



# UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE GRADUADOS

EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PRODUCTIVOS Y METABÓLICOS EN VACAS  
LECHERAS SUPLEMENTADAS CON NABO (*Brassica rapa ssp. rapa* L.) Y RAPS  
FORRAJEROS (*Brassica napus ssp. biennis* L.)

TESIS DE MAGISTER

MIGUEL ÁNGEL CASTILLO UMAÑA

VALDIVIA – CHILE

2018

**EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PRODUCTIVOS Y METABÓLICOS EN VACAS  
LECHERAS SUPLEMENTADAS CON NABO (*Brassica rapa ssp. rapa* L.) Y RAPS  
FORRAJEROS (*Brassica napus ssp. biennis* L.).**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de Magíster en Ciencias mención Producción Animal.

Por

**MIGUEL ÁNGEL CASTILLO UMAÑA**

**VALDIVIA – CHILE**

**2018**

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Facultad de Ciencias Agrarias

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER**

La Comisión Evaluadora de Tesis comunica al Director de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Agrarias que la tesis de Magíster presentada por el candidato

**MIGUEL ÁNGEL CASTILLO UMAÑA**

Ha sido aprobada en el examen de defensa de Tesis rendido el día 23 de enero de 2018, como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias mención Producción Animal. Y, para que así conste para todos los efectos firman:

Profesor Patrocinante de Tesis:

**Dr. Juan Pablo Keim San Martín**

Facultad de Ciencias Agrarias  
Universidad Austral de Chile

---

Comisión Evaluadora de Tesis:

**Dr. Oscar Balocchi Leonelli**

Facultad de Ciencias Agrarias  
Universidad Austral de Chile

---

**Dr. Rubén Pulido Fuenzalida**

Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Austral de Chile

---

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Universidad Nacional de Costa Rica, la cual me facilitó los recursos para poder llevar a cabo mis estudios de postgrado.

A mi profesor patrocinante de tesis, Dr. Juan Pablo Keim, por su apoyo y colaboración en el desarrollo de la tesis.

Y a los académicos y administrativos del Instituto de Produccion Animal de la Universidad Austral de Chile, por su buena disposición y colaboracion en mi proceso de estudio.

A mi esposa Yeidy Molina Porras y mis hijos  
Santiago, Samanta y Sofia por su gran amor y apoyo.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Capítulo		Página
	RESUMEN	1
	ABSTRACT	4
1	INTRODUCCION	6
1.1	ANTECEDENTES	6
1.1.1	Brásicas forrajeras (rendimiento agronómico y calidad nutricional)	7
1.1.2	Utilización de BF en la alimentación de vacas lecheras.	9
1.2	EFFECTO DE SUPLEMENTACIÓN CON BRASICAS FORRAJERAS SOBRE LA FISIOLOGIA RUMINAL	10
1.2.1	FERMENTACIÓN RUMINAL	11
1.2.1.1	Producción de ácidos grasos volátiles en el rumen.	11
1.2.1.2	pH ruminal	12
1.2.1.3	Metabolismo del nitrógeno a nivel ruminal y síntesis de proteína microbiana.	13
1.3	COMPORTAMIENTO INGESTIVO EN VACAS LECHERAS.	18
1.4	HIPÓTESIS DEL TRABAJO	20
1.5	OBJETIVO GENERAL:	20
1.6	OBJETIVOS ESPECIFICOS:	20
2	MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1	UBICACIÓN DEL ESTUDIO	21
2.2	ALOJAMIENTO DE LOS ANIMALES	21
2.3	ALIMENTACIÓN	22
2.3.1	Ofrecimiento de los alimentos	25
2.3.2	Cosecha de las BF	25
2.4	MANEJO DIARIO Y RUTINA DE LOS ANIMALES	26
2.5	ANÁLISIS REALIZADOS EN LOS ALIMENTOS	26
2.6	OBTENCIÓN DE DATOS, TOMA Y ANÁLISIS DE MUESTRAS.	27

2.6.1	Producción de leche.	27
2.6.2	Análisis de calidad de leche.	27
2.6.3	Consumo de alimentos	28
2.6.4	Observaciones de comportamiento	28
2.6.5	pH ruminal	29
2.6.6	Determinación de Ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal	29
2.6.6.1	Toma de muestras de licor ruminal	29
2.6.6.2	Análisis de muestras de licor ruminal	29
2.6.7	Determinación de síntesis de proteína microbiana a partir de derivados de purinas.	30
2.6.8	Eficiencia del uso del nitrógeno para la síntesis de proteínas lácteas	32
2.6.9	Análisis de perfiles sanguíneos.	32
2.7	Diseño experimental y Análisis Estadístico	33
3	RESULTADOS	37
3.1	PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LECHE	37
3.2	CONSUMO DE MATERIA SECA, NUTRIENTES E INGREDIENTES	38
3.3	ACTIVIDADES DE COMPORTAMIENTO	39
3.4	FERMENTACIÓN RUMINAL	44
3.4.1	Concentración de ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal	44
3.4.2	pH RUMINAL	47
3.4.3	Metabolismo del nitrógeno y síntesis de proteína microbiana	48
3.5	PARAMETROS SANGUINEOS	50
3.5.1	Hemograma, GGT y Urea en Sangre.	50
3.5.2	Hormonas tiroideas.	52
4	DISCUSIÓN	53

4.1	PRODUCCIÓN, COMPOSICIÓN DE LECHE, CONSUMO DE MS Y NUTRIENTES	53
4.1.1	Producción de leche, consumo de materia seca y nutrientes.	53
4.1.2	Consumo de ingredientes y nutrientes.	55
4.1.3	Composición de leche.	57
4.2	ACTIVIDADES DE COMPORTAMIENTO INGESTIVO	58
4.3	CONCENTRACION DE ACIDOS GRASOS VOLÁTILES	60
4.4	pH RUMINAL	63
4.5	METABOLISMO DEL NITRÓGENO Y SINTESIS DE PROTEINA MICROBINA	65
4.5.1	Análisis de urea en leche y en sangre.	65
4.5.2	Análisis del nitrógeno amoniacal	66
4.5.3	Síntesis de N microbiano y proteína microbiana.	67
4.6	PERFILES SANGUÍNEOS	69
5	CONCLUSIONES	71
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		Página
1	Distribución de la ración alimenticia para los tratamientos y grupo control.	22
2	Promedio y desviación estándar de la composición nutricional del alimento concentrado, afrecho de soya, ensilaje de pradera, nabo y raps ofrecidos en la alimentación.	23
3	Composición nutricional de la dieta control, y dieta suplementada con RF y NF, consumida por los animales.	24
4	Contenido de materia seca y relación de los componentes hoja: tallo en RF y hoja raíz en NF.	25
5	Distribución de tratamientos para cada una de las vacas por periodo experimental.	34
6	Asignación de códigos a las distintas secuencias de aplicación de tratamientos.	36
7	Efecto de la suplementación en vacas lecheras con RF y NF sobre la producción y calidad de leche.	37
8	Efecto de la suplementación en vacas lecheras con RF y NF sobre el consumo de materia seca total, materia seca digestible, ingredientes y nutrientes.	39
9	Porcentaje de tiempo y cantidad de minutos que vacas lecheras suplementadas con RF y NF y sin suplementar, destinan a actividades de comportamiento ingestivo.	40
10	Concentración y proporción molar de ácidos grasos volátiles y amonio en licor ruminal	46
11	pH promedio y tiempo bajo límites específicos de pH ruminal en vacas suplementadas con BF y una dieta control.	48
12	Indicadores del metabolismo del nitrógeno, concentración, excreción de derivados de purinas y síntesis de proteína microbiana.	50
13	Media de mínimos cuadrados y error estándar de parámetros sanguíneos de vacas suplementadas con NF, RF y dieta control.	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Distribución de actividades (comer, rumiar o sin actividad) que se encontraban realizando las vacas consumiendo una dieta control.	43
2	Distribución de actividades (comer, rumiar o sin actividad) que se encontraban realizando las vacas suplementadas con NF.	43
3	Distribución de actividades (comer, rumiar o sin actividad) que se encontraban realizando las vacas suplementadas con RF.	43
4	pH ruminal en vacas suplementadas con NF, RF y dieta control	48

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO		Página
1	pH ruminal de vacas suplementadas con NF, RF y dieta control	86

## ÍNDICE DE ABREVIACIONES

°C	Grados celsius
AA	Aminoácidos
AGVs	Ácidos grasos volátiles
BF	Brásica forrajera
C	Constante de excreción de creatinina
CAlant	Concentración de alantoína
CAU	Concentración de ácido úrico
CCreat	Concentración de creatinina
cC2	Concentración de ácido acético
cC3	Concentración de ácido propiónico
cC4	Concentración de ácido butírico
cCap	Concentración de ácido caprónico
clsbut	Concentración de ácido isobutírico
clsoval	Concentración de ácido isovalérico
cVal	Concentración de ácido valérico
cAGVscr	Concentración de ácidos grasos de cadena ramificada
cAGVt	Concentración de ácidos grasos totales
C3:C2	Relación ácido acético: ácido propiónico
(C2+C3):C4	Relación (ácido acético mas propiónico):ácido butírico
CHOs	Carbohidratos
CMS	Consumo de materia seca
CO	Concentración de creatinina
CTot	Cenizas totales
CT	Creatinina total excretada
De	Degradabilidad efectiva
DP	Derivados de purinas
DPe	Excreción diaria de derivados de purinas
DPB	De pie bebiendo
DPC	De pie comiendo
DPR	De pie rumiando
DPS	De pie sin actividad
EAlant	Excreción de alantoína
EAU	Excreción de ácido úrico
EC	Echada comiendo
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EEAA	Estación Experimental Agropecuaria Austral
EE	Extracto etéreo
EEM	Error estándar de la media
EM	Energía Metabolizable
ER	Echada rumiando
ES	Echada sin actividad
FDA	Fibra detergente ácido
FDN	Fibra detergente neutro
fL	Onza fluida
GGT	Gama glutamil transpeptidasa

hrs	Horas
ha	Hectárea
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IEU	Índice de excreción urinaria
INIA	Instituto de Investigaciones Agropecuarias
kg	Kilogramo
$K_{ct}$	Coefficiente de excreción diaria de creatinina
LCE	Leche corregida por energía
$L \text{ día}^{-1}$	Litros por día
$\text{mg día}^{-1}$	Miligramos por día
$\text{mg Kg}^{-1}$	Miligramos por kilogramo
$\text{mg L}^{-1}$	Miligramos por litro
Mcal	Mega caloría
ml	mililitro
MJ	Mega joules
$\text{mmol L}^{-1}$	Milimoles por litro
$\text{mmol día}^{-1}$	Milimoles por día
MS	Materia seca
N	Nitrógeno
$N_{cons}$	Nitrógeno consumido
$N_{mic}$	Nitrógeno microbiano
$N_{mic}/\text{Kg MS}$	Síntesis de nitrógeno microbiano por Kg de MS
NF	Nabo Forrajero
$\text{NH}_3$	Amoniaco
$\text{NH}_4^+$	Amonio
$N_{retL}$	Nitrógeno retenido en leche
PB	Proteína bruta
pC2	Proporción de ácido acético
pC3	Proporción de ácido propiónico
pC4	Proporción de ácido butírico
pCap	Proporción de ácido caprónico
pIsobut	Proporción de ácido isobutírico
pIsoval	Proporción de ácido isovalérico
pVal	Proporción de ácido valérico
pAGVcr	Proporción de ácidos grasos de cadena ramificada
pH	Potencial de ion $\text{H}^+$
PL	Producción de leche
PMt	Síntesis de proteína microbiana total
PV	Peso vivo
P/V	Peso en volumen
RF	Raps Forrajero
RPM	Revoluciones por minuto
SMCO	Sulfóxido de metil cisteína
ton	Tonelada
T3	Triyodotironina
T4	Tetrayodotironina

## RESUMEN

El componente alimenticio en los sistemas de producción de leche es de gran importancia para el éxito productivo. La pradera cumple un rol fundamental para lograr esto, debido a su valor nutricional y relativo bajo costo, no obstante dependiendo de las condiciones ambientales su aporte en cuanto a cantidad y calidad podría ser variable.

Es así como las brásicas forrajeras como el nabo forrajero (*Brassica rapa*) y raps forrajero (*Brassica napus*) se presentan como un alternativa viable y de alto potencial para cubrir deficiencias alimenticias, debido a sus características nutricionales, su adaptabilidad a ciertas condiciones edafoclimáticas y su menor costo respecto a otras alternativas. Sin embargo, resultados de estudios previos de evaluación alimenticia con estos alimentos son algo escasos, limitados y con repuestas productivas poco consistentes.

Como objetivo del presente trabajo se plantea determinar el efecto de la suplementación con nabo y raps forrajero sobre el consumo total de materia seca, producción y composición de leche, fermentación ruminal, parámetros sanguíneos y comportamiento ingestivo en vacas lecheras.

El estudio se llevó a cabo entre enero y marzo de 2017 en la Estación Experimental Agropecuaria Austral de la Universidad Austral de Chile. Se utilizaron 12 vacas multíparas con 75 a 100 días de lactancia. Éstas fueron estabuladas y manejadas en cubículos individuales. Los 12 animales pasaron por cada uno de los tratamientos en un diseño cuadrado latino de 3x3 replicado (tres tratamientos y tres periodos) y balanceado para efectos residuales. Los tratamientos correspondieron a: dieta control (16,2 kg de ensilaje de pradera, 2,25 kg afrecho de soya y 2,25 kg de alimento concentrado comercial), 75% dieta control + 25% nabo forrajero y 75% dieta control + 25% raps forrajero.

Cada periodo experimental fue de 21 días, correspondiente a 14 días de acostumbramiento a la dieta y 7 días de evaluación. En la última semana de cada periodo experimental, se midió la producción, composición de leche, consumo de materia seca, ingredientes y nutrientes. Además, se estimó la síntesis de proteína microbiana y se determinó la concentración de ácidos grasos volátiles y el pH ruminal. También se evaluó el comportamiento ingestivo y perfiles sanguíneos de cada una de las vacas.

Al evaluar los resultados, se determinó que la inclusión de brásicas forrajeras en la ración alimenticia, no tuvo efecto sobre la producción y composición de la leche. La producción promedio fue de 24,2 kg vaca día<sup>-1</sup>. El porcentaje de grasa en leche fue de 4,32 y el de proteína de 3,36.

El consumo de materia seca total, fue 0,98 kg y 1,12 kg menor cuando las vacas se suplementaron con raps y nabo respectivamente en comparación a la dieta control, no obstante no hubo diferencia si la suplementación fue con nabo o con raps. Cuando las vacas se suplementaron con nabo forrajero el tiempo de consumo fue 46 y 98 minutos mayor, en comparación a cuando se suplementaron con raps y la dieta control respectivamente. También permanecieron 52 minutos más comiendo cuando se suplementaron con raps respecto a cuándo se les ofreció la dieta control. Por el contrario las vacas permanecieron 42 y 61 minutos más de tiempo rumiando cuando se les ofreció la dieta control en comparación a cuando se les ofreció la ración suplementada con raps y nabo.

El pH ruminal presentó diferencias después de la 5:00 pm y hasta por un máximo de 6 horas diarias, siendo menor cuando las vacas consumieron nabo en comparación a cuando no fueron suplementadas con brásicas, sin embargo en promedio, el pH no descendió bajo 5,9 con ninguna de las raciones.

La concentración molar de ácidos grasos volátiles totales fue mayor con la ración suplementada con nabo en comparación a la dieta control, sin embargo no fue superior a la ración con raps. La proporción del ácido acético fue superior con la dieta suplementada con raps en horas de la tarde con un valor del 68,6 mmol mol<sup>-1</sup>, no obstante al suplementar con raps también se presentó el valor más bajo de proporción de ácido propiónico en horas de la tarde. Para el ácido butírico, la proporción fue mayor con la dieta suplementada con nabo y raps en comparación a la dieta control, con valores del 13,09 mmol mol<sup>-1</sup> y 12 mmol mol<sup>-1</sup> respectivamente. La proporción de ácidos grasos de cadena ramificada fue menor en horas de la tarde con las dietas suplementadas con nabo y raps respecto a la dieta control; con un valor del 2,47 y 2,73 mmol mol<sup>-1</sup> respectivamente; mientras que la relación acetato:propionato fue incrementada 6 h después de la suplementación con raps.

La estimación de síntesis de proteína microbiana fue  $557 \text{ g día}^{-1}$  mayor al suplementar raps comparado a cuando las vacas consumieron la dieta control. Además, no se observaron diferencias entre la suplementación con nabo y la dieta control.

También, se determinó mediante perfiles sanguíneos, que la inclusión de brásicas forrajeras en la ración en los niveles consumidos, no fue un factor que modificara la condición de salud de los animales, asociados a la ingestión de compuestos antinutricionales presentes en la brásicas forrajeras.

Palabras clave: Producción de leche, raps, nabo, fermentación ruminal.

## ABSTRACT

Feeding represents one of the most important factors in milk production systems. Pasture consumption reduces production costs and increases profitability, due to its nutritional value and relative low cost. However, pasture availability and quality varies according to environmental conditions such temperature and rainfall. Forage brassicas, such as summer turnip (*Brassica rapa*) and fodder rape (*Brassica napus*), are used as supplementary crops during summer, due to their nutritional characteristics, their adaptability to climatic and soil conditions and their lower cost compared to other alternatives. However, studies with lactating dairy cows fed these forages are limited and with inconsistent productive responses.

The aim of this study was to determine the effect of the supplementation with turnip and fodder rape on dry matter intake, milk production and composition, ruminal fermentation, blood parameters and ingestive behavior in lactating dairy cows.

The study was carried out between January and March 2017 at the Austral Agricultural Experimental Station of the Austral University of Chile. We used 12 multiparous cows with 75 to 100 days in milk. They were kept and handled in individual cubicles. The experimental design was a 3x3 (three treatments and three periods) replicated latin square, balanced for carryover effects. The treatments corresponded to: control diet (16.2 kg of grass silage, 2.25 kg soybean meal and 2.25 kg of commercial concentrated feed), 75% control diet + 25% summer turnip and 75% control diet + 25% fodder rape.

Each experimental period considered 21 days, corresponding 14 days of adaptation to the diet and 7 days of evaluation. In the last week of each experimental period, milk production and composition, dry matter ingredients and nutrient consumption were measured. In addition, the synthesis of microbial protein was estimated and the concentration of volatile fatty acids and ruminal pH were determined. The ingestive behavior and blood profiles of each cow were also evaluated.

The inclusion of forage brassica had no effect on milk production and composition. The average production was 24.2 kg cow day<sup>-1</sup>. The percentage of fat in milk was 4.32; and the protein 3.36.

The dry matter intake was 0.98 kg and 1.12 kg lower when the cows were supplemented with rape and turnip respectively compared to the control diet, with no difference among brassica species. Cows spent 46 and 98 more minutes eating (in 11 hours of observation) when they were supplemented with turnip compared to fodder rape supplementation and the control diet. On the opposite, cows rumination time was 42 and 61 minutes longer for the control diet compared to rape and turnips supplementation respectively.

The ruminal pH showed differences after 5:00 pm and up to a maximum of 6 hours a day, being lower when the cows consumed turnip compared to control diet, however, rumen pH did not decrease under 5.9 for any of the dietary treatments.

The molar concentration of total volatile fatty acids increased with turnip supplementation compared to the control diet, whereas rape supplementation did not differ with any of the other two dietary treatments. A higher proportion of acetic acid ( $68.5 \text{ mmol mol}^{-1}$ ) and lower proportion of propionic acid was observed with forage rape after 6h of supplementation, whereas no differences among dietary treatments was observed prior supplementation. For butyric acid, the proportion was higher with turnip and rape supplementation with values of  $13.1 \text{ mmol mol}^{-1}$  and  $12 \text{ mmol mol}^{-1}$  respectively. After 6 h from brassica supplementation, the proportion of branched-chain fatty acids was lower for cows supplemented with rape and turnip compared to the control diet; with a value of 2.7 and  $2.5 \text{ mmol mol}^{-1}$  and the acetate:propionate ratio after 6h of rape supplementation.

The estimation of microbial protein synthesis was  $557 \text{ g day}^{-1}$  greater when supplementing rape compared to the control diet. In addition, no differences were observed between turnip supplementation and the control diet.

Finally, it was determined by blood profiles, that the inclusion of summer brassica forages did not affect the health condition of the animals, associated with the ingestion of antinutritional compounds present in these forages.

Key words: milk production, rape, turnips, ruminal fermentation.

# 1 INTRODUCCION

## 1.1 ANTECEDENTES

La variación en el crecimiento de las especies forrajeras a través de las estaciones del año provocan cambios en la disponibilidad de forraje kg MS/ha. Esto, es un factor que afecta la producción de leche, debido a generación de balances forrajeros negativos, disminuyendo así la oferta de nutrientes proveniente de la pradera hacia los animales.

Al confrontar la distribución estacional de la producción de las praderas con los requerimientos alimenticios del ganado lechero, se puede apreciar que, dependiendo del sistema de producción, existen importantes déficits tanto en invierno como en verano (Parga *et al.*, 2015).

Con una menor disponibilidad forrajes, la alternativa de los ganaderos para evitar disminución de la productividad de los hatos lecheros, es la suplementación, condición que normalmente aumenta sus costos de producción y disminuye el margen de rentabilidad por litro de leche debido a los precios más altos de éstos, respecto al precio de la pradera.

La competitividad en el sector lechero bovino es alta, y los ganaderos permanecen con la constante amenaza de ser desplazados de la actividad si sus costos de producción se elevan como en el caso de la suplementación excesiva con alimentos de alto costo como los concentrados. De ahí, se desprende la constante necesidad de buscar alternativas alimenticias, que cumplan con los requisitos de ser alimento de buena calidad nutricional para las vacas, que sean de más bajo costo que otros suplementos y tengan buena disponibilidad en la región donde se desean implementar.

Es así como las brásicas forrajeras (BF) se han convertido en una estrategia ampliamente usada por productores lecheros del sur de Chile y de otras partes del mundo, tanto en época invernal como estival, cuando la pradera presenta su menor tasa de desarrollo. Esto se debe a su buena adaptabilidad a condiciones climáticas y su relativo bajo costo de producción. Sin embargo, aún quedan vacíos en investigación respecto a la utilización de estas plantas como suplemento en la alimentación de las vacas lecheras, siendo necesario evaluar su implementación con respecto a la productividad lechera y los posibles efectos que pueda tener su ingestión sobre la fisiología del animal.

### 1.1.1 Brásicas forrajeras (rendimiento agronómico y calidad nutricional)

Las brásicas son una familia de plantas que están distribuidas por todo el mundo y han sido ampliamente utilizadas en la alimentación humana y animal, para suplir la demanda alimenticia de vacas lecheras en épocas de escases de alimento cuando hay poco desarrollo de la pradera o la calidad de la misma es baja. Esto se da particularmente en invierno y verano (Rattray *et al.*, 2007). Dentro de este grupo de plantas, se encuentran el nabo forrajero (NF) (*Brassica rapa*) y el raps forrajero (RF) (*Brassica napus*) las cuales se utilizan como suplemento para la época estival.

Además, presentan otras ventajas como un buen rendimiento productivo por unidad de superficie y pueden ser cosechadas por el mismo animal; esto es particularmente ventajoso ya que disminuye los costos por su utilización al evitar gastos en corte y acarreo. Sin embargo, algunos autores indican que el valor nutricional para los animales y los rendimientos productivos podrían ser inconsistentes y muy variables (Westwood y Mulcock, 2012; Moate *et al.*, 1998).

En cuanto a su calidad nutricional, las brásicas tienen mayor proporción de carbohidratos fermentables (carbohidratos solubles en agua y pectinas) que carbohidratos estructurales (hemicelulosa y celulosa), en comparación con los pastos utilizados comúnmente como praderas de pastoreo (Barry, 2013; Sun *et al.*, 2015), lo que podría favorecer una mejor fermentabilidad ruminal frente a otras fuentes forrajeras.

El NF, sembrado en primavera, alcanza gran desarrollo en el periodo estival generando raíces comestibles que sobresalen de la superficie del suelo. Los reportes de rendimientos productivos son variables. Parga *et al.* (2015), indican que bajo condiciones climáticas normales en Chile se pueden presentar rendimientos de 10 ton MS/ha pero podría disminuir hasta en un 35 % en años con fuerte sequía estival.

En estas plantas, las hojas representan cerca del 60% y las raíces el 40% del rendimiento total a inicios de verano (enero), situación que tiende a invertirse con el avance de la estación a finales de febrero-principios de marzo, particularmente si el verano es seco (Parga *et al.*, 2015).

En cuanto a calidad nutricional, para el nabo forrajero, Sun *et al.* (2012) en Nueva Zelanda, reportan valores de 10,1% de materia seca (MS); 14,9% de cenizas totales (CTot); 13% de proteína cruda (PC), 23,8% de carbohidratos solubles en agua (CHOS); 9,4 % de pectina; 24% de fibra detergente neutro (FDN); 18% de fibra detergente ácido (FDA) y 6,3% de lignina. Estos valores se presentan en hojas y bulbos en relación 1:1. Además, en cuanto a digestibilidad de materia seca, el mismo autor presenta valores para ovejas de 80,8% y 12,1 MJ de EM/kg de MS. (2,89 Mcal de EM/kg de MS). Por su parte, Moate *et al.* (1998), indican que la digestibilidad de la materia seca de la raíz es superior a la de la hojas, reportando valores de 0,95 y 0,86 respectivamente.

En Chile, Anrique *et al.* (2014) reportan valores para el nabo forrajero en planta entera de 9,68% de materia seca; 12,74% de CTot; 17,9% de PC, 1,21% de extracto etéreo (EE); y 21,17% de FDN. En cuanto al valor energético, el mismo presenta valores para ganado bovino de 2,97 Mcal de EM/kg de MS).

Por su parte, el raps forrajero (*Brassica napus*), se presenta como un cultivo de rápido establecimiento y alta calidad nutricional para ser usado en un pastoreo único o múltiple si las condiciones de fertilidad del suelo y humedad así lo permiten. Se puede iniciar su cosecha alrededor de los 80-120 días después de la siembra y se recomienda dejar luego del pastoreo un residuo de 8-10 cm para un adecuado rebrote. Rattray *et al.* (2007) reportan rendimientos productivos en un rango de 4-9 ton MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en Nueva Zelanda.

Para el raps forrajero, Sun *et al.* (2012) en Nueva Zelanda, indican valores de 12,6% de MS; 14,0% CTot; 19,3% PC, 19,6% de CHOS; 8,9 % de pectina; 23,4% de FDN; 16,3% de FDA y 6,3% de lignina. Estos valores se presentan en hojas y tallos. En cuanto a digestibilidad de MS, el mismo autor presenta valores para ovejas de 80,9 y 13,2 MJ de EM/kg de MS (3,15 Mcal de EM/kg de MS).

También en Chile, Anrique *et al.* (2014), reportan valores para el raps forrajero de 9,65% de MS; 12,59% de CTot; 27,48% de PC y 22,01% FDN. En cuanto a valor energético, el autor reporta para ganado bovino 2,84 Mcal de EM/kg de MS).

### 1.1.2 Utilización de BF en la alimentación de vacas lecheras.

La utilización de Nabo forrajero es común en productores de leche bovina para suplementación estival (Anrique, 2011) y presenta la ventaja de poder ser pastoreado directamente por los animales ya que el cultivo se adapta a la capacidad de pastoreo de los animales. Estas plantas se han ido utilizando para llenar el déficit alimenticio en épocas de varano (Notman, 1994; Stockdale *et al.*, 1997). Sin embargo, algunos autores como Aucal *et al.* (2015), indican que la información en cuanto a la utilización a nivel de campo de este cultivo suplementario y la relación de la inclusión de éste en la dieta con la producción de leche es aún limitada. En un estudio realizado en Chile por Parga *et al.* (2015), reportó una menor producción de leche en vacas cuando fueron alimentadas con pradera suplementada 4 kg de MS de NF, en comparación a otro grupo que fue suplementado con 4 kg de MS de alimento concentrado. Por otra parte, Moate *et al.* (1999), indicaron resultados de menor producción de leche y consumo de MS al ofrecer una ración basada en forraje y suplementada con cebada en comparación a igual ración suplementada con NF.

Otros autores como Lanuza (2011), indican que para vacas en lactancia, no se recomienda incluir en más de un 30% de la ración total expresado en materia seca.

A pesar de que estas plantas presentan un contenido nutricional aceptable para vacas lecheras, su consumo debe ser controlado y esto se debe principalmente a que su ingestión excesiva podría generar problemas metabólicos en los animales, ocasionados por compuestos o metabolitos secundarios que podrían ser factores antinutricionales, como el sulfóxido de metil cisteína (SMCO), glucosinolatos y nitratos (Barry, 2013).

El SMCO es un amino ácido presente en plantas del género *Brassica*, este compuesto es fermentado en el rumen a dimetil disulfido, el cual puede inactivar la hemoglobina y esto ocasionar en el animal anemia hemolítica. La severidad de la anemia depende directamente de la cantidad de SMCO ingerido y de la tasa de degradación de los microorganismos en el rumen (Smith, 1980).

Lo primeros signos clínicos de toxicidad son observado de 3-4 semanas posteriores al inicio de la alimentación con brásicas. Dentro de estos signos están la anemia con una reducción del número de eritrocitos en sangre y la aparición de cuerpos de Heinz, los cuales son

depósitos de metahemoglobina desnaturalizada causada por la oxidación irreversible de la hemoglobina por el dimetil disulfito (Smith, 1980). La anemia ocasionada, puede favorecer un menor consumo voluntario de alimento por parte de los animales, y esto a su vez ocasionar menores rendimientos productivos (Barry, 2013).

Los glucosinolatos, cuando son ingeridos por el animal, son hidrolizados a metabolitos potencialmente tóxicos como el iso tiocianato y nitrilo. El iso tiocianato es un compuesto que tiene efectos negativos sobre la síntesis de hormonas tiroideas como la triyodotironina (T3) y tetrayodotironina (T4) debido a que interfieren con el atrapamiento del yodo por parte de la tiroides, siendo potencialmente bociogénico (agrandamiento de la glándula tiroides) (Cunningham, 1999). El nitrilo por su parte tiene un efecto depresor de consumo voluntario de alimento (Barry, 2013). El nitrato por sí mismo no tiene efectos tóxicos para el animal, sin embargo cuando es reducido a nitrito muy rápidamente y no puede ser convertido a amonio en el rumen, entra en la sangre y convierte la hemoglobina en metahemoglobina, lo que genera anoxia y depresión en el consumo voluntario de alimento (Barry, 2013).

La evaluación de los posibles efectos tóxicos en las vacas, de los factores antinutricionales de las brásicas, se pueden realizar a través de la determinación de perfiles sanguíneos como el hemograma, determinación de cuerpos de Heinz y la actividad plasmática de enzimas como la gamma glutamil transpeptidasa (GGT), la cual permite diagnosticar daño hepático (Noro *et al.*, 2013).

## 1.2 EFECTO DE SUPLEMENTACIÓN CON BRASICAS FORRAJERAS SOBRE LA FISIOLOGIA RUMINAL.

La suplementación con BF al ganado lechero como estrategia alimentación en épocas de escasez de alimento, implica la inclusión de alimentos que la vaca no venía consumiendo regularmente. Esto a su vez, y debido a características propias de la brásicas forrajeras, podrían generar condiciones que afectan la fisiología normal del complejo gástrico del rumiante y por ende su nutrición y condición sanitaria.

Aspectos como el pH ruminal y productos finales de la fermentación como ácidos grasos volátiles (AGVs) y síntesis de proteína microbiana, puede verse afectados bajo modificaciones de la dieta (Contreras y Noro, 2010), como la inclusión de suplementos

como las brásicas. De ahí la importante necesidad de realizar evaluaciones sobre estos parámetros cuando se realiza investigación con distintos suplementos alimenticios como las BF.

### 1.2.1 FERMENTACIÓN RUMINAL

Los animales rumiantes, presentan una adaptación en su sistema digestivo que les permite mediante simbiosis con microorganismos y las enzimas producidas por estos, degradar alimentos altos en fibra como los forrajes mediante la fermentación. El principal producto final de este proceso ruminal son los ácidos grasos volátiles (AGVs) y la biomasa microbial, los cuales son utilizados por el propio rumiante como fuente de energía y proteína (Castillo *et al.*, 2014). No obstante, no todos los productos de la fermentación microbiana son útiles para el rumiante, algunos como el metano y dióxido de carbono no son aprovechables. Otros como el amoníaco, incluso podrían ser nocivos si se encuentran en elevadas concentraciones (Owens y Goetsch, 1986).

Algunas, características propias del alimento pueden modificar la síntesis de estos productos de la fermentación. Sun *et al.* (2015), reportó que al comparar una ración en corderos con pastos raygrass, estos producían una mayor cantidad de metano que una ración suplementada con raps forrajero, además observó que se modificó el perfil de ácidos grasos volátiles a nivel ruminal y esto lo atribuyó a un favorecimiento de ciertas poblaciones microbianas debido a un mayor contenido de carbohidratos de rápida fermentación en comparación a carbohidratos estructurales en el raps comparado con la pradera.

#### 1.2.1.1. Producción de ácidos grasos volátiles en el rumen.

Los carbohidratos que son consumidos por el animal son degradados por los microorganismos que se encuentra en el complejo gástrico del rumiante. Estos en un una primera fase los degradan hasta azúcares sencillos, los cuales son liberados hacia el ambiente ruminal y este proceso es llevado a cabo mediante enzimas microbianas extracelulares (Church, 1993). Luego, la glucosa y el resto de los azúcares son absorbidos inmediatamente y metabolizados por los microorganismos siguiendo diferentes vías. Los productos finales de la digestión de los carbohidratos en el rumen son los ácidos grasos volátiles (AGVs), principalmente acético, propiónico y butírico, sin embargo, también se

producen otros como el valérico, isovalérico e isobutírico. La concentración total de AGVs en un tiempo determinado, varía en función del tipo de ración consumida y del tiempo transcurrido desde la última comida ya que también depende de la absorción del mismo por las paredes del rumen (Church, 1993).

En el rumen, la producción de los ácidos AGVs depende de varios factores como la composición de la ración, la actividad microbiana, el pH del medio y la frecuencia de ingestión de alimentos; Sayer, (1999); García *et al.* (2000); Bargo *et al.* (2002) confirman esto y señalan que la suplementación con alimentos como los concentrados modifican las proporciones de AGVs en el licor ruminal, reduciendo la proporción molar de acetato e incrementa la proporción molar de propionato. Por otra parte, Sun *et al.* (2015) señalan que la incorporación de BF como el raps a una alimentación basada en ryegrass podría favorecer una mayor proporción molar de ácido propiónico respecto a acético y atribuye esto a que el raps tiene mayor cantidad carbohidratos rápidamente fermentables y menos carbohidratos estructurales y además presenta una degradabilidad más rápida en el rumen en comparación a una pradera de ryegrass.

#### 1.2.1.2 pH ruminal

El pH ruminal, es una condición muy dinámica que en un momento está dada por el equilibrio entre las tasas de producción y remoción de AGVs obtenidos de la fermentación de los forrajes, los suplementos ingeridos en las últimas horas y la adición de soluciones tampón al rumen a través de la saliva (Pulido, 2010). Allen (1997), indica que el balance entre la producción de ácidos por la fermentación y la secreción de sustancias buffer es uno de la mayores determinantes del pH ruminal.

La disminución en el pH ruminal es comúnmente observada en dietas altas en concentrado o carbohidratos rápidamente fermentables (Krause y Oetzel, 2006) y esto es considerado como uno de los principales factores responsables de la disminución en la degradación de la fibra. Además podría disminuir también la síntesis de proteína microbiana, el consumo de materia seca y por consiguiente la producción de leche (Allen, 1997). Esto es particularmente importante en raciones con brásicas como el nabo debido a que comparado con forrajes como la ballica, éste, presenta mayor cantidad de carbohidratos de rápida

fermentación (Barry, 2013; Sun *et al.*, 2015), lo que dependiendo de los niveles de inclusión podrían favorecer una disminución del pH.

El pH ruminal tiene efecto sobre la degradación de los alimentos. Estudios han encontrado una disminución en la celulólisis cuando el pH desciende por debajo de 6 (Hoover, 1986; Rusel y Wilson, 1996). No obstante, otros autores como (Contreras y Noro, 2010; Krause y Oetzel, 2006) indican que el pH en rumiantes bovinos puede variar normalmente de 5,5-7,0 a través del día, y esta variación depende de la dieta ingerida y la capacidad buffer del licor ruminal (Counotte *et al.*, 1979), la cual depende en gran medida de la salivación del animal. No obstante, para la degradación de la celulosa, es más crítico la magnitud de la disminución y el tiempo en el que el pH está por debajo del óptimo, que el valor medio diario (Itsasse *et al.*, 1986; De Vet y Kolver, 2001).

Un pH ácido también, puede disminuir la degradación de las proteínas. Sin embargo el pH óptimo para la proteólisis (5,5-7,0) se encuentra dentro del rango del pH ruminal normal por lo que el descenso en la proteólisis por el pH ácido no se debe a una inhibición enzimática sino más bien por una disminución en la poblaciones bacterianas capaces de degradar péptidos y desaminar aminoácidos al igual que como ocurre con la bacterias celulolíticas (Efe *et al.*, 1982).

#### 1.2.1.3 Metabolismo del nitrógeno a nivel ruminal y síntesis de proteína microbiana.

##### 1.2.1.3.1 Metabolismo del nitrógeno a nivel ruminal.

El metabolismo del N a nivel ruminal puede ser dividido en dos eventos distintos: la degradación de la proteína que aporta nitrógeno para las bacterias y luego la síntesis de proteína microbiana (Bach, 2005).

La cantidad de carbohidratos y el nitrógeno disponible a nivel ruminal son dos de los factores más determinantes para la síntesis de proteína microbiana (NRC, 2001). Para maximizar esta síntesis de proteína microbiana y hacer un uso eficiente del nitrógeno proveniente de proteína dietaria degradable en rumen y no proteica, debe existir una sincronización en cuanto al aporte de energía y nitrógeno a los microorganismo. (Contreras y Noro, 2010; Kolver *et al.*, 1998). Según Fébel y Fekete (1996) el factor más importante que limita la síntesis de proteína microbiana, es la energía que se libera en el rumen durante la fermentación de los carbohidratos a ácidos orgánicos.

Para lograr esta sincronía, varios autores han planteado que en la dieta debe existir una relación entre los carbohidratos no estructurales (CNE) y la proteína degradable en rumen (PDR) que oscile entre 3,2 y 4,0 (NRC, 2001; Stokes, 1997).

A pesar de que el concepto de sincronización del suministro de proteína y energía tiene una sólida base teórica, la mezcla de microorganismos del rumen conforma un ecosistema complejo en el cual, el suministro de nutrientes puede estar sincronizado para determinadas poblaciones y para otras no. Además, el reciclado ruminal de nitrógeno vía saliva, puede contribuir a estabilizar el crecimiento microbiano cuando el suministro de este no sea el más adecuado para la sincronización (Bach *et al.*, 2005).

En el rumen, la proteína verdadera se degrada a péptido y aminoácidos, luego eventualmente se desamina en amoníaco (Contreras y Noro, 2010). El nitrógeno amoniacal es considerado un recurso esencial para el crecimiento de los microorganismos ruminales, por lo tanto es conveniente su aporte constante y en cantidades apropiadas (Abdoum *et al.*, 2006). Bryant y Robinson (1962) indicaron que cerca del 90% de las especies de bacterias en el rumen utilizan el amonio como principal fuente de nitrógeno para su crecimiento. Se ha estimado que entre el 40 y el 100% de la proteína microbiana deriva del amoníaco y esta proporción variará en función de las condiciones ruminales y alimentarias (Stern y Hoover, 1979). En algunas especies de bacterias celulolíticas, el amoníaco es el único compuesto nitrogenado que pueden incorporar a sus síntesis proteica, sin ser capaces de utilizar péptidos y aminoácidos preformados (Bryant y Robinson, 1963; Hungate, 1966).

La dinámica de degradación de los alimentos ingeridos puede modificar la síntesis de proteína microbiana. Cuando la tasa de degradación de proteínas de la dieta es superior a la tasa de fermentación de CHOs, grandes cantidades de N pueden perderse, y cuando la tasa de fermentación de CHOs es superior, la síntesis de proteína microbiana puede disminuir (Contreras y Noro, 2010), por no existir el suficiente sustrato para síntesis de proteína microbiana. La estrategia más eficaz para reducir las pérdidas de nitrógeno dietario bajo condiciones típicas de alimentación para el ganado vacuno, es la manipulación de la degradación de la proteína ruminal o la eficiencia del uso del nitrógeno en el rumen. Las pérdidas pueden reducirse disminuyendo la degradación de proteínas en el rumen y/o aumentando la utilización de nitrógeno por los microorganismos mediante un adecuado aporte energético a nivel ruminal (Contreras y Noro, 2010).

Según (Satter y Slyter, 1974), la concentración óptima de amonio a nivel ruminal, es la necesaria para mantener la máxima síntesis de proteína microbiana. Otros autores como (Mehrez *et al.*, 1977) señalan que la concentración óptima es la que maximiza la degradabilidad ruminal de la materia seca consumida. Piatkowski (1982) indica que para optimizar la eficiencia en la síntesis de proteína microbiana considerando una adecuada sincronía entre aporte energético y proteico en la dieta, la concentración de amonio debería estar dentro de un rango de 8,8 a 17,6 mmol L<sup>-1</sup>. Por otra parte Griswold *et al.* (2003) indican que para un adecuado crecimiento bacteriano se requieren concentraciones ruminales mínimas de amonio de entre 3-4 mmol L<sup>-1</sup>. Concentraciones superiores a 55 mmol L<sup>-1</sup> se podría relacionar con intoxicaciones agudas en animales rumiantes (Chalupa *et al.*, 1970).

La concentración de nitrógeno amoniacal puede variar según el porcentaje de proteína cruda de los alimentos consumidos. Vacas suplementadas con alimento concentrado de mayor valor proteico puede aumentar la concentración de nitrógeno amoniacal en muestras de licor ruminal (Bargo *et al.*, 2001). Se han reportado valores de proteína cruda en BF inferiores al 20%, dato que podría considerarse inferior a otros alimentos como praderas en épocas de primavera o subproductos agroindustriales como el afrecho de soya, lo que facilitaría evitar un uso ineficiente del nitrógeno, acompañado eso sí, de un adecuado aporte energético.

Cuando existe un extensa degradación de las proteínas y la cantidad de amoníaco es elevada, el exceso de éste se absorbe por medio de las paredes del rumen y posteriormente se convierte en urea en el hígado (Rodríguez *et al.*, 2007). Por lo tanto, se puede considerar que, la urea es un metabolito que está afectado por factores de tipo nutricional como el porcentaje de proteína, cantidad de carbohidratos solubles y la relación proteína: energía a nivel ruminal. La urea, es incorporada al torrente sanguíneo y puede ser excretado en la leche y orina; otra parte también puede ser reincorporada al sistema digestivo mediante la excreción en la saliva (Hammon, 1994; Leng, 1992; Rowlands, 1978).

La concentración de nitrógeno ureico presente en la leche también se ha correlacionado fuertemente con la concentración del nitrógeno ureico en la sangre (Pardo, 2008; Butler *et al.*, 1996; Broderick y Clayton, 1997). Además se ha relacionado también con la excreción urinaria de nitrógeno (Jonker *et al.*, 1998).

Un exceso o una disminución de la urea láctea pueden indicar un desbalance nutricional entre la proporción de proteína y energía de la dieta del rumiante (Pedraza, 2006). En general, el exceso de urea en leche, refleja excesivo aporte de proteína bruta en la dieta o bajo suministro de carbohidratos no fibrosos degradables en el rumen, situación que podría no presentarse en raciones suplementadas con BF por su mayor contenido de carbohidratos no estructurales respecto a forrajes comunes. Pedraza *et al.* (2006) indica que los niveles de urea en leche en una ración adecuadamente balanceada en proteína y energía, debería encontrarse entre 150-300 mg L<sup>-1</sup>. Otros autores reportan valores de concentración de urea en leche un poco superiores a los mencionados anteriormente: 220 ± 6 mg L<sup>-1</sup> (Butler *et al.*, 1996); 249 mg L<sup>-1</sup> (Roseler *et al.*, 1993); 287 mg L<sup>-1</sup> (DePeters y Ferguson, 1992.) Wittwer *et al.* (1993) en estudios realizados en Chile han reportado un promedio de 367 ± 122 mg L<sup>-1</sup>, en vacas lecheras.

McCormick *et al.* (2001) y Chapa *et al.* (2001), señalan que niveles superiores a 250 mg L<sup>-1</sup> de urea en leche podrían indicar la existencia de un exceso de proteína en la ración y una utilización ineficiente de la energía, ya que la vaca la requiere para convertir amonio en urea. No obstante, no se han reportado evaluaciones de dietas con BF que hayan utilizado metabolitos como la urea en sangre o en leche para determinar la eficiencia del uso del nitrógeno o balance proteico energético a nivel ruminal.

#### 1.2.1.3.2 Síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal

La proteína microbiana es generada por los microorganismos ruminales, los cuales la sintetizan utilizando la energía fermentable que se encuentra presente en los alimentos consumidos, junto con los aminoácidos y/o nitrógeno no proteico, producto de la degradación de las proteínas dietarias (Webster, 1992; AFRC, 1996). Esta representa la fuente proteica más importante para el metabolismo de la vaca lechera (Webster, 1993) y además presenta un adecuado balance de aminoácidos (AA) requeridos por las vacas (NRC, 2001).

La proteína metabolizable es definida como toda la proteína verdadera digestible y que es utilizable por el ganado lechero para su metabolismo luego de que el alimento pasa por el proceso de digestión y absorción en el tracto digestivo. Esta posee dos componentes:

proteína verdadera microbiana digestible (sintetizada por los microorganismos del rumen) y proteína del alimento que no fue degradada a nivel ruminal pero sí es digestible en el intestino delgado (AFRC, 1996; Oldham, 1996).

La proteína microbiana sintetizada en el rumen provee la mayor parte de la proteína suministrada al intestino delgado de los rumiantes, lo que representa entre el 50 y el 80% del total de la proteína absorbible y la cantidad total que fluye al intestino delgado depende de la disponibilidad de nutrientes y de la eficiencia del uso de estos nutrientes por las bacterias del rumen (Contreras y Noro, 2010). Dewhurst *et al.* (2000) señalan que, de dos tercios a tres cuartos de los aminoácidos absorbidos por el rumiante, provienen de la proteína microbiana. Mientras tanto Clark *et al.* (1992) indica que el 59 % de la proteína que llega al intestino delgado proviene de la proteína microbiana. De ahí la importancia para la nutrición del animal de la maximización en la síntesis de esta importante fuente de nutrientes.

La medición del aporte de proteína de origen microbiano sintetizada en el rumen es cada vez de más interés, debido al rol fundamental que tiene ésta sobre la nutrición del rumiante. Además, el flujo de ésta hacia el duodeno es considerado el más importante indicador de optimización del metabolismo del rumen en vacas lecheras de alta producción (Tas y Susenbeth, 2007). No obstante, información respecto a la síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal y metabolismo de nitrógeno en vacas lecheras alimentadas con BF es aún escasa por lo que es de suma importancia generar información respecto al tema. Se han realizado algunas investigaciones con relación a la dinámica de la fermentación ruminal (producción de AGVs y NH<sub>3</sub>) utilizando alimentación con brásicas que se podrían asociar a un favorecimiento o no del ambiente ruminal para la síntesis de proteína microbiana.

Para la estimación del aporte de N-microbiano se han utilizado diversas técnicas como por ejemplo las basadas en el uso de marcadores internos (ácido diaminopimélico, ácidos nucleicos, purinas y pirimidinas) (Sandoval y Herrera, 1999). Estas técnicas, requieren el uso de animales con cánulas post-ruminales para la colecta de las muestras y el uso simultáneo de marcadores de flujo de digesta, lo que podría ser dificultoso y molesto para los animales (Tas y Susenbeth, 2007).

La técnica de los derivados de purinas representa una alternativa simple y no invasiva para estimar la producción de N-microbiano en rumiantes (Chen y Gomes, 1992; Tas y Susenbeth,

2007). En los animales rumiantes, la hipoxantina, xantina, ácido úrico y alantoína, son el producto final del catabolismo de las purinas y provienen principalmente de ácidos nucleicos de microorganismos ruminales que fluyen y son digeridos y absorbidos a nivel duodenal (Antoniewicz *et al.*, 1980). Estos se absorben en forma de nucleósidos o como bases libres y en el ganado vacuno sufren una cierta degradación a ácido úrico en su paso por la mucosa (Stangassinger *et al.*, 1995), luego se transportan hasta el hígado, donde tiene lugar su utilización y degradación y tras su metabolismo son excretadas en la orina en forma de alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina, que colectivamente se les conoce como derivados de purinas (DP) (Sandoval y Herrera, 1999), aunque en el ganado vacuno las cantidades de estos dos últimos compuestos son insignificantes (Verbic *et al.*, 1990).

Un inconveniente que tiene la estimación de la proteína microbiana a partir de derivados de purinas es que algunos alimentos pueden contener purinas que sobrepasen al rumen y llegan al intestino, sobreestimando esto la producción de proteína microbiana (Tas y Susenbeth, 2007). Sin embargo, Hristov *et al.* (2005) considera que los aportes de purinas dietarias a la excreción urinaria de derivados de purinas es pequeña.

### 1.3 COMPORTAMIENTO INGESTIVO EN VACAS LECHERAS.

Según Phillips (1993), el comportamiento ingestivo se refiere a una secuencia de actividades que realizan los animales para la obtención de nutrientes para su mantención y productividad, estos son principalmente ingesta, bebida y rumia.

Los rumiantes, al igual que todos los demás animales domésticos, no comen continuamente durante todo el día, sino que dividen su ingestión diaria en un conjunto de comidas de un determinado tamaño y duración separadas por unos intervalos en que el animal no come (Nielsen, 1999). Además, Hafez y Schein, (1962) indican que la ingesta se origina por la prehensión del alimento, por lo tanto, variaciones en la forma del alimento suministrado podrían dificultar la misma, siendo esto particularmente importante cuando se ofrecen brásicas con raíz tan voluminosas como el NF.

La ingesta también se puede definir como, la cantidad de masa consumida en un determinado lapso de tiempo, y los animales la controlan por el mecanismo de hambre y saciedad (Dado y Alien, 1994). Teller *et al.* (1993), señalan que la ingestión diaria de

alimentos está en función del número de comidas al día, el largo de las comidas y la tasa de consumo de ingestión.

Welch y Hooper, (1988) indican que algunos factores inciden sobre el tiempo en que un animal destina a la ingesta diaria, dentro de estos están, la densidad del forraje, el fotoperiodo, la temperatura, el clima, la calidad y forma del alimento y la situación fisiológica del animal. Además, señalan que la disponibilidad de alimento, más que su calidad, es de suma importancia para los rumiantes. Por otra parte, Stefaniski *et al.* (2010) mencionan que la estructura de la planta, humedad y compuestos antinutricionales son factores que pueden incidir sobre el consumo de alimentos en vacas lecheras. Dentro de los factores antinutricionales se pueden mencionar los nitratos y glucosinolatos, compuestos dietarios secundarios presentes en las brásicas forrajeras.

#### 1.4 HIPÓTESIS DEL TRABAJO

La suplementación a vacas lecheras con brásicas forrajeras de verano (Nabo y Raps) en un 25 % de su ración, no tiene efecto sobre el consumo de materia seca total, producción de leche y parámetros de fermentación ruminal en vacas lecheras al compararlas con vacas no suplementadas con BF.

La suplementación con brásicas forrajeras en un 25% de la ración a vacas lecheras no genera problemas de salud en los animales, asociados a metabolitos presentes en estas plantas.

Las vacas suplementadas con brásicas forrajes bajo sistemas de estabulación presentan mayor actividad de ingestión de alimento con respecto a vacas no suplementadas.

#### 1.5 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto de la suplementación con Nabo o Raps forrajero sobre el consumo total de materia seca, producción y composición de leche, fermentación ruminal, parámetros sanguíneos y comportamiento ingestivo en vacas lecheras.

#### 1.6 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

Determinar el consumo de materia seca total y su efecto sobre la producción de leche, en vacas suplementadas con brásicas forrajeras de verano (Nabo y Raps) y no suplementadas con BF.

Determinar la concentración de ácidos grasos volátiles, nitrógeno amoniacal y síntesis de proteína microbiana en vacas lecheras suplementadas con brásicas forrajeras de verano y no suplementadas con BF.

Evaluar el impacto de la suplementación con brásicas forrajeras de verano sobre la salud animal, a través de perfiles sanguíneos como hemograma, conteo de cuerpos de Heinz, hormonas tiroideas y GGT.

Evaluar el comportamiento ingestivo de las vacas suplementadas y no suplementadas con brassicas forrajeras de verano bajo un sistema de estabulación completa.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se realizó de enero a marzo del año 2017 en la Estación Experimental Agropecuaria Austral (EEAA) de la Universidad Austral de Chile, la cual se ubica a 4 km al norte de la ciudad de Valdivia en el sector Cabo Blanco, comuna de Valdivia, Chile.

Para realizar el ensayo se utilizaron 12 vacas Holstein Friesian multíparas que se encontraban entre 75 y 100 días de lactancia. Estas se agruparon en 4 grupos (cuadrados) de tres animales, las cuales se asignaron a cada uno de los tres tratamientos. Los tratamientos correspondieron a la suplementación con NF o con RF, y el control correspondió a una ración sin brásicas. Las 12 vacas pasaron por cada uno de los tratamientos y el grupo control. El periodo experimental por cada tratamiento fue de 21 días, correspondientes a 14 días de adaptación a la dieta y un periodo de 7 días para evaluación del tratamiento, periodo en donde se tomaron todas las muestras y datos de mediciones.

### 2.2 ALOJAMIENTO DE LOS ANIMALES

Las vacas se alojaron en cubículos individuales dentro de un galpón cerrado, donde se les ofreció todas las condiciones adecuadas para su bienestar y producción. Las vacas fueron alojadas en este galpón, 8 días antes del inicio del ensayo, con la finalidad de acostumbrarlas a las condiciones de estabulación completa. En este lugar se les brindó en comederos individuales, la ración de alimento completa diaria correspondiente al tratamiento en el cual se encontraban.

## 2.3 ALIMENTACIÓN

Durante el periodo pre-experimental o de acostumbramiento, todos los animales consumieron una ración a base de ensilaje de pradera, afrecho de soya y alimento concentrado. En este periodo, el ensilaje se ofreció a libre consumo.

Durante el periodo experimental, la alimentación se realizó por grupos, según el tratamiento al que correspondía cada vaca.

A las vacas en grupo control, se les ofreció una ración que cubriera los requerimientos nutricionales según la producción y peso vivo de los animales, la cual consistía en 20,7 Kg MS; que se distribuyen como se observa en el cuadro 1.

A las vacas suplementadas con NF o RF se les ofreció la misma cantidad de MS que al grupo control, pero sustituyendo por nabo o por raps, un 25% de la MS ofrecida de ensilaje de pradera y alimento concentrado. A estos grupos se les ofreció la misma cantidad de afrecho de soya que al grupo control, con el objetivo de garantizar un adecuado aporte proteico y que este nutriente no fuese limitante en la ración.

**Cuadro 1.** Distribución de la ración alimenticia para los tratamientos y grupo control.

<b>Ingrediente</b>	<b>Control</b>	<b>Raps</b>	<b>Nabo</b>
Ensilaje de Pradera (Kg MS)	16,2	12,25	12,25
Concentrado (Kg MS)	2,25	1,2	1,2
Afrecho de Soya (Kg MS)	2,25	2,25	2,25
Brásica (Kg MS)	-	5	5
Total (Kg MS)	20,7	20,7	20,7

La calidad nutricional de cada uno de los ingredientes utilizados en la ración alimenticia descrita anteriormente, se muestra en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Promedio y desviación estándar de la composición nutricional y degradabilidad efectiva del alimento concentrado, afrecho de soya, ensilaje de pradera, nabo y raps ofrecidos en la alimentación.

Ingredientes	MS	PB	FDN	FDA	EM Mcal	EE	CTot	CNF	De
Concentrado	893	121	334	146,1	3,12	28	46	472	769
Afrecho soya	870	514	117	42	3,22	23	71	274	745
Nabo entero <sup>1</sup>	95 ± 12	144,6 ± 21	191 ± 29	139 ± 21	3,15 ± 0,3	10 ± 0,1	99 ± 3	630 ± 29	924
Raps entero <sup>2</sup>	117 ± 1	174,6 ± 40	217 ± 20	155 ± 16	2,98 ± 1,7	18 ± 0,6	133 ± 45	548 ± 69	889
Ensilaje	360	177,1 ± 11	418 ± 25	272 ± 13	2,82 ± 0,06	42 ± 0,3	95 ± 5	268 ± 27	789
Raíz Nabo	78 ± 10	124,2 ± 25	188 ± 39	140 ± 27	3,21 ± 0,04	7 ± 0,1	85 ± 6	595 ± 52	-
Hoja Nabo	114 ± 20	172,9 ± 17	195 ± 19	138 ± 16	3,06 ± 0,04	14 ± 0,2	118 ± 11	500 ± 3	-
Tallo Raps	100 ± 14	154,5 ± 52	300 ± 32	221 ± 16	2,83 ± 0,15	7 ± 0,04	138 ± 42	399 ± 69	-
Hoja Raps	124 ± 16	181,6 ± 35	187 ± 22	132 ± 21	3,03 ± 0,18	22 ± 0,7	131 ± 48	478 ± 97	-

MS=Materia seca (g Kg<sup>-1</sup>); CTot=Cenizas Totales (g Kg<sup>-1</sup>); PB=Proteína Bruta (g Kg<sup>-1</sup>); FDN=Fibra Detergente Neutro (g Kg<sup>-1</sup>); FDA=Fibra Detergente Acido (g Kg<sup>-1</sup>); EM= Energía Metabolizable. 1 = proporción hoja/raíz en nabo de 0,73; 2= proporción hoja/tallo en raps de 2,86. EE= Extracto etéreo (g Kg<sup>-1</sup>); De= Degradabilidad efectiva (g Kg<sup>-1</sup>). CNF= Carbohidratos no Fibrosos (g Kg<sup>-1</sup>).

El ensilaje que se ofreció, provino de una pradera de ballica inglesa (*Lolium perenne*) de la misma EAAA, y se conservó en bolos de plástico. Al momento de la cosecha esta pradera tenía 35 días de rezago y una producción estimada de 3500-4000 Kg de MS/ha. Estos bolos se realizaron el día 22 de octubre 2016 y al momento del inicio de ensayo el 11 de enero 2017 tenían 90 días de conservación.

El NF y RF que se ofreció, se cultivaron en áreas próximas a la lechería en la misma EAAA. Estos se sembraron en dos fechas con 14 días de diferencia, esto con el objetivo de utilizar el cultivo de menor edad en las etapas finales del ensayo. Las fechas de siembra fueron el día 22 de octubre y el 5 de noviembre del 2016. Al inicio del ensayo el NF y el RF de la primera siembra tenían 81 días de maduración y las de la segunda fecha 67 días. Al momento de la primera evaluación del ensayo, las BF de la primera siembra tenían 107 días de maduración. Las variedades cultivadas de NF y RF fueron Barkant y Spitfire respectivamente.

Antes del inicio de cada periodo experimental y al finalizar el ensayo, se determinó el contenido de materia seca de las BF. Además, se estimó el rendimiento por hectárea y se determinó la relación hoja-tallo en el caso del RF y la relación hoja-raíz en el NB como se muestra en cuadro 4.

La composición nutricional de cada una de la raciones se muestra en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Composición nutricional de la dieta control, y dieta suplementada con RF y NF, ofrecida por los animales.

Ración	MS%	PB%	FDN%	FDA%	EM Mcal	EE%	CTot %	CNF%	FDNf%
Control	47,34	20,76	37,61	23,38	2,89	3,83	8,72	29	32,71
Raps	38,76	20,98	33,18	21,18	2,92	3,33	9,87	34,8	29,9
Nabo	38,23	20,26	32,56	20,80	2,96	3,14	9,06	36,8	29,3

MS=Materia seca; CTot=Cenizas Totales; PB=Proteína Bruta; FDN=Fibra Detergente Neutro; FDA=Fibra Detergente Acido; EM= Energía Metabolizable; EE= Extracto etéreo; FDNf= Fibra Detergente neutro de la ración, proveniente de forraje.

**Cuadro 4.** Contenido de materia seca y relación de los componentes hoja: tallo en RF y hoja raíz en NF.

Periodo	NF		RF	
	Relación hoja: raíz	% MS	Relación hoja: tallo	% MS
1	0,79	8,92	4,9	10,05
2	0,78	10,69	2,8	13,04
3	0,67	8,12	1,9	11,41
Final	0,68	10,26	1,8	12,38
Rend Kg Ms ha <sup>-1</sup>	5346		6636	

MS: materia seca; NF: Nabo forrajero; RF: Raps forrajero. Rend= Rendimiento agronómico.

Cada uno de los 12 cubículos de alojamiento de los animales, contaban con bebederos automáticos con agua disponible durante todo el día para garantizar el libre consumo. Junto con el alimento concentrado, se ofreció 200 gramos de una mezcla de sales minerales.

### 2.3.1 Ofrecimiento de los alimentos.

Todos los alimentos fueron pesados antes de la alimentación y ofrecidos en comederos individuales para cada vaca. Los alimentos se suministraron de la siguiente manera: El ensilajes de pradera, después del ordeño de la mañana y la tarde (07:30 hrs y 16:30 hrs), ofrecido en el comedero del galpón. El alimento concentrado, dos veces al día durante los ordeños (7:00 hrs y 16:30 hrs), ofrecido en comederos en la sala de ordeño; el afrecho de soya dos veces por día después de los ordeños (07:30 hrs y 16:30 hrs), ofrecido en el comedero del galpón y las brásicas después de las 11:00 hrs y durante 5 hrs aproximadamente hasta que las vacas regresaran al ordeño de la tarde.

### 2.3.2 Cosecha de las BF

El NF se cosechó diariamente de forma manual. A éstos, se le removió la tierra adherida a la raíz, para luego ser trasportados y ofrecidos en los comederos individuales como planta entera.

El RF fue cosechado de forma diaria aproximadamente a las 9:00 hrs con una segadora de forrajes a una altura de corte cercana a los 10 cm del nivel de suelo, luego fue transportado y ofrecido en el comedero individual también como planta entera.

## 2.4 MANEJO DIARIO Y RUTINA DE LOS ANIMALES

Durante todo el periodo experimental, las vacas permanecieron estabuladas. Diariamente las vacas fueron ordeñadas dos veces, aproximadamente a las 5:00 hrs y 16:00 hrs. Para el ordeño, las vacas se trasladaron del galpón de estabulación a la sala de ordeño la cual se encuentra próxima a este.

La limpieza de las camas en el galpón de estabulación se realizó dos veces por día, cuando las vacas se encontraban en la sala de ordeño y este proceso consistió de un lavado con agua y escobillón para posteriormente ser drenado y secado antes del ingreso de los animales. Adicionalmente a este manejo de la limpieza y durante el transcurso del día, se efectuaba constantemente la recolección de excretas con pala de cada uno de los cubículos de las vacas con la finalidad de que las excretas no se acumularan cercano a los animales. Los comederos eran limpiados con escoba dos veces por día y esto se realizaba cuando las vacas estaban en la sala de ordeño. El material alimenticio sobrante de los comederos se retiraba y descartaba para luego colocar alimento nuevo antes del ingreso de las vacas.

## 2.5 ANÁLISIS REALIZADOS EN LOS ALIMENTOS

### 2.5.1 Determinación de contenido nutricional.

Antes del inicio del ensayo se tomó una muestra de alimento concentrado y se llevó al laboratorio de nutrición animal del Instituto de Producción Animal (IPA) de la Universidad Austral de Chile, donde se le realizó un análisis proximal para determinar su composición nutricional.

A los alimentos forrajeros también se les determinó su contenido nutricional tomando una muestra por periodo experimental. Antes de realizar los análisis las muestras de los forrajes fueron liofilizadas. La determinación de materia Seca (MS) se realizó con un horno de ventilación forzada a 60 °C durante 48 horas y luego a 105 °C. La proteína cruda (PC) se determinó con un analizador de nitrógeno (LECO FP528, St Joseph, Michigan, Estados

Unidos) basado en el método de DUMAS (Nitrógeno x 6,25). Para la determinación de la fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA), se utilizó el procedimiento descrito por Soest *et al.* (1991). Para la estimación de la energía metabolizable se utilizó la ecuación de Garrido y Mann (1981) en base al valor D determinado mediante el procedimiento de Tilley and Terry, (1963). Las cenizas totales (CTot) se determinaron por calcinación en mufla a 550-600 °C por 5 horas.

## 2.6 OBTENCIÓN DE DATOS, TOMA Y ANÁLISIS DE MUESTRAS.

### 2.6.1 Producción de leche.

Los datos de producción de leche individual por día fueron tomados de las bases de datos del software Alpro™ para Windows® que utiliza la EEA para el manejo del hato, el cual registra la producción de leche por vaca por cada ordeño, mediante medidores de leche MM27BC de la empresa Delaval. De esa misma base de datos también se tomó el peso individual de cada animal el cual se registra de forma diaria.

Los datos de producción de leche diaria se corrigieron al 4% de materia grasa utilizando la ecuación planteada por Gaines y Davidson, citados por Lasley (1982).

$L4\% = 0,4 \times \text{kg de leche} + 15 \times \text{kg de grasa}$ .

Donde:

L4%: Leche corregida al 4% de grasa.

Además se corrigió por energía según la siguiente ecuación planteada por Tyrrell y Reid (1965).

$LCE = (12,82 \times \text{kg de grasa}) + (7,13 \times \text{kg de proteína}) + (0,323 \times \text{kg de leche})$

Donde:

LCE: Leche corregida por energía.

### 2.6.2 Análisis de calidad de leche.

Durante la semana de medición de cada periodo experimental se tomaron muestras de leche por cada vaca en la mañana y en la tarde, en tres días no consecutivos. Estas fueron enviadas al laboratorio de calidad de leche del Instituto de investigaciones Agropecuarias

(INIA) Carillanca donde se les determinó: grasa, proteína, lactosa y urea, por espectrofotómetro infrarrojo (Foss 4300 Milko-scan, Foss Electric, Denmark). El valor diario por animal corresponde al promedio ponderado por producción en la mañana y en la tarde. De los tres datos por vaca en cada periodo experimental, se tomó el promedio como el valor para realizar los análisis estadísticos.

### 2.6.3 Consumo de alimentos.

El consumo individual de materia seca se obtuvo mediante la medición de la diferencia entre el alimento ofrecido y el rechazado basados en materia seca. De cada uno de los residuos, se tomaron muestras que fueron enviadas al laboratorio de nutrición animal del Instituto de Producción Animal (IPA) de la Universidad Austral de Chile para obtener su peso seco luego de pasar 48 horas en un horno a 60 °C.

El contenido de materia seca en el residuo también se utilizó para determinar la proporción de cada alimento que se podría encontrar en el residuo y además de las proporciones de hoja: raíz y hoja: tallo en el caso de NB y RF forrajero.

Con las proporciones de alimento expresado en materia seca en cada uno de los residuos, se calculó por diferencia entre lo ofrecido y lo rechazado, el consumo individual de cada alimento ofrecido en la ración. Con los datos de composición nutricional y consumo de cada ingrediente por animal, se determinó el consumo de cada uno de los nutrientes animal<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>.

### 2.6.4 Observaciones de comportamiento.

El comportamiento ingestivo de cada uno de los animales se evaluó desde las 09:30 hrs hasta las 21:30 hrs realizando y registrando observaciones cada 10 minutos con la utilización de un etograma. Durante el periodo de ordeño de la tarde no se realizaron observaciones. Los criterios de observación de comportamiento fueron: de pie comiendo (DPC), de pie rumiando (DPR), de pie bebiendo (DPB), de pie sin actividad (DPS), echada comiendo (EC), echada rumiando (ER) y echada sin actividad (ES). Además, cada 30 minutos y en el mismo rango de horas se registró, la cantidad de bocados por minuto que realizaba cada uno de los animales.

### 2.6.5 pH ruminal.

Durante todo el periodo experimental se monitoreó el pH y la temperatura ruminal de cada vaca. Esto se realizó mediante la lectura de bolos intraruminales (eCows Ltd, Devon, Reino Unido) que se colocaron en cada animal previo al inicio del periodo experimental. Estos bolos son dispositivos telemétricos inalámbricos que se alojan en la parte ventral del rumen y monitorean pH y temperatura ruminal cada 15 minutos. La información se recolectó, mediante una antena conectada a un teléfono celular y los datos se almacenaron en planillas Excel. Se obtuvo el promedio de pH de cada hora para cada animal en los 7 días de la semana en cada periodo experimental. Luego se determinó el promedio de pH en cada hora en la semana de medición y este fue el dato que se utilizó para el análisis estadístico.

### 2.6.6 Determinación de Ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal.

#### 2.6.6.1 Toma de muestras de licor ruminal.

El licor ruminal se recolectó con una sonda esofágica (Flora Rumen Scoop, Munich Alemania). Se tomaron muestras de 20 ml por animal. La toma de muestra fue antes y 4,5 horas después de suministrar las BF del día 20 del periodo experimental. Inmediatamente después se mezclaron 10 ml de cada muestra con 200 micro litros de Ácido sulfúrico al 50% PV, luego se conservaron a -20 °C.

#### 2.6.6.2 Análisis de muestras de licor ruminal.

Al finalizar el ensayo todas las muestras fueron descongeladas, centrifugadas y analizadas en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) de la Universidad Austral de Chile para la determinación de la concentración y proporción molar de ácidos grasos volátiles (AGV) y concentración molar de nitrógeno amoniacal (NH<sub>3</sub>), mediante cromatografía de gases con el método descrito por Tavendale *et al.* (2005).

### 2.6.7 Determinación de síntesis de proteína microbiana a partir de derivados de purinas.

Las muestras de orina se tomaron de cada vaca cada 3 horas durante el transcurso del día tomando la primera muestra a las 9:00 h una vez por cada periodo de medición en la semana de toma de muestras. La muestra se tomó mediante masaje sub-vulvar descartando los primeros chorros de orina. La muestra se recolectó en recipientes de 500 ml a los cuales se les colocó filtro de tela para evitar la recolección de material que no fuese orina.

De cada muestra recolectada se tomó una sub-muestra de 20 ml que se acidificó con 2 ml de ácido sulfúrico al 10% P/V para mantener el pH por debajo de 3. Del total de orina recolectado en el día se tomó una muestra de 20 ml que fue congelada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

Al final de la etapa de campo del ensayo, todas las muestras de orina fueron enviadas y analizadas en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) de la Universidad Austral de Chile. Ahí se realizó la determinación de derivados de purinas (alantoína, ácido úrico y creatinina) utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) descrita por Chizzotti *et al.* (2008). Para esto se utilizó un HPLC (Waters 2695) acoplado a un detector con arreglo de diodos (Waters 2996), equipado con una columna C18 (YMC-Pack ODS-AM 150 x 6,0 mm l .D. S- 5  $\mu\text{m}$ , 12 nm).

Las muestras de orina fueron descongeladas y posteriormente fueron centrifugadas a 10000 RPM durante diez minutos. El sobrenadante fue diluido 1/50 para luego ser inyectadas en el cromatógrafo.

De cada muestra de orina se obtuvo la concentración en  $\text{mmol L}^{-1}$  de alantoína, ácido úrico y creatinina. Con estos datos se estimó la síntesis diaria de proteína microbiana a través del siguiente sistema de ecuaciones:

Para la determinación de la excreción diaria en  $\text{mmol día}^{-1}$  de alantoína y ácido úrico se utilizaron las siguientes ecuaciones:

1. Alantoína ( $\text{mmol día}^{-1}$ ) = Alantoína ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) X volumen de orina ( $\text{L día}^{-1}$ )
2. Ácido Úrico ( $\text{mmol día}^{-1}$ ) = Ácido Úrico ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) x volumen de orina ( $\text{L día}^{-1}$ )

La estimación de del volumen diario de orina se calculó de la siguiente forma:

$$3. \text{ Volumen de orina (L día}^{-1}\text{)} = \text{CT (mg día}^{-1}\text{)} / \text{CCreat (mg L}^{-1}\text{)}$$

Donde:

CT (mg día<sup>-1</sup>) = creatinina total excretada en miligramos al día

CCreat (mg L<sup>-1</sup>) = concentración de creatinina en las muestras de orina en miligramos por litro.

La excreción diaria de creatinina en miligramos por día (CT) se calculó de la siguiente forma:

$$4. \text{ CT (mg día}^{-1}\text{)} = \text{PV (Kg)} \times \text{C (mg Kg}^{-1}\text{)}.$$

Donde:

PV (kg) = peso vivo del animal

C (mg Kg<sup>-1</sup>) = constante que equivale a una excreción de creatinina de 26 mg Kg<sup>-1</sup> de PV.

La excreción diaria de los derivados de purinas (DPe) se calculó utilizando la formula citada por Faichney *et al.* (1995).

$$5. \text{ DPe (mmol/día)} = (\text{DPT (mmol L}^{-1}\text{)} \times (\text{PV (kg)} \times \text{K}_{\text{ct}}) / 113.12) / \text{CT (mmol L}^{-1}\text{)}$$

Donde:

DPT (mmol L<sup>-1</sup>): Excreción diaria de los derivados de purinas total.

PV (Kg): Peso vivo del animal.

CT (mmol L<sup>-1</sup>): concentración de creatinina en la muestra de orina.

K<sub>ct</sub>: coeficiente de excreción diario de creatinina (mg/día) = 113 \* PV<sup>-0,25</sup> (113,12= peso molecular de la creatinina).

La absorción diaria de purinas (PA) que provienen de los ácidos nucleicos microbianos se calculó utilizando la siguiente ecuación citada por Chen y Gomes (1992).

$$6. \text{ PA (mmol/día)} = (\text{DPe (mmol día}^{-1}\text{)} - (0.385 * \text{PV}^{0.75})) / 0.85$$

Para calcular el aporte de nitrógeno microbiano (Nmic) se utilizó la siguiente ecuación citada por Chen y Gomes (1992).

$$7. \text{ Nmic (g/día) = (PA (mmol/día) * 70 mg/mmol) / (0,83 * 0,116 * 1000)}$$

Para realizar la comparación del aporte de nitrógeno microbiano a un mismo consumo de materia seca, se dividió el aporte de nitrógeno microbiano entre el consumo de materia seca como se muestra:

$$8. \text{ Nmic (g/día)/CMS (Kg).}$$

La síntesis de proteína microbiana total (PMT) se estimó utilizando la siguiente ecuación de Chen y Gomes (1992).

$$9. \text{ PMt (g/día) = Nmic (g/día) * 6,25}$$

#### 2.6.8 Eficiencia del uso del nitrógeno para la síntesis de proteínas lácteas:

La eficiencia del uso del nitrógeno para la síntesis de proteínas lácteas se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$N_{\text{retL}} / N_{\text{cons}} * 100$$

Donde:

$$N_{\text{retL}} = \text{Nitrógeno retenido en leche (g)} = (\text{Producción de proteína láctea (kg)} * (6,38/100)) * 1000$$

$$N_{\text{cons}} = \text{Nitrógeno consumido (g)} = (\text{Consumo de proteína cruda (kg)} * (6,25/100)) * 1000$$

#### 2.6.9 Análisis de perfiles sanguíneos.

Para la evaluación del perfil sanguíneo, se tomaron dos muestras de sangre de la vena coccígea a cada una de las vacas una vez por periodo experimental. Para la toma de muestras se utilizaron agujas para vacutainer calibre 18, camisas para tubo y tubos vacutainer sin anticoagulante y con anticoagulante EDTA de 10 ml.

Las muestras de sangre recolectadas en tubos sin anticoagulante fueron centrifugadas para extraer el plasma sanguíneo el cual fue congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y al final de ensayo fue enviado al laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la Universidad Austral de Chile donde fueron descongeladas y analizadas para determinar la concentración de urea, la enzima GGT (gama glutamil transeptidasa) y hormona tiroidea T3 (triyodotironina). Para este último se utilizó un Kit de Elisa para determinación de triyodotironina en bovinos de la empresa Mybiosource. Para determinar la actividad de la enzima GGT, se utilizó un autoanalizador Metrolab 2300® (Wiener Lab) a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Las muestras recolectadas en tubos con anticoagulante también fueron enviadas al laboratorio de patología clínica veterinaria de la Universidad Austral de Chile donde fueron analizadas para determinar el hemograma completo y conteo de cuerpos de Heinz. En los resultados del hemograma se excluyó el dato de una vaca consumiendo NF en el periodo 1 y dos consumiendo NF y una consumiendo RF en el periodo 2 esto debido a que las muestras de sangre se coagularon antes de realizar el análisis de laboratorio.

Para los resultados de T3 solo se utilizaron 18 datos correspondientes a tres vacas en la dieta con RF, uno en la dieta con NF y dos con la dieta control en el periodo 1; dos vacas en la dieta con RF, uno en la dieta con NF y dos con la dieta control en el periodo 2; una vaca en la dieta con RF, 4 vacas en la dieta con NF y dos con la dieta control en el periodo 3. Solo se utilizaron estos datos debido a que los otros fueron valores muy desviados que se salían de los rangos observados en estudios previos para animales en condiciones ambientales similares.

## 2.7 Diseño experimental y Análisis Estadístico.

El diseño experimental utilizado fue un cuadrado latino  $3 \times 3$  replicado en 4 cuadrados y balanceado para efectos residuales (Williams, 1948). El tratamiento correspondía al factor ración alimenticia que cuenta con tres niveles (NF, RF y control). En este diseño, el periodo de medición corresponde a las columnas y el grupo de animales corresponde a las filas. En el cuadro 5 se observa cómo se distribuyeron los tratamientos en cada uno de los periodos para cada una de las vacas.

**Cuadro 5.** Distribución de tratamientos para cada una de las vacas por periodo experimental.

Cuadrado	Vaca	Periodo		
		1	2	3
C1	3509	Raps	Control	Nabo
	3521	Control	Nabo	Raps
	3507	Nabo	Raps	Control
C2	3514	Nabo	Control	Raps
	3460	Raps	Nabo	Control
	3527	Control	Raps	Nabo
C3	3895	Raps	Control	Nabo
	3500	Control	Nabo	Raps
	3535	Nabo	Raps	Control
C4	3534	Nabo	Control	Raps
	3309	Raps	Nabo	Control
	3495	Control	Raps	Nabo

La agrupación inicial de los animales se realizó considerando peso vivo y la producción de leche. Los animales dentro de los cuadrados se distribuyeron aleatoriamente a cada grupo de alimentación en cada periodo experimental.

Para el análisis estadístico de las variables: producción de leche, consumo de materia seca, consumo de ingredientes, consumo de nutrientes, actividades de comportamiento ingestivo, producción de proteína microbiana, concentración de ácidos grasos volátiles en licor ruminal, nitrógeno amoniacal y parámetros sanguíneos, se utilizaron dos modelos estadísticos.

El primer modelo se describe a continuación y se utilizó para determinar si existió efecto residual (*carry over*) de los tratamientos sobre la evaluación en los sub siguientes periodos de experimentación.

$$\text{Modelo 1. } Y_{ijklmn} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \omega_k + \Omega_{l(k)} + \theta_m + \varepsilon_{ijklmn}$$

Donde:

$Y_{ijklmn}$  = Variable respuesta

$\mu$  = media general

$\alpha_i$  = efecto i-ésimo asociado al factor fijo ración alimenticia (tratamiento).

$\beta_j$  = efecto j-ésimo asociado al factor fijo periodo

$\omega_k$  = efecto asociado al efecto fijo de la secuencia de aplicación del tratamiento

$\Omega_{l(k)}$  = efecto asociado al l-ésimo factor aleatorio del animal anidado en la secuencia.

$\theta_m$  = efecto residual del tratamiento anterior o *carry over* (0 en el periodo 1)

$\varepsilon_{ijklmn}$  = error experimental

Si el efecto residual o *carry over* no era significativo, los datos se analizaron como un cuadrado latino replicado como se describe a continuación:

$$\text{Modelo 2. } Y_{ijklm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \theta_k + \Omega_{l(k)} + \varepsilon_{ijklm}$$

Donde:

$Y_{ijklm}$  = Variable respuesta

$\mu$  = media general

$\alpha_i$  = efecto i-ésimo asociado al factor fijo ración alimenticia (tratamiento).

$\beta_j$  = efecto j-ésimo asociado al factor fijo periodo

$\theta_k$  = efecto asociado al k-ésimo factor aleatorio del cuadrado

$\Omega_{l(k)}$  = efecto asociado al l-ésimo factor aleatorio animal anidado en el cuadrado

$\varepsilon_{ijklm}$  = error experimental

Para análisis del comportamiento ingestivo a través de las horas del día, el pH ruminal y AGVs y NH<sub>3</sub> se incluyó en el modelo 2 la hora como medida repetida y la interacción entre el tratamiento y la hora.

Para evaluar la secuencia de aplicación del tratamiento a través de los periodos se asignó un código a cada una de estas como se presenta a continuación en cuadro 6.

**Cuadro 6.** Asignación de códigos a las distintas secuencias de aplicación de tratamientos.

Secuencia	Código Asignado
Raps Nabo Control	1
Control Raps Nabo	2
Control Nabo Raps	3
Nabo Raps Control	4
Raps Control Nabo	5
Nabo Control Raps	6

Para evaluar el efecto residual o *carry over* se clasificaron los datos de respuesta con el tratamiento que se le había aplicado en el periodo anterior. En el periodo 1 se le asignó el código 0 debido a que no tuvieron tratamiento previo como lo describe Ratkowsky y Alldredge (1993).

Antes de realizar el análisis de varianza con cada uno de los modelos, se procedió a comprobar los supuestos de normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Levene.

Para el análisis estadístico se utilizó el PROC MIXED del software estadístico SAS® v 9.4 (SAS Institute 2006).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LECHE.

En el cuadro 7 se muestra la composición y producción de leche de las vacas cuando se suplementaron con NF, RF y dieta control. En el mismo se observa que la producción de leche y la producción de leche corregida a 4% de grasa y corregida por energía, no fueron distintas cuando las vacas se suplementaron con las dos brásicas ni cuando recibieron la ración del grupo control. Lo mismo se presentó con el porcentaje de materia grasa, proteína y lactosa, los cuales no presentaron diferencias entre los tres grupos de alimentación.

La relación, producción de leche por consumo de materia seca total vaca día<sup>-1</sup> fue superior cuando las vacas fueron suplementadas con BF con respecto a cuando recibieron la dieta control. La producción de leche por Kg de materia seca si fue distinta cuando los animales se suplementaron con BF y cuando consumieron la dieta control. Por cada kg de materia seca consumida, las vacas suplementadas con RF y NF, produjeron 0,084 y 0,083 kg de leche más respecto a cuándo se alimentaron con la dieta control.

**Cuadro 7.** Efecto de la suplementación en vacas lecheras con RF y NF sobre la producción y calidad de leche.

	Tratamiento				p-valor
	Control	Raps	Nabo	EEM	
Producción de leche (kg)	24,16	24,31	24,11	0,78	0,936
PL a 4% grasa (kg)	25,19	25,76	25,17	0,90	0,663
PL corregida por energía (kg)	26,78	27,37	26,96	0,88	0,685
Producción proteína (kg/vaca/día)	0,799	0,815	0,827	0,02	0,308
Producción de grasa (kg/vaca/día)	1,033	1,067	1,033	0,04	0,619
Materia grasa (%)	4,28	4,41	4,28	0,14	0,538
Proteína (%)	3,31	3,36	3,42	0,08	0,320
Lactosa (%)	4,87	4,88	4,84	0,03	0,392
Producción de leche/consumo MS	1,27 <sup>b</sup>	1,35 <sup>a</sup>	1,35 <sup>a</sup>	0,04	0,015

PL= Producción de leche. p-valor= valor de probabilidad. EEM= Error estándar de la media. Letras distintas entre las filas reflejan una diferencia estadísticamente significativa entre los datos ( $P < 0,05$ ).

### 3.2 CONSUMO DE MATERIA SECA, NUTRIENTES E INGREDIENTES.

En el cuadro 8 se presenta el consumo de materia seca, ingredientes y nutrientes de las vacas cuando se suplementaron con NF, RF y la dieta control.

En este se muestra que el consumo de materia seca total fue menor cuando las vacas fueron suplementadas con BF, en comparación a cuando fueron alimentadas con la dieta control (0,98 kg y 1,12 kg menos con RF y NF, respectivamente), sin embargo no hubo diferencias entre los tratamientos nabo y raps. El consumo individual de nabo y raps tampoco fue distinto y su consumo fue del 18,30 y 17,16% respecto al consumo de materia seca total.

El consumo de ensilaje y concentrado fue menor cuando las vacas fueron suplementadas con BF, esto es esperado, debido a que el ofrecimiento de estos ingredientes también fue menor, sin embargo comparando los tratamientos NF y RF se observa que no existió diferencias entre los consumos de estos ingredientes. Cuando las vacas fueron suplementadas con NF y RF, consumieron respectivamente 3,68 y 3,44 kg vaca<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> menos de ensilaje con respecto a cuando fueron alimentadas con la dieta control. Además, cuando las vacas se suplementaron con BF consumieron en promedio 910 gramos menos de alimento concentrado con respecto a cuando se alimentaron con la dieta control.

En cuanto al consumo de afrecho de soya, este no fue distinto cuando las vacas se suplementaron con BF con respecto al grupo control ni tampoco fue distinto cuando se suplementaron con NF en comparación a cuando se suplementaron con RF.

Con respecto a la proteína cruda, el consumo de este nutriente, no fue distinto entre los tratamientos suplementados con NF, RF y el grupo control. El consumo de fibra detergente neutro fue distinto entre los tratamientos suplementados con BF y estos también comparados con la dieta control. Cuando las vacas se suplementaron con NF y RF, consumieron en promedio 1,20 y 1,07 kg menos de FDN.

Cuando las vacas se suplementaron con BF consumieron 0,62 y 0,69 kg menos de FDA con respecto a cuando consumieron la dieta control, sin embargo a diferencia de la FDN, los consumos de este nutriente no presentó diferencias significativas entre los tratamientos suplementados con BF.

El consumo de energía metabolizable también fue distinto entre los tratamientos con BF y el grupo control, no obstante, no fue diferente cuando la suplementación fue con NF o RF. Cuando las vacas se suplementaron con NF y RF, consumieron en promedio 2,0 y 1,8 Mcal de EM menos respectivamente en comparación con la dieta control.

**Cuadro 8.** Efecto de la suplementación en vacas lecheras con RF y NF sobre el consumo de materia seca total, materia seca digestible, ingredientes y nutrientes.

Consumo	Tratamiento				
	Control	Raps	Nabo	EEM	p-valor
Materia seca total (kg MS/día)	19,00 <sup>a</sup>	18,02 <sup>b</sup>	17,88 <sup>b</sup>	0,46	0,0001
Materia seca digestible (Kg MS/día)	14,83	14,50	14,37	0,36	0,0865
Brásica (kg MS/día)	-	3,08	3,31	0,19	0,0903
Ensilaje (kg MS/día)	14,97 <sup>a</sup>	11,53 <sup>b</sup>	11,29 <sup>b</sup>	0,29	<0,0001
Afrecho de soya	1,85	2,06	1,98	0,13	0,3219
Concentrado	2,24	1,33	1,33	0,006	<0,0001
Suplemento <sup>1</sup> (kg MS/día)	4,09 <sup>a</sup>	3,40 <sup>b</sup>	3,32 <sup>b</sup>	0,13	<0,0001
Proteína cruda (kg MS/día)	3,65	3,84	3,71	0,14	0,4998
Fibra detergente neutro (kg MS/día)	7,20 <sup>a</sup>	6,13 <sup>b</sup>	6,00 <sup>c</sup>	0,15	<0,0001
Fibra detergente ácido (kg MS/día)	4,48 <sup>a</sup>	3,86 <sup>b</sup>	3,79 <sup>b</sup>	0,09	<0,0001
Extracto etéreo (kg MS/día)	0,73 <sup>a</sup>	0,62 <sup>b</sup>	0,59 <sup>c</sup>	0,01	<0,0001
Energía metabolizable (Mcal/día)	54,9 <sup>a</sup>	53,1 <sup>b</sup>	52,9 <sup>b</sup>	1,4	0,0088

1= concentrado más afrecho de soya. p-valor= valor de probabilidad. EEM= Error estándar de la media. Letras distintas entre las filas reflejan una diferencia estadísticamente significativa entre los datos (P < 0,05).

### 3.3 ACTIVIDADES DE COMPORTAMIENTO

En el cuadro 9 se muestra la distribución del tiempo que las vacas le dedican a cada actividad en porcentaje y en minutos del total del tiempo observadas. Además, se presenta la cantidad de bocados por minuto que realizan las vacas para su consumo de alimentos.

**Cuadro 9.** Porcentaje de tiempo y cantidad de minutos que vacas lecheras suplementadas con RF y NF y sin suplementar, destinan a actividades de comportamiento ingestivo.

Actividad	Tratamiento				p-valor
	Control	Raps	Nabo	EEM	
De pie comiendo (%)	34,6 <sup>c</sup>	42,6 <sup>b</sup>	49,5 <sup>a</sup>	2,35	<0,0001
De pie rumiando (%)	8,4 <sup>a</sup>	4,9 <sup>b</sup>	2,9 <sup>b</sup>	0,98	0,0018
De pie bebiendo (%)	4,9	3,4	3,6	0,91	0,4330
De pie sin actividad (%)	12,6 <sup>a</sup>	9,7 <sup>b</sup>	6,5 <sup>c</sup>	1,55	0,0013
Echada rumiando (%)	15,9	13,0	12,1	1,46	0,1715
Echada sin actividad (%)	23,4	26,4	25,3	2,74	0,6018
De pie comiendo (minutos)	229 <sup>c</sup>	281 <sup>b</sup>	327 <sup>a</sup>	15,5	<0,0001
De pie rumiando (minutos)	55,8 <sup>a</sup>	32,3 <sup>b</sup>	19,7 <sup>b</sup>	6,4	0,0018
De pie bebiendo (minutos)	32,9	22,6	23,6	6,03	0,4330
De pie sin actividad (minutos)	83,4 <sup>a</sup>	63,7 <sup>b</sup>	43,1 <sup>c</sup>	10,27	0,0013
Echada rumiando (minutos)	104,9	85,9	80	9,60	0,1715
Echada sin actividad (minutos)	154,3	174,4	166,7	18,07	0,6009
Comiendo (minutos)	229 <sup>c</sup>	281 <sup>b</sup>	327 <sup>a</sup>	15,5	<0,0001
Rumiando (minutos)	160,8 <sup>a</sup>	118,2 <sup>b</sup>	99,7 <sup>b</sup>	8,33	0,0002
Otra actividad (minutos)	270,9	261,1	233,7	15,06	0,0823
De pie (minutos)	402,6	401,5	414,9	20,15	0,8346
Echada (minutos)	257,4	258,5	245	20,15	0,8346
Bocados por minuto	69,4 <sup>b</sup>	73,4 <sup>a</sup>	75,8 <sup>a</sup>	1,30	0,0023

EEM= Error estándar de la media. p-valor= valor de probabilidad. Letras distintas entre las filas reflejan una diferencia estadísticamente significativa entre los datos (P < 0,05).

Cuando las vacas fueron suplementadas con NF y RF permanecieron más tiempo comiendo en comparación a cuando fueron alimentadas con la dieta control. Dentro de las dietas suplementadas con BF, la del NF fue la que generó que las vacas permanecieran más tiempo en total comiendo en comparación con la dieta con RF.

Por el contrario, cuando las vacas no fueron suplementadas (control) y estando de pie, pasaron 5,47 % y 3,56 % más tiempo en actividad de rumia; en comparación a cuando fueron suplementadas con NF y RF respectivamente; esto es 36,1 y 23,5 minutos más en el total del periodo de observación de 11 horas.

Adicionalmente a esto, la tasa de consumo medida en bocados por minuto fue mayor en las vacas suplementadas con respecto a cuándo las vacas no fueron suplementadas con BF. Sin embargo, esto no implicó un mayor consumo de materia seca total como se mostró en cuadro 7.

Cuando las vacas no fueron suplementadas con BF, al pasar menos tiempo comiendo cuando estuvieron de pie, dedicaron más su tiempo a rumiar y estar sin actividad alguna. La actividad de rumia si fue distinta entre los tratamientos como se mencionó anteriormente pero las diferencias se presentaron cuando las vacas estaban de pie, ya que cuando se encontraban echadas no hubo diferencias estadísticas para esta actividad.

La suplementación tampoco implicó diferencias en cuanto a los tiempos totales en que las vacas permanecieron de pie o echadas. Durante el periodo de observación, las vacas permanecieron echadas un 43, 40 y 42% del tiempo cuando fueron alimentadas con RF, NF y dieta control.

En las figuras 1, 2 y 3 se presentan la distribución de actividades (comer, rumiar o sin actividad) que se encontraban realizando las vacas a través del periodo de observaciones y cada 30 minutos.

En estos se observa que mientras las vacas no fueron suplementadas con BF, una mayor proporción de vacas estaban rumiando (barras rojas) en comparación a cuando fueron suplementadas con BF, situación en la cual permanecían la mayor proporción de animales comiendo (barras azules) durante el transcurso del periodo de observación.

También, se puede apreciar una mayor actividad ingestiva (comiendo) en horas cercanas al ofrecimiento de los alimentos (9:30 am y 5:30 pm con las tres dietas) y (11:30 am-12 md, con dietas suplementadas con BF). Entre el 90 y el 100 % de los animales permanecían comiendo durante la primera media hora luego del ofrecimiento de los alimentos.

En la primera hora posterior a la suplementación con BF, cerca del 90% de las vacas permanecieron comiendo. Luego, este porcentaje empieza a descender, sin embargo la disminución de la proporción de animales fue mayor en vacas suplementadas con RF en comparación a las vacas consumiendo NF. Dos horas después de la suplementación con

RF, cerca del 30% de las vacas estaban comiendo mientras que luego de 2 horas de suplementación con NF, cerca del 70% de las vacas aún se encontraban comiendo.

La cantidad de animales con actividad ingestiva volvió a ser alta luego a las 5:30 pm cuando las vacas salieron del ordeño de la tarde y se les ofreció la ración alimenticia con la que permanecían hasta el día siguiente. En la primera media hora después del ofrecimiento del alimento, cerca del 90% de las vacas estaban comiendo, posteriormente, este porcentaje disminuye a un 60-80% la siguiente media hora y luego disminuye de forma más drástica en los tres grupos de alimentación, iniciando nuevamente actividades de rumian o no presentando actividad alguna. Cerca de las 8:00 pm se presenta un leve repunte en la cantidad de animales consumiendo con cerca del 40% de los mismos sin embargo esta proporción vuelve a caer en la próxima media hora con los tres tipos de alimentación.

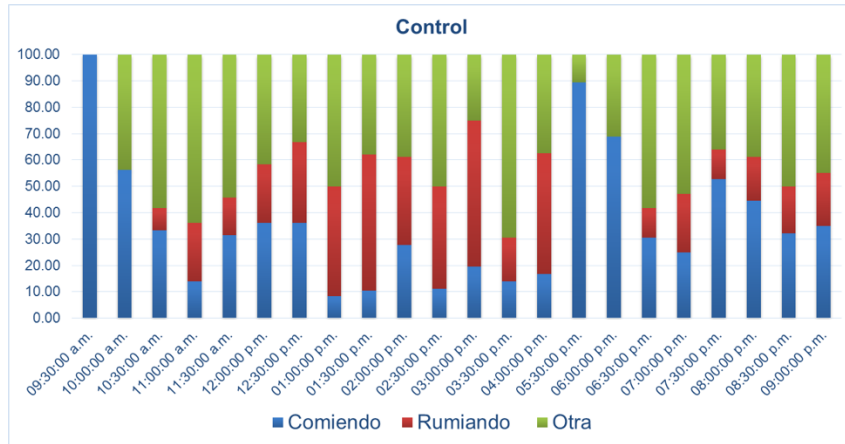


Figura 1 Distribución de actividades (comer, rumiar o sin actividad) que se encontraban realizando las vacas consumiendo una dieta control.

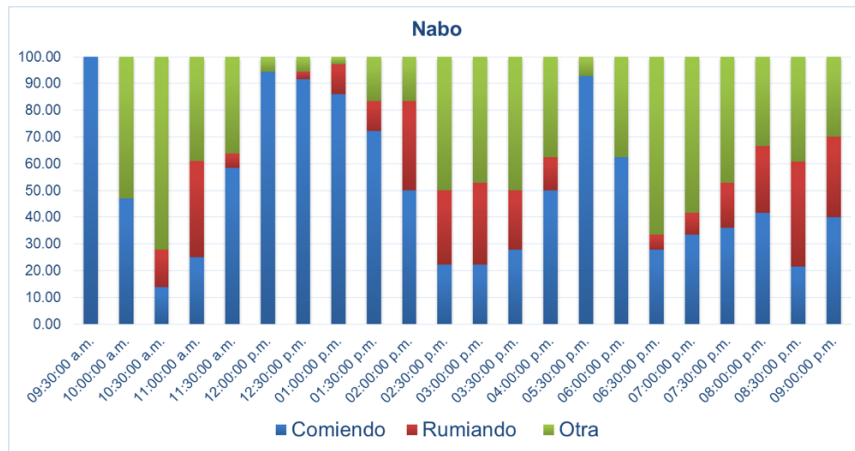


Figura 2 Distribución de actividades (comer, rumiar o sin actividad) que se encontraban realizando las vacas suplementadas con NF.

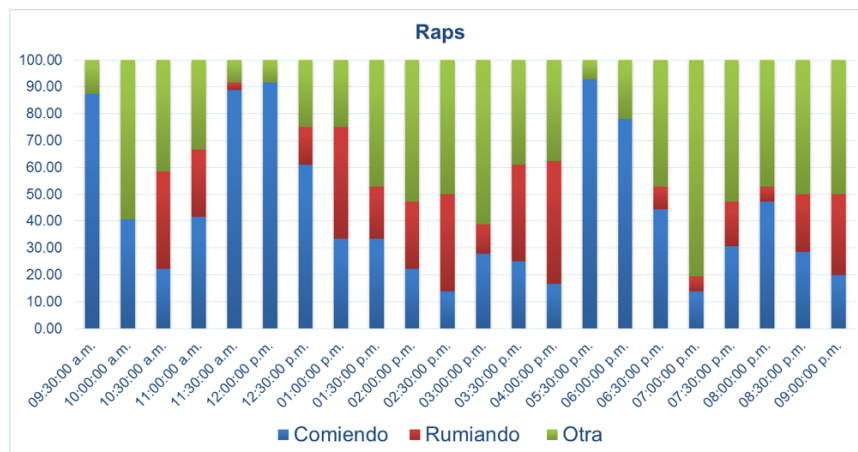


Figura 3 Distribución de actividades (comer, rumiar o sin actividad) que se encontraban realizando las vacas suplementadas con RF.

### 3.4 FERMENTACIÓN RUMINAL

#### 3.4.1 Concentración de ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal.

En el cuadro 10 se presenta la concentración de concentración de AGVs y nitrógeno amoniacal en muestras de licor ruminal. También se muestra la proporción molar de cada uno de los AGVs respecto al total determinado.

Para el total de AGVs se puede observar que la concentración molar fue mayor cuando las vacas se suplementaron con NF en comparación con la dieta control, sin embargo no fue distinta entre la suplementación con NF y RF. Este mismo patrón se presentó para la concentración molar de ácido acético. Se determinó que la concentración de este AGV, fue  $5,54 \text{ mmol L}^{-1}$  mayor cuando las vacas se suplementaron con NF en comparación a cuando consumieron la dieta control. Sin embargo, la proporción molar de este AGV fue superior en el muestreo de la tarde luego de que las vacas se suplementaron con RF. En el muestreo previo a la alimentación con BF (mañana) no se encontraron diferencias en la proporción de ácido acético cuando las vacas se alimentaron con las distintas dietas.

Las concentraciones de ácido propiónico no fueron distintas cuando las vacas fueron alimentadas con los tres grupos de alimentación en horas de la mañana. Además la concentración de este AGV fue superior en la mañana con respecto a la concentración de la tarde con las con la ración suplementada con RF y la dieta control. La concentración molar de este AGV fue inferior en la tarde cuando se suplementó con RF en comparación a cuando se suplementó con NF y la dieta control, además fue inferior a la concentración molar en la mañana con la misma dieta. La proporción molar de este AGV, mostró que en el muestreo de la mañana cuando las vacas se alimentaron con NF presentaron una menor proporción en comparación a cuando fueron alimentadas con la dieta control, sin embargo en el muestreo de la tarde, con la ración suplementada con RF, se presentó una menor proporción para este AGV.

Al relacionar las concentraciones de ácido acético y propiónico, se observa que esta relación fue mayor en horas de la tarde cuando las vacas se suplementaron con RF, en comparación a la medición en horas de la mañana, también fue significativamente mayor a cuando las vacas se suplementaron con NF y cuando consumieron la dieta control. Para

este indicador no se presentaron diferencias entre la suplementación con NF y la dieta control.

Para el ácido butírico se muestra que la concentración molar fue mayor cuando las vacas se suplementaron con NF en comparación a cuando recibieron la dieta control y la suplementación con RF. La proporción molar de este AGV fue mayor cuando las vacas consumieron NF, pero fue distinta únicamente a la dieta control; con respecto a la dieta suplementada con RF no se presentaron diferencias.

En cuanto a la concentración molar de los AGVs de cadena ramificada se presenta que en horas de la tarde fue mayor con la dieta control con respecto a las dietas suplementadas con BF, además las concentraciones de estos AGVs para todos los grupos de alimentación fueron mayores en horas de la mañana en comparación a los mismos grupos pero en el muestreo de la tarde.

La concentración molar del ácido caprónico no fue distinta en horas de la mañana con las tres dietas diferentes. Las concentraciones para este AGV fueron inferiores en la tarde respecto a horas de la mañana, siendo aún menor cuando las vacas se suplementaron con RF respecto a cuándo se alimentaron con la dieta control. De igual forma la concentración del ácido isobutírico no fue distinta cuando las vacas fueron alimentadas con las tres raciones en horas de la mañana, pero si fue superior a las concentraciones observadas en horas de la tarde. Con la suplementación con BF se presentaron las menores concentraciones molares para este AGV. El mismo patrón se presenta para las concentraciones molares del ácido isovalérico. La concentración del ácido valérico no fue distinta con las tres raciones, sin embargo la proporción de este AGV respecto al total, si varió siendo mayor con la dieta control y diferente a cuando las vacas se suplementaron con NF.

En cuanto a la concentración molar de nitrógeno amoniacal, se muestra que ésta fue menor en horas de la tarde cuando las vacas cuando las vacas se suplementaron con BF. En horas de la mañana, la concentración fue mayor con la ración con RF en comparación a la ración con NF. La disminución más drástica en concentración molar de nitrógeno amoniacal entre el muestreo de mañana y de la tarde se presenta con la ración suplementada con RF, disminuyendo 7,28 mmol L<sup>-1</sup>.

**Cuadro 10.** Concentración y proporción molar de ácidos grasos volátiles y amonio en licor ruminal.

	Horario		Tratamiento							Tratamiento*Horario							EEM	p-valor		
	am	pm	EEM	valor-p	C			NF				am			pm					
					C	NF	RF	EEM	valor-p	C	NF	RF	C	NF	RF	C			NF	RF
cC2	64,50 <sup>a</sup>	59,40 <sup>b</sup>	1,18	0,0040	59,65 <sup>b</sup>	65,19 <sup>a</sup>	61 <sup>ab</sup>	1,43	0,0266	64,11	65,81	63,56	55,19	64,57	58,44	2,03	0,1924			
cC3	18,17 <sup>a</sup>	15,39 <sup>b</sup>	0,42	<,0001	16,78 <sup>ab</sup>	17,76 <sup>a</sup>	15,80 <sup>b</sup>	0,49	0,0219	18,74 <sup>a</sup>	17,87 <sup>a</sup>	17,91 <sup>a</sup>	14,81 <sup>bc</sup>	17,65 <sup>ab</sup>	13,70 <sup>c</sup>	0,69	0,0082			
cC4	12,30 <sup>a</sup>	11,33 <sup>b</sup>	0,36	0,0417	10,70 <sup>b</sup>	13,08 <sup>a</sup>	11,67 <sup>b</sup>	0,42	0,0006	11,48	12,90	12,53	9,92	13,26	10,81	0,58	0,1343			
cCap	0,55 <sup>a</sup>	0,34 <sup>b</sup>	0,02	<,0001	0,45	0,46	0,42	0,02	0,2979	0,52 <sup>a</sup>	0,56 <sup>a</sup>	0,58 <sup>a</sup>	0,38 <sup>b</sup>	0,36 <sup>bc</sup>	0,26 <sup>c</sup>	0,03	0,0091			
clsbut	1,06 <sup>a</sup>	0,64 <sup>b</sup>	0,03	<,0001	0,92 <sup>a</sup>	0,80 <sup>b</sup>	0,83 <sup>ab</sup>	0,03	0,0110	1,04 <sup>a</sup>	1,07 <sup>a</sup>	1,08 <sup>a</sup>	0,79 <sup>b</sup>	0,53 <sup>c</sup>	0,59 <sup>c</sup>	0,04	0,0009			
clsoval	1,49 <sup>a</sup>	0,71 <sup>b</sup>	0,04	<,0001	1,27 <sup>a</sup>	0,97 <sup>b</sup>	1,06 <sup>b</sup>	0,05	0,0002	1,51 <sup>a</sup>	1,43 <sup>a</sup>	1,51 <sup>a</sup>	1,02 <sup>b</sup>	0,51 <sup>c</sup>	0,61 <sup>c</sup>	0,07	0,0032			
cVal	1,53 <sup>a</sup>	1,00 <sup>b</sup>	0,04	<,0001	1,32	1,27	1,21	0,05	0,2889	1,52	1,53	1,56	1,13	1,01	0,86	0,07	0,0852			
cAGVscr	4,64 <sup>a</sup>	2,69 <sup>b</sup>	0,10	<,0001	3,97 <sup>a</sup>	3,51 <sup>b</sup>	3,53 <sup>ab</sup>	0,13	0,0258	4,61 <sup>a</sup>	4,59 <sup>a</sup>	4,73 <sup>a</sup>	3,34 <sup>b</sup>	2,42 <sup>c</sup>	2,32 <sup>c</sup>	0,18	0,0091			
cAGVt	99,63 <sup>a</sup>	88,83 <sup>b</sup>	1,83	0,0002	91,15 <sup>b</sup>	99,54 <sup>a</sup>	92,00 <sup>ab</sup>	2,23	0,02	99,99 <sup>ab</sup>	101,18	98,73	83,31	97,10	85,28	3,19	0,1392			
pC2	64,77 <sup>b</sup>	66,98 <sup>a</sup>	0,27	<,0001	65,56	65,60	66,46	0,33	0,1293	64,78 <sup>b</sup>	65,16 <sup>b</sup>	64,38 <sup>b</sup>	66,34 <sup>b</sup>	66,05 <sup>b</sup>	68,55 <sup>a</sup>	0,48	0,0038			
pC3	18,22 <sup>a</sup>	17,24 <sup>b</sup>	0,23	0,0002	18,30 <sup>a</sup>	17,81 <sup>a</sup>	17,08 <sup>b</sup>	0,26	0,0008	18,93 <sup>a</sup>	17,61 <sup>b</sup>	18,12 <sup>ab</sup>	17,67 <sup>ab</sup>	18,00 <sup>ab</sup>	16,04 <sup>c</sup>	0,33	0,0005			
pC4	12,33	12,70	0,20	0,1509	11,77 <sup>b</sup>	13,09 <sup>a</sup>	12,68 <sup>a</sup>	0,24	0,0004	11,59	12,70	12,68	11,93	13,48	12,68	0,32	0,4539			
pCap	0,55 <sup>a</sup>	0,38 <sup>b</sup>	0,01	<,0001	0,50	0,46	0,45	0,01	0,1322	0,52 <sup>ab</sup>	0,55 <sup>ab</sup>	0,59 <sup>a</sup>	0,47 <sup>bc</sup>	0,37 <sup>cd</sup>	0,30 <sup>d</sup>	0,02	0,0001			
plsobut	1,07 <sup>a</sup>	0,77 <sup>b</sup>	0,02	<,0001	1,00 <sup>a</sup>	0,80 <sup>c</sup>	0,89 <sup>b</sup>	0,02	<,0001	1,05 <sup>a</sup>	1,06 <sup>a</sup>	1,09 <sup>a</sup>	0,95 <sup>b</sup>	0,54 <sup>d</sup>	0,69 <sup>c</sup>	0,03	<,0001			
plsoval	1,49 <sup>a</sup>	0,82 <sup>b</sup>	0,04	<,0001	1,38 <sup>a</sup>	0,97 <sup>c</sup>	1,13 <sup>b</sup>	0,05	<,0001	1,53 <sup>a</sup>	1,41 <sup>ab</sup>	1,54 <sup>a</sup>	1,22 <sup>b</sup>	0,52 <sup>c</sup>	0,71 <sup>c</sup>	0,06	<,0001			
pVal	1,54 <sup>a</sup>	1,13 <sup>b</sup>	0,04	<,0001	1,44 <sup>a</sup>	1,27 <sup>b</sup>	1,31 <sup>ab</sup>	0,04	0,0109	1,52 <sup>ab</sup>	1,50 <sup>ab</sup>	1,59 <sup>a</sup>	1,35 <sup>b</sup>	1,03 <sup>c</sup>	1,02 <sup>c</sup>	0,06	0,0022			
pAGVscr	4,66 <sup>a</sup>	3,06 <sup>b</sup>	0,08	<,0001	4,32 <sup>a</sup>	3,49 <sup>b</sup>	3,77 <sup>b</sup>	0,10	<,0001	4,64 <sup>a</sup>	4,52 <sup>ab</sup>	4,82 <sup>a</sup>	3,99 <sup>b</sup>	2,47 <sup>c</sup>	2,73 <sup>c</sup>	0,13	<,0001			
C2:C3	3,57 <sup>b</sup>	3,93 <sup>a</sup>	0,06	<,0001	3,61 <sup>b</sup>	3,71 <sup>b</sup>	3,93 <sup>a</sup>	0,06	0,0009	3,44 <sup>b</sup>	3,71 <sup>b</sup>	3,57 <sup>b</sup>	3,77 <sup>b</sup>	3,71 <sup>b</sup>	4,30 <sup>a</sup>	0,09	0,0002			
(C2+C4):C3	4,25 <sup>b</sup>	4,67 <sup>a</sup>	0,07	<,0001	4,26 <sup>b</sup>	4,46 <sup>b</sup>	4,68 <sup>a</sup>	0,08	0,0002	4,06 <sup>c</sup>	4,44 <sup>bc</sup>	4,27 <sup>bc</sup>	4,45 <sup>b</sup>	4,48 <sup>b</sup>	5,09 <sup>a</sup>	0,10	0,0003			
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	9,81 <sup>a</sup>	4,64 <sup>b</sup>	0,33	<,0001	8,76 <sup>a</sup>	5,52 <sup>c</sup>	7,39 <sup>b</sup>	0,4	<,0001	10,08 <sup>ab</sup>	8,31 <sup>b</sup>	11,03 <sup>a</sup>	7,44 <sup>b</sup>	2,73 <sup>c</sup>	3,75 <sup>c</sup>	0,55	0,0005			

C: dieta control; NF: Nabo forrajero; RF: Raps forrajero; cC2: concentración de ácido acético (mmol L<sup>-1</sup>); cC3: concentración de ácido propiónico (mmol L<sup>-1</sup>); cC4: concentración de ácido butírico (mmol L<sup>-1</sup>); cCap: concentración de ácido caproico (mmol L<sup>-1</sup>); clsbut: concentración de ácido isobutírico (mmol L<sup>-1</sup>); clsoval: concentración de ácido isovalérico (mmol L<sup>-1</sup>); cVal: concentración de ácido valérico (mmol L<sup>-1</sup>); cAGVscr: concentración de ácidos grasos volátiles de cadena ramificada (valérico, isovalérico, isobutírico, caproico) (mmol L<sup>-1</sup>); cAGVt: concentración de ácidos grasos volátiles totales (mmol L<sup>-1</sup>); C2:C3: relación ácido acético: ácido propiónico; pC2: proporción ácido acético (mmol mol<sup>-1</sup>); pC3: proporción ácido propiónico (mmol mol<sup>-1</sup>); pC4: proporción ácido butírico (mmol mol<sup>-1</sup>); pCap: proporción ácido caproico (mmol mol<sup>-1</sup>); plsobut: proporción ácido isobutírico (mmol mol<sup>-1</sup>); plsoval: proporción ácido isovalérico (mmol mol<sup>-1</sup>); pVal: proporción ácido valérico (mmol mol<sup>-1</sup>); pAGVscr: proporción ácidos grasos volátiles de cadena ramificada (mmol mol<sup>-1</sup>); NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: Amonio (mmol L<sup>-1</sup>). EEM: error estándar de la media. p-valor= valor de probabilidad. Letras distintas entre las filas reflejan una diferencia estadísticamente significativa entre los datos (P < 0,0)

### 3.4.2 pH RUMINAL

En la figura 4 se observa la media y error estándar del pH ruminal por hora de vacas suplementadas con NF, RF y dieta control. En el mismo se puede observar que el pH ruminal no presenta diferencias significativas entre los grupos de suplementación y el grupo control desde las 00:00 a las 16:00 horas. A las 17:00 horas se muestra una tendencia, siendo inferior el pH de vacas suplementadas con NF en comparación a cuando consumieron dieta control. De las 18:00 a las 23:00 horas, se observan diferencias significativas en los valores promedios de pH a nivel ruminal, mostrando en este lapso de tiempo a excepción de las 19:00 horas que las vacas cuando se les ofreció la dieta control y que se suplementaron con raps, presentaron valores promedios más altos de pH con respecto a cuándo se suplementaron con Nabo.

Al comparar el pH ruminal de vacas suplementadas con RF y dieta control, se muestra que cuando fueron suplementadas, presentaban valores de pH más bajos únicamente a las 19:00 horas. La cantidad de minutos bajo límites específicos de pH ruminal y el pH ruminal promedio por día, se presentan en el cuadro 11.

El promedio de pH diario cuando las vacas consumieron las 3 distintas raciones, fue superior a 6,2. Sin embargo el pH ruminal fue significativamente menor cuando las vacas se suplementaron con NF, con respecto a cuándo se suplementaron con RF y con la dieta control. Además se muestra que cuando las vacas se suplementaron con NF y RF, pasaron 257,5 y 100,9 minutos al día con pH ruminal bajo 6,0 respectivamente. Además cuando consumieron NF y RF, estuvieron 418 y 367 minutos respectivamente con pH ruminal entre 6,2 y 6,0.

También se presenta que cuando las vacas no se suplementaron con BF, el pH ruminal se mantuvo entre 6,2 y 6,0 durante 267,4 y solamente durante 49,7 minutos estuvo bajo 6,0.

Cuando las vacas consumieron las tres distintas raciones, el pH ruminal promedio no fue inferior a 5,9.

**Cuadro 11.** pH promedio y tiempo bajo límites específicos de pH ruminal en vacas suplementadas con BF y una dieta control.

	Tratamiento				p-valor
	Control	Raps	Nabo	EEM	
pH promedio	6,32 <sup>a</sup>	6,30 <sup>a</sup>	6,23 <sup>b</sup>	0,035	<0,0001
pH Bajo 6,2 y sobre 6 (min día <sup>-1</sup> )	267,4	367,4	418,9	85,98	0,0971
pH Bajo 6 (min día <sup>-1</sup> )	49,7	100,9	257,5	71,51	0,0994

EEM= Error estándar de la media. p-valor= valor de probabilidad. Letras distintas entre las filas reflejan una diferencia estadísticamente significativa entre los datos (P < 0,05).

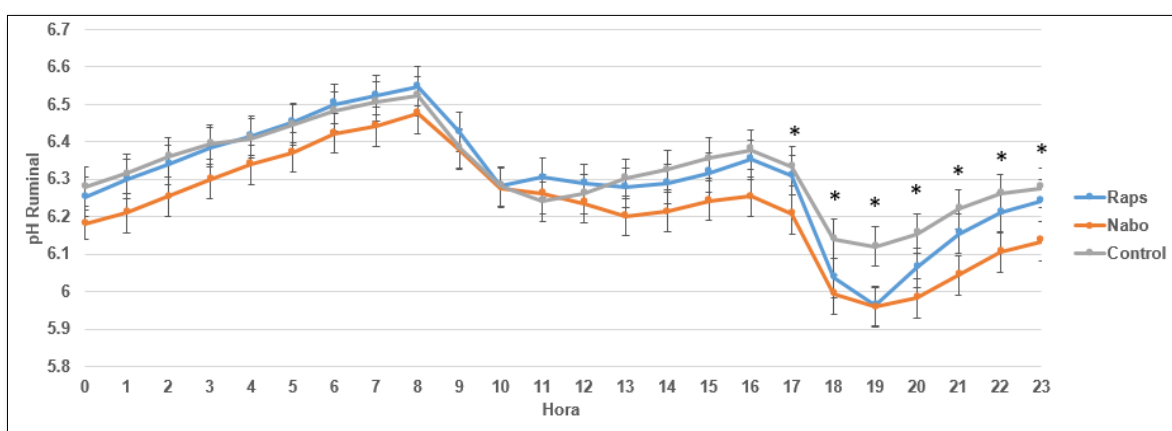


Figura 4 pH ruminal en vacas suplementadas con NF, RF y dieta control

### 3.4.3 Metabolismo del nitrógeno y síntesis de proteína microbiana

En el cuadro 12, se presentan indicadores del metabolismo del nitrógeno, excreción de derivados de purinas y síntesis de proteína microbiana.

Los derivados de purinas encontrados en muestras de orina, fueron alantoína y ácido úrico, xantina e hipoxantina no fueron detectadas en las muestras, sin embargo, en muestras de orina de bovinos es esperable no encontrar estos DP.

Tanto las concentraciones de los derivados de purinas como de creatinina y la síntesis de proteína microbiana, fueron distintos según la suplementación alimenticia que recibiera las vacas.

La concentración molar de alantoína en muestras de orina de vacas suplementadas con NF fue superior, en comparación con las vacas no suplementadas con BF, sin embargo no fue

distinta entre vacas suplementadas con RF y dieta control. Además no existieron diferencias en la concentración si la suplementación fue con NF o con RF. Este mismo patrón ocurrió con la concentración molar de ácido úrico pero en este caso la dieta control fue distinta a la suplementación con ambas BF.

La concentración molar de creatinina fue superior cuando las vacas se suplementaron NF en comparación a cuando fueron suplementadas con RF y con la dieta control. Además la concentración fue mayor cuando las vacas se suplementaron con RF en comparación a cuando no fueron suplementadas con BF.

La relación entre (concentración de alantoína+ concentración de ácido úrico): concentración de creatinina se reporta como el índice de excreción urinaria y este fue superior en las muestras de vacas suplementadas con BF en comparación a cuando consumieron la dieta control.

La excreción de derivados de purinas, las purinas absorbidas, el aporte de nitrógeno microbiano y la síntesis de proteína microbiana fue superior cuando las vacas fueron suplementadas con NF con respecto a cuándo no fueron suplementadas BF y fue igual a cuando se suplementaron con RF. Sin embargo no fue distinta entre la suplementación con RF y la dieta control.

La síntesis de nitrógeno microbiana por Kg de MS y Kg de MS digestible consumido fue mayor con la dieta con RF en comparación a cuando consumieron la dieta control. Para este indicador, no hubo diferencias entre la suplementación con NF y la suplementación con RF, ni con la dieta control.

Cuando las vacas fueron suplementadas con NF, a nivel ruminal se sintetizó en promedio 557,3 g más de proteína microbiana, en comparación a cuando fueron alimentadas con la dieta control.

No existió diferencias entre los tratamientos y dieta control en cuanto a la eficiencia del uso del nitrógeno para la síntesis de proteínas lácteas. Tampoco se presentaron diferencias para la urea en sangre y en leche entre los tratamientos y dieta control.

**Cuadro 12.** Indicadores del metabolismo del Nitrógeno, concentración, excreción de derivados de purinas y síntesis de proteína microbiana.

	Tratamiento				p-valor
	Control	Raps	Nabo	EEM	
CAlant (mmol L <sup>-1</sup> )	6,46 <sup>b</sup>	7,37 <sup>ab</sup>	8,32 <sup>a</sup>	0,43	0,0166
CAU (mmol L <sup>-1</sup> )	0,16 <sup>b</sup>	0,39 <sup>a</sup>	0,38 <sup>a</sup>	0,06	0,0461
CCreat (mmol L <sup>-1</sup> )	2,90 <sup>b</sup>	2,39 <sup>c</sup>	3,17 <sup>a</sup>	0,09	<,0001
EAlant (mmol día <sup>-1</sup> )	291,02 <sup>b</sup>	393,45 <sup>a</sup>	359,73 <sup>a</sup>	16,60	0,0001
EAU (mmol día <sup>-1</sup> )	7,31 <sup>b</sup>	19,66 <sup>a</sup>	18,55 <sup>ab</sup>	3,32	0,022
IEU	2,33 <sup>b</sup>	3,31 <sup>a</sup>	3,29 <sup>a</sup>	0,23	0,012
DPe (mmol día <sup>-1</sup> )	264,68 <sup>b</sup>	368,67 <sup>a</sup>	314,36 <sup>ab</sup>	17,47	0,002
Pa (mmol día <sup>-1</sup> )	260,10 <sup>b</sup>	382,74 <sup>a</sup>	318,85 <sup>ab</sup>	20,59	0,002
N mic (g día <sup>-1</sup> )	189,11 <sup>b</sup>	278,27 <sup>a</sup>	231,82 <sup>ab</sup>	14,97	0,002
N mic/Kg MS (g/kg MS)	10,15 <sup>b</sup>	15,61 <sup>a</sup>	12,92 <sup>ab</sup>	0,90	0,0019
Nmic/Kg MSdig (g/kg MS)	12,72 <sup>b</sup>	19,54 <sup>a</sup>	16 <sup>ab</sup>	1,11	0,0017
PMt (g día <sup>-1</sup> )	1181,92 <sup>b</sup>	1739,19 <sup>a</sup>	1448,88 <sup>ab</sup>	93,60	0,002
N consumido (g)	228,26	239,98	231,99	8,88	0,499
N retenido en leche (g)	50,96	51,99	52,74	1,49	0,308
Efic uso N en leche (%)	22,88	22,78	21,75	0,69	0,459
Urea sangre (mg dL <sup>-1</sup> )	31,38	32,99	34,76	1,63	0,245
Urea en leche (mg dL <sup>-1</sup> )	30,68	27,36	29,07	1,85	0,228

CAlant = concentración de alantoína; CAU = concentración de Ácido úrico; CCreat = concentración de creatinina; EAlant = excreción diaria de alantoína; EAU = excreción diaria de ácido úrico, DPe= excreción diaria de los derivados de purinas; Pa = Absorción diaria de derivados de purinas. Nmic = Aporte de nitrógeno microbiano. PMt: Síntesis de proteína microbiana total. IEU = Índice de excreción urinaria; N mic/Kg MS = Nitrógeno microbiano por kg de MS consumida; N mic/Kg MSdig = Nitrógeno microbiano por kg de MS digestible consumida; EEM= Error estándar de la media. p-valor= valor de probabilidad. Letras distintas entre las filas reflejan una diferencia estadísticamente significativa entre los datos (P < 0,05).

### 3.5 PARAMETROS SANGUINEOS

#### 3.5.1 Hemograma, GGT y Urea en Sangre.

El perfil sanguíneo de vacas suplementadas con NF, RF y dieta control, se muestra en cuadro 13. Para los resultados del hemograma se excluyó el dato de una vaca consumiendo NF en el periodo 1 y dos consumiendo NF y una consumiendo RF en el periodo 2 esto debido a que las muestras de sangre se coagularon antes de realizar el análisis de laboratorio.

En los resultados del hemograma, se observa que ninguno de los índices eritrocíticos: volumen corpuscular medio (VCM) y concentración de hemoglobina corpuscular medio (CHCM), fueron diferentes entre los grupos de suplementación ni estos con el grupo de

alimentación control. Tampoco se observó diferencias entre los grupos de alimentación para los valores de hematocrito, eritrocitos ni de hemoglobina. Además, en ninguna de las muestras analizadas se detectaron cuerpos de Heinz.

Los resultados no muestran diferencias en el contenido de leucocitos y los componentes de este entre las vacas cuando fueron suplementadas con BF ni comparando estas a cuando consumieron la dieta control.

La concentración de urea en sangre no fue diferente entre los grupos de vacas suplementadas ni tampoco fue diferente entre éstas y el grupo control. De igual forma la gama glutamil transpeptidasa (GGT) no fue diferente entre los grupos de suplementación con brásicas, ni estos con el grupo control.

**Cuadro 13.** Media de mínimos cuadrados y error estándar de parámetros sanguíneos de vacas suplementadas con NF, RF y dieta control.

Perfil Sanguíneo	Tratamiento			
	Control	Raps	Nabo	p-valor
GGT (U/L)	97,01 ± 32,36	132,47 ± 32,36	94,78 ± 32,36	0,3197
VGA (%)	28,79 ± 0,45	28,82 ± 0,47	28,87 ± 0,54	0,9920
Hemoglobina (g/L)	90,20 ± 1,91	88,53 ± 1,94	89,58 ± 2,07	0,5254
Eritrocitos (x10 <sup>6</sup> /μL)	6,04 ± 0,15	6,01 ± 0,15	6,08 ± 0,15	0,7100
Leucocitos (n/μL)	7970,97 ± 723	8555,9 ± 757	8608,5 ± 870	0,7813
VCM (fL)	47,60 ± 1,27	47,82 ± 1,28	47,80 ± 1,31	0,9275
CHCM (g/L)	313,47 ± 4,03	307,19 ± 4,13	308,50 ± 4,48	0,2183
Protrombina (g/L)	85,89 ± 1,86	84,32 ± 1,88	83,58 ± 1,93	0,1617
Eosinófilos (n/μL)	709,52 ± 203	940,74 ± 207	734,17 ± 223	0,4284
Neutrófilos (n/μL)	3472,16 ± 693	4094,3 ± 718	4381,3 ± 797	0,5682
Linfocitos (n/μL)	2885,59 ± 334	3240,8 ± 345	3239,6 ± 383	0,5269
Monocitos (n/μL)	351,64 ± 62	335,60 ± 65	446,85 ± 75	0,5095
Triiodotironina (nmol/L)	2,52± 0,52	2,25± 0,53	2,50± 0,54	0,7045
Cuerpos de Heinz	ND	ND	ND	

VCM= volumen corpuscular medio; CHCM= concentración de hemoglobina corpuscular medio. EEM = error estándar de la media, VGA= Hematocrito. GGT= Gamma glutamil transpeptidasa. EEM= Error estándar de la media. p-valor= valor de probabilidad. Letras distintas entre las filas reflejan una diferencia estadísticamente significativa entre los datos (P < 0,05). ND = No detectados.

### 3.5.2 Hormonas tiroideas.

En el cuadro 13, también se presenta el valor de concentración plasmática de la hormona tiroidea, triiodotironina (T3), obtenidas de cada una de las vacas utilizadas en el ensayo. Estos resultados muestran que no existieron diferencias significativas en la concentración plasmática de esta hormona entre los tres grupos de alimentación.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 PRODUCCIÓN, COMPOSICIÓN DE LECHE, CONSUMO DE MS Y NUTRIENTES

#### 4.1.1 Producción de leche, consumo de materia seca y nutrientes.

Los resultados del ensayo muestran que no existieron diferencias significativas en producción de leche entre los tratamientos con BF y tampoco entre estos con la dieta control. Otros estudios como el reportado por Parga *et al.* (2015) difieren de este resultado mostrando que la producción de leche fue significativamente mayor en vacas a las que se les ofreció 30 kg día<sup>-1</sup> de MS de pradera en pastoreo y fueron suplementadas con 4 kg de MS de alimento concentrado en comparación con vacas a las que se les ofreció la misma cantidad de pradera en pastoreo pero suplementadas con 4 kg de NF bajo sistema de pastoreo. Sin embargo, es importante considerar que el sistema de alimentación de ambos ensayos fue distinto debido a que en el ensayo reportado por Parga *et al.* (2015) las vacas permanecieron bajo un sistema de pastoreo.

Contrario a la producción de leche, el CMS, si fue distinto entre los grupos suplementados y la dieta control, siendo menor cuando las vacas fueron suplementadas con BF. Moate *et al.* (1998), reportaron que el CMS y la producción de leche fueron superiores cuando se suplementó a vacas lecheras estabuladas con 6 kg de MS de NF a las cuales se les ofrecía una dieta basal de 3 kg de MS de heno y 6 kg de MS de ensilaje de pradera en comparación a cuando solo consumieron la dieta basal. No obstante el CMS y la producción de leche fue menor cuando se sustituyó los 6 kg de MS de suplemento de NF por una misma cantidad de MS de cebada, y ofreciendo también la misma cantidad de dieta basal.

En otro estudio, Moate *et al.* (1999) mostraron que el consumo de materia seca total también fue menor en una ración con 10 kg de ración basal (2 kg MS de heno, 3 kg MS de pradera de ballica perenne y 5 kg MS de ensilaje de pradera), suplementada con 5 kg de MS de NF planta entera en comparación con otra ración con los mismos 10 kg de ración basal pero suplementada con 5 kg MS de cebada, sin embargo el consumo de materia seca fue aún mayor cuando se ofreció la misma ración basal pero suplementada con 3 kg de MS de NF y 2 kg MS de cebada, por lo que se evidencia que el consumo de materia seca total también

podría estar influenciado no solo por la suplementación del NF sino por la combinación con otros ingredientes en la ración.

La disminución en el consumo de materia seca total en vacas lecheras suplementadas con BF puede ser debido a distintos factores. Algunos autores como Smith (1980) y Barry (2013) indican que la ingesta de BF podría generar un menor consumo de materia seca, asociado principalmente a factores antinutricionales que están presentes en estas plantas y que pueden ocasionar anemia hemolítica. Debido a esto, Lanuza (2011) sugiere que el consumo de BF no exceda el 30% de la ración total BMS. Sin embargo, el consumo de NF y RF fue de 3,31 y 3,08 kg de MS lo que corresponde apenas a un 16,0% y 14,9% respectivamente del consumo de materia seca total, valores que están por debajo de dichas sugerencias o recomendaciones prácticas.

La consideración de que el consumo de materia seca total fue menor debido a factores antinutricionales presentes en la BF aún con un consumo por debajo de lo máximo recomendado, se puede descartar debido a que los animales no presentaron ningún perfil sanguíneo que indicara algún tipo de problema de salud como anemia hemolítica u otro ocasionado por la ingestión de estas plantas como se presentó en los resultados de perfiles sanguíneos.

A pesar de esta sugerencia en cuanto al nivel de inclusión, en algunos estudios como el presentado por Moate *et al.* (1998) en vacas lecheras en estabulación, se reportan un consumo de 5,1 kg de MS de NF lo que correspondía al 38% de la MS total ingerida, sin reportar problemas productivos o de salud asociados a este nivel de consumo. De igual forma Moate *et al.* (1999) reportaron consumos de materia seca del 31 % de la ración total en vacas estabulas, las cuales no presentaron problema fisiológico alguno.

Las características físicas propias de los alimentos también pueden ser un factor importante en cuanto al nivel de consumo individual de los alimentos (Stefaniski *et al.*, 2010). Dentro de estas características está la morfología propia de las plantas ofrecidas. Moate *et al.* (1999) en un ensayo con vacas estabuladas y suplementadas con nabo forrajero, indican que algunas vacas rechazaban consumir la hoja y otras más la raíz por lo que esto podría ser un factor determinante en cuanto al consumo de este alimento. En el caso del ensilaje, el proceso de conservación al que es sometido también podría ser importante para su

consumo. El alto contenido de humedad de las BF, implicó que el volumen ofrecido de alimento en materia fresca a los animales fuese mayor en comparación con la dieta control, esto también pudo influir en el comportamiento ingestivo de las vacas.

Aspectos como la relación hoja:tallo en el RF y hoja:raíz en el NF pudieron ser fundamentales en cuanto al consumo.

La estructura de la planta como tal y el mayor volumen suministrado debido a su alto contenido de humedad pudieron ser factores que influyeran sobre la tasa de pasaje de estos alimentos por el rumen-retículo y esto está relacionado directamente con el consumo de materia seca (AFRC, 1993). Las raciones suplementadas con NF y RF fueron mucho más voluminosas que la ración control, y esto debido principalmente por el bajo contenido de MS en las brásicas.

En el caso del RF, se observó que las vacas preferían consumir las hojas ante los tallos y la gran parte del residuo fueron tallos. En el caso del NF, la experiencia fue más variada debido a que algunos animales preferían consumir las raíces y otros preferían las hojas. Esto se evidenció al extraer los residuos de los comederos. Estos aspectos pudieron ser aún más determinantes que el contenido de factores antinutricionales para que el consumo de NF y RF fuesen apenas el 66,2% y 61,6% de lo ofrecido. Lo que sugiere que estos porcentajes en el consumo de BF afectan el consumo de materia seca total de forma importante.

A pesar de que las vacas presentaron un menor CMS cuando fueron suplementadas con BF, no se observó diferencias en el CMS digestible, lo que podría estar explicando que no se presentaran diferencias en la producción de leche. Esto debido a la mayor digestibilidad de la ración total cuando se suplementó.

#### 4.1.2 Consumo de ingredientes y nutrientes.

La variación en la composición de cada ración y de los ingredientes en ésta, también implicó que el consumo de algunos nutrientes fuese distinta, lo que como se ha mostrado, no solo no generó un efecto sobre la cantidad de leche producida sino que tampoco generó diferencias en la calidad nutricional de la misma, mostrando valores similares en el

porcentaje de proteína, grasa y lactosa. No obstante, el consumo real de nutrientes como la EM y PC, fueron superiores a los requerimientos para animales con estas características productivas, lo que implicó que ninguno de estos nutrientes fuese limitante. Según NRC (2001), vacas con peso promedio de 550 kg, produciendo en promedio 24,2 Kg de leche con 4,3 % de grasa, tiene requerimiento diario de 46,75 Mcal de EM y 2,735 Kg de PC, valores que están por debajo de los consumos reales de estos nutrientes.

Cuando las vacas fueron suplementadas con BF presentaron menores consumos de FDA y FDN en comparación con la dieta control y el caso del consumo de FDN en particular, su consumo no solo fue menor al de la dieta control sino que también fue menor cuando las vacas se suplementaron con NF en comparación con RF. Sin embargo, el porcentaje de FDN consumido en ninguna de las raciones suplementadas fue menor a un 33% y esto también pudo ser determinante para que evitar que las vacas cuando estuvieron en alguno de los tratamientos y en grupo control sufrieran acidosis ruminal subaguda. NRC (2001), recomienda que una ración total debería contener un mínimo de 33% de FDN y que de este porcentaje, al menos un 15% provenga de forrajes, condición que se cumple en las tres raciones utilizadas en este estudio como se mostró en el cuadro 3.

Además, a pesar de que los consumos de fibra fueron distintos en los diferentes grupos de alimentación, no se observaron diferencias en los porcentajes de grasa en leche, esto debido posiblemente a que con los nutrientes consumidos se contaba con precursores de grasa láctea suficiente.

Al evaluar la relación producción de leche por consumo de materia seca, se observa que cuando las vacas se suplementaron con BF, esta relación fue significativamente mayor con respecto a cuándo las vacas no fueron suplementadas. Este resultado señala una mayor eficiencia de la conversión alimenticia cuando las vacas consumen BF, lo que puede deberse a una mayor eficiencia en la fermentación ruminal de estos alimentos (Sun *et al.*, 2016).

Este resultado es particularmente importante debido a que señala una mayor eficiencia en la conversión de los alimentos aun considerando que el consumo de alimento concentrado fue menor cuando las vacas no fueron suplementadas con BF, lo que eventualmente dependiendo del costo de los alimentos concentrados podría representar también una ventaja económica.

#### 4.1.3 Composición de leche.

Los resultados mostraron que la composición nutricional no fue distinta entre los tres grupos de alimentación. Por lo tanto, en este estudio, la suplementación con BF, no fue determinante en la concentración de los componentes lácteos.

La composición de la leche bovina podría variar dependiendo de distintos factores algunos propios del animal y otros del ambiente (Schwendel *et al.*, 2015). Dentro de los factores ambientales, la dieta ofrecida es uno de los que genera mayor impacto. Ferlay *et al.* (2008); Larsen *et al.* (2010); Palmquist *et al.* (1993); Bauman *et al.* (2006); señalan que la grasa es el componente de los sólidos lácteos que se puede modificar más fácilmente y esto se puede lograr mediante modificaciones de la dieta. Además, Bachman, (1992), indica que la variación podría llegar a ser de 2 hasta 3 unidades porcentuales.

La dieta ofrecida a las vacas, podría modificar el perfil de AGVs producidos en el rumen y estos a su vez modificar las características nutricionales de la leche. Los AGVs acético y butírico son precursores de la fracción lipídica de la leche bovina (Houten y Wanders, 2010), por lo tanto una modificación en la producción de estos podría afectar la concentración de grasa en leche.

En los resultados del presente estudio se reporta que la producción de ácido acético y butírico es mayor cuando las vacas fueron suplementadas con NF en comparación con la dieta control. Sin embargo, al analizar los datos promedio de grasa láctea con las tres distintas dietas se observa que son valores considerablemente altos (sobre 4,28%) en los tres casos para este tipo de animal, lo que indica que a pesar de existir diferencias en las concentraciones de AGV, las cantidades disponibles no fueron limitantes en ninguno de los casos para alcanzar valores potenciales. Este patrón en la grasa láctea es similar al reportado por Moate *et al.* (1999), donde indica que no hubo diferencias significativas en % de grasa láctea con vacas suplementadas con 4 kg de NF en comparación a una ración sin brásicas.

## 4.2 ACTIVIDADES DE COMPORTAMIENTO INGESTIVO

A pesar de que las vacas suplementadas con BF mostraron un menor consumo de materia seca total, éstas se mantuvieron mayor cantidad de tiempo comiendo en comparación a cuando no fueron suplementadas. Adicionalmente también se observa que las vacas suplementadas con NF estuvieron más tiempo comiendo en comparación con las que fueron suplementadas con RF. Esta variación puede deberse a las diferencias morfológicas de las dos especies de BF, ya que el NF se ofrecía con la raíz entera. Algunas de estas raíces eran de gran tamaño, lo que podrían generar algún tipo de dificultad para su consumo y por esta razón permanecían más tiempo intentando consumirlas. No obstante ambas BF, fueron consumidas por los animales. Algunos autores indican que la forma del alimento (Welch y Hooper, 1988) y las características morfológicas de las plantas (Stefaniski *et al.*, 2010) son factores determinantes en la cantidad de tiempo que un animal rumiante dedica a comer.

El porcentaje de materia seca de la ración es otro factor determinante que pueden incidir sobre el tiempo que permanecen los animales consumiendo alimento (Welch y Hooper, 1988). En ese sentido, las vacas cuando fueron suplementadas con NF, consumían una ración con cerca del 9,10 % menos MS que la ración que consumían como control, por lo tanto para llegar a consumir similar cantidad de MS debían ingerir un volumen mayor de materia fresca. Para lograr consumir ese mayor volumen debían pasar más tiempo comiendo, esto puede explicar su mayor proporción de tiempo con actividad ingestiva. Misma situación ocurre cuando las vacas fueron suplementadas con RF en comparación a cuando consumieron la dieta control. En el caso del RF, el porcentaje de MS de la ración total fue 8,58 % menos comparada con la ración control.

Ciertamente la variación del contenido de MS de ración total es explicada por la inclusión de BF, debido a que el % de MS de estos ingredientes en la ración era mucho menor al de los alimentos sustituidos (ensilaje de pradera y concentrado). Por lo tanto, para ofrecer iguales cantidades de MS se ofrecieron mayores volúmenes de materia fresca. Esto también pudo ser un factor para que las vacas permanecieran aún más tiempo comiendo NF en comparación a cuando se suplementaron con RF, la cual presentaba en planta entera una mayor % de MS compara con el NF.

Al permanecer menos tiempo comiendo las vacas cuando se encontraban consumiendo la dieta control, destinaron una mayor proporción de su tiempo a rumiar y esto fue principalmente cuando estuvieron de pie. Además, permanecieron una mayor proporción del tiempo sin actividad. Esta mayor proporción de tiempo en actividad de rumia favorece una mayor producción de saliva la cual contiene sustancias amortiguadoras del pH ruminal (Contreras y Noro, 2010). Esto es coincidente con los resultados de pH mostrados donde se reporta que cuando las vacas consumían dieta control, presentaron pH más alto en comparación a cuando consumieron la dieta con NF.

Los resultados presentados para actividad de rumia con la dieta suplementada con NF y RF difieren a resultados reportados por Stockdale y King (1983), donde indican que en promedio las vacas permanecen 27% de su tiempo rumiando y en el presente estudio se muestra que con la dieta suplementada con RF y NF las vacas pasaron 17,9 y 15,1 % de su tiempo rumiando. Roca, (2010) señala que en sistemas en confinamiento, los animales destinan aún más tiempo a la rumia que en pastoreo y reportan valores del 30% del tiempo a esta actividad, pero con vacas alimentadas con una ración mezclada totalmente y ofrecida una vez al día a base de forrajes y concentrado. Además, señala que vacas en estabulación disminuyen el tiempo que dedican a comer debido a la facilidad de la obtención del alimento.

Las características morfológicas de las BF pudieron ser un factor muy determinante para modificar el comportamiento ingestivo (Stefaniski *et al.*, 2010), pudiendo esto aumentar el tiempo de consumo y disminuyendo el tiempo de rumia en vacas suplementadas con BF.

El mayor tiempo de rumia también puede estar asociado a un mayor contenido de fibra en la ración. Autores como Dado y Allen (1995), Varga *et al.* (1998); Bae *et al.* (1981); Chermiti *et al.* (1994); indican que el contenido de FDN de la ración, aumenta el número de rumias por día. Lo que puede relacionarse además a un menor tiempo dedicado a consumo. La dieta control del presente estudio presentaba un 37,6 % de FDN, el cual era superior al 33,2% y 32,5 % en las raciones suplementadas con RF y NF, respectivamente.

Según resultados de este estudio, cuando las vacas no fueron suplementadas con BF, consumieron 1,2 Kg y 1,07 Kg más FDN en comparación a cuando se suplementaron con NF y RF, respectivamente y coincidentemente, también pasaron mayor proporción de su tiempo rumiando. No obstante este patrón no se presentó comparando los resultados de las vacas cuando consumieron NF y RF, esto porque a pesar de que cuando las vacas se

suplementaron con RF, consumieron  $130 \text{ g dia}^{-1}$  más FDN en comparación a cuando fueron suplementadas con NF. Esto pudo deberse a que el porcentaje de FDN y FDN proveniente de forrajes en la ración total en RF y NF no fue tan distinto variando en un poco más de 1%.

Un menor tiempo de consumo cuando la dieta fue más alta en fibra, también fue reportado por Martínez *et al.* (2002), evaluado comportamiento ingestivo en vacas lecheras estabuladas suplementadas con paja de trigo y en donde reportó además un mayor tiempo de rumia.

#### 4.3 CONCENTRACION DE ACIDOS GRASOS VOLÁTILES

Para los AGVs de cadena corta, se observó que la concentración molar total fue mayor cuando se suplementó con NF en comparación a cuando no se suplementó con BF. Esto indica que el sustrato alimenticio presentaba una mayor fermentabilidad debido a que los principales productos de la fermentación son los ácidos grasos volátiles de cadena corta acético, propiónico y butírico (Zavaleta, 1976). Esta mayor concentración de AGVt con NF respecto a la dieta control fue debida a una mayor concentración de acetato y butirato y no así a la concentración de propionato la cual no fue distinta entre estos grupos de alimentación (NF y control), lo que también confirma las buenas características fermentativas del NF, al no mostrar diferencias con una ración con mayor aporte de alimentos concentrados el cual tenía ingredientes amiláceos como el maíz, los cuales son precursores de una mayor concentración de ácido propiónico (Knowlton, 1998; Sinclair *et al.*, 2000; Contreras y Noro, 2010).

La ración suplementada con RF, no presentó diferencias en cuanto a la concentración molar de AGVt en comparación a la dieta control y a la ración suplementada con NF. Aunque si se observó que la concentración y proporción molar del propionato en horas de la tarde fue menor comparando la dieta con NF. Esto también ocasionó que la relación acetato: propionato fuera mayor en horas de la tarde cuando las vacas se suplementan con RF. No obstante, esta menor concentración de ácido propiónico comparando la dieta suplementada con NF y la suplementada con RF, no generó un efecto importante sobre características productivas como la producción de leche, la cual como se presentó anteriormente, no fue diferente entre los grupos de suplementación y la dieta control. Esto

podría explicarse con el hecho de que no hay diferencias en la producción de este AGV en horas de la mañana y además cuando las vacas fueron suplementadas con RF, presentaron una mayor síntesis de proteína microbiana.

Una mayor concentración de AGVs en la dieta suplementada con NF respecto a la dieta control pudo también haber compensado el hecho de que las vacas, a pesar de haber consumido una menor cantidad de materia seca total, no presentaron diferencias en producción de leche.

Estudios han reportado que la suplementación con BF pueden modificar el perfil de AGVs a nivel ruminal. Sun *et al.* (2015), en un estudio realizado en corderos, mostraron que la proporción de propionato en líquido ruminal, fue mayor y la proporción de acetato menor con raciones basadas en RF, comparada con una ración basada en pradera de ballica perenne (*Lolium perenne*). Este perfil de AGVs fue asociado a la mayor proporción de carbohidratos no estructurales presentes en el RF en comparación a la ballica perenne. No obstante en el presente estudio no se repitió este patrón para la ración con RF comparada con la ración control, a pesar de que el ensilaje posee una menor cantidad de carbohidratos no estructurales comparado al RF. En este caso lo que pudo haber sido muy importante fueron los 910 gramos más de alimento concentrado que comieron las vacas cuando estuvieron con la dieta control para generar esa mayor concentración de propionato respecto a la dieta con RF.

En otro estudio realizado por Sun *et al.* (2012), reportan concentraciones de 98,5 y 95,4 mmol L<sup>-1</sup> en ovejas suplementadas con RF y NF respectivamente no siendo distintas estadísticamente. Esto fue similar a lo reportado en el presente estudio y con datos totales similares, en los cuales se mostró que la concentración total de AGV no fue distinta comparando la suplementación con NF y RF.

Como se mencionó, el contenido nutricional de los ingredientes de cada ración, pudo ser otro factor importante que favoreciera una mayor producción en AGV con la ración suplementada con NF respecto a la ración control, aunque no distinta a la ración con RF. En general, las BF presentan mayor contenido de carbohidratos de rápida fermentación (Mc Donald *et al.*, 1988, Barry, 2013) en comparación al ensilaje de pradera, el cual fue el ingrediente que se sustituyó en mayor porcentaje con brásicas en la dieta. Barry (2013),

reporta valores de 23,8 % y 19,6 % de carbohidratos solubles en agua y de 9,4 % y 8,9% de pectinas en NF y RF. Por otra parte, Westwood y Mulcock, (2012) reporta valores de 28,6 % y 27,3 % de carbohidratos solubles en agua para NF y RF respectivamente, mientras que Cabanilla *et al.* (2017) reportan 22,6% y 23,8% de carbohidratos no estructurales en NF y RF, de los cuales 8,25% y 10,7% fue almidón.

Estas características observadas para las BF, mostrando mayor contenido de carbohidratos fermentables como los presentados anteriormente, podría generar una mayor disponibilidad de materia orgánica potencialmente fermentable en el rumen, e inducir a una mayor producción de AGV totales (Sotelo *et al.*, 2012), tal como se observó en el presente estudio con la dieta con NF, comparada con la dieta control.

También, se presentaron variaciones en las concentraciones molares de los AGVs entre la mañana y la tarde. Esto se debe no solo a la producción sino también a la absorción de los mismos. Contreras y Noro, (2010), señalan que la absorción de AGVs por la paredes del rumen aumenta al disminuir el pH y esto es debido a que los AGVs están en forma no disociada. Según esta condición y dependiendo de la producción de AGV según cada ración, se podría presentar que la absorción sea mayor a la producción en horas de la tarde, lo que podría modificar las concentraciones de AGV observadas en ambos tiempos. De forma general se, observó que la concentración molar de AGV fue menor en horas de la tarde, y es consistente con una disminución del pH ruminal en horas de la tarde.

En el caso de ácidos grasos de cadena ramifica, se observó que el caproico, valérico, isovalérico e isobutírico presentaron el mismo patrón con las tres dietas mostrando una concentración molar mayor en el muestreo de la mañana con respecto a la concentración en la tarde, lo que sugiere que en ese lapso de tiempo, la absorción de AGVcr a través de las paredes ruminales es superior a la síntesis de los mismos o la producción de estos es menor con los sustratos alimenticios utilizados antes de la medición en horas de la tarde, lo que puede sugerir que la incorporación de BF en la ración es un factor importante que podría estar generando una menor producción de estos AGVs. Esta situación no se muestra como favorable para aspectos como la síntesis de proteína microbiana, ya que estos se consideran importantes para en la síntesis de aminoácidos y lípidos en especies de microorganismos ruminales (Bryant *et al.*, 1955; Allison *et al.*, 1958). No obstante, contrario

a lo esperado, cuando las vacas fueron suplementadas con RF, se determinó una mayor síntesis de proteína microbiana.

#### 4.4 pH RUMINAL

Los resultados de las mediciones del pH ruminal, muestran que en horas de la tarde posterior al ordeño, las vacas suplementadas con BF presentaron pH más bajos respecto a cuándo las vacas no consumieron BF, sin embargo esta diferencia fue apenas durante una hora cuando las vacas se suplementaron con RF con respecto a la dieta control y fue de 6 horas cuando la suplementación fue con NF. Además, el pH fue significativamente más bajo durante una hora cuando se suplementó con NF en comparación a cuando se suplemento con RF.

El pH más bajo durante horas de la tarde cuando las vacas se alimentaron con BF y principalmente con NF en comparación con el pH ruminal de las vacas en dieta control en horas de la tarde, también es congruente con una mayor cantidad de AGVs totales cuando las vacas fueron suplementadas con NF comparadas a cuando recibieron la dieta control.

Estas diferencias en los patrones de pH ruminal mostrado, puede estar relacionado a la forma de alimentación de la vacas que fueron suplementadas. Pulido (2010), indica que las variaciones en pH ruminal en vacas en pastoreo pueden estar asociado al comportamiento alimenticio, la periodicidad del consumo de materia seca y el proceso de rumia. Además, el contenido nutricional de los ingredientes de cada ración, también pudo ser otro factor importante que favoreció un menor pH ruminal con la ración suplementada con NF y RF debido a su mayor contenido de carbohidratos de rápida fermentación (Mc Donald *et al.*, 1988, Barry, 2013) en comparación al ensilaje de pradera, Un mayor contenido de carbohidratos fermentables favorece una mayor producción de AGV totales (Sotelo *et al.*, 2012), tal como se observó en el presente estudio con la dieta con NF comparada con dieta control, y consecuentemente bajar el pH ruminal de forma más marcada.

La ración alimenticia suplementada con BF fue suministrada cercano a las 11:00 am, aproximadamente 4 horas después del último ofrecimiento de alimentos en la mañana que se brindó al grupo que animales que estaba con la dieta control, esto claramente evidencia una distinta periodicidad del consumo, siendo mayor en las vacas suplementadas puesto

que su ración alimenticia se distribuyó más. Aunado a esto, según los resultados de las actividades de comportamiento presentadas, cuando las vacas consumieron la dieta control, pasaron aproximadamente 42 y 61 minutos más rumiando en el periodo de observación en comparación a cuándo se suplementaron con RF y NB respectivamente. Una mayor cantidad de tiempo rumiando, favorece la salivación y por lo tanto una mayor secreción de sustancias Buffer que amortiguarían el pH ruminal.

En ambos casos, cuando las vacas fueron suplementadas y cuando fueron alimentadas con el grupo control, se observó una disminución en el pH ruminal. Esto implica que con estas raciones, la propia actividad de ingestión de los alimentos como tal es un factor importante para la disminución del pH ruminal. A pesar de esto, las diferencias en pH ruminal entre los grupos de alimentación se presentan hasta después de las 17:00 horas; posterior al ordeño de la tarde donde se les ofreció alimento concentrado a las vacas. Al parecer la capacidad *Buffer* del rumen luego de esta alimentación es menor cuando las vacas son suplementadas con BF. Esta se sustenta debido a que previo a la alimentación con concentrado en la tarde el pH ruminal no fue diferente entre los tres grupos de alimentación.

No obstante y a pesar de presentarse diferencias en el pH ruminal entre los distintos grupos de alimentación, en ninguno se observó pH menores a 5,9 y cuando el pH estuvo bajo 6,0 fue por lapso de tiempo de 3 horas como máximo. Wales *et al.* (2004), señalan que es importante que el pH del líquido ruminal de las vacas esté dentro de valores que permitan una adecuada digestión de los forrajes, siendo óptimo un pH de 6,35; y que la digestibilidad de los mismos puede disminuir cuando el pH baja de 5,80. Esta disminución es debido a su efecto negativo en la digestión de celulosa asociada al menor desarrollo de las bacterias celulolíticas (Russell y Dombrowski, 1980).

Los valores de pH mostrados en la figura 4, siempre estuvieron sobre lo considerado como normales, por lo tanto no se supone que este factor tuviese un impacto negativo al menos sobre la digestibilidad de alimentos forrajeros suministrados.

La disminución en el pH ruminal en vacas suplementadas con NF con respecto a otra ración sin BF también fue observado por Moate *et al.* (1998), cuando reportó que vacas consumiendo una ración con una base de pasturas más NF presentaban un pH de 6,66; el

cual era menor al pH ruminal de vacas alimentadas solamente con la misma ración base con un valor de 7,04.

## 4.5 METABOLISMO DEL NITRÓGENO Y SINTESIS DE PROTEINA MICROBINA

### 4.5.1 Análisis de urea en leche y en sangre.

Los resultados de la concentración de urea en leche y sangre reportados en el presente estudio no presentaron diferencias significativas comparando, cuando las vacas fueron suplementadas con BF y cuando consumieron la dieta control. Esto hace suponer que la ración alimenticia no fue un factor determinante que hiciera variar estos indicadores. Además evaluando los datos de urea en leche reportados en los resultados, los cuales se encontraban en el rango de 273-307 mg L<sup>-1</sup> (4,5- 5,0 mmol L<sup>-1</sup>), se determinó que éstos están dentro de valores de referencia reportados por Wittwer *et al.* (1993) de entre 2,5 -7,4 mmol L<sup>-1</sup>. Este mismo autor reporta en estudios realizados en vacas en pastoreo en el sur de Chile un promedio de 4,9 ± 1,2 mmol L<sup>-1</sup> de urea en leche. De igual forma, los valores de urea en sangre reportados en los resultados, están dentro de los valores de referencia reportados por Wittwer (2012) de entre 2,7-7,0 mmol L<sup>-1</sup>.

Este similar patrón en los niveles de concentración de urea en leche y en sangre, era esperable debido alta correlación que presentan ambos indicadores y que ha sido descrito por varios autores (Wittwer *et al.*, 1993., Refdals, 1983; Oltner y Wiktorsson, 1983.)

Con los datos reportados se puede inferir que la ración alimenticia presentaba una adecuado balance de proteína y energía a nivel ruminal generando un adecuado aprovechamiento de este nutriente e indicando que no existían elevados excesos de proteína en la dieta respecto al nivel de energía aportado. Autores como Rodríguez *et al.* (2007) han señalado que excesos de proteína en la dieta, al no ser aprovechada por los microorganismo en el rumen se acumularán como amoniaco, el cual es absorbido llegando al hígado, convirtiéndose en urea, la cual pasará al torrente sanguíneo y tomará la vía de la excreción urinaria o mediante la leche. Pedraza *et al.* (2006) indican que en una ración adecuadamente balanceada en proteína y energía, el contenido de urea en la leche debería

encontrarse entre 150 y 300 mg L<sup>-1</sup>, lo que también sustenta que las raciones ofrecidas no presentaban desbalances entre energía y proteína.

Sin embargo, otros autores como McCormick *et al.* (2001) y Chapa *et al.* (2001), señalan que niveles superiores a 250 mg L<sup>-1</sup> de urea en leche podrían indicar la existencia de un exceso de proteína en la ración y una utilización ineficiente de la energía. No obstante, no se han reportado evaluaciones de dietas con BF que hayan utilizado metabolitos como la urea en sangre o en leche para determinar la eficiencia del uso del nitrógeno o balance proteico energético a nivel ruminal.

#### 4.5.2 Análisis del nitrógeno amoniacal

Otro de los indicadores del metabolismo del nitrógeno a nivel ruminal, es la concentración de nitrógeno amoniacal. Algunos autores como (Russell *et al.*, 1983; Hristov *et al.*, 1997; Heldt *et al.*, 1999), señalan que la concentración de amonio en el rumen es inversamente relacionado a la disponibilidad de carbohidratos, los cuales son fuente energética para los microorganismos.

Según los resultados obtenidos, se observa que la concentración de amonio en horas de la mañana no fue distinta si las vacas fueron suplementadas con BF o si consumían la dieta control, pero esta concentración disminuyó considerablemente en horas de la tarde, cuando las vacas fueron suplementadas con BF. Esto además, no ocurrió cuando las vacas consumieron la dieta control, manteniéndose similar la concentración entre la mañana y la tarde. Este patrón indica que la suplementación con BF, modifica la concentración de amonio en rumen. Esto pudo deberse a un aumento de la disponibilidad energética para los microorganismos aportada por las BF debido, ya sea a un mayor contenido de carbohidratos de rápida fermentación con respecto al ensilaje o la forma en que se alimentó con un mayor fraccionamiento de la ración, favorecido una mejor sincronización entre el aporte de energía y la degradación de la proteína.

El aumento de la disponibilidad energética a nivel ruminal puede mejorar la captación de nitrógeno amoniacal por parte de los microorganismos haciéndola más eficiente, lo que también se sustenta en el hecho de que la síntesis de proteína microbiana total fue superior cuando las vacas fueron suplementadas con RF respecto a la dieta control.

Bargo *et al.* (2001); Contreras y Noro (2010), mencionan que la concentración de proteína cruda puede incidir en la concentración de nitrógeno amoniacal en rumen, sin embargo las variaciones observadas en la concentración ruminal de amonio cuando las vacas se suplementaron con BF, se deberían más a una mayor utilización del mismo que a un efecto de la proteína cruda de la dieta, debido a que los tres grupos de alimentación consumieron la misma cantidad diaria de proteína cruda y que la concentración de proteína cruda en la tres raciones fue similar.

#### 4.5.3 Síntesis de N microbiano y proteína microbiana.

Como se mostró en los resultados, la síntesis de N microbiano fue superior cuando las vacas se suplementaron con RF comparándolos a cuando consumieron la dieta control, no obstante es conveniente analizar otro indicador que relaciona este parámetro con el consumo de materia seca, por lo tanto es más adecuado analizar la síntesis de N microbiano por Kg de MS consumida. A pesar de que los consumos de MS fueron distintos esto no hizo cambiar los patrones presentados en síntesis de N microbiano y síntesis de N microbiano por Kg de MS consumida.

Una mayor síntesis de proteína microbiana cuando las vacas se suplementaron con RF respecto a cuándo no fueron suplementada con BF, pudo deberse a una mejor sincronización del aporte de energía y proteína a nivel ruminal. AFRC (1996); NRC (2001), indican que la síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal depende de varios factores, dentro de estos uno de los más importantes es la sincronización entre el aporte de nitrógeno y energía a los microorganismos. Sin embargo esta sincronía pudo deberse no solo por el contenido energético del RF y la mayor proporción de carbohidratos fermentables (carbohidratos solubles en agua y pectinas) que carbohidratos estructurales (hemicelulosa y celulosa) en comparación con los pastos utilizados comúnmente como praderas de pastoreo (Barry, 2013), sino también por la misma forma de la alimentación, la cual fue más fraccionada en el caso del RF en comparación con la dieta control.

Autores como Herrera *et al.* (1990) han reportado que cuando la ración es sincronizada para una rápida fermentación con carbohidratos como almidón y proteína de rápida degradabilidad, el flujo de proteína microbiana podría ser de hasta 3 kg día<sup>-1</sup>. Lo que sugiere

que una ración que refleja una mayor síntesis de proteína microbiana con mayor probabilidad es porque está mejor sincronizada.

Este resultado es congruente con los resultados presentados de nitrógeno amoniacal, el cual fue más bajos en horas de la tarde cuando las vacas se suplementaron con RF en comparación a cuando consumieron la dieta control. Este patrón fue reportado por Roman *et al.* (2016), en un metanálisis realizado a 183 estudios, donde indica que el nitrógeno amoniacal y el pH ruminal se relacionaba negativamente al flujo de proteína microbiana. No obstante el mismo autor indica en ese estudio que un mayor flujo de proteína microbiana fue relacionado además, positivamente con la proporción molar del AGVcr isovalérico e isobutírico. Muchos trabajos han mostrado que una gran cantidad de especies de bacterias del rumen tienen requerimientos específicos de uno o más AGVcr (Bryant *et al.*, 1955; Allison *et al.*, 1958). Estos autores también han señalado la importancia del AGVcr isovalérico e isobutírico en la síntesis de aminoácidos y lípidos en especies de microorganismos ruminales.

Según los resultados presentados, tanto la concentración como la proporción molar de los AGVcr isobutírico e isovalérico, importantes en la síntesis de proteína microbiana, fue menor cuando las vacas se suplementaron con BF, en comparación a cuando no fueron suplementadas, lo que parecería no congruente con el resultado de síntesis de proteína microbiana. Es sugiere que otros aspectos como la sincronización entre el proteína y energía y el aporte de AGV de cadena corta fueron más importantes para favorecer una mayor síntesis de proteína microbiana. Zavaleta (1997), indica que la síntesis de proteína microbiana se realiza principalmente a partir de ácido acético por lo que esto pudo ser la causa de una mayor síntesis cuando las vacas se suplementaron con RF.

Sin embargo, esta mayor síntesis de proteína microbiana, no significó una mejora en la eficiencia del uso de nitrógeno para la síntesis de proteínas lácteas, ya que no se observaron diferencias entre los tratamientos para este indicador. No obstante, es importante señalar que los valores obtenidos en los tres grupos de alimentación, estuvieron sobre los valores de referencia de eficiencia del uso del nitrógeno para la síntesis de proteínas lácteas, entre el 19 y 20 % de eficiencia de utilización que reportan algunos autores como (Tamminga, 1992; MacRae *et al.*, 1995).

Además, es importante considerar que la estimación de la síntesis de N microbiano a nivel ruminal es un parámetro que puede ser muy variable. Roman *et al.* (2016) en un meta análisis de estudios de flujo de nitrógeno microbiano al rumen en ganado lechero consideró 613 resultados y reportó valores promedio de 275 g día<sup>-1</sup>, con mínimos de 52 g día<sup>-1</sup> y máximos de 743 g día<sup>-1</sup>. Sin embargo, estos datos fueron tomados de análisis de flujo de N microbial tomando muestras de licor ruminal con animales fistulado y excluyendo análisis con estimaciones de derivados de purinas, y con vacas lecheras bajo sistemas de producción intensivos. No obstante como referencia se puede observar que los valores obtenidos en el presente estudio se encuentran cercanos al promedio reportado por Roman *et al.* (2016).

#### 4.6 PERFILES SANGUÍNEOS

Factores antinutricionales presentes en las brásicas como el SMCO y glucosinolatos son potencialmente tóxicos y podrían representar factores de riesgo para la salud de los animales que los consumen. Fales *et al.* (1987) señalan que la ingestión de SMCO tiene la capacidad potencial de generar anemia hemolítica presentándose una disminución en el número de eritrocitos y en la aparición de cuerpos de Heinz. Sin embargo según los resultados observados en los perfiles sanguíneos, las vacas suplementadas con BF no presentan diferencias entre sí y tampoco presentan diferencias con respecto a cuándo las vacas fueron alimentadas con la dieta control en cuanto al número de eritrocitos, el tamaño de los mismos (VCM) y la concentración de hemoglobina en estos (CHCM), lo que podría relacionarse con anemia. Además, en ninguna de las vacas se observó, la presencia de cuerpos de Heinz que son indicativos de daño por oxidación irreversible de la hemoglobina (Smith, 1980). Esto también confirma, que la suplementación con BF, no generó problemas de anemia relacionados con el SMCO.

Los valores determinados en cada una de las muestras cuando las vacas fueron suplementadas con BF y cuando fueron alimentadas con la dieta control, están dentro de los rangos normales para la especie a excepción de la hemoglobina que está levemente baja. Wittwer (2012) indica valores de referencia de eritrocitos en bovinos entre 5,8-8,5 x10<sup>6</sup>, VGA entre 28 y 38%; hemoglobina entre 98 y 138 g/L; VCM entre 43 y 61 f/L y CHCM entre 300 y 370 g/L. El análisis de estos resultados descartaría que el consumo de 3,09 y 3,27 kg de MS de NF y RF respectivamente implicara generación de anemia en las vacas.

Las concentraciones de leucocitos, tampoco fueron diferentes entre los grupos de alimentación, lo que también es indicativo que no se presentaron problemas de salud relacionados a la ingestión de BF.

La determinación de la concentración de enzimas hepáticas como (GGT), permite diagnosticar la presencia de daño hepático y orientar la ubicación de la lesión (Hoffmann, 2008) y este pueden estar relacionado con efectos tóxicos de los factores antinutricionales presentes en las BF. Sin embargo, los resultados de concentración de esta enzima, tampoco mostraron diferencias cuando las vacas fueron suplementadas con BF o cuando estas consumieron la dieta control, lo que descarta que la inclusión alimenticia de BF al menos en los niveles consumidos en el estudio, genere variación en la condición hepática de las vacas. Wittwer (2012) indica que el límite superior de referencia para la enzima GGT es de 39 U/L, por lo tanto Noro *et al.* (2013), consideran que valores sobre ese límite superior de referencia es indicativo de daño hepático. Los valores presentados de GGT en este estudio están en rangos de 94-132 U/L lo que podría evidenciar cierto daño. No obstante, Noro *et al.* (2013), en un análisis realizado en 418 animales ubicados en regiones del Bio Bio y los Lagos en Chile, determinaron que el 34,4% de los análisis presentaban valores sobre el límite superior de referencia, lo que podría indicar que estos valores son frecuentes en sistemas lecheros similares a los del presente estudio.

Por otra parte Wittwer (2012), señala que la GGT es una enzima semi específica de la membrana celular del conducto biliar hepático y la determinación de su actividad sérica se emplea principalmente para evaluar alteraciones obstructivas por daño en el conducto biliar. Noro *et al.* (2013), consideran que la determinación de otras enzimas como la glutamato dehidrogenasa (GDH) serían mejores para el diagnóstico de daño hepático por la especificidad.

Otro de los perfiles analizados a nivel sanguíneo, fue la hormona tiroidea (T3), la cual como se mostró en resultados, no presentó diferencias significativas en cuanto a la concentración plasmática cuando las vacas fueron suplementadas con las dos BF, con respecto a cuando fueron alimentadas con la dieta control sin brásicas, lo que indica que el consumo de BF en los niveles alcanzados en el presente estudio no tuvo incidencia sobre la concentración plasmática de esta hormona, la cual, autores como (Cunningham, 1999; Barry, 2013), indican que puede verse afectada, disminuyendo su síntesis, debido a factores antinutricionales como los glucosinolatos presentes en las BF. No obstante estos resultados

son esperables debido a que los consumos de materia seca de estos ingredientes en la ración fueron inferiores al máximo recomendado de un 30%, para evitar problemas asociados a estos compuestos.

## 5. CONCLUSIONES

La suplementación con BF, generó que las vacas tuvieran un menor consumo de MS total, comparado a cuando consumieron la ración control, no obstante esto no implicó una menor producción de leche o una disminución en la calidad de la misma, además no se presentó diferencias si la suplementación fue con NF o si fue con RF. Esto indica que cuando se suplementó con BF, las vacas presentaron una mayor eficiencia en convertir los alimentos consumidos en producción de leche. Además el consumo de nutrientes con las tres raciones fue superior a los requerimientos para el tipo de animal y su condición fisiológica y productiva, no existiendo limitantes en nutrientes, lo que podría justificar la igualdad en la producción.

Parámetros de fermentación ruminal fueron modificados cuando las vacas se suplementaron con BF, favoreciendo una mayor concentración de AGV en el caso del NF y una mayor síntesis de proteína microbiana en el caso de RF comparadas con la dieta control, condiciones que pudieron ser los factores que favorecieron una mayor eficiencia en la conversión alimenticia mostrada.

La suplementación alimenticia con NF y RF en los niveles reportados, no generaron ninguna condición sanitaria desfavorable asociada a compuestos antinutricionales presentes en las brásicas.

El comportamiento ingestivo fue modificado por la suplementación con BF y también dependió de la especie de brásica, mostrando las vacas una mayor actividad ingestiva con NF comparado a cuando fueron suplementadas con RF, y estas a su vez, mayor actividad ingestiva respecto cuando se les ofreció la dieta control. Estas variaciones en las actividades de comportamiento ingestivo pudieron estar asociadas a características físicas de las plantas y también pudo tener relación con otros indicadores como pH ruminal y consumo de materia seca.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdoun, K., F. Stumpff y H. Martens. 2006. Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. *Anim Health Res Rev* 7(1/2), 43-59.
- Albright, J. 1993. Feeding behaviour of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 76:485-498.
- Allison, M.J., M.P. Bryant y R.N. Doetsch. 1958. Volatile Fatty Acid Growth Factor for Cellulolytic Cocci of Bovine Rumen. *Science* 128: 474.
- Agricultural and Food Research Council (AFRC). 1993. Energy and protein requirements of ruminants. En: An advisory manual prepared by the AFRC Technical Committee on Responses to nutrients. CAB International. Wallingford, UK.
- Agricultural and Food Research Council (AFRC). 1996. Necesidades energéticas y proteicas de los rumiantes. Manual de consulta preparado por el Comité Técnico sobre respuestas a los nutrientes del AFRC. Traducido por Sanz, R. Acribia. Zaragoza, España. 175 p.
- Allen, M.S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *J. Dairy Sci.* 80:1447-1462.
- Anrique, R. 2011. Análisis de Características del Consumo de Nueve Predios Bajo Monitoreo en dos Escenarios Pluviométricos. Plan de Desarrollo Lechero Watt's. Publicación N°1, Año 2. Osorno, Chile.
- Anrique, R., X. Molina, M. Alfaro y R. Saldaña. 2014. Composición de alimentos para el ganado bovino. Fundación para la Innovación Agraria, FIA, Ministerio de Agricultura, MINAGRI. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- Antoniewicz, A., W. Heinemann y E. Hanks. 1980. The effect of changes in the intestinal flow of nucleic acids on allantoin excretion in the urine of sheep. *J Agric Sci* 95:395-400.

- Aucal, S., O. Balocchi y J.P. Keim. 2015. Inclusión del Nabo forrajero (*Brassica rapa*) como suplemento estival en dietas ofrecidas a vacas lecheras en predios de la Provincia de Ranco. *Agro sur*, 2015, vol. 43, n.3.
- Bach, A., S. Calsamiglia y M.D. Stern. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 88: 1
- Bachman, K. C. 1992. Managing milk composition. En: Large dairy herd management. Eds. Van Horn H.H. . American Dairy Science Association. Champaing. 336 pp.
- Bae, D.H., J. Welch, Y M. Smith. 1981. Efficiency of mastication in relation to hay intake by cattle. *J. Animal Sci.* 52: 1371-1375.
- Bargo, F., D. H. Rearte, F. J. Santini, y L. D. Muller. 2001. Ruminal digestion by dairy cows grazing winter oats pasture supplemented with different levels and sources of protein. *J. Dairy Sci.* 84:2260-2272.
- Bargo, F., L. D. Muller, J. E. Delahoy y T. W. Cassidy. 2002. Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. *J. Dairy Sci.* 85:1777-1792.
- Barry, T.N. 2013. The feeding value of forage brassica plants for grazing ruminant livestock. *Animal Feed Science and Technology.* 181: 15-25.
- Bauman, D.E.; I.H. Mather, R.J. Wall y A.L. Lock. 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J. Dairy Sci.* 89: 1235-1243
- Broderick, G.A y M.K. Clayton. 1997. A statical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentration of milk urea nitrogen *J. Dairy Sci.* 80:2964-2971.
- Bryant, M.P, y I.L. Doetsch.1955. Factors Necessary for the Growth of *Bateroides succinogenes* in the Volatile Fatty Acid Fraction of Rumen Fluid. *J. Dairy Sci.* 38: 340.

- Bryant, M.P y I.M. Robinson.1962. Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria. *J. Bacteriol* .84: 605–614.
- Bryant M.P. y I.M. Robinson.1963. Apparent incorporation of ammonia and amino acid carbon during growth of selected species of ruminal bacteria. *J. Dairy. Sci.* 46: 226-234.
- Butler, W.R., J.J. Calaman, y S.W. Beam. 1996. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 74:858-865.
- Cabanilla, J., O. Balocchi, R. Pulido, A. Bertrandt y J.P. Keim. In Vitro Fermentation and in Situ degradation Kinetics of summer forage brassica plants. 2017. No publicado.
- Castillo, A.R., M.E. Burrola, J. Domínguez y A. Chávez. 2014. Rumen and microorganism and fermentation. *Arch Med Vet* 46: 349-361.
- Chalupa, W., J. Clark, P. Opliger y R. Lavker. 1970. Detoxication of ammonia in sheep fed soy protein or urea. *J Nutr.* 100, 170-176.
- Chapa, A.M., M.E. McCormick, J.M Fernández, D.D. French, J.D. Ward y J.F. Beatty. 2001. Supplemental dietary protein for grazing dairy cows: reproduction, condition loss, plasma metabolites, and insulin. *J. Dairy Sci.* 84:908-916
- Chen, X.B y M.J. Gomes. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives. En: International feed resources unit. An overview of the technical details. Rowwett Research Institute. Bucksburn Aberdeen, UK.
- Chen, X.B y M.J. Gomes.1998. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of the technical details. International Feed Resources Unit Rowett Research Institute, Bucksburn Aberdeen AB2 9SB, UK.

- Chermiti, A., E. Teller, M. Vanbelle, G. Collignon, y B. Matatu. 1994. Effect of ammonia or urea treatment of straw on chewing behaviour and ruminal digestion processes in nonlactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 47: 41-51.
- Chizzotti, M.L., S.C. Valadares Filho, R.F.D. Valadares, F.H.M. Chizzotti y L.O. Tedeschi. 2008. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. 2008. *Livestock Science* 113, 218–225.
- Clark, J.H., T.H. Klusmeyer y M.R. Cameron. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75, 2304-2323.
- Contreras, P., F. Wittwer, V. Ruiz, A. Robles, y H. Bröhmwald. 1999. Valores sanguíneos de triyodotironina y tiroxina en vacas frisón negro a pastoreo. *Arch. med. vet.* Vol. 31. N.2.
- Contreras, P y M. Noro (eds). 2010. Rumen: morfofisiología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa. 3ª ed. Valdivia, Chile.
- Counotte, G. H. M., A. Th. van't Klooster, J. van der Kuilen. y R. A. Prins. 1979. An analysis of the buffer system in the rumen of dairy cattle. *J. Anim Sci* 49:1536-1544.
- Cunningham, 1999. Fisiología Veterinaria. Barcelona, España. 675. p.
- Dado, R y M. Allen. 1994. Variation in and relationships among feeding, chewing, and drinking variables for lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:132-144.
- Dado, R y M. Allen. 1995. Intake limitation, feeding behaviour, and rumen function of cows challenged with rumen fill from dietary fiber or inert bulk. *J. Dairy Sci.* 78:118-133.
- Dechow, C., C. Baumrucker, R. Bruckmaier y J. Blum. 2017. Blood plasma traits associated with genetic merit for feed utilization in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 100:8232-8238.

- Dewhurst, R., D. Davies y R. Merry. 2000. Microbial protein supply from the rumen. *Anim Sci Technol* 85, 1-20.
- DePeters, E.J., y D.J. Ferguson. 1992. Non protein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. *J. Dairy Sci.* 75:3192-3209.
- De Veth, M. J., y E. S. Kolver. 2001. Diurnal variation in pH reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture. *J. Dairy. Sci.* 84: 2066-2072.
- Erfle, J. D., R.J. Boila, R. M. Theather, S. Mahadevan, y F.D. Saucer. 1982. Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms in vitro. *J. Dairy Sci.* 65: 1457-1514.
- Church, D.C. 1993. El Rumiente. Fisiología digestiva y nutrición. (Ed.). Editorial ACRIBIA, S. A. Zaragoza (España). Cap.14. P-305.
- Fales, S.L., D.L. Gustine, S.C. Bosworth y R.J. Hoover. 1987. Concentration of glucosinolatos and S-Methylcysteine Sulfoxide in ensiled Rape (*Brassica napus L.*). *J. Dairy. Sci.* 70. No 11.
- Fébel, H. y S. Fekete. 1996. Factors influencing microbial growth and the efficiency of microbial protein synthesis: a review. *Acta Vet. Hung.* 44:39
- Ferlay, A., C. Agabriel, C. Sibra, C. Journal, B. Martin, y Y. Chilliard. 2008. Tanker milk variability in fatty acids according to farm feeding and husbandry practices in a French semi mountain area. *Dairy Sci. Technol* 88:193–215
- García, S.C., F.J. Santini, y J.C. Elizalde. 2000. Sites of digestion and bacterial protein synthesis in dairy heifers fed fresh oats with or without corn or barley grain. *J. Dairy Sci.* 83:746–755.

- Garrido, O., E. Mann. 1981. Composición química, digestibilidad y valor energético de una pradera permanente de pastoreo a través del año. Tesis Ing. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 63 p.
- Griswold, K.E., G.A. Apgar, J. Bouton y J.L. Firkins. 2003. Effects of urea infusion and ruminal degradable protein concentration on microbial growth, digestibility, and fermentation in continuous culture. *J Anim Sci* 81, 329-336.
- Hafez, E., y M. Schein. 1962. The behaviour of cattle. En: Hafez, E. (editor). The behaviour of domestic animals. London, England.
- Hammond, A.C. 1994. Use of Blood urea nitrogen concentration to guide protein supplementation in cattle. *Am Regi Prof Ani Sci*.10:9-18.
- Heldt, J.S., R.C. Cochran, C.P. Mathis, B.C. Woods, K.C. Olson, E.C. Titgemeyer. T.G. Nagaraja, E.S. Vanzant, y D.E. Johnson. 1999. Effects of level and source of carbohydrate and level of degradable protein on intake and digestion of low-quality tallgrass- prairie hay by beef steers. *J. Anim. Sci.* 77:2846–2854.
- Herrera, R., R. Gómez, M. Tobrabi, y T. Huber. 1990. Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis. *J. Dairy Sci.* 73:142– 148.
- Hoover, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy. Sci.* 69: 2755-2766.
- Hristov, A.N., T.A. McAllister, y K.-J. Cheng. 1997. Effect of carbohydrate level and ammonia availability on utilization of  $\alpha$ -amino nitrogen by mixed ruminal microorganisms in vitro. Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science, vol 48:186–189.
- Itsasse, L., R.I. Smart, y R.E. Orskov. 1986. Comparison between two methods of feeding concentrate to sheep given a diet high or low in concentrate, with or without buffering substance. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 16:37-49.

- Hoffmann, W.E. 2008. Diagnostic enzymology of domestic animals. en: Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Kaneko, J.J., J.W. Harvey y M.L. Bruss. San Diego, California: Academic Press.
- Hristov, A.N., T.A. McAllister, D.R. Ouellet y G.A. Broderick. 2005. Comparison of purines and nitrogen-15 as microbial flow markers in beef heifers fed barley- or corn-based diets. *J. Anim. Sci.* 85: 211–222.
- Hungate, R.E. 1966. The rumen and its microbes. Academic Press. New York.
- Jonker, J.S., R.A. Kohn, y R.A. Erdman.1998. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:2681–2692.
- Kolver, E.S., L.D. Muller, G.A. Varga y T.J. Cassidy. 1998. Synchronization of ruminal degradation of supplemental carbohydrate with pasture nitrogen in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81, 2017-2028.
- Knowlton, K.F., T.E. Dawson, B.P. Glenn, G.B. Huntington y R.A Erdman.1998. Glucose metabolism and milk yield of cows infused abomasally or ruminally with starch. *J. Dairy Sci.* 81, 3248-3258.
- Krause, K.M. y G.R. Oetzel. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim Feed Sci Tech* 126:215-236.
- Lanuza, F. 2011. Suplementos Alimenticios, en: Pulido, R., Parga, J., Lanuza, F., Balocchi, O. (Eds.), Suplementación de vacas lecheras a pastoreo. Consorcio Tecnológico de la Leche S.A. Osorno, Chile. pp. 21-48.
- Larsen, M.K., J.H. Nielsen, G. Butler, C. Leifert, T. Slots, G.H. Kristiansen, y A.H. Gustafsson. 2010. Milk quality as affected by feeding regimens in a country with climatic variation. *J. Dairy Sci.* 93:2863–2873.

- Lasley, J. 1982. Genética del mejoramiento del ganado. 341 p. México.
- Leng, R.A. 1992. Nutrition of ruminants at the pastures in the tropics: implications for selection criteria. 3<sup>rd</sup> Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium University of Florida. Vol.8, 298-309.
- MacRae, J.C., F.R.C. Backwell, B.J. Bequette y G.E. Lobley. 1995. Protein metabolism in specific organs. In Proceedings of the 7th EAAP Symposium on Protein Metabolism and Nutrition. EAAP Publication No. 81, p. 297. A. F. Nunes, A. V. Portugal, J. P. Costa and J. R. Robeiro, eds. J. Vale de Santarem, Portugal: Estacao Zootechnica Nacional.
- Martínez, E.D., R. Pulido, y L. Latrille. 2002. Efecto de la paja de trigo tratada con álcali sobre el consumo de alimento y comportamiento ingestivo de vacas lecheras. *Arch. med. vet.* Vol. 2. N.2.
- McCormick, M., A. Chapa., M. Fernández y J. Beatty. 2001. New tool to gauge dairy herd nutrition. *Lousiana Agriculture* 44(3):18–20
- Mehrez, A.Z., E.R. Orskov y I. McDonald. 1977. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *Br J Nutr* 38, 437- 443.
- Moate, P.J., D.E. Dalley, K. Martin y C. Grainger. 1998. Milk production responses to turnips fed to dairy cows in mid lactation. *Aust. J. Exp. Agric.* 38, 117–123.
- Moate, P.J., D.E. Dalley, J.R. Roche, C. Grainger, M. Hannah y K. Martin. 1999. Turnips and protein supplements for lactating dairy cows. *Aust. J. Exp. Agric.* 39, 389–400.
- National Research Council (NRC). 2001. The nutrient requirement of dairy cattle. Seventh edition. National Academy Press. Washington, D.C. 381 p.
- Nielsen, B.L. 1999. On the interpretation of feeding behaviour measures and the use of feeding rate as an indicator of social constrain. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 63: 79-91.

- Noro, M., P. Cid, C. Wagemann, V. Arnés. V y F. Wittwer. 2013. Valoración diagnóstica de enzimas hepáticas en perfiles bioquímicos sanguíneos de vacas lecheras. *Rev.MVZ Córdoba* 18(2):3474-3479.
- Notman, P. 1994. Turnips a farmer's experiences. In 'Proceedings of the Grasslands Society of Victoria, 35th Annual Conference'. pp. 60–8. (Grasslands Society of Victoria: Parkville.)
- Oldham, J. D. 1996. Protein requirement systems for ruminants. en: Phillips, C. J. C. (ed.) *Progress in dairy science*. Cab International. Wallingford, UK. pp: 3-27.
- Oltner, R., y H. Wiktorsson. 1983. Urea concentrations in milk and blood as influenced by feeding varying of protein and energy to dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 10: 457-468.
- Owens, F.N., y A.L. Goetsch. 1986. Digesta passage and microbial protein synthesis. Pág. 196 -226 en: *Control of digestion and metabolism in ruminants*. L. P. Milligan, W. L. Grovum y A. Dobson, Eds. Reston Book, Prentice-Hall, Englamood Cliffs, New Jersey.
- Palmquist, D.L., Bealieu, A y D.M. Barbano.1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76: 1753-1771.
- Pardo, O., J.E. Carulla, H.D. Hess. 2008. Efecto de la relación proteína y energía sobre los niveles de amonio ruminal y nitrógeno ureico en sangre y leche, de vacas doble propósito del piedemonte llanero, Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 21: 387-397.
- Parga, J., L. Barrientos, R. Pulido, F. Canto, F. Lanuza y O. Balocchi. 2015 Suplementación estival de vacas lecheras a pastoreo con Nabo forrajero (*Brassica rapa*). Resultado de investigaciones. Consorcio lechero.
- Pedraza, C., A. Mansilla, F. Merucci, P. Pinedo, y H. Contreras. 2006. Niveles de Urea Láctea en Vacas de la Región del Bío-Bío, Chile. *Agric. Tec.* 66, 264-270.

- Piatkowski, B. 1982. El aprovechamiento de los nutrientes en el rumiante. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina Pp 429.
- Phillips, C.J.C. 1993. Cattle behaviour. 1nd ed., Farming Press Books, London.
- Pulido, R. 2010. Dinámica del nitrógeno amoniacal y pH ruminales en vacas en pastoreo. En: Contreras y Noro. (ed). Rumen. Morfología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa. Consorcio lechero. Chile.
- Ratkowsky, D.A., y J.R. Alldredge. 1993. Cross-over experiments: designs, analysis application. Statistics, textbooks and monograph. Vol 135. pp: 1-15.
- Ratray, P.V., I.M. Brookes, y A.M. Nicol. 2007. Pasture and Supplements for Grazing Animals. New Zealand Society of Animal Production. New Zealand. ISSN 0111-3976.
- Refsdals, A.O., 1983. Urea in bulk milk as compared to the herd mean of urea blood. *Acta Vet. Scand.* 24. 518-520.
- Reid, J.T. 1970. Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. Oriel Press, 1ra. Edición pp. 8-9.
- Roca, A. I., C.P. Ferris, E. R. Vance y A. González. 2010. Comportamiento Animal de vacas Hlstein-Friesian en dos sistemas: Pastoreo y estabulación. En: Pastos Fuente Natural de energía. 2010. 359-364.
- Rodríguez, R., A. Sosa y Y. Rodríguez. 2007. La síntesis de proteína microbiana en el rumen y su importancia para los rumiantes. *Revista cubana de Ciencia Agrícola.* 41: 303-311
- Roman, Y., R.R. White, y F.L Firkins. 2016. Meta-analysis of postruminal microbial nitrogen flows in dairy cattle. I. Derivation of equations. *J. Dairy Sci.* 99:7918–7931

- Roseler, D.K., D.J. Ferguson, C.J. Sniffen, y J. Herrema. 1993. Dietary protein degradability effects on plasma and milk urea nitrogen and milk non protein nitrogen in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 76:525-534.
- Rowlands. G. J. 1978. Changes in concentrations of serum albumin in dairy cows at calving and their possible significance in relation to milk yield and fertility during lactation. The use of blood metabolites in animal production. Proceedings of a Symposium British Society of Animal. Production Occasional Publications.1978; 1:59-70.
- Russell J.B. y D.B. Dombrowski. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl Envir Microbiol* 39, 604-610.
- Russell, J.B., C.J. Sniffen, y P.J. Van Soest.1983. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 66:763–775.
- Russell J.B., y D.B. Wilson. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose al low pH?. *J. Dairy Sci.* 79,1503-1509.
- Sandoval, C. y F. Herrera. 1999. Estimación de la síntesis de proteína microbial en rumiantes a través de la medición de los derivados de purina en orina. *Rev Biomed;* 10:241-251.
- Sarne, D. y L. DeGrootT. 1989. Hypotalamic and neuroendocrine regulation of thyroid hormone. En : *Endocrinology*, 2nd ed., vol 1, W.B. Saunders Co., Philadelphia, E.E.U.U.
- SAS Inst. Inc. 2009. SAS/STAT® User's guide: Statistics. Version 9.2. Cary; NC, USA.
- Sayers, H.J. 1999. The effect of sward characteristics and level and type of supplement on grazing behaviour, herbage intake and performance of lactating dairy cows. Ph.D. Thesis. Queens University of Belfast. The Agricultural Research Institute of Northern Ireland. Hillsborough

- Satter, L.D. y L.L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br J Nutr* 32, 199-208.
- Schwendel, B.H., T.J. Wester, P.C.H. Morel., M.H. Tavendale, C. Deadman, N. M. Shadbolt, y D.E. Otter. 2015. Organic and conventionally produced milk — An evaluation of factors influencing milk composition. *J. Dairy Sci.* 98 :721–746.
- Sinclair, K.D., L.A. Sinclair y J.J. Robinson. 2000. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: I. Adaptative changes in intake and metabolism to diets differing in their rate of energy and nitrogen release in the rumen. *J Anim Sci.* 78, 2659-2669.
- Smith, R.H. 1980. Kale poisoning: the brassica anemia factor. *Veterinary record* 107: 12-15.
- Stokes, S. 1997. Balancing carbohydrates for optimal rumen function and animal health. Western Canadian Seminar.
- Sun, X.Z., G.C. Waghorn, S.O. Hoskin, S.J. Harrison, S. Muetzel y D. Pacheco. 2012. Methane emissions from sheep fed fresh brassicas compared to perennial ryegrass. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 176, 107–116.
- Sun, X.Z., G. Henderson, F. Cox, G. Molano, J. Harrison, D. Luo, P. Janssen y D. Pacheco. 2015. Lambs Fed Fresh Winter Forage Rape (*Brassica napus* L.) Emit less methane than those fed perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), and possible mechanisms behind the difference. *PLoS ONE* 10(3): e0119697.
- Sun, X.Z., D. Pacheco, y D.W. Luo. 2016. Forage brassica: a feed to mitigate enteric methane emissions?. *Animal Production Science* 56(2-3):451-456.
- Stefanski, E.P., S.C. García, S.R. Farina, D.K. Tan y D. Tanner. 2010. Effects of sowing rate and grazing management of forage rape (*Brassica napus*) on grazing behaviour and utilisation by dairy cattle. *Animal Production Science* 50(6), 560-567.
- Stern, M.D y H. Hoover. 1979. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: A review. *J. Anim, Sci.* 46: 1590-1603.

- Stockdale, C.R., D.W. Dellow, C. Grainger, D.E. Dalley and P.J. Moate. 1997. 'Supplements for Dairy Production in Victoria.' (Department of Natural Resources and Environment: Tatura, Vic.)
- Stockdale, C.R., y K.R. King. 1983. Effect of stocking rate on the grazing behaviour and faecal output of lactating dairy cows. *Grass Forage Sci.* 38:215-218.
- Tamminga, S. 1992. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. *J. Dairy Sci.* 75:345–357.
- Tas, B.M., y Susenbeth, A. 2007. Urinary purine derivatives excretion as an indicator of in vivo microbial N flow in cattle: A review. *Livestock Science* 111:181–192
- Tavendale, M.H., L.P Meagher, D. Pacheco, N. Walker, G.T. Attwood y S. Sivakumaran. 2005. Methane production from In vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124 (Part1), 403–419.
- Teller, E., M. Vanbelle y P. Kamatali. 1993. Chewing Behaviour and Voluntary Grass Silage Intake by Cattle. *Livestock Production Science*, 33:215-227.
- Tilley, J., y R. Terry. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society* 18:104-111.
- Tyrrell, H., y J. Reid. 1965. Prediction of the Energy Value of Cow's Milk. *J. Dairy Sci.* 48. 1215-1223
- Van Soest, P.J., J.B. Robertson y B.A. Lewis, B.A. 1991. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.
- Varga, G., H. Dann, y V. Ishler. 1998. The use of fiber concentrations for ration formulation. *J. Dairy Sci.* 81: 3063-3070.

- Westwood, C.T., y H. Mulcock. 2012. Nutritional evaluation of five species of forage brassica. Proceedings of the New Zealand Grassland Association.
- Welch, J.G., y A.P. Hooper. 1988. Ingestión de alimentos y agua. En: Church, D. (editor). El rumiante fisiología digestiva y nutrición. Editorial ACRIBIA, S. A., Zaragoza, España.
- Wales, W.J., E.S. Kolver, P.L. Thorne, y A.R. Egan. 2004. Diurnal variation in ruminal pH on the digestibility on highly digestible perennial ryegrass during continuous culture fermentation. *J. Dairy Sci.* 87,1864-1871.
- Webster, A.J.F.1992. The metabolizable protein system for ruminants. In: Garnsworthy, P. C.; Haresign, W. y Cole, D. J. A. (eds.) Recent advances in animal nutrition. Butterworth-Heinemann. Nottingham, UK. pp: 93-110.
- Webster, A.J.F. 1993. Understanding the dairy cow. 2ª ed. Blackwell Science. Oxford, UK. 382 p.
- Williams, E.J. 1948. Experimental Designs Balanced for the estimation of residual effects of treatments. *Australian Journal of Scientific Research.* 2: 149-168.
- Wittwer, F.G., H. Opitz, J. Reyes, P. Contreras, y H. Böhmwald. 1993. Determinación de urea en muestras de leche de rebaños bovinos para el diagnóstico de desbalance nutricional. *Arch. Med. Vet.* 25:165-172.
- Wittwer, F. 2012. Manual de Patología Clínica Veterinaria 2 da ed. Imprenta América. Valdivia, Chile.
- Zavaleta, E. 1976. Los ácidos grasos volátiles, fuente de energía en los rumiantes. En: Moreno, R. (ed) Ciencia Veterinaria. 223-240. Universidad Autónoma de México. México.

## ANEXOS

Anexo 1. pH ruminal de vacas suplementadas con NF, RF y dieta control.

Hora	Tratamiento						p-valor
	Control		Raps		Nabo		
	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	
0:00	6,2795	0,0527	6,2531	0,0528	6,1794	0,0526	0,177
1:00	6,3157	0,0526	6,2999	0,0526	6,2097	0,0527	0,1225
2:00	6,3586	0,0527	6,3384	0,0526	6,2539	0,0527	0,1377
3:00	6,3938	0,0526	6,3851	0,0528	6,2994	0,0527	0,174
4:00	6,4092	0,0527	6,4161	0,0526	6,3389	0,0526	0,3091
5:00	6,4449	0,0527	6,4511	0,0524	6,3707	0,0526	0,2764
6:00	6,4814	0,0527	6,5000	0,0525	6,4225	0,0527	0,3494
7:00	6,5063	0,0526	6,5234	0,0525	6,4408	0,0527	0,2941
8:00	6,5227	0,0527	6,5475	0,0528	6,4743	0,0527	0,4094
9:00	6,3826	0,0526	6,4261	0,0527	6,378	0,0527	0,6345
10:00	6,2813	0,0526	6,282	0,0527	6,2756	0,0526	0,9922
11:00	6,2405	0,0527	6,3049	0,0525	6,2604	0,0526	0,4965
12:00	6,2607	0,0527	6,2877	0,0527	6,2355	0,0526	0,6452
13:00	6,3009	0,0527	6,2778	0,0527	6,201	0,0527	0,172
14:00	6,3251	0,0527	6,2874	0,0524	6,2138	0,0527	0,1274
15:00	6,3567	0,0527	6,3173	0,0526	6,242	0,0526	0,1128
16:00	6,3781	0,0526	6,3529	0,0526	6,2537	0,0527	0,0622
17:00	6,3332 <sup>a</sup>	0,0527	6,3109 <sup>ab</sup>	0,0526	6,2073 <sup>b</sup>	0,0527	0,055
18:00	6,1409 <sup>a</sup>	0,0527	6,0375 <sup>ab</sup>	0,0525	5,9934 <sup>b</sup>	0,0526	0,0252
19:00	6,1199 <sup>a</sup>	0,0526	5,9623 <sup>b</sup>	0,0525	5,9588 <sup>b</sup>	0,0527	0,0045
20:00	6,1546 <sup>a</sup>	0,0527	6,0647 <sup>ab</sup>	0,0527	5,9822 <sup>b</sup>	0,0527	0,0086
21:00	6,2208 <sup>a</sup>	0,0527	6,1535 <sup>a</sup>	0,0526	6,0437 <sup>b</sup>	0,0527	0,006
22:00	6,2607 <sup>a</sup>	0,0527	6,2118 <sup>ab</sup>	0,0525	6,1047 <sup>b</sup>	0,0527	0,0169
23:00	6,2771 <sup>a</sup>	0,0528	6,2422 <sup>ab</sup>	0,0555	6,1342 <sup>b</sup>	0,053	0,0308

EEM= Error estándar de la media. p-valor= valor de probabilidad. Letras distintas entre las filas reflejan una diferencia estadísticamente significativa entre los datos (P < 0,05).