02_90-96.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Chilibroste, P. (2012). Estrategias de alimentación en sistemas de producción de leche de base pastoril. *Revista Cangué*, (32), 2-8.  
[http://www.eemac.edu.uy/cangué/joomdocs/cangué032\\_chilibroste.pdf](http://www.eemac.edu.uy/cangué/joomdocs/cangué032_chilibroste.pdf)
- Chilibroste, P. (2015a). Carga o productividad individual?, o, Pasto o concentrado?: Mitos y realidades en la intensificación de los sistemas de producción de leche en Uruguay. En Centro Médico Veterinario de Paysandú, *XLIII Jornadas Uruguayas de Buiatría "Dr. Recaredo Ugarte"* (pp. 158-162). <https://rb.gy/pt8gqo>
- Chilibroste, P. (2015b). Ruta de cambio técnico en la lechería uruguaya: Rol de la carga, la producción individual, la cosecha de forraje, el uso de concentrados y la eficiencia de conversión. En W. Paris, U. Cecato, M. M. Danielce, & G. C. Mari (Eds.), *III Simpósio de Produção Animal a Pasto* (pp. 123-138). Nova Sthampa. <https://rb.gy/8u4utb>

- Chilibroste, P. (2021). A major challenge for the Uruguayan dairy industry: Sustainable growth. *Agrociencia Uruguay*, 25(2), e970.  
<https://doi.org/10.31285/agro.25.970>
- Chilibroste, P., & Battezzore, G. (Coord.). (2014). *Proyecto Producción Competitiva*. Conaprole.
- Colombatto, D. (2012). Avances en nutrición y manejo en el engorde a corral. *Revista Veterinaria*, 48(supl.1), 53-58.
- Cooperativa Nacional de Productores de Leche. (2009). *Composición de los principales alimentos*. <http://www.eleche.com.uy/files/cartilla-4-tabla-de-composicion-de-alimentos?es>
- Correa, H. J., & Cuéllar, G. A. E. (2004). Aspectos clave del ciclo de la urea con relación al metabolismo energético y proteico en vacas lactantes. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 17(1), 29-38.  
<https://revistas.udea.edu.co/index.php/rccp/article/view/323921/20781100>
- Cotro Souto, B. L. (1999). *Evaluación nacional de leguminosas cultivadas: Degradabilidad ruminal y digestibilidad intestinal periodo: Verano-otoño: Primer año* [Trabajo final de grado]. Universidad de la República.  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/25331/1/CotroSoutoLuisaBeatriz.pdf>
- Cozzi, G., Dorigo, M., Gottardo, F., Berzaghi, P., & Andrighetto, I. (2005). Effects of alfalfa germplasm and stage of maturity on digestive process and productive response of dairy cows fed alfalfa hay-based diets. *Italian Journal of Animal Science*, 4(3), 211-221.  
<https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.4081/ijas.2005.211?needAccess=true&role=button>
- Cozzolino, D., & Fassio, A. (1995). *Ensilaje de maíz: Cultivares y calidad*. INIA.  
<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2971/1/111219240807134706.pdf>
- Crampton, E. W., & Harris, L. E. (1969). *Applied animal nutrition*. Freeman.



- D'Agosto, M., & Carneiro, M. E. (1999). Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16(3), 725-729.  
<https://www.scielo.br/j/rbzool/a/rGWXF5p7LtqSTkD4mL4CBKz/?lang=en>
- Elizalde, H. R., Carrillo, M. J. M., & Suárez, D. H. (2008). *Evaluación de un programa de alimentación suplementado con cultivos de levaduras vs. el uso de un  $\beta$ -agonista en bovinos para carne finalizados en confinamiento* [Tesis de grado]. Universidad Autónoma de Chapingo. <https://rb.gy/hnxjtu>
- Elizondo-Salazar, J. & Monge, C. (2020). Fistulación en bovinos y uso de la técnica de degradabilidad ruminal para análisis de alimentos. *Nutrición Animal Tropical*, 14(2), 209-229.  
<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/nutrianimal/article/view/45167/44945>
- Enríquez Espinoza, E. & Huamán Vilca, G. (2022). *Valor nutritivo y cinética de la degradación ruminal del heno de alfalfa, residuos agrícolas, maíz chala con y sin levadura de pan (*Saccharomyces cereviceae*)* [Tesis de grado]. Universidad de Huancavelica.  
<https://apirepositorio.unh.edu.pe/server/api/core/bitstreams/3cc4592e-0d25-4781-bae5-1f933f43ad27/content>
- Fajardo Sokol, M. (2013). *Integración de pastura y dietas totalmente mezcladas en la alimentación de vacas Holando a inicio de lactancia* [Tesis de maestría]. Universidad de la República.  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/1867/1/0109faj.pdf>
- Fariña, S. R., & Chilbroste, P. (2019). Opportunities and challenges for the growth of milk production from pasture: The case of farm systems in Uruguay. *Agricultural Systems*, 176, 102631.  
<https://doi.org/10.1016/j.agsy.2019.05.001>
- Fernández, M., López, S., Rodríguez, A. B., García-González, R., Frehner, M., & González, J. S. (2005). Efecto del aditivo CRINA® sobre la actividad fermentativa ruminal in vitro. *ITEA, extra*(26), 566-568.  
<https://rb.gy/d7n7sk>

- Fernández, M., Serrano, E., Frutos, P., Giráldez, F. J., Mantecón, A. R., & Llach, J. R. (1997). Efecto del aditivo Crina HC sobre la actividad fermentativa ruminal en la especie ovina. *ITEA, extra*(18), 160-162.  
<https://digital.csic.es/handle/10261/16143>
- Fierros Rodríguez, J. A. (2019). *Efecto de la suplementación de aceites esenciales y monensina sobre el metabolismo ruminal y digestión en tracto total en novillos Holstein alimentados con una dieta de finalización* [Tesis de grado]. Universidad Autónoma de Baja California.
- Flores, A. J., Garcarena, A. D., Vieyra, J. M. H., Beauchemin, K. A., & Colombatto, D. (2013). Effects of specific essential oil compounds on the ruminal environment, milk production and milk composition of lactating dairy cows at pasture. *Animal Feed Science and Technology*, 186(1-2), 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.09.001>
- Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. (2016). *Avena*.  
[http://www.fundacionfedna.org/ingredientes\\_para\\_piensos/avena](http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/avena)
- Galindo, J., & Marrero, Y. (2005). Manipulación de la fermentación microbiana ruminal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 39, 439-448.  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193017842006>
- Geraci, J. I., Garcarena, A., Gagliostro, G., Beauchemin, K., & Colombatto, D. (2012). Plant extracts containing cinnamaldehyde, eugenol and capsicum oleoresin added to feedlot cattle diets: Ruminal environment, short term intake pattern and animal performance. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1-4), 123-130.  
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.015>
- Giraldo, L., Gutiérrez, L., & Rúa, C. (2007). Comparación de dos técnicas in vitro e in situ para estimar la digestibilidad verdadera en varios forrajes tropicales. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20, 269-279.  
<http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v20n3/v20n3a05.pdf>

- González, D., Ruiz, M., Romero, F., & Pezo, D. (1990). Recomendaciones sobre la utilización de los métodos in vitro, in situ y enzimático en el estudio de la digestión de alimentos. En M. E. Ruiz, & A. Ruiz (Eds.), *Nutrición de rumiantes, guía metodológica de investigación* (pp. 127-140). IICA-RISPAL. <https://rb.gy/6671jc>
- Hernández Martínez, B., Murillo Ortiz, M., Pámanes Carrasco, G., Reyes Estrada, O., & Herrera Torres, E. (2017). Parámetros de fermentación y cinética ruminal en novillos suplementados con diferentes aditivos. *Investigación y Ciencia*, 25(72), 5-11. <https://www.redalyc.org/pdf/674/67453654001.pdf>
- Instituto Nacional de la Leche. (s.f.). *Uruguay lechero*. <https://www.inale.org/uruguay-lechero/>
- Instituto Nacional de Semillas, & Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. (2021). *Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de especies forrajeras: Anuales, Bianauales y Perennes*. <https://rb.gy/anbupq>
- Jalilvand, G., Naserian, A., Kebreab, E., Odongo, N. E., Valizadeh, R., Eftekhari Shahroodi, F., Lopez, S., & France, J. (2008). Rumen degradation kinetics of alfalfa hay, maize silage and wheat straw treated with fibrolytic enzymes. *Archivos de Zootecnia*, 57(218), 155-164. <https://rb.gy/v2xcme>
- Kolver, E. S., & Muller, L. D. (1998). Performance and Nutrient Intake of High Producing Holstein Cows Consuming Pasture or a Total Mixed Ration. *Journal of Dairy Science*, 81(5), 1403-1411. [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(98\)75704-2/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(98)75704-2/pdf)
- Martínez Fernández, G. (2013). *Estudio del mecanismo de acción de los compuestos que modifican la fermentación ruminal en pequeños rumiantes* [Tesis de doctorado]. Universidad de Córdoba. <https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/11407/2013000000839.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Mattiauda, D. A., Tamminga, S., Gibb, M. J., Soca, P., Bentancur, O., & Chilbroste, P. (2013). Restricting access time at pasture and time of grazing allocation for Holstein dairy cows: Ingestive behaviour, dry matter intake and milk production. *Livestock Science*, 152(1), 53-62.  
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.12.010>
- McDonald, P. (2006). *Nutrición animal*. (6ta. ed.). Acribia.
- Meikle, A., Cavestany, D., Carriquiry, M., Adrien Delgado, M. L., Artegoitia, V., Pereira, I., Reprechter, G., Pessina, P., Rama, G., Fernandez, A., Breijo, M., Laborde, D., Pritsch, O., Ramos, de Torres, E., Nicolini, P., Mendoza, A., Dutour, J., Fajardo, M., ... Chilbroste, P. (2013). Avances en el conocimiento de la vaca lechera durante el período de transición en Uruguay: Un enfoque multidisciplinario. *Agrociencia (Uruguay)*, 17(1), 141-152. <https://doi.org/10.31285/AGRO.17.528>
- Methol, M. (1997). *Heno: Valor nutritivo y factores que afectan su calidad*. INIA.
- Mieres, J. (Ed.). (2004). *Guía para la alimentación de rumiantes*. INIA.  
<http://www.inia.uy/publicaciones/documentos%20compartidos/111219240807141556.pdf>
- Mirabá Rosales, C. C. (2015). *Cinética de degradación y digestibilidad del forraje verde hidropónico de maíz (Zea maíz) en cabras criollas en Santa Elena, Ecuador* [Tesis de grado]. Universidad Estatal Península de Santa Elena.  
<https://repositorio.upse.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/46000/2214/UPSE-TIA-2015-006.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- National Research Council. (1978). *Nutrient requirements of dairy cattle*. (5th ed. rev.). National Academy Press.
- National Research Council. (1996). *Nutrient requirement of beef cattle*. (7th ed.). National Academy Press.
- National Research Council. (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle*. (7th ed. rev.). National Academy Press.

- Nogueira, S. C. (2011). *Suplementación con mezcla comercial de taninos de quebracho y castaño en vacas lecheras* [Trabajo final de grado]. Universidad Católica Argentina.  
<https://repositorio.uca.edu.ar/bitstream/123456789/445/1/doc.pdf>
- Oficina de Estadísticas Agropecuarias. (2021). *Anuario Estadístico Agropecuario*. MGAP.  
<https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2021/LIBRO%20ANUARIO%202021%20Web.pdf>
- Ornaghi, M. G., Passetti, R. A. C., Torrecilhas, J. A., Mottin, C., Vital, A. C. P., Guerrero, A., & Prado, I. N. (2017). Essential oils in the diet of young bulls: Effect on animal performance, digestibility, temperament, feeding behaviour and carcass characteristics. *Animal Feed Science and Technology*, 234, 274-283.  
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.10.008>
- Owens, F. N., & Zinn, R. (1993). Metabolismo de la proteína en los rumiantes. En C. D. Church, *El rumiante: Fisiología digestiva y nutrición* (pp. 255-281). Acribia.
- Pérez Ruchel, A. (2006). *pH, amoníaco, ácidos grasos volátiles y producción de proteína microbiana en el rumen de corderos, según el horario de corte de la pastura consumida* [Trabajo final de grado]. Universidad de la República.  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19333/1/FV-26844.pdf>
- Perrachon Ariztia, J. (2020). ¿Qué gramínea perenne es mejor para Uruguay, Dactylis o Festuca? *Revista del Plan Agropecuario*, (173), 54-57.  
[https://www.planagropecuario.org.uy/uploads/magazines/articles/188\\_2915.pdf](https://www.planagropecuario.org.uy/uploads/magazines/articles/188_2915.pdf)
- Pinos Rodríguez, J., & González Muñoz, S. (2000). Efectos biológicos y productivos de los ionóforos en rumiantes. *Interciencia*, 25(8), 379-385.  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33905004>

- Pirela, M. (2005). Valor nutritivo de los pastos tropicales. En C. González-Stagnaro, & E. Soto Belloso (Eds.), *Manual de ganadería doble propósito* (pp. 176-182). Fundación GIRARZ. <https://docplayer.es/13269504-valor-nutritivo-de-los-pastos-tropicales.html>
- Plaizier, J. C., Martin, A., Duffield, T., Bagg, R., Dick, P., & McBride, B. W. (2000). Effect of a prepartum administration of monensin in a controlled-release capsule on apparent digestibilities and nitrogen utilization in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 83(12), 2918-2925. [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(00\)75192-7/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(00)75192-7/pdf)
- Pordomingo, A., Kent, F., Volpi-Lagrecia, G., & Alende, M. (2010). Efecto del nivel de alimentación en recria a corral sobre la respuesta animal en el pastoreo subsiguiente. *Revista Argentina de Producción Animal*, 30(10), 131-141. <http://www.aapa.org.ar/rapa/30/2/001-NA855-Pordomingo.pdf>
- Reglamento (CE) n° 1831/2003: del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal. (2003, 18 de octubre). *Diario Oficial de la Unión Europea*, L268, 29-43. <https://www.boe.es/doue/2003/268/L00029-00043.pdf>
- Roman-Garcia, Y., Denton, B. L., Mitchell, K. E., Lee, C., Socha, M. T., & Firkins, J. L. (2021). Conditions stimulating neutral detergent fiber degradation by dosing branched-chain volatile fatty acids. I: Comparison with branched-chain amino acids and forage source in ruminal batch cultures. *Journal of dairy science*, 104(6), 6739-6755. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-20054>
- Romero, F. (1990). Utilización de la técnica de digestión in situ para la caracterización de forrajes. En M. E. Ruiz, & A. Ruiz (Eds.), *Nutrición de rumiantes, guía metodológica de investigación* (pp. 105-114). IICA-RISPAL.
- Romero, N., Comerón, E., & Ustarroz, E. (1995). *Manejo y utilización de la alfalfa*. Sitio Argentino de Producción Animal. <https://rb.gy/3d1lru>

- Rueda Camero, J. A. (2019). *Evaluación de la inclusión de aceites esenciales de ajo (*Allium sativum*) y orégano (*Origanum vulgare*) en dietas para rumiantes como aditivo sobre la digestibilidad* [Tesis de grado]. Universidad Cooperativa de Colombia.  
<https://repository.ucc.edu.co/server/api/core/bitstreams/f5302a56-7460-467f-9844-b1b9d64c257a/content>
- Rufino, P. J., Blanco, M., & Joy, M. (2021). Taninos condensados de la esparceta y su efecto sobre los parámetros de la fermentación ruminal: Influencia del estado fenológico y de la conservación: Revisión bibliográfica. *Información Técnica Económica Agraria*, 117(3), 227-246.  
<https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/itea/revistas/2021/117-3/227-246%20ITEA%20117-3.pdf>
- Soriano, F. D., Polan, C. E., & Miller, C. N. (2001). Supplementing pasture to lactating Holsteins fed a total mixed ration diet. *Journal of dairy science*, 84(11), 2460-2468. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74696-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74696-6)
- Suárez-Machín, C., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2017). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la alimentación de rumiantes. *ICIDCA, Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 51(2), 21-30.  
<https://www.redalyc.org/pdf/2231/223154251004.pdf>
- Tager, L. R., & Krause, K. M. (2011). Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 94(5), 2455-2464.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3505>
- Tekeli, A., Yıldız, G., Drochner, W., & Steingass, H. (2015). Efficacy of essence oil supplementation to feeds on volatile fatty acid production. *Revista MVZ Córdoba*, 20(supl.), 4884-4894.  
<https://revistamvz.unicordoba.edu.co/article/view/4/7>
- Tekippe, J. A., Hristov, A. N., Heyler, K. S., Cassidy, T. W., Zheljzkov, V. D., Ferreira, J. F., Karnati, S. K., & Varga, G. A. (2011). Rumen fermentation and production effects of *Origanum vulgare* L. leaves in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 94(10), 5065-5079.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2010-4095>

- Temez, S. (2022, 25 de julio). *Importancia de los ácidos grasos volátiles en la alimentación de los bovinos*. Ganadería.com. <https://rb.gy/kphcej>
- Trujillo, A. (2006). *Comparación de una técnica in situ y una técnica in vitro para estimar la cinética de degradación en alimentos para rumiantes* [Tesis de maestría]. Universidad de la República. <https://rb.gy/jcvtx>
- Trujillo, A. I., & Uriarte, G. (2015). *Valor nutritivo de las pasturas*. Universidad de la República.  
[http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/ALIMENTOS%20RUMIANTES/Trujillo\\_Uriarte.VALOR\\_NUTRITIVO\\_PASTURAS.pdf](http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/ALIMENTOS%20RUMIANTES/Trujillo_Uriarte.VALOR_NUTRITIVO_PASTURAS.pdf)
- Van Lier, E., & Regueiro, M. (2008). *Digestión en retículo-rumen*. Facultad de Agronomía.  
<http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/AFA/TEORICOS/Repartido-Digestion-en-Reticulo-Rumen.pdf>
- Van Soest, J. P. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Comstock.
- Van Soest, J. P., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597.
- Villalobos González, C., González Valenzuela, E., & Ortega Santos, J. A. (2000). Técnicas para estimar la degradación de proteína y materia orgánica en el rumen y su importancia en rumiantes en pastoreo. *Técnica Pecuaria en México*, 38(2), 119-134.
- Volpi Lagreca, G., Alende, M., Pordomingo, A., Babinec, F. J., & Ceron Cucchi, M. E. (2013). Engorde de bovinos a corral: Efectos de monensina y de dos niveles de taninos condensados de quebracho sobre el comportamiento productivo, la fermentación ruminal y la degradabilidad in situ de la materia seca y de la proteína. *Revista Argentina de Producción Animal*, 33(2), 65-77. <http://www.aapa.org.ar/rapa/33/2/001-NA-Volpi%20Lagreca%20y%20otros.pdf>



- Yang, W. Z., Ametaj, B. N., Benchaar, C., He, M. L., & Beauchemin, K. A. (2010). Cinnamaldehyde in feedlot cattle diets: Intake, growth performance, carcass characteristics, and blood metabolites. *Journal of animal science*, 88(3), 1082-1092. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1608>
- Yokoyama, M. T., & Johnson, K. A. (1993). Microbiología del rumen e intestino. En C. D. Church (Ed.), *El rumiante: Fisiología digestiva y nutrición* (pp. 137-158). Acribia.
- Zavaleta, E. (1998). *Los ácidos grasos volátiles, fuente de energía en los rumiantes*. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol1/CVv1c09.pdf>
- Zubizarreta, J., Gallardo, M., Romero, L., Gaggiotti, M., & Coméron, E. (2006). Manual de actualización técnica en calidad en forrajes conservados. *Publicación Miscelánea*, 6(4), 56-62. <https://rb.gy/biyq76>
- Ørskov, E. R., & McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, 92(2), 499-503.
- Ørskov, E. R., Deb Hovell, F. D., & Mould, F. (1980). The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. *Tropical Animal Production*, 5(3), 195-213. [https://www.cipav.org.co/TAP/TAP/TAP53/53\\_1.pdf](https://www.cipav.org.co/TAP/TAP/TAP53/53_1.pdf)