

CONSUMO VOLUNTARIO Y DIGESTIBILIDAD DEL HENO
DE PASTO PAJÓN (*Dichanthium annulatum*) TRATADO CON
UN COMPLEJO ENZIMÁTICO Y UNO NITROGENADO

por

Joaquín Caridad del Rosario

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2012

Aprobado por:

Rafael Ramos Santana, M.S.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Paul Randel Folling, Ph.D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Ernesto O. Riquelme, Ph.D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Elide Valencia Chin, Ph.D.
Presidente del Comité Graduado

Fecha

Teodoro Ruiz López Ph.D.
Representante de estudios graduados

Fecha

Skip Van Bloem, Ph.D.
Director del Departamento

Fecha

RESUMEN

Se realizaron dos experimentos para determinar si la composición química (CQ), el consumo voluntario (CV) y la digestibilidad *in vivo* e *in situ* del heno de pasto pajón (HPP) (*Dichanthium annulatum*), en avanzado estado de madurez, podría mejorarse con la aplicación de aditivos. En experimento 1 se evaluaron dos aditivos; uno de índole enzimático conocido comercialmente como Dyadic[®] Cellulase PLUS (ENZ) y otro nitrogenado, urea líquida (ULI). Se utilizaron nueve (9) carneros en un diseño de cuadrado latino (3x3) con los tres tratamientos: HPP sin aditivo (CON), y HPP con ENZ y con ULI. Se rociaron los aditivos sobre el heno 24 horas antes de ofrecerlo a razón de 4% del peso vivo (PV) de los animales diariamente. La aplicación de la ENZ no resultó en cambios de importancia en CQ, CV, ni digestibilidad de materia seca (MS) o las fracciones proteína bruta (PB), fibra detergente neutro (FDN) y ácido (FDA). Solo hubo ligeras tendencias a reducir ($p < 0.11$) el contenido de FDN (73.91 vs. 74.27 %) y a aumentar ($p < 0.09$) el de FDA (44.37 vs. 42.87 %). El rociado del HPP con ULI aumentó ($p < 0.01$) el contenido de PB (8.11 vs. 6.41 %), tendió a reducir ($p < 0.11$) la proporción de FDN (73.0 vs. 74.27 %) y a aumentar ($p < 0.09$) la de FDA (43.17 vs. 42.87 %); aumentó el consumo de PB ($p < 0.01$) (87 vs. 67 g) y tendió ($p < 0.06$) a aumentar el de MS (1027 vs. 986 g) y la digestibilidad de la PB ($p < 0.10$) (61.11 vs. 53.98 %). El CV diario de MS como porcentaje del PV animal, no fue afectado significativamente (3.13, 2.94 y 3.23 % para CON, ENZ y ULI, respectivamente). En dos corridas del experimento 2, de diseño bloques completos al azar con dos factores, se evaluó la digestibilidad *in situ* del HPP. Tres HPP de distintos estados de madurez: comercial (alegadamente de 8 semanas) y

dos de producción propia de 12 y 24 semanas de rebrote, a los cuales se aplicó la misma enzima y dosis que en el primer experimento, constaron el primer factor y seis tiempos (0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas) de incubación en bolsas de dacrón dentro del rumen de una vaca fistulada, el segundo factor. El heno comercial fue el de mayor desaparición *in situ* de MS a las 3 y 6 horas de incubación (21.86 y 24.64 %), mientras que la del HPP de 12 semanas de edad fue superior a las 12, 24 y 48 horas (32.42, 46.84 y 56.99 %). El HPP de 24 semanas tuvo los menores valores en todos los tiempos de incubación llegando a 47.38 % de la MS a las 48 horas. La desaparición de FDN no difirió entre los tres HPP a las 3 y 6 horas de incubación, pero en los intervalos de 12, 24 y 48 horas los HPP de 12 semanas y el comercial tuvieron mayores ($p < 0.05$) desapariciones con valores respectivos de 25.43, 38.11, 43.62 %; y 26.50, 35.42, 43.54 %. El HPP de 24 semanas tuvo lo menores, mostrando 37.97 % a las 48 horas en el rumen. En cambio, la desaparición de la FDA no se vio afectada por la madurez vegetal hasta las 48 horas de incubación cuando el HPP de 12 semanas de edad mostró superioridad ($p < 0.05$) (31.10 %) sobre los HPP comercial (24.74 %) y de 24 semanas de edad (27.22 %). En conclusión, el tratamiento con la enzima no tuvo efecto importante sobre el HPP evaluado por CQ y observaciones *in vivo*, por su parte la ULI aumentó el contenido y consumo de PB del HPP, y por ende su valor nutritivo.

ABSTRACT

Two experiments were conducted to determine if the chemical composition (CC), *in vivo* voluntary intake (VI) and digestibility *in vivo* and *in situ* degradability of mature Bluestem grass hay (BGH) (*Dichanthium annulatum*), could be improved by the application of additives. In experiment 1 two additives were used, one of enzymatic nature, Dyadic[®] Cellulase PLUS (ENZ) and the other a nitrogen source, liquid urea (LU). Nine (9) young rams were used in a 3x3 latin square design with the three treatments: BGH without additive (CON), and with added ENZ or LU. The additives were sprinkled over the hay 24 hours prior to being offered at 4 % of the animal body weight (BW) daily. Application of ENZ resulted in no change in CC, VI or digestibility of dry matter (DM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF) and acid (ADF). But it tended to slightly reduce ($p < 0.11$) NDF content (73.91 vs. 74.27 %), and to increase ($p < 0.09$) ADF content (44.37 vs. 42.87 %). Treatment of BGH with LU increased ($p < 0.01$) the content of CP (8.11 vs. 6.41 %), tended to depress ($p < 0.11$) NDF (73.00 vs. 74.27 %) and increase ($p < 0.09$) ADF (43.17 vs. 42.87 %); it also increased ($p < 0.01$) VI of CP (87 vs. 67 g) and tended ($p < 0.06$) to increase VI of DM (1027 vs. 986 g) and ($p < 0.10$) CP digestibility (61.11 vs. 53.98 %). Daily VI of DM as a percentage of BW was not significantly affected by treatments (3.13, 2.94 and 3.23 % for CON, ENZ and LU, respectively). In two runs of experiment 2, of a complete randomized block design and two factors, the *in situ* degradability of BGH was evaluated. Three BGH of different maturity: a commercial hay of allegedly 8 weeks regrowth, and two homemade hays of 12 and 24 week regrowth, to which was applied the same enzyme and dosage used as in

experiment 1, constituted the first factor. The second factor was time (0, 3, 6, 12, 24 and 48 hours) of incubation in the rumen. *In situ* disappearance of DM was greatest for the commercial hay at 3 and 6 hours of incubation (21.86 and 24.64 %), while at 12, 24 and 48 hours the 12-week hay was superior (32.42, 46.84 y 56.99 %). The 24-week old BGH was lowest at all incubation times and reached 47.38 % at 48-hour. Disappearance of NDF did not differ among the three BGH at 3 and 6 hours of incubation, but at 12, 24 and 48 hours intervals BGH 12-week old and commercial had higher ($p < 0.05$) respective values 25.43, 38.11, 43.62; and 26.50, 35.42, 43.54 %. The 24-week old BGH was always the lowest and showed a value of 37.97 % after 48 hours in rumen. By contrast, ADF disappearance was not significantly affected by vegetative maturity until 48 hours of incubation, when 12-week old BGH demonstrated superiority ($p < 0.05$) (31.10 %), over the commercial (24.74 %) and 24-week old BGH (27.22 %). In conclusion, treatment with the enzyme had no important effect on BGH as evaluated by CC and *in vivo* criteria, whereas treatment with LU clearly increased CP content of the BGH and VI of CP, thus improving the nutritive value.

© Joaquín Caridad del Rosario, 2012

DEDICATORIA

A Dios, todopoderoso, por darme vida y fuerzas para lograr mis metas y objetivos

A mi esposa Mary por su comprensión y apoyo incondicional soportando a pesar de la distancia.

A mis hijos Yomary Paola, Joan Félix y Gerald Joaquín por ser la bujía que me inspira a mantener el enfoque en mis metas. Espero que esto les sirva de motivación para hacer lo propio.

A mis padres Paula y Joaquín porque con sus consejos y protección son parte de mí.

A mis hermanos Betsaida, Débora y Ariel por su solidaridad con esta causa.

A mis tíos, Santiago del Rosario y Leonel del Rosario por su disposición a apoyarme siempre e igualmente a todos mis familiares.

A mi abuelo Martín del Rosario (póstumo) por enseñarme que para llegar a la meta hay que luchar por ellas..

A mis amigos y compañeros y a los que de una forma u otra han compartido, sin importar el estado de ánimo, este proceso de mi vida.

A todo ser humano que lucha por un cambio interior para provocar un cambio exterior

Joaquín Caridad del R.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al profesor Dr. Elide Valencia Chin por darme la oportunidad de realizar esta investigación bajo su guía y supervisión. Además, por brindarme motivación y coraje durante todo este proceso.

Al comité graduado de esta tesis Dr. Paul Randel F., Dr. Ernesto Riquelme y al Prof. Rafael Ramos Santana M.S. por la disposición de participar y contribuir científicamente a este trabajo de grado. Igualmente, al Recinto Universitario de Mayagüez (RUM) de la Universidad de Puerto Rico, por su acogida y seguimiento.

Al proyecto T-STAR “Improving the potency and reliability of fibrolytic enzymes for enhancing tropical forage utilization by livestock” por proveer los fondos para el estudio.

También, al Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF) y al Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (CONIAF), al junto de sus equipos de trabajo por darme apoyo financiero mientras duraron los estudios.

De igual manera quiero agradecer a la Ing. Birmania Wagner, al Dr. Gregorio García Lagombra y al Ing. Manuel Tapia Chalas por su recomendación para iniciar este estudio y mantener un seguimiento activo al mismo. Igualmente, a mi compañero y amigo Víctor Asencio por sus gestiones, ayuda y apoyo personal a mi llegada a Mayagüez.

Agradecer, por último y no menos importante, al personal del Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales y de las Estaciones Experimentales de Corozal y Lajas, en especial al Prof. Juan Ortiz y familia por su apoyo y colaboración en todo momento del desarrollo de esta investigación.

Tabla de Contenido

| | Página |
|--|---------------|
| Resumen | ii |
| Abstract | iv |
| Dedicatoria | vii |
| Agradecimientos | viii |
| Tabla de contenido | ix |
| Lista de tablas | xi |
| Lista de figuras | xii |
| Apéndice | xiii |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Objetivos | 3 |
| 2. Revisión de literatura | 4 |
| 2.1. Los forrajes en el trópico | 4 |
| 2.2. Valor nutritivo de los forrajes tropicales | 6 |
| 2.2.1. Composición química | 6 |
| 2.2.2. Digestibilidad | 8 |
| 2.2.3. Consumo voluntario | 9 |
| 2.3. El pasto pajón (<i>Dichanthium annulatum</i>) | 12 |
| 2.4. Aditivos | 14 |
| 2.4.1. Preparados enzimáticos | 15 |
| 2.4.1.1. Dyadic [®] Cellulase PLUS | 17 |

| | |
|---|----|
| 2.4.2. Urea | 17 |
| 3. Materiales y Métodos | 20 |
| 3.1 Composición química, consumo voluntario y digestibilidad del HPP tratado o no con un aditivo enzimático o un nitrogenado | 20 |
| 3.1.1 Diseño experimental | 23 |
| 3.1.2 Recolección de datos | 24 |
| 3.1.3 Análisis estadísticos | 26 |
| 3.2 Digestibilidad <i>in situ</i> del HPP a diferentes grados de madurez tratados con una enzima fibrolítica (Dyadic® Cellulase PLUS) | 27 |
| 3.2.1 Diseño experimental y análisis estadístico | 30 |
| 4. Resultados y Discusión | 31 |
| 4.1 Composición química, Consumo voluntario y Digestibilidad | 31 |
| 4.1.1 Composición química | 31 |
| 4.1.2 Consumo Voluntario | 33 |
| 4.1.3 Digestibilidad <i>in vivo</i> | 37 |
| 4.2 Digestibilidad <i>in situ</i> | 41 |
| 5. Conclusiones | 45 |
| 6. Implicaciones | 46 |
| 7. Literatura citada | 47 |
| 8. Apéndice | 58 |

Lista de Tablas

| | | Página |
|----------|---|---------------|
| Tabla 1. | Descripción de los aditivos enzimático y nitrogenado evaluados | 21 |
| Tabla 2. | Distribución de las unidades experimentales y el arreglo de los tratamientos en los tres períodos experimentales | 23 |
| Tabla 3. | Composición química de heno de pasto pajón con o sin aditivo enzimático o nitrogenado | 31 |
| Tabla 4. | Consumo voluntario diario de heno de pasto pajón con o sin un aditivo enzimático o nitrogenado | 34 |
| Tabla 5. | Digestibilidad aparente del heno de pasto pajón con o sin un aditivo enzimático o nitrogenado | 37 |
| Tabla 6. | Desaparición (%) de la MS, FDN y FDA del HPP en tres estados de madurez tratado con Dyadic® Cellulase PLUS a diferentes tiempos de incubación en el rumen | 42 |

Lista de Figuras

| | | Página |
|-----------|--|---------------|
| Figura 1. | HPP picado, tratado y empacado, diariamente, 24 horas antes ser ofrecido | 22 |
| Figura 2. | Jaulas metabólicas con carneros mestizos Dorper x St. Croix White usados en el estudio | 22 |
| Figura 3. | Muestras del heno ofrecido y rechazado tomadas diariamente por cada animal | 25 |
| Figura 4. | Cantidad total diaria de heces procedente de un animal durante el proceso de recolección de datos | 25 |
| Figura 5. | Material ajustado a las cadenas listo para ser introducido en el rumen | 28 |
| Figura 6. | Procedimiento de retiro de las bolsas de acuerdo al tiempo de incubación planificado | 29 |
| Figura 7. | Materia seca residual lista para ser enviada al laboratorio Dairy One Lab. | 29 |
| Figura 8. | Consumo voluntario de MS diario como porcentaje del peso vivo de heno de pasto pajón con o sin un aditivo enzimático o nitrogenado | 36 |

Apéndice

Página

| | |
|--|----|
| Apéndice A. Comportamiento de la pluviometría (milímetros-mm) y la temperatura (Celsius-C) durante la investigación de digestibilidad <i>in vivo</i> , Corozal, Puerto Rico (2011) | 58 |
|--|----|

1 INTRODUCCIÓN

La conservación de gramíneas tropicales en forma de heno ha aumentado en las últimas décadas y juega un papel importante en la industria lechera de Puerto Rico que no cuenta hoy día, como fuente complementaria de forrajes, con suficientes áreas para pastoreo. Según, la ORIL (2008) en el período 2000-2008 los terrenos dedicados a pastos en las vaquerías de PR se redujeron en un 22.5 % relativo al año 2000 y se redujo en 16 % el número de las unidades animales presentes. Las vacas lecheras requieren alrededor de 34 % de fibra detergente neutro (FDN) de alta calidad y un 21 % de fibra detergente ácido (FDA) en base seca (BS) para el buen funcionamiento del rumen y un adecuado contenido de grasa en la leche, además de alrededor de 16 % de proteína bruta (PB) en la dieta diaria total (National Research Council, 2001).

Las gramíneas tropicales utilizadas para heno, generalmente, no cumplen con los requerimientos necesarios para la alimentación de la vaca lechera (Newman *et al.*, 2007; Brown y Adjei, 1995). Comúnmente estas se caracterizan por su bajo valor nutritivo producto del avanzado estado de madurez en que se cosechan (> 8-12 semanas), lo cual influye negativamente en el valor nutritivo y el consumo voluntario.

Las gramíneas conservadas que se producen en la región semiárida de Puerto Rico son, en su mayoría, de especies naturalizadas, tales como el pasto pajón (*Dichanthium annulatum*), guinea (*Panicum máximum* Jacq.) o mezclas de otras gramíneas tropicales. La oferta de henos de especies mejoradas como el de pasto pangola (*Digitaria eriantha*), está limitada en el mercado debido a factores de manejo y climatológicos. El heno de la especie citada posee en promedio 5 % de PB, 45 % de FDA y 68 % de FDN, según análisis realizado

en Pakistán (Sultan *et al.*, 2008). Por tal razón es necesario identificar pastos mejorados de mejor valor nutritivo para henificar o ensilar, o mejorar el manejo de los ya existentes para maximizar su utilización por las vacas lecheras.

En los últimos años se han investigado distintos tratamientos químicos para mejorar el valor nutritivo de las gramíneas tropicales conservadas. En el proceso de ensilaje se ha utilizado como aditivo enzimas exógenas del tipo oligosacaridasas para mejorar la fermentación (Adesogan *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2001), también se ha probado rociar el producto fibrolítico enzimático al momento de alimentar a los rumiantes para mejorar su consumo voluntario (CV) y digestibilidad (Tous-Rivera *et al.*, 2010; Almaraz *et al.*, 2010; Gallardo *et al.*, 2010; Giraldo *et al.*, 2008; Avellaneda *et al.*, 2009; Elwakeel *et al.*, 2007; Szasz *et al.*, 2002; Flores *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 1996). En otras investigaciones se ha rociado urea líquida sobre el forraje antes de henificarlo para mejorar su contenido de PB (Almodóvar *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2007). Tradicionalmente se ha usado la urea combinada con melaza para aumentar los niveles dietéticos de nitrógeno utilizando caña de azúcar como dieta básica (Preston and Willis, 1974; Silvestre *et al.*, 1977; Ravelo *et al.*, 1978). Estas iniciativas se justifican por los conocidos efectos adversos de la madurez avanzada de las gramíneas tropicales sobre su valor nutritivo.

En una investigación local, Tous-Rivera *et al.* (2010) demostraron aumentos en el consumo voluntario y mejoras en la composición química, mediante el rociado de enzimas exógenas sobre el pasto guinea de ocho semanas de edad. Sin embargo se requiere estudio adicional tocante al potencial de las enzimas fibrolíticas o la urea en forma líquida para el tratamiento de otras gramíneas tropicales de amplio uso en la isla.

1.1 Objetivos

- Determinar el efecto sobre la composición química, consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes del heno de pasto pajón (*Dichanthium annulatum*) al adicionarle una enzima fibrolítica o un compuesto que aporte nitrógeno no proteico.
- Evaluar la degradabilidad ruminal de la fibra del heno de pasto pajón (*Dichanthium annulatum*) a diferentes grados de madurez tratados con una enzima fibrolítica.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Los forrajes en el trópico

Los pastos y forrajes existen en una amplia gama de suelos y localidades en todo el mundo, poseyendo cada especie, dentro de un tipo de planta, su propia adaptabilidad (Pitman, 2001). El trópico húmedo es la región con mayor potencial para su producción, debido al clima cálido, alta pluviometría y variedad de suelos existentes (Vicente-Chandler *et al.*, 1983). Sin embargo, estas características provocan que las gramíneas que allí crecen tengan una relación baja entre los carbohidratos no estructurales y la proteína degradable (Sánchez, 2001).

Los diversos grupos de gramíneas responden al factor suelo y el grado de su propia madurez de diferentes formas. Por ejemplo, los *Cynodon* originarios de África, fueron desarrollados para suelos fértiles, pero se han adaptado a una amplia gama de suelos. Por su lado, el CIAT ha liberado un grupo de gramíneas mejoradas del género *Brachiaria*, que se adaptan a suelos de baja a mediana fertilidad (Holmann *et al.*, 2004). El contenido de nutrientes aprovechables por los animales en los pastos tropicales como limpoglass (*Hemarthria altissima*), bermudagrass (*Cynodon dactylon*) y stargrass (*Cynodon spp*) está estrechamente asociado al estado de madurez de la planta. En bahíagrass (*Paspalum notatum*) hay poco cambio debido al estado de madurez de la planta (Arthington y Brown, 2005). El abonamiento no cambia esta relación (Sotomayor-Ríos *et al.*, 1976).

Otro hecho pertinente es la vía metabólica que utilizan las gramíneas tropicales para realizar la fotosíntesis. Son plantas de tipo C₄ que poseen una estructura folial conocida como

anatomía de Kranz, caracterizada por células del mesófilo en forma de corona y paredes celulares gruesas y abundantes que contrastan con las estructuras de las leguminosas (Atkin, 1993). Relativo a las plantas C₃, las gramíneas tropicales (C₄) presentan a través de toda la planta mayor contenido de pared celular y lignina. La cual se encuentra fuertemente enlazada con la hemicelulosa por enlaces covalentes, que limitan la degradación de los componentes estructurales y, por ende, la digestibilidad de la planta, según se maduran (Moore y Hatfield, 1994). Se ha sugerido como modo de superar estas desventajas combinar gramíneas, leguminosas y árboles multipropósito en la alimentación animal (Faría-Mármol, 2006).

No obstante sus limitaciones, los pastos y forrajes tropicales con un adecuado manejo tradicional, siguen siendo un alimento de bajo costo adecuado para alimentar el ganado (Holmann, 1998). Estos pueden ser producidos en terrenos marginales que no pueden ser utilizados para cultivos. Al depender de estos forrajes se puede proveer suficiente fibra para las necesidades de los microorganismos del rumen. En terrenos marginales, de baja fertilidad, los pastos tropicales contribuyen con materia orgánica al suelo y ayudan a controlar la erosión, de esta manera pueden usarse para restaurar suelos degradados (CIAT, 2008). Por otro lado el consumo de fibra promueve la rumia y ayuda a mantener el contenido de grasa en la leche. Los rumiantes alimentados mayormente con forrajes proveen 70 % del total de la proteína animal, 80 % de la leche y 10 % de la fibra natural que consumen o usan los seres humanos en el mundo (Barahona-Rosales y Sánchez-Pinzón, 2005). Ello ocurre gracias a la capacidad del rumiante para digerir parcialmente la pared celular de los forrajes (Paterson *et al.*, 1994, referido por Fahey, 1997). Por las razones expuestas se hace necesario evaluar el valor nutricional de los pastos con miras a mejorar su utilización.

2.2 Valor nutritivo de los forrajes tropicales

El valor nutritivo determina el aporte potencial de los forrajes a la producción animal. Arce *et al.* (2003) lo define como la cuantificación del aporte de la planta de nutrientes digeribles a los herbívoros que la consumen. Los nutrientes aportados por los forrajes se hallan en el contenido celular y en la pared celular. El primero es altamente soluble y los carbohidratos presentes allí se denominan no estructurales. Esta fracción se digiere rápidamente en el rumen (Colburn y Evans, 1967). En cambio, la pared celular es altamente insoluble, y se constituye de carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa y lignina). Esta fracción se retiene en el rumen donde los microorganismos (hongos, bacterias y protozoos) que allí habitan, la utilizan como fuente de energía y para elaborar la proteína microbiana. El valor nutricional de los forrajes depende de la composición química, la digestibilidad y de la eficiencia de utilización de los nutrientes absorbidos.

2.2.1 Composición química

La composición química de la pastura nativa varía en función de la época del año, edad del rebrote, especie botánica y parte de la planta (Tejos, 2002). Comúnmente se determina la composición nutricional de los forrajes en término de las fracciones analíticas MS, PB, FDN, FDA y materia inorgánica [(ceniza) (MI)]. Menos común es la determinación de minerales y vitaminas individuales. La PB abarca sustancias nitrogenadas presentes en el contenido celular y otras ligadas a la pared celular del forraje (Minson, 1990; NRC, 1985). La fracción MI, indica el contenido total de minerales y se usa para obtener el porcentaje BS

de materia orgánica (MO) mediante el cálculo $100 - \% \text{ MI}$. Estas fracciones pertenecen al llamado análisis proximal o de Weende. La FDN abarca el conjunto fibroso que incluye celulosa, hemicelulosa y lignina, con alguna presencia de minerales y sustancias nitrogenadas, la FDA corresponde al conjunto de la celulosa y lignina ausente la hemicelulosa. Se determina el contenido de FDN y FDA con el esquema de análisis químico, según Van Soest (1994). La FDN se considera equivalente a la pared celular cuya utilización por los rumiantes es indispensable para la producción de carne y leche a base de forraje, mayormente (Atkin, 1993).

Las gramíneas tropicales varían en concentración de los diversos nutrientes, como la PB que suele oscilar, mayormente, desde 4 hasta 14 %. Especies como *Panicum maximum* y las *Brachiarias* poseen valores típicos entre 7 y 14 % de PB, mientras que los de la *Andropogum gayanus* están entre 6 y 10 % (Pérez, 2008). Gramíneas forrajeras de los géneros *Digitarias* y *Brachiarias* y la *Cynodon nlemfuensis* muestran niveles proteínicos desde 8.8 hasta 12.9 % en promedio (Sotomayor-Ríos *et al.*, 1976; Vega *et al.*, 2006). Roncendó y Pérez (2005) encontraron en pasturas degradadas de rhodes (*Chloris gayana* kunt cv. Pioneer) con inter-siembra de leguminosas, niveles de PB entre 4.56 y 6.30 %. Según CORPOICA (2001) pastos como kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), guinea (*Panicum maximum*) y colosuana (*Bothriochloa pertusa*), sembrados a cielo abierto y asociados en sistemas silvopastoriles varían en PB desde 4.9 hasta 12.9 % y en FND y FDA desde mínimos de 63.9 y 33.9 % hasta máximos de 71.9 y 42.5 %, respectivamente. Los bajos niveles de PB y altos valores de FDN y FDA en los pastos tropicales se deben en parte a los tipos de suelo y a la madurez al cosecharse, lo que afecta su digestibilidad.

2.2.2 Digestibilidad

La digestibilidad de los forrajes consiste en la porción de éste, que es asimilado por el animal expresado como porcentaje del total ingerido. Los tres factores que la afectan son el animal, el forraje y el nivel de consumo (Esparza, 2004). Referente al factor animal la especie es de gran importancia ya que diferentes especies varían en su estructura anatómica y funcional y en su capacidad de digerir y utilizar los alimentos. Los rumiantes tienen una ventaja comparativa frente a los no rumiantes referente al uso de la fibra de los forrajes, si bien la presencia de una gran cantidad de forraje en el rumen puede reducir la digestibilidad de la energía, por una baja concentración relativa de enzimas microbianas y un tránsito más rápido del contenido por el rumen lo que disminuye las posibilidades de digestión y absorción de las sustancias más resistentes (Buxade, 1994). Con respecto al factor forraje, su composición físico-química, sobre todo el contenido de pared celular y grado de lignificación, relación hoja-tallo y tamaño de partículas (Van Soest, 1994), afectan la digestibilidad.

La determinación experimental de la digestibilidad *in vivo* de los forrajes pastoreados presenta dificultades, particularmente, para cuantificar la MS ingerida y la excretada en las heces. En pruebas *in vivo* con animales estabulados, generalmente se determina la digestibilidad de forrajes y raciones completas directamente y la de los concentrados por el método de sustitución. Entre las otras metodologías comúnmente utilizadas para propósitos experimentales, el método *in situ* es útil para describir la interacción animal/dieta y el método *in vitro* permite comparar muchos alimentos a la vez (Varel y Kreikemeier, 1995). También se puede estimar la digestibilidad utilizando marcadores internos o externos (Bowman *et al.*,

1999). Estos marcadores son sustancias indigestibles contenidas naturalmente en el pasto o añadidas por el investigador, por ejemplo, óxido crómico (Cr_2O_3), lignina insoluble en detergente ácido, nitrógeno ligado a la FDA, cenizas insolubles en ácido o alcanos (ceras de cadena impar). Se han utilizado estos métodos para estimar la digestibilidad de muchos pastos tropicales, encontrándose variabilidad de acuerdo a la especie botánica, madurez de la planta y nutriente evaluado.

En trabajos locales León (2003), encontró una digestibilidad aparente de 54.71 % para MS y 48.83 % para FDN, de heno de hierba Johnson (*Sorghum halepense*) y de pasto guinea (*Panicum máximum*), mezclado en las proporciones 80:20, respectivamente. Sandoval (2007) evaluó pasto rhodes (*Chloris gayana*) y estimó digestibilidades de 55.51 % para MS y 53.9 % para FDN en carneros. También, Tous-Rivera *et al.* (2010) encontraron 50.12 % de digestibilidad de MS en heno de pasto guinea de ocho semanas de edad utilizando ovinos. Ramos *et al.* (1995), informaron una digestibilidades de MS baja de 42.5 % en el pasto estrella (*Cynodon plectostachyus*) y de 59 % en *Brachiaria decumbens*, coincidiendo esta última con resultados obtenidos en CIAT (Vega *et al.*, 2006). Se estima que un forraje con una digestibilidad alrededor de 65 % de la MS permite un adecuado consumo de energía en la mayoría de los animales (Pirela, 2005).

2.2.3 Consumo voluntario

El concepto de consumo voluntario (CV) comprende la cantidad de un alimento que ingiere voluntariamente un animal, en un período dado, cuando se ofrece a libertad (Minson, 1990) y se considera uno de los determinantes del valor nutritivo del mismo (Allison, 1985).

Su importancia radica en que a mayor consumo de MS, mayor ingestión de nutrientes de las diversas clases. Los rumiantes tienden a consumir en mayor cantidad un forraje con alta densidad energética (Esparza, 2004) y en menor cantidad un forraje muy fibroso de menor densidad energética (Chesson, 1988).

Los factores que afectan el CV pueden clasificarse entre los que son propios del animal, del forraje, del clima y del manejo ganadero (Mejía, 2002; Raggi-Saini, 1988). Los factores propios del animal incluyen la raza, condición corporal y estado fisiológico; los del forraje se relacionan con la madurez, composición química, tamaño de las partículas, digestibilidad y palatabilidad; los climáticos incluyen la temperatura y humedad; y los de manejo abarcan tiempo de acceso al alimento, frecuencia de alimentación e inclusión de aditivos (Ingvarsen, 1994).

Referente al efecto de la raza es notable que se está usando ganado Holstein, oriundo de clima templado, para la producción especializada de leche en el trópico, donde es difícil que su necesidad de PB quede satisfecha por los forrajes locales (Karue *et al.*, 1972). En cambio, el ganado Cebú, adaptado a los trópicos, consume bien un heno bajo en proteína (7 %) y mantiene su metabolismo normal, quizás porque su tasa metabólica normal y potencial productiva sean menores que las de las razas europeas (Preston y Leng, 1989; McDowell, 1975).

Desde el punto de vista hormonal el hipotálamo está relacionado directamente con el control del hambre y la saciedad (Balch y Campling, 1962; Baile y Mayer, 1970). Elevados niveles de glucosa o propionato en el hígado bloquean una sección del nervio vago lo que envía una señal al cerebro de reducir el consumo (Forbes, 2007). Los requerimientos

nutricionales varían directamente con el peso metabólico (Wagner *et al.*, 1986). El estado fisiológico también puede afectar la ingestión de alimento, ya que los requerimientos nutricionales para mantenimiento, crecimiento o lactación son diferentes.

La edad de crecimiento previo al corte del forraje, determinará su madurez. Al avanzar la madurez el contenido celular de la planta se reduce y la porción de pared celular aumenta y se lignifica progresivamente. Estos cambios fisiológicos en la planta dificultan la degradación del forraje y la fermentación microbiana en el rumen (Hoffman *et al.*, 2007). La fermentación ruminal se atrasa y aumenta el tiempo de paso de la ingesta por el tracto digestivo (Campling, 1970). La madurez del forraje, también afecta la naturaleza voluminosa de la fibra (Van Soest, 1994) y el contenido de humedad en el pasto (Forbes, 1986). Dietas con forrajes toscos y de madurez mediana contienen típicamente 8-10 % de proteína y no se prestan para el consumo máximo (Allison, 1985). En términos generales, existe una relación positiva entre el CV y la digestibilidad de los forrajes (Blaxter *et al.*, 1961, referidos por Raggi-Saini, 1988), pero cuando la digestibilidad excede el 66 %, en rumiantes, el consumo de energía digestible tiende a estabilizarse (Ellis, 1978).

Altas temperaturas ambientales crean condiciones de estrés calórico en el animal, lo cual afecta la ingestión de alimento y si este efecto es lo suficientemente severo no se cubren los requerimientos nutricionales (Dulphy *et al.*, 1980). Esto ocurre como respuesta fisiológica homeostática para mantener la temperatura corporal óptima, mediante un menor consumo de MS y consecuentemente menor producción de calor por la fermentación ruminal y el metabolismo tisular (McDowell, 1985). Por otra parte, una alta humedad relativa del aire

dificulta la disipación de calor corporal por la evapotranspiración, por lo que el animal tiende a limitar su consumo a las horas más frescas del ciclo diurno.

León (2003) estudió gramíneas tropicales naturalizadas y estimó el CV de heno mezclado compuesto de hierba johnson (*Sorghum halepense*) y pasto guinea (*Panicum máximum*) en las respectivas proporciones 80:20 y caracterizado por alta fibrosidad y bajo contenido de PB, en un poco menos del 3 % del peso vivo diariamente en ovinos. Tous-Rivera *et al.* (2010) encontraron un CV de heno de pasto guinea (*Panicum maximun*) igual a 2.86 % del peso vivo. Por otro lado, Sandoval (2007) informó un CV de 2.03 % del peso vivo (PV) de carneros alimentados con heno de pasto rhodes (*Chloris gayana*). Mairena *et al.* (2008) encontraron CV de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) igual a 2.77 % del PV. Estos consumos son reflejo de los niveles proteínicos y las digestibilidades bajas que caracterizan a los pastos tropicales.

2.3 Pasto pajón (PP) (*Dichanthium annulatum*)

Esta planta forrajera es nativa de África y se halla naturalizada en el norte de Australia y las Américas. Es conocida como pasto pajón (Puerto Rico), climacuna (Colombia), Kleberg bluestem (USA), (Skerman y Riveros, 1990). Está ampliamente establecida en Puerto Rico por su gran versatilidad de desarrollo, tanto así que se establece espontáneamente en muchos casos y es una de las más utilizadas para henificar. Posee un sistema radical rizoma-cespitoso con tallos geniculados (primero tendido y luego levantado verticalmente) y erguidos. Se adapta a diferentes zonas del trópico y a la mayoría de los suelos de texturas variadas y que van desde pH de 5,5 de acidez hasta alcalinos (Jaramillo y Jiménez, 1988). No es exigente en

fertilidad, aunque a menudo se encuentra creciendo en los suelos fértiles. Es tolerante a condiciones desde secas a moderadamente húmedas, pudiendo persistir donde existe una temporada de 6-8 meses secos o en zonas con lluvias anuales de 700-1,400 mm concentradas en verano y a alturas desde 300 hasta 2.600 msnm. Crece en tierras de pastoreo, bordes de caminos, campos en barbecho, prados enmalezados, dunas y desiertos abiertos (Skerman y Riveros, 1990).

A pesar de poseer una baja concentración de PB que suele fluctuar desde 2.60 hasta 10.40 % y digestibilidad de 28 a 47 %, es fácilmente consumido por pequeños y grandes rumiantes (Cook *et al.*, 2005). En Pakistán encontraron en *Dichanthium annulatum* valores de PB de 6.4 y 4.3 % y de digestibilidad de 51.4 y 39.5 % al cosecharse al inicio de la floración y a una etapa madura, respectivamente (Sultan *et al.*, 2008). Si se le da un manejo adecuado puede mejorar su rendimiento, tal como mostraron Cuesta-Muñoz *et al.* (1997) en Colombia, al renovar pasturas de pajón (*Dichanthium annulatum*) altamente degradadas por compactación del suelo e invadidas por malezas gramalote (*P. fasciculatum*) y yerba amarga (*Panicum laxum*). Lograron aumentar las proporciones pasto pajón/maleza gramalote de 30:70 a 77:23 en cuatro meses y la producción del PP de 1.3-1.4 a 2.07 t/ha por efecto de la renovación. En trabajos para evaluar la producción de carne por novillos cebú comerciales de 220-240 kg de peso vivo en praderas de PP, Latorre *et al.* (2000) (referido por Cuesta-Muñoz *et al.*, 1997) obtuvieron ganancias diarias de peso de 0.622 y 0.463 kg durante tres meses al comparar dos manejos: rotacional y continuo de pastoreo, respectivamente. Sin embargo, no ha sido posible encontrar literatura sobre estudios realizados con la aplicación de aditivos a este pasto para mejorar su calidad, siendo dicho aspecto el tratado en esta investigación.

2.4 Aditivos

Un aditivo se define como cualquier sustancia que, independientemente de su valor nutricional, se añade intencionadamente a un alimento con fines tecnológicos y en cantidades controladas, según el *Codex alimentarius* (Ibáñez *et al.*, 2003). Su uso está reglamentado para asegurar eficiencia y seguridad a la especie animal en cuestión, a los consumidores y al medio ambiente (Carro *et al.*, 2006). Para tales fines el Parlamento de la Unión Europea (UE) clasificó los aditivos en cinco grupos que son: tecnológicos, organolépticos, zootécnicos, nutricionales y coccidiostatos.

1. Tecnológicos: Estos incluyen conservantes, espesantes, emulgentes, ligantes, anticoagulantes, reguladores de acidez y aditivos para ensilajes.
2. Organolépticos: sustancias que modifican las características sensoriales perceptibles de los alimentos como colorantes, saborizantes y aromatizantes.
3. Zootécnicos: cualquier aditivo utilizado para influir positivamente en la productividad de animales sanos o en la protección del medio ambiente. Aquí se incluyen digestivos, estabilizadores de la flora ruminal y sustancias que influyan positivamente al medio ambiente.
4. Nutricionales: abarca vitaminas, provitaminas y sustancias químicamente definidas de efecto análogo; oligoelementos o compuestos de éstos, aminoácidos, sus sales y análogos y la urea y sus derivados.
5. Coccidiostatos e histomonostáticos.

2.4.1 Preparados enzimáticos

Los preparados enzimáticos son aditivos zootécnicos usados en la alimentación de los rumiantes. La mayoría de los mismos, comercialmente distribuidos, proceden de cuatro especies bacterianas (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus faecium*) y tres fúngicas (*Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* y *Saccharomyces cerevisiae*) (McAllister *et al.*, 2001). Los aditivos enzimáticos comerciales más usados poseen capacidad variable para degradar las paredes celulares vegetales y se clasifican principalmente como celulasas o xilanasas, aunque también suelen presentar actividades enzimáticas secundarias de tipo amilasa, proteasa o pectinasa.

Los trabajos realizados durante años han logrado avances genéticos y agronómicos que han mejorado significativamente la digestibilidad de la pared celular de los forrajes. Aun así, este problema continúa siendo una limitante importante en el consumo y la disponibilidad de energía dietética del forraje en los rumiantes (Beauchemin *et al.*, 2003). Por esta razón se sigue estudiando la aplicación de enzimas fibrolíticas al heno de gramíneas tropicales (Wallace *et al.*, 2001; Morgavi *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 1998). Sin embargo, no todos los estudios logran las mejoras esperadas, sino que las respuestas han sido variables de acuerdo a las condiciones del experimento y el producto base de la enzima (Officer DI., 2000), o por la cepa microbiana seleccionada y el sustrato utilizado para su producción (Coughlan, 1989; Lee *et al.*, 1998).

Tous-Rivera *et al.* (2010) estudiaron el efecto de aplicar en forma rociada, dos enzimas comerciales Promote^{NET} (Agribrand, Canadá) y Biocellulase^{A-20} (Loders Crocklaan, Channahon, IL, USA), derivados de *Trichoderma longibratum* y *Aspergillus reesei*,

aportadoras principalmente de celulasas y xilanasas, a henos de gramíneas tropicales de ocho semanas de rebrote y encontraron mejoras sustanciales en la calidad nutritiva. Pinos-Rodríguez *et al.* (2002) usaron ovejas canuladas para estudiar una enzima fibrolítica exógena aplicada a heno de gramíneas o leguminosas y observaron que la enzima puede cambiar la fermentación ruminal, el consumo y la digestibilidad de acuerdo al valor nutritivo del forraje. Krueger *et al.* (2008) aplicaron un cóctel multienzimático a hierba bermuda madura lo que redujo la fase de latencia y mejoró la eficiencia de la fermentación ruminal y aceleró el flujo saliente del rumen, pero no afectó la digestión de la MS. Giraldo *et al.* (2008) probaron que una enzima exógena de actividad xilanasas y otra de actividad endoglucanasa añadidas directamente al rumen de ovinos fistulados puede incrementar la actividad fibrolítica y estimular el crecimiento de las bacterias celulolíticas, pero sin interacción entre ellas. López-Soto *et al.* (2006) verificaron que una enzima fibrolítica que investigaron actuó en forma sinérgica con el proceso de maceración, resultando en una mejora del valor nutricional de forrajes de baja calidad.

En cambio, Szasz *et al.* (2002) no encontraron un efecto beneficioso en el consumo y la digestibilidad en el ganado de carne cuando adicionaron a la paja de semilla de bluegrass (alta en fibra) Fibrozyme® (Alltech, Inc.). Alegadamente esta posee actividad celulasas y xilanasas. Peters *et al.* (2010) tampoco observaron efectos sobre la concentración de nitrógeno microbiano, la digestibilidad aparente de las fracciones de MS, MO, FDN y FDA, ni en la producción o composición de la leche en vacas lecheras cuando añadieron una enzima fibrolítica con actividad celulasas y xilanasas a una ración total.

2.4.1.1 Dyadic[®] Cellulase PLUS

Esta preparación enzimática es producida por la fermentación de microorganismos no modificados genéticamente de *Trichoderma longibrachiatum* (anteriormente *Trichoderma reesei*). Es un líquido ácido de enzima celulasa concentrada y su manejo no es peligroso. Este producto ya se usa mundialmente como coadyuvante en la elaboración de alimentos, en las panaderías, la separación del almidón del gluten de trigo, fermentación del alcohol y alimentación animal. Posee alta actividad de celulasa y β 1,3-1,4 glucanasa. Es capaz de romper los polisacáridos no amiláceos y disminuir la viscosidad de las sustancias presentes en la pared celular vegetal, tales como la celulosa y β -glucanos, de los pastos y forrajes y mejorar sus índices de calidad (Jundzil, 2009).

Víquez y Bonilla (2002) midieron el efecto de la adición de tres concentraciones de una celulasa y una pectinasa comercial sobre la digestibilidad *in vitro* de la MO de dos variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y obtuvieron aumentos de la digestibilidad en 5.7 %; 9.2 % y 12.0 % ($p < 0.05$) en una variedad de frijol, mientras que en la otra el aumento fue menos de un 5.0 % ($p < 0.05$) para las tres concentraciones. No encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la aceptación general de los frijoles tratados y sin tratar con la enzima.

2.4.2 Urea

Es un aditivo del tipo nutricional y fuente de nitrógeno no proteínico (NNP) para el consumo animal. El producto comercial granular tiene una pureza de 98.5 % y mínimos

contenidos de humedad y cenizas. El contenido en N es de 45 % (equivalente a 280 % de PB). La urea es una de las fuentes de NNP más utilizada en condiciones prácticas para la alimentación de los rumiantes. Se usa con mayor eficiencia con piensos ricos en hidratos de carbono fácilmente digestibles y deficientes en proteína ruminalmente degradable. Niveles altos de inclusión de urea reducen la palatabilidad de la ración. Un exceso de consumo (más de 200 g/d en vacas de 500 kg, ó más del 1 % de la MS ingerida ó más del 25 % del N total de la dieta) puede provocar toxicidad por excesiva liberación en el rumen de NH_3 y su absorción en la sangre (Blas *et al.*, 2007).

Cuando el rumiante consume urea ésta se hidroliza formando amoníaco y anhídrido carbónico en el rumen mediante la acción de la enzima ureasa que es producida por ciertas bacterias. El amoníaco liberado en el rumen se combina con los cetoácidos para formar aminoácidos, que a su vez se incorporan en la proteína microbiana. Por sí solo, el amoníaco no posee ningún valor nutritivo, sino que para nutrir al animal necesita ser transformado en proteína microbiana y ésta digerida y absorbida en el intestino. El NH_3 en exceso es absorbido del rumen y eliminado a través de su conversión en urea en el hígado, luego su paso a los riñones y finalmente su excreción en la orina. De la urea presente en la sangre una porción regresa al rumen a través de la saliva, también ocurre difusión de NH_3 de la sangre al rumen en dependencia del gradiente de concentración (Carreño *et al.*, 2010).

El suministro de urea, como fuente de NNP a diversos rumiantes domésticos (bovinos, búfalos, ovejas, cabras), es bien aceptado por productores y técnicos como modo positivo de promover la producción animal (Botero y Preston, 2007). La urea puede mejorar la tasa de digestión de la fibra y el pasaje del alimento a través del tracto digestivo (Araque,

2009). Las primeras experiencias con el uso de la urea como fuente de NNP para los rumiantes datan del siglo XIX. Investigación más recientes ha demostrado que la urea a niveles bajos ofrecida en combinación con melaza y forraje de caña de azúcar no afecta el CV (Silvestre *et al.*, 1977) y que promueve buen rendimiento animal cuando se usa combinada con melaza y una fuente de proteína sobrepasante (Preston y Willis, 1974). Souza y Dos Santo (2006) estudiaron la inclusión de un 6 vs. 4 % de urea en una ración basada en paja de cebada, encontrando que la mayor proporción de urea afectó el nitrógeno retenido y mejoró la digestibilidad de la MO y de la PB, mientras que el porcentaje menor solo tuvo tendencia (no significativa estadísticamente) a mejorar el valor nutritivo del material.

Krueger *et al.* (2008) compararon como aditivos el amoníaco y una enzima fibrolítica sin encontrar diferencias en el rendimiento del ganado. También concluyeron que el tratamiento enzimático sobre pasto bermuda al momento del corte resultó más efectivo que la aplicación al henificar o al suplirlo a los animales. Con miras a mejorar la utilización de la fibra Almodóvar *et al.* (2008) y Rodríguez *et al.* (2007) rociaron urea en forma líquida al pasto para henificar al momento del corte y al heno 24 horas antes de ser ofrecido a ovejas y obtuvieron aumentos en los niveles de N del heno, pero sin afectar las fracciones FDN y FDA.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Composición química, consumo voluntario y digestibilidad del HPP tratado o no tratado con un aditivo enzimático o uno nitrogenado

Este estudio se realizó en la Subestación Experimental Agrícola de Corozal del Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto, cuyas condiciones climáticas se describen en el Apéndice. Se utilizó heno de pasto pajón (HPP) (*Dichanthium annulatum*), de más de 24 semanas de edad, adquirido en la finca privada Altamira, en el municipio de Cabo Rojo. Se trató el heno con dos aditivos uno enzimático del tipo zootécnico y otro nitrogenado del tipo nutricional. La preparación enzimática comercial fue Dyadic® Cellulase PLUS (ENZ) (con actividad celulasa micótica proveniente de *Trichoderma reesei*), mientras que la fuente de nitrógeno fue urea líquida (ULI) procedente de la industria farmacéutica local (Tabla 1).

Los tres tratamientos evaluados fueron: un control (CON; HPP sin aditivo), HPP con ENZ o con ULI. Luego de reducir el tamaño de partícula del heno (aproximadamente a 7 cm) con una troceadora comercial (Briggs & Statton), para minimizar la selectividad en el consumo, cada día ambos aditivos fueron rociados sobre el HPP utilizando una bomba asperjadora y almacenados en bolsas plásticas por 24 horas (Figura 1). La dosis se seleccionó de acuerdo al nivel que ha sido efectivo en estudios previos Romero *et al.*, (2011) con pasto bermuda *in vitro* para la ENZ y Rodríguez *et al.* (2007) con ULI en ovinos. La ENZ se aplicó a razón de 2.33 g/kg de MS del heno, mientras que la inclusión de ULI fue equivalente a 4 % del peso del heno a ofrecer en BS. Ambos aditivos se diluyeron 1 : 10 en agua destilada para

su aplicación (Romero *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2007). Los henos se ofrecieron, diariamente, a una hora fija en la mañana a razón de 4 % del peso vivo (PV) animal. Se ubicaron nueve carneros (Dorper x St. Croix White) de 32.0 ± 10 kg, en jaulas metabólicas con comedero y bebedero individual, además de colectores de heces (Figura 2). Los carneros se examinaron semanalmente para síntomas de anemia según el método FAMACHA (De León y Choque-López, 2010), pero no hubo evidencia de estos síntomas, por tanto no se aplicó antihelmíntico.

Tabla 1. Descripción de los aditivos enzimático y nitrogenado evaluados

| Aditivos ¹ | Enzima fibrolítica | Urea líquida |
|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| Nombre comercial | Dyadic [®] Cellulase PLUS | Urea |
| Fuente (microorganismos) | <i>Trichoderma reesei</i> | Farmacéutica |
| Ingrediente activo | Celulasa | Nitrógeno no proteico |
| Enzimas activas | Celulasa, β -glucanasa | - |
| Razón de aplicación recomendada | 2.33 g/kg MS | 4 % MS consumida |
| pH óptimo | 4.5 \pm 0.5 | |
| Temperatura óptima | 40 – 57 °C | |
| Actividad enzimática celulasa | 30,000 – 36,000UI/g | |

¹información suministrada por fabricante



Figura 1. HPP picado, tratado y empacado, diariamente, 24 horas antes de ser ofrecido



Figura 2. Jaulas metabólicas con carneros mestizos Dorper x St. Croix White usados en el estudio

3.1.1 *Diseño experimental*

Se utilizó un diseño en cuadrado latino generalizado (filas y columnas), en el que se dispuso de tres tratamientos, tres períodos y nueve unidades experimentales (Tabla 2). La unidad experimental fue un carnero entero de 32 kg PV en promedio y su asignación a una columna (correspondiente a una de tres secuencias de los tratamientos) fue aleatorizada.

El experimento tuvo una duración de 42 días, entre los meses junio-julio 2011, con tres períodos de 14 días, dividido cada uno, en una etapa de adaptación previa de siete días, un período de cinco días de recolección de datos comparativos y dos días de descanso.

Tabla 2. Distribución de las unidades experimentales y el arreglo de los tratamientos en los tres períodos experimentales

| Unidades experimentales | |
|-------------------------|--------------------|
| Períodos | 1 2 3 4 5 6 7 8 9 |
| 1 | A* B C A B C A B C |
| 2 | B C A B C A B C A |
| 3 | C A B C A B C A B |

* Las letras corresponden a los tratamientos

A: CON; B: ENZ; C: ULI

3.1.2 Recolección de datos

Los carneros se pesaron al comienzo y final de cada período experimental para ajustar el alimento ofrecido. Diariamente se cuantificó y se tomó muestras tanto del forraje ofrecido como del rechazado por cada animal (Figura 3), así como de las heces fecales totales (Figura 4). Muestras de cada tipo se pesaron y se colocaron en un horno a temperatura controlada para determinar su contenido de MS. Luego de combinar las muestras diarias por animal en muestras compuestas éstas se molieron a través de un cedazo de 1 mm de porosidad y se almacenaron a temperatura ambiente. Más tarde se enviaron a Dairy One Lab (Ithaca, NY) para determinar su contenido de MS, PB, MI, FDN, FDA y lignina, según la metodología estándar de AOAC (1996) y la de Van Soest *et al.* (1991). Se determinó el CV de MS y de varias de las otras fracciones citadas mediante el cálculo de lo ofrecido menos lo rechazado, según las respectivas concentraciones dietéticas. Tomando como base las concentraciones fecales de las fracciones analizadas y la cantidad de excreción fecal, se obtuvo la digestibilidad aparente *in vivo* de MS, PB, FDN y FDA (Van Soest *et al.*, 1991) por el cálculo:

$$\frac{\text{Nutriente ingerido} - \text{Nutriente en heces}}{\text{Nutriente ingerido}} \times 100$$



Figura 3. Muestras del heno ofrecido y rechazado tomadas diariamente por cada animal



Figura 4. Cantidad total diaria de heces procedente de un animal durante el proceso de recolección de datos

3.1.3 Análisis estadísticos

Para analizar el cambio en la composición química del heno por efecto de la adición del producto enzimático y del nitrogenado, se aplicó un análisis de varianza (Infostat, 2008) de acuerdo a un diseño completamente al azar con nueve repeticiones por tratamiento. El

modelo estadístico utilizado fue: $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$

Donde,

Y_{ij} = composición química obtenida en cada fracción del HPP

μ = media estimada de la composición química

α_i = efecto de los tratamientos sobre HPP, i

ε = error aleatorio asociado a la respuesta de ij

Los datos de consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes se sometieron a un análisis de varianza utilizando un modelo general lineal de Infostat (2008), según el modelo estadístico siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijk}$$

Donde,

Y_{ijk} = observación del i -ésimo tratamiento del período j del animal k

μ = media estimada

α_i = efecto de tratamiento, i

β_j = efecto del período experimental, j

γ_k = efecto del animal, k

ε_{ijk} = error aleatorio asociado a la respuesta de ijk

En casos de diferencias significativas, la separación de medias fue mediante la prueba de Tuckey, estableciendo un valor de significancia a $p < 0.05$ y $p < 0.10$ para detectar tendencias.

3.2 Digestibilidad *in situ* del HPP a diferentes grados de madurez tratados con una enzima fibrolítica (Dyadic® Cellulase PLUS)

Este experimento se realizó en la vaquería de la Subestación Experimental de Lajas de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, en julio/2012. Se utilizó la técnica *in situ* de suspensión de muestras dentro de bolsas de dacrón en el rumen, descrita por Ørskov *et al.* (1980), usando una vaca adulta provista de fístula ruminal (10 cm de diámetro). Esta se alimentó *ad libitum*, con heno de pasto pajón y tuvo acceso a agua limpia a libertad, durante todo el experimento. El HPP evaluado fue de diferentes estados de madurez, incluyendo un heno comercial (alegadamente de ocho semanas de rebrote, según datos suplidos por la finca proveedora) y henos de 12 y 24 semanas de rebrote (cosechados en la Subestación Experimental de Lajas). La enzima (Dyadic® Cellulase PLUS) fue la misma usada en el primer ensayo. Los henos se rociaron con la misma a la dosis recomendada (2.33 g/kg de MS), 24 horas antes de ser secados y pasados por un molino (Willey) con un tamiz de 2 mm de porosidad. Se usaron bolsas de dacrón (Ankom), tamaño 10 x 20 cm y porosidad 50 μm , de peso tara conocido en que se colocó 5. g de materia vegetal/bolsa. Las bolsas, una vez llenas, se cerraron herméticamente y se ataron con hilo de nylon a tres cadenas de acero inoxidable (Figura 5) en grupos de diez para introducirlas en el

rumen de la vaca. Los grupos de bolsas representaron la madurez del HPP y las bolsas individuales los tiempos de incubación en el rumen. Las bolsas se retiraron escalonadamente después de 3, 6, 12, 24 y 48 horas de incubación (Figura 6). Se tomaron como representativas del tiempo cero bolsas sin entrar al rumen. Tanto las bolsas de tiempo cero, como las retiradas del rumen, en función del tiempo, se lavaron debajo de un flujo de agua de tubería hasta que el efluente quedó completamente claro. Las bolsas lavadas se secaron en un horno de aire forzado a 65 °C por 48 horas. Se procedió a pesar la bolsa con el residuo, luego se vertió el contenido en una bolsa plástica (Figura 7) y se pesó nuevamente la bolsa de dacrón sola. Por diferencia se obtuvo el peso de la MS residual (peso residuo y bolsa – peso de la bolsa vacía = peso de la MS residual). La materia vegetal residual fue enviada al Dairy One Lab., Ithaca, NY, para determinación de las fracciones químicas MS, FDN y FDA.



Figura 5. Material ajustado a las cadenas listo para ser introducido en el rumen



Figura 6. Procedimiento de retiro de las bolsas de acuerdo al tiempo de incubación planificado



Figura 7. Materia seca residual lista para ser enviada al Dairy One Lab.

3.2.1 Diseño experimental y análisis estadístico

Se usó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 3 x 6: tres (estados de madurez del HPP) x seis (tiempos de incubación en el rumen). Los datos de desaparición de MS, FDN y FDA se sometieron a análisis de varianza, comparándose las medias por el método de Tukey (Infostat, 2008) y tomando $p < 0.05$ como valor de significancia y $p < 0.10$ como indicativo de tendencia.

El modelo estadístico que se utilizó fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde,

Y_{ijk} = observación del i -ésimo nivel de madurez en el j -ésimo tiempo de retención

μ = media estimada

α_i = efecto de madurez, i

β_j = efecto del tiempo de retención, j

$\alpha\beta_{ij}$ = efecto de la interacción, ij

ε_{ijk} = error aleatorio asociado a la respuesta de ijk

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Composición química, Consumo voluntario y Digestibilidad

4.1.1 Composición química

La composición química del heno de pasto pajón (24 semanas de rebrote) utilizado en este estudio (vea tratamiento control en Tabla 3), mostró valores típicos de gramíneas tropicales (Combellas *et al.*, 1971) henificadas a edad avanzada. Esto lo manifiesta la baja concentración de PB y los altos contenidos de las fracciones en la pared celular (FDN, FDA, hemicelulosa y lignina).

Tabla 3. Composición química de heno de pasto pajón con o sin aditivo enzimático o nitrogenado

| Componente | Tratamientos % | | | |
|---------------------------------|----------------|-----------------------|--------------|------------------|
| | Control | Celulasa ¹ | Urea líquida | EEM ² |
| Materia Seca | 91.99 | 92.03 | 92.26 | 0.10 |
| Materia Orgánica ^{3,4} | 92.55 | 92.40 | 92.52 | 0.08 |
| Materia Inorgánica ⁴ | 7.45 | 7.60 | 7.48 | 0.08 |
| Proteína Bruta ⁴ | 6.41b | 6.22b | 8.11a | 0.06 |
| FDN ⁴ | 74.27 | 73.91 | 73.00 | 0.41 |
| FDA ⁴ | 42.87 | 44.37 | 43.17 | 0.47 |
| Hemicelulosa ^{4,5} | 31.40 | 29.54 | 29.83 | 0.61 |
| Lignina ⁴ | 5.89 | 5.76 | 6.30 | 0.19 |

¹Dyadic® Cellulase PLUS; ²Error estándar de la media (nueve observaciones);

³100 – materia inorgánica; ⁴Datos en base seca; ⁵Diferencia entre FDN-FDA

^{ab}Medias con letras iguales en la misma línea no difieren significativamente a $p < 0.05$

Los valores de la composición química 24 horas después de aplicar ENZ o ULI al HPP, también aparecen en la Tabla 3. El contenido de MS del material vegetal no resultó afectado significativamente ($p < 0.14$) por la aplicación de los aditivos. Los porcentajes de MO y MI también mostraron sólo cambios ligeros, sin existir diferencias significativas entre los tratamientos. En cambio, la concentración de PB aumentó ($p < 0.01$) por 1.70 y 1.89 unidades de por ciento cuando se roció el HPP con ULI sobre los valores de los tratamientos CON y ENZ. La diferencia de ENZ de 0.19 unidad de por ciento relativo al CON, no fue significativa. La proporción de FDN decreció por 0.91 unidad de por ciento con la aplicación de ULI comparada con la ENZ y por 1.27 unidad frente al CON, mientras que la diferencia entre estos dos últimos fue de sólo 0.36 unidad. En cambio, el contenido de FDA fue menor para CON y se verificó una tendencia ($p < 0.09$) a aumentar esta fracción al aplicar los aditivos, siendo la magnitud del aumento de 1.50 y 0.30 unidades de por ciento para ENZ y ULI, respectivamente. Dado el método de su cálculo, la hemicelulosa tiende a variar directamente con la FDN e inversamente con la FDA, siendo en este caso mayor para CON por márgenes de 1.86 y 1.57 unidades de por ciento relativo a ENZ y ULI, respectivamente ($p < 0.10$). El contenido de lignina del HPP no fue diferente entre los tratamientos.

Estos resultados son compatibles con los de Kung *et al.* (2000) que no hallaron diferencias en las fracciones de FDN, FDA y hemicelulosa del forraje (ensilaje de maíz y heno de alfalfa) rociado con dos niveles de enzimas celulasas y xilanasas combinadas, antes de mezclarlas con un concentrado para formar una ración completa. Dean *et al.* (2005) encontraron que el contenido de PB, en el heno de pasto guinea (*Panicum maximum*) y el ensilaje de pasto bermuda (*Cynodon dactylon*) no fue afectado por la aplicación de enzimas

fibrolíticas, pero los contenidos de FDN y FDA se redujeron al rociar los forrajes con la enzima Promote. Tous-Rivera *et al.* (2010) observaron aumento significativo en la proporción de MS y PB al adicionar las enzimas Promote o Biocelulase al heno de pasto guinea (*Panicum maximum*), pero los menores valores observados de FDN (70.04 vs. 69.96 y 69.29 %), FDA (56.26 vs. 55.44 y 54.40 %) y hemicelulosa (14.90 vs. 14.85 y 13.69 %) relativo al control no fueron significativos.

Con relación a ULI, Souza y Dos Santos (2002) reportaron la misma tendencia ascendiente que la observada en el presente estudio con relación a la PB, al aplicar 4 ó 6 % de urea sobre paja de cebada usada para alimentar ovinos. Wanapat *et al.* (2000), rociaron paja de arroz con urea y lo compararon con la caña de azúcar para alimentar ganado lechero. Ellos también obtuvieron aumentos en el contenido de PB (8.5 vs. 7.1 %) con la adición de NNP, coincidiendo con los resultados presentes referente al efecto positivo de la urea sobre esta fracción.

4.1.2 Consumo Voluntario

Los resultados de CV del HPP ofrecido 24 horas después de ser rociado o no con una enzima fibrolítica o ULI se muestran en Tabla 4. La aplicación de ULI tendió a aumentar ($p < 0.06$) el CV de la MS del HPP. Los carneros consumieron 90 y 41 g más de MS al compararse con la ENZ y CON, respectivamente. El tratamiento del material vegetal con la ENZ resultó en 49 g menos CV frente al CON. La PB fue la fracción más afectada por la aplicación de ULI al resultar en aumentos ($p < 0.01$) de CV de 25 g sobre la ENZ y 20 g sobre CON. La diferencia de 5 g entre estos últimos tratamientos no fue significativa. La tendencia

a aumentar el consumo de MS con la aplicación de ULI (Tabla 4) podría explicarse en que cuando la cantidad de proteína requerida para la síntesis microbial, en ovinos, es inadecuada, el consumo de MS se afecta proporcionalmente a la disponibilidad de proteína degradable en el rumen (Ruralticnova, 2011). No obstante, la aplicación de ULI sólo resultó en pequeños aumentos en el consumo de las fracciones fibrosas (FND, FDA) sobre CON, mientras dio un aumento de 51 g de FDN sobre ENZ, pero esta diferencia no fue significativa ($p>0.15$).

Tabla 4. Consumo voluntario diario de heno de pasto pajón por ovejos estabulados con o sin un aditivo enzimático o nitrogenado

| Componente | Control | Celulasa ¹ | Urea líquida | EEM ² |
|---------------------------------------|---------|-----------------------|--------------|------------------|
| Consumo Voluntario (g/d) ⁴ | | | | |
| Alimento ofrecido | | | | |
| MS | 1217 | 1154 | 1208 | 32.12 |
| PB ³ | 78a | 72a | 98b | 2.23 |
| FDN ³ | 904 | 855 | 881 | 24.90 |
| FDA ³ | 520 | 515 | 522 | 17.11 |
| Alimento rechazado | | | | |
| MS | 231 | 217 | 181 | 17.98 |
| PB | 11 | 10 | 11 | 1.05 |
| FDN | 171 | 161 | 137 | 13.28 |
| FDA | 104 | 99 | 91 | 8.95 |
| Consumo voluntario | | | | |
| MS | 986 | 937 | 1027 | 24.36 |
| PB | 67a | 62a | 87b | 1.97 |
| FDN | 733 | 693 | 744 | 19.99 |
| FDA | 416 | 415 | 431 | 12.80 |

¹Dyadic® Cellulase PLUS; ²Error estándar de la media (nueve observaciones); ³Datos en base seca; ⁴gramos x día; ab= letras iguales en la misma fila no difieren estadísticamente $p<0.05$

Los resultados presentes referentes al tratamiento ENZ están de acuerdo con la experiencia de Lewis *et al.* (1996) de no obtener un efecto positivo en el CV de MS al aplicar una enzima con actividad de celulasa y xilanasas bien sea directamente en el rumen o rociada sobre una mezcla de heno y paja de cebada a 0 ó 24 horas antes de ser ofrecido. Las investigaciones de Szasz *et al.* (2002), Yang *et al.* (2000), Kung *et al.* (2000) y Sutton *et al.* (2003), tampoco revelaron un efecto en el consumo de MS y otras fracciones cuando se añadió una enzima fibrolítica a un alimento concentrado o a una ración mixta completa. Por el contrario Ware *et al.* (2005), Krueger *et al.* (2008) reportaron resultados positivos al utilizar enzimas fibrolíticas. Por ejemplo Krueger *et al.* (2008), encontraron aumento en el CV de MS, PB y FDN con la aplicación de enzimas exógenas al heno de pasto bahía (*Paspalum notatum*) al momento de henilar. Un efecto positivo sobre el CV con la suplementación enzimática podría atribuirse a una mayor tasa de pasaje de sólidos (Feng *et al.*, 1996) o a una más rápida digestión de la fibra en el rumen (Bowman *et al.*, 2002).

En lo concerniente al tratamiento con urea, Rojo *et al.* (2000), Ruiz *et al.* (2006), Zapata *et al.* (2004) también observaron aumento en el CV de la PB al aplicar urea u otros compuestos de NNP a dietas fibrosas. Igualmente, Shultz *et al.* (1974) encontraron aumento del consumo de PB, pero no de la MS del heno de pasto pangola (*Digitaria eriantha*) tratado con urea. Estos autores sugieren que un posible efecto de la adición de la urea sobre el CV podría deberse a un incremento de la masa microbiana que promueve una rápida degradación de los sustratos fibrosos, aumentando la tasa de pasaje y, por ende, el consumo. Ayala *et al.* (1994) no encontraron efecto de la urea, combinada con melaza, sobre el consumo voluntario de las fracciones nutricionales de paja de cártamo.

Al expresar el consumo de MS como porcentaje del PV no se observó diferencias entre los tratamientos (Figura 8). Yang *et al.* (1999) obtuvieron resultados similares a los presentes en vacas lactantes consumiendo forraje tratado con Promote (celulasa y xilanas combinadas). En cambio, Tous-Rivera *et al.* (2010) y Krueger *et al.* (2008) observaron aumento en este índice de consumo al aplicar una enzima fibrolítica al forraje 24 horas antes de ofrecerlo a los animales o antes de empacarlo como henilaje, respectivamente.

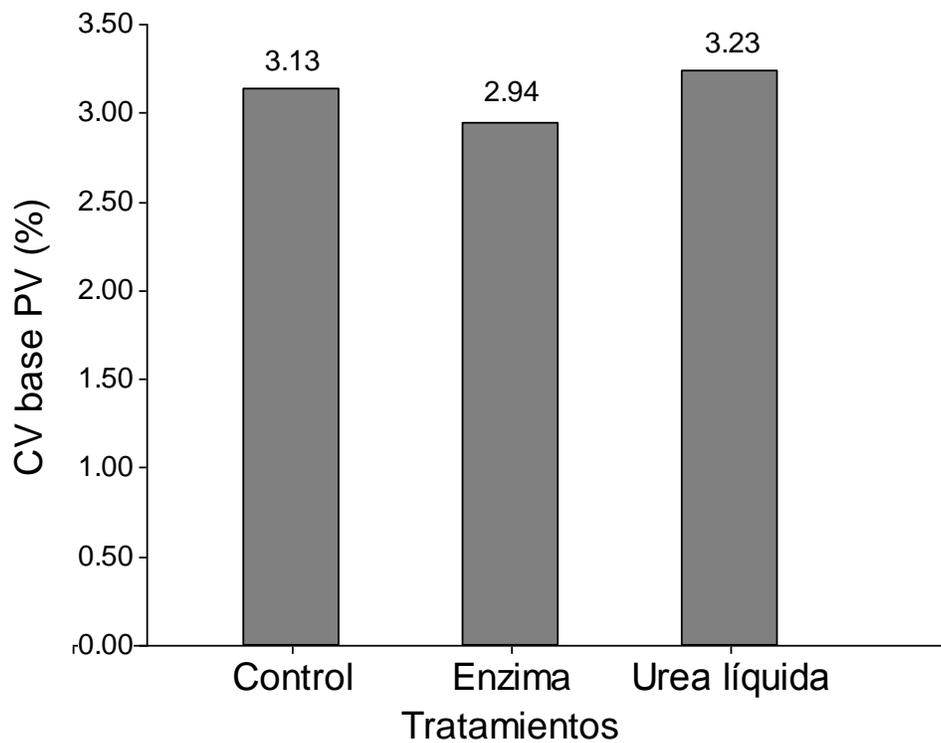


Figura 8. Consumo voluntario de MS diario, como porcentaje del PV, de heno de pasto pajón con o sin un aditivo enzimático o nitrogenado

4.1.3 Digestibilidad *in vivo*

En la Tabla 5 se presentan los valores de digestibilidad del HPP tratado o no con Dyadic® Cellulase PLUS o urea líquida. No hubo diferencias significativas entre tratamientos en lo que atañe a la digestibilidad de la MS, sino una leve superioridad de CON. En cuanto a la digestibilidad de PB, a pesar de una diferencia numérica sustancial a favor de ULI (8.64 y 7.13 puntos de porcentaje) sobre ENZ y CON, no hubo diferencias significativas, pero sí se verificó una tendencia ($p < 0.10$) a tales efectos. La diferencia entre CON y ENZ fue sólo de 1.51 puntos de porcentaje. En relación a la digestibilidad de las fracciones fibrosas (FDN y FDA) ocurrió lo contrario al registrar el tratamiento ULI los menores valores, sobretodo en el caso de FDA, pero la alta variabilidad evitó que hubiera diferencias significativas. El tratamiento ENZ no dio evidencia de efectividad relativo al control.

Tabla 5. Digestibilidad aparente del heno de pasto pajón con o sin un aditivo enzimático o nitrogenado

| Fracción | Control | Celulasa ¹ | Urea líquida | EEM ² |
|-----------------------------|---------|-----------------------|--------------|------------------|
| Materia Seca | 67.78 | 66.12 | 65.01 | 1.66 |
| Proteína Bruta ³ | 53.98 | 52.47 | 61.11 | 2.63 |
| FDN ³ | 73.66 | 72.00 | 70.09 | 1.48 |
| FDA ³ | 65.08 | 66.83 | 60.70 | 2.06 |

¹Dyadic®Cellulase PLUS; ²Error estándar de la media (nueve observaciones); ³ Datos en base seca

Referente a esta última observación Szasz *et al.* (2002) tampoco encontraron efectividad de una enzima con actividad de xilanasas y celulasas aplicada a la paja de semilla de bluegrass (*Poa spp.*) en la digestibilidad de la MS, FDN o FDA. Igualmente, Ruiz *et al.* (2006), Leatherwood *et al.* (1960) y Burroughs *et al.* (1960) observaron que la

suplementación con una enzima celulolítica no tuvo efecto en la digestibilidad de varias fracciones químicas de la ración. Krueger *et al.* (2008) estudiaron la aplicación de amonio o una enzima fibrolítica sobre pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*) con cinco semanas de rebrote y obtuvieron un aumento en la digestibilidad de PB que atribuyeron al mayor aporte de nitrógeno procedente de los aditivos. También encontraron un efecto de los tratamientos sobre la digestibilidad de la MS y las fracciones fibrosas.

En contraste con el estudio presente, Tous-Rivera *et al.* (2010), obtuvieron aumento significativo en la digestibilidad de MS, PB, FDN y FDA al usar enzimas fibrolíticas para tratar el pasto guinea (*Panicum maximun*) de ocho semanas de rebrote. Ellos sugieren que este resultado pudo ser debido al espectro de enzimas presentes que promovió la efectividad microbiana en el rumen. Romero *et al.* (2011) lograron aumentos significativos de la digestibilidad *in vitro* de MS y FDN del heno de Tifton 85 (*Cynodon dactylon*) con 4 semanas de rebrote, mediante el uso de Dyadic[®]Cellulase PLUS. Sin embargo, en el presente trabajo *in vivo* aplicación de la misma enzima a HPP de avanzada madurez no confirmó semejante efecto. Hay que resumir que la mayoría de los datos que describen el efecto de las enzimas fibrolíticas no son concluyentes en escenarios donde las dietas o forrajes utilizados son de baja calidad nutricional o de avanzado estado de madurez (Sasz *et al.*, 2002). En tal sentido, varios hechos son pertinentes: la variabilidad que existen en la expresión de actividad enzimática; las diferentes formas y dosis de aplicación; y los diversos tipos de dieta utilizados, de tal modo que las discrepancias observadas no son sorprendentes. Además, esto pone de relieve la necesidad de precaución al comparar los diferentes estudios (Arriola *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2001). Al respecto, Beauchemin *et al.* (2003) plantean que las enzimas

comerciales celulasas pueden diferir sustancialmente y su proporción y actividad impactarían la eficacia en la degradación de la pared celular. Es notable que McAllister *et al.* (1999) informaron efecto favorable al usar una enzima con una dieta compuesta por cebada y ensilaje de ryegrass, mientras que ZoBell *et al.* (2000) no encontraron efecto al utilizar, aparentemente, la misma enzima, en una dieta para toros en finalización, con los mismos ingredientes.

Por tanto, el resultado negativo obtenido en el estudio presente con relación al uso de Dyadic[®] Cellulase PLUS podría deberse a varios factores: primero, a su estabilidad tanto en el HPP (durante y después del procesamiento) como en el rumen; segundo, a la capacidad de los componentes de la enzima para hidrolizar los polisacáridos de la pared celular de las plantas en avanzado estado de madurez y a la capacidad de los animales para utilizar los productos de dicha acción fibrolítica. Las gramíneas maduras se caracterizan por la presencia de una cutícula hidrófoba en la superficie y por la asociación de la lignina con los polisacáridos de la pared celular. Por su naturaleza la lignocelulosa impide que la enzima utilice la fibra en el rumen (Bhat, 2000).

Con relación al uso de urea y otras fuentes nitrogenadas no proteicas, los estudios realizados han sido consistentes en señalar el aporte positivo del NNP en la alimentación y al desempeño productivo animal siempre que se trate de corregir una deficiencia de N ruminal. Sin embargo, su efecto sobre la utilización de otras fracciones aparte de la proteína ha sido variable. Bae y Jung (1988) no obtuvieron efecto de la urea sobre la digestibilidad *in vitro* de los constituyentes de la pared celular, pero si sobre la de MS al probar tres niveles de adición de urea a paja de arroz. Ayala *et al.* (1994) observaron un efecto de la adición de 10 % urea

en una ración para ovinos compuesta de paja de cártamo y granos de sorgo en la digestibilidad de PB, pero no en la MS y FDN, aunque si observaron diferencias en digestibilidad *in vitro*, entre estas fracciones. Chicco *et al.* (1971) no observaron aumentos significativos de digestibilidad de MS, FDN y N al suplementar con biuret o urea a un forraje tropical (*Pennisetum purpureum*) cortado a la florecida a toretes, lo que contrasta con los resultados presentes en relación a N. Yulistiani *et al.* (2003) trabajaron con la adición de urea a paja de arroz ensilada para ovinos y concluyeron que aunque no hubo diferencias significativas, los datos obtenidos indican que probablemente, el hidróxido de amonio liberado por la urea causó algún rompimiento de los enlaces entre la lignina y los carbohidratos estructurales del sustrato base. Al tratarse de animales a pastoreo, Yalchi *et al.* (2010) y Shultz *et al.* (1974), no encontraron aumento en la digestibilidad de la PB, ni de la MS al suplementar con urea a ovinos que pastaron pasto pangola (*Digitaria eriantha*). A diferencia, Rojo *et al.* (2000) hallaron aumento en la digestibilidad ruminal de la FDA y FDN al ofrecer urea y un subproducto microbiano como parte de una dieta suplementaria a toretes en pastoreo, aunque es poco común ese efecto en FDA y particularmente cuando se trata de forrajes de mala calidad. Asimismo, Ruiz *et al.* (2006), reportaron que el uso de urea mejoró la digestibilidad de la pared celular de la cascarilla de avena, lo que atribuyeron probablemente, al crecimiento de microbios ruminales por la mayor presencia de nitrógeno soluble en el rumen.

4.2 Digestibilidad *in situ*

La digestibilidad *in situ* de la MS, FDN y FDA del HPP de tres edades de madurez y tratado con la enzima celulolítica, luego de seis duraciones de tiempo de incubación en el rumen, se muestra en la Tabla 6. La desaparición de MS del material sin entrar al rumen, pero que se lavó con agua, que representa el tiempo cero, no difirió ($p>0.05$) entre los tres henos. Durante las tres primeras horas de incubación, la degradación de la MS del heno comercial superó por 1.62 ($p<0.05$) y 4.47 unidades porcentuales al HPP de 12 y 24 semanas de edad, respectivamente. La diferencia en 2.85 unidades en la degradación de la MS entre los henos de 12 y 24 semanas no alcanzó significancia. A las 6 horas de incubación las correspondientes ventajas a favor del HPP comercial en desaparición de la MS fueron 4.40 y 2.09 puntos porcentuales con la misma relación de significancia que en el intervalo anterior. A las 12 horas de incubación no hubo diferencias significativas entre el HPP comercial y el heno de 12 semanas de edad y ambos superaron ($p<0.05$) al HPP de 24 semanas de edad, siendo las respectivas diferencias de 3.97 y 5.36 unidades porcentuales. A las 24 y 48 horas de incubación el HPP de 12 semanas de edad fue más degradable que HPP comercial y de 24 semanas de edad ($p<0.05$), siendo las respectivas diferencias de 4.19 y 8.04 (24 horas); 4.50 y 9.61 (48 horas) unidades porcentuales. Los márgenes de diferencia entre el HPP comercial y el HPP de 24 semanas de edad fueron de 3.85 y 5.11 unidades porcentuales a las 24 y 48 h, siendo significativa ($p<0.05$) en el segundo caso. Con relación a la digestibilidad *in situ* de FDN, a tres y seis horas de incubación no hubo diferencia significativa entre los estados de madurez. Luego de 12 horas en el rumen, la desaparición de FDN del HPP comercial y de 12 semanas de edad fue mayor por 5.38 ($p<0.05$) y 4.31 ($p>0.05$) unidades porcentuales al del

HPP de 24 semanas. A este intervalo al igual que a 24 y 48 horas de incubación las diferencias entre los dos primeros no resultaron significativas. Sin embargo, a 24 y 48 horas de incubación el HPP comercial y de 12 semanas de edad superaron ($p < 0.05$) por 8.21 y 5.52 (24 horas); 5.65 y 5.57 (48 horas) unidades al HPP de 24 semanas. La desaparición de FDA no difirió significativamente entre los tres HPP en los primeros cinco tiempos de incubación. Finalmente luego de 48 horas en el rumen la desaparición en el HPP de 12 semanas de edad fue mayor ($p < 0.05$) por márgenes de 3.88 y 6.36 puntos que en el HPP comercial y el de 24 semanas de edad respectivamente.

Tabla 6. Desaparición (%) de la MS, FDN y FDA del HPP en tres estados de madurez tratado con Dyadic[®] Cellulase PLUS a diferentes tiempos de incubación en el rumen

| Edad del heno | Tiempo de incubación en horas | | | | | | EEM ¹ |
|------------------------|-------------------------------|---------|---------|---------|--------|--------|------------------|
| | 0 | 3 | 6 | 12 | 24 | 48 | |
| MS | | | | | | | |
| Comercial ² | 7.93 | 21.86a | 24.64a | 31.03a | 42.65b | 52.49b | 0.73 |
| 12 Semanas | 7.38 | 20.24ab | 22.55ab | 32.42a | 46.84a | 56.99a | 0.73 |
| 24 Semanas | 6.94 | 17.39b | 20.24b | 27.06b | 38.80b | 47.38c | 0.73 |
| FDN³ | | | | | | | |
| Comercial | 6.14 | 16.21 | 20.21 | 26.50a | 35.42a | 43.54a | 0.87 |
| 12 Semanas | 5.22 | 16.68 | 18.74 | 25.43ab | 38.11a | 43.62a | 0.87 |
| 24 Semanas | 5.90 | 13.80 | 16.27 | 21.12b | 29.90b | 37.97b | 0.87 |
| FDA³ | | | | | | | |
| Comercial | 3.71 | 10.82 | 12.78 | 15.75 | 22.09 | 24.74b | 0.69 |
| 12 Semanas | 3.51 | 10.59 | 11.65 | 16.29 | 24.79 | 31.10a | 0.69 |
| 24 Semanas | 3.60 | 9.37 | 10.61 | 14.06 | 21.50 | 27.22b | 0.69 |

¹ Error estándar de la media (tres observaciones); ² 8 semanas; ³ Datos en base seca

^{ab} Medias con letras iguales en la misma columna no difieren significativamente a $p < 0.05$

Giraldo *et al.* (2008) utilizaron la enzima Fibrozyme con una dieta de 12.5 % de PB, compuesta 70:30 de heno de gramínea:alimento concentrado y encontraron mayor porcentaje de desaparición de MS a nivel ruminal a todos los tiempos de incubación, llegando, incluso, al valor máximo de 74.8 %. Igualmente la desaparición de FDN de 59.30 % superó a lo obtenido con el HPP del trabajo presente. Los autores atribuyeron la extensa desaparición de MS y de FDN observadas a la colonización y posterior digestión de la teórica fracción de fibra lentamente degradable por los microorganismos del rumen. Cabe señalar que dietas con altos niveles de PB, como es el caso en cuestión, tienden a mejorar la degradación de la fibra. Lara *et al.* (2010) observaron en pasto Angleton (*Dichanthium aristatum*) a 7 semanas de edad sin aplicación de enzimas cifras de 53.35, 70.56 y 59.32 % de desaparición de MS, FDN y FDA en el rumen, respectivamente. Estos resultados están cercanos a la desaparición de MS observada para el HPP de 12 semanas de edad del estudio presente (3.64 puntos de porcentaje menor) y el HPP comercial (0.86 puntos mayor), pero mayor al valor obtenido con el HPP de 24 semanas (5.97 puntos). Las comparaciones análogas con relación a FDN revelan mayor degradabilidad a los tres estados de madurez de HPP, igualmente ocurre en lo relativo a FDA con valores aún más amplios. Aquellos autores concluyeron que a los 28 días de crecimiento el pasto Angleton posee una pared celular muy definida y suficientemente lignificada como para que el tratamiento pueda afectar la digestibilidad. Yescas *et al.* (2004) no encontraron diferencias al aplicar o no Fibrozyme a rastrojos de maíz con relación a la digestibilidad *in situ*. Estos autores atribuyen este resultado al alto grado de cementación entre la celulosa y la lignina por tratarse de producto de desecho agrícola, coincidiendo, en el efecto de la enzima, con lo obtenido en el presente estudio.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran un efecto de la madurez del HPP al revelar una significativa inferioridad del heno de 24 semanas de edad frente al de 12 semanas en la degradabilidad ruminal de MS, FDN y FDA. A las 48 horas de incubación la relativa inferioridad fue 17, 13 y 12 % MS, FDN y FDA. Los resultados obtenidos tienden a poner en duda el alegato que el HPP comercial era de solo 8 semanas de edad, ya que mostró menor digestibilidad *in situ* que el HPP de 12 semanas. A medida que la planta madura se desarrolla una pared secundaria de composición distinta a la primaria donde ocurre una notable deposición de polímeros aromáticos. Estos cambios químicos y anatómicos afectan marcadamente la degradabilidad ruminal del forraje (Ramírez *et al.*, 2002).

5 CONCLUSIONES

La composición química del heno de pasto pajón, en avanzado estado de madurez, no fue afectada por la aplicación de la enzima fibrolítica (Dyadic[®] Cellulase PLUS) que se roció sobre el mismo 24 horas antes de ser ofrecido a los carneros. Tampoco se afectó el CV absoluto o relativo ni la digestibilidad *in vivo*. Si bien la prueba *in vivo* indicó poco efecto de la aplicación enzimática en una comparación entre HPP de la misma etapa de madurez con o sin la enzima, el estudio de degradabilidad *in situ* indicó que la aplicación enzimática no sirvió de nivelador en la digestibilidad de HPP de distintas etapas de madurez todos tratados con la enzima. Más útil lució la aplicación de urea líquida que mejoró la composición química del HPP logrando levantar el contenido de PB en 1.7 unidades porcentuales (8.11 vs. 6.41 %), lo que representa un cambio relativo de 21 %. También aumentó el CV por cordero de PB (87.5 vs. 67.25 g MS/d), mientras que su digestibilidad mostró tendencia a mejorarse (61.1 vs. 54.0 %) resultando en cambios relativos de 23 y 12 %, respectivamente, todo lo cual representa una mejora sustancial de valor nutricional del HPP.

6 IMPLICACIONES

La información aportada por esta investigación se relaciona con la tecnología para mejorar el valor nutritivo del heno de una gramínea tropical en avanzado estado de madurez, en términos de su composición química, consumo voluntario y digestibilidad, a través de la aplicación de la enzima fibrolítica Dyadic[®] Cellulase PLUS o la urea líquida. Se observó que el tratamiento de un heno de las citadas características con esta enzima no representa una alternativa promisorio. En cambio, la utilización de la urea líquida rociada sobre el heno es efectiva para elevar el nivel proteínico y mejorar otros criterios indicativos del valor nutritivo para rumiantes. Aún queda por evaluar el tratamiento enzimático con el mismo u otros pastos, pero a más temprana edad de rebrote e incluir en las evaluaciones de los aditivos un criterio de producción animal como por ejemplo la ganancia en peso vivo de los carneros.

7 LITERATURA CITADA

- Adesogan, A.T., N. Krueger, M.B. Salawu, D.B. Dean, and C.R. Staples, 2004. The influence of treatment with dual purpose bacterial inoculants or soluble carbohydrates on the fermentation and aerobic stability of bermudagrass. *J. Dairy Sci.* 87:3407-3416.
- Allison, C.D., 1985. Factors affecting forage intake by range ruminants: a review. *J. Range Manage.* 38: 305–311.
- Almaraz, I., S.S. González, J.M. Pinos Rodríguez, and L.A. Miranda, 2010. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in sacco* and *in vitro* degradation of diets and on growth performance of lambs. *Italian J. Anim. Sci.* 9: 6-10.
- Almodóvar, L.E., E. Valencia, and A. Rodríguez, 2008. Liquid urea rate effects on nutritive value of 8-week regrowth of guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) hay. Edited by: Caribbean Food Crops Society, 44th Annual Meeting. University of Florida's. Institute of Food and Agricultural Sciences (UF/IFAS) Miami Beach, FL.
- AOAC (Association of official analytical chemists), 1996. Official methods of analysis. 16th ed. AOAC, Arlington, VA.
- Araque C., 2009. Uso de la urea en la alimentación de rumiantes. FONAIAP. Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Táchira, Bramón, Venezuela. <http://www.engormix.com/M-A-ganaderia-carne/nutricion/articulos/uso-urea-alimentacion-rumiantes-t2398/141-p0.htm>.
- Arce, C.P., F. Arbaiza, C. Carcelen y L.A. Orlando, 2003. Estudio comparativo de la digestibilidad de forrajes mediante dos métodos de laboratorio. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 14 (1): 7-12.
- Arriola, K.G., S.C. Kim, C.R. Staples, and A.T. Adesogan, 2010. Effect of fibrolytic enzyme application to low and high concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 94(2): 832-841.
- Arthington, J. D. and W.F. Brown, 2005. Estimation of feeding value of four tropical forage species at two stages of maturity. *J. Anim. Sci.* 83 (7):1726-1731.
- Atkin, D.E. 1993. Perspectives of cell wall biodegradation. H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Jatfield, and J. Ralph (ed.) *Forage Cell Wall Structure and Digestibility* Chapter 3, p. 73-82. USDA-ARS, Athens, GA.
- Avellaneda, J.H., J.M. Pinos-Rodríguez, S.S. González, R. Barcena, A. Hernández, M. Cobos, D. Hernández, and O. Montañés, 2009. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestion of Guinea grass hay. *Anim. Feed Sci. Tech.* 149 (1-2): 70-77
- Ayala, J., G. Mendoza, R. Bárcena y S. González, 1994. Efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae* y melaza-urea sobre la digestibilidad in vivo e in situ en dietas para ovinos basadas en paja de cártamo. *Vet. Méx.* 25(3):221-226.

- Bae, D.H. and K.K Jung, 1988. Studies on urea utilization as a source of ammonia for the rice straw treatment. Effects of urea levels, moisture contents in rice straw and treatment periods on chemical components and in vitro dry matter digestibility of the urea treated ammonia. Kor. J. Anim. Sci. 30(1): 28-33.
- Baile, C.A. and J. Mayer, 1970. Hypothalamic centres: feed-backs and receptors sites in the short-term control of feed intake. In A.T. Phillipson (ed) Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. Oriel Press. England, pp. 254 - 265.
- Balch C.C. and R.C. Campling, 1962. Regulation of voluntary food intake in ruminants. Nutr. Abst. Rev. 32 (3): 669 – 686.
- Barahona-Rosales, R. y S. Sánchez-Pinzón, 2005. Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. Programa de Fisiología y Nutrición Animal, Revista Corpoica, Vol 6 N°1.
- Beauchemin, K.A., D. Colombatto, D.P. Morgavi, and W.Z. Yang, 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. J. Anim. Sci. 81: E37-E47.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Research review paper. J. Biotechn. Advan. 18: 355–383.
- Blas, C., G.G. Mateos y P.G. Rebollar, 2007. Urea y tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España.
- Botero B., R. y T.R. Preston, 2007. Eliminación de riesgos de intoxicación en rumiantes suplementados con urea líquida. Puerto Limón, Costa Rica. www.produccion-animal.com.ar.
- Bowman, G.R., K.A. Beachemin y J.A. Shelford, 2002. The proportion of the diet to which fibrolytic enzymes are added affects nutrient digestion by lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 85: 3420
- Bowman, J.G.P., B.F. Sowell, D.L. Boss, and H. Sherwood, 1999. Influence of liquid supplement delivery method on forage and supplement intake by grazing beef cows. Anim Feed Sci Tech 78 (3): 273-285.
- Brown, W.F. and M. Adjei. 1995. Urea ammoniation effects on the feeding value of guineagrass (*Panicum maximum*) hay. J. Anim. Sci. 73:3085-3093.
- Burroughs, W., W. Woods, S.A. Ewing, J. Greig, and B. Theurer, 1960. Enzyme additions to fattening cattle rations. J. Animal Sci. 19(2):458-464.
- Buxade, C., 1994. Zootecnia, bases de producción animal. Tomo II. Reproducción y alimentación. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España. 345 p.
- Campling, R.C., 1970. Physical regulation of voluntary intake. In A.T. Phillipson (ed) Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. Oriel Press. England, pp. 226 - 234.

- Carreño, L., P. Gallardo, J.J. Izurieta, S. Mosquera y J. Serrano, 2010. Producción industrial de la urea y sus aplicaciones. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Universidad del Ecuador, Guayaquil, Ecuador.
- Carro, M.D., M.J. Ranilla y M.L. Tejido, 2006. Utilización de aditivos en la alimentación del ganado ovino y caprino. Sitio Argentino de Producción Animal. Artículos de revisión 3: 26-37.
- Chesson, A. 1988. Lignin-polysaccharide complexes of the plant cell wall and their effect on microbial degradation in the rumen. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 21: 219-228.
- Chicco, C.F., T.A. Shultz, A.A. Carnevali, L. Oropeza, and C.B. Ammerman, 1971. Biuret and urea in supplements for bovines fed green chop elephant grass. *J. Anim. Sci.* 33(1): 133-136.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 2008. Improved multipurpose forages for the developing world. SBA 3 Annual Report. Cali, Colombia 150p.
- Colburn, M.W. and J.L. Evans, 1967. Chemical composition of the cell-wall constituent and acid detergent fiber fractions of forages. *J. Dairy Sci.* 50: 1130-1135.
- Combellas, J., E. González J. y R. Parra R., 1971. Composición y valor nutritivo de forrajes producidos en el trópico. I. Digestibilidad aparente y verdadera de las fracciones químicas. *Agronomía Tropical* 21(6):483-494.
- Cook, B.G., B.C. Pengelly, S.D. Brown, J.L. Donnelly, D.A. Eagles, M.A. Franco, J. Hanson, B.F. Mullen, I.J. Partridge, M. Peters, and R. Schultze-Kraft, 2005. Tropical Forages: an interactive selection tool. [CD-ROM] CSIRO, DPI&F (Qld), CIAT and ILRI, Brisbane, Australia.
- CORPOICA, 2001. Plan de Modernización de la Ganadería Bovina Colombiana: Resumen de resultados del componente de investigación 1996- 2000, Parte I, Silvopastoreo.
- Coughlan, M.P., 1989. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 3: 39-109.
- Cuesta-Muñoz, P.A., H.M. Echeverría, M.O. Santana R. y J. Barro Henríquez, 1997. Estrategias de manejo de praderas para mejorar la productividad de la ganadería en las regiones Caribe y Valles Interandinos. P.A. Cuesta M. (ed) Manual técnico: "Producción y utilización de recursos forrajeros en sistemas de producción bovina de las regiones caribe y valles interandinos. Cap. IV pp. 43 – 64.
- Dean, D.B., A.T. Adesogan, N. Kruger, and R.C. Littell, 2005. Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of bermuda grass silage. *J. Dairy Sci.* 88:994-1003.
- De León E. y J.A. Choque-López, 2010. El Método FAMACHA© para diagnosticar anemias causadas por parasitosis en ovinos y caprinos. Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF), Santo Domingo, RD.

- Dulphy, J.P., B. Remond, and M. Theriez, 1980. Ingestive behavior and related activities in ruminants. In: Y. Ruckebusch and P. Thivend (ed) Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants. AVI Publishing Company, Westport, CT.
- Ellis, H.C., 1978. Determinants of grazed forage intake and digestibility. *J. Dairy Sci.* 61:1828-1840.
- Elwakeel, E.A., E.C. Titgemeyer, B.J. Johnson, C.K. Armendariz, and J.E. Shirley, 2007. Fibrolytic enzymes to increase the nutritive value of dairy feedstuffs. *J. DairySci.*90 (11): 5226-5236.
- Esparza C., M.R., 2004. Compendio de Ensayos Cátedra: Evaluación de Forrajes. Plan de Estudios carrera de Zootecnia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Fahey, G.C. Jr., 1997. Introduction. Conference: New developments in forage science contributing to enhanced fiber utilization by ruminants. *J. Nutr.* 127: 809S.
- Faría-Mármol, J., 2006. Manejo de pastos y forrajes en la ganadería de doble propósito. X Seminario de Pastos y Forrajes. Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela.
- Feng, P., C.W. Hunt, G.T. Pritchard, and W.E. Julien, 1996. Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* degradation and *in vivo* digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. *J. Anim. Sci.* 1996. 74:1349–1357.
- Flores, J., R. Rojo, D. López, J.F. Vázquez, S. Rebollar y D. Colín, 2000. Composición química, digestibilidad y cinética de digestión de paja de avena tratada con *Pleurotus ostreatus*. Universidad Autónoma de México. Temascaltepec, México.
- Forbes, J.M., 1986. A model of the short term control of feeding in the ruminant: effects of changing animal or feed characteristics. *Appetite* 1: 21-41
- Forbes, J.M., 2007. Voluntary food intake and diet selection in farm animals. 7th ed. Bristish Library, London, UK.
- Gallardo, I., R. Bárcena, J.M. Pinos-Rodríguez, M. Cobos, L. Carreón, and M.E Ortega, 2010. Influence of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* and *in sacco* degradation of forages for ruminants. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Tecamachalco, México.
- Giraldo, L.A., M.L. Tejido, M.J. Ranilla, S. Ramos, and M.D. Carro, 2008. Influence of direct fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay based diet. *J. Anim. Sci.* 86 (7): 1617-1623.
- Hoffman, P.C., K.M. Lundberg, L.M. Bauman, R.D. Shaver y F.E. Contreras-Govea, 2007. El Efecto de la Madurez en la Digestibilidad de la FDN (fibra detergente neutro). *Focus on Forage* – 5(15). University of Wisconsin-Madison.

- Holmann, F., 1998. Evaluación económica de sistemas de producción de leche en el trópico. Arch Latinoam Prod. Anim, 6 (1):19-32.
- Holmann, F., L. Rivas, P. Argel y E. Pérez, 2004. Impacto de la adopción de pastos *Brachiaria*: Centroamérica y México. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Documento de Trabajo No. 197.
- Ibáñez, F.C., P. Torre y A. Irigoyen, 2003. Aditivos Alimentarios. Área de Nutrición y Bromatología, Universidad Pública de Navarra, México.
- InfoStat, 2008. InfoStat, versión 2008. Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas. Córdoba, Argentina.
- Ingvarsen, K.L., 1994. Models of voluntary food intake in cattle. Livest. Prod. Sci. 39: 19 – 38.
- Jaramillo, C.G. y J.L. Jiménez, 1988. Observaciones sobre la producción de semillas de *Dichanthium annulatum*. Pasturas Tropicales, 10 (3): 24-25.
- Jundzil, R., 2009. Dyadic® Cellulase PLUS. Product # 47. Dyadic international, INC. www.dyadic.com
- Karue, C.N., J.L. Evans, and A.D. Tillman, 1972. Metabolism of nitrogen in Boran and in Herford-Boran crossbred steers. J. Anim. Sci. 35: 1025.
- Krause, M., K.A. Beauchemin, L.M. Rode, B.I. Farr, and P. Norgaard, 1998. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. J. Anim. Sci. 76: 2912-2920.
- Krueger, N.A., A.T. Adesogan, C.R. Staples, W.K. Krueger, S.C. Kim, R.C. Littell, and L.E. Sollenberger, 2008. Effect of method of applying fibrolytic enzymes or ammonia to Bermuda grass hay on feed intake, digestion, and growth of beef steers. J. Anim. Sci. 86:882–889.
- Kung, L. Jr., R.J. Treacher, G.A. Nauman, A.M. Smagala, K.M. Endres, and M.A. Cohen, 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 83:115–122.
- Lara, C., L.E. Oviedo y C.A. Betancur, 2010. Efecto de la época de corte sobre la composición química y degradabilidad ruminal del pasto *Dichanthium aristatum* (Angleton). Zootec. Trop. 28(2): 275-281.
- Latorre, S., G. Serrano y H. Mateus, 2000. Pastoreo rotacional intensivo más suplementación estratégica. En: Subproductos agrícolas para nutrición animal. Memorias. p 26 –29.
- Leatherwood, J.M., R.D. Mochrie, and W.E. Thomas, 1960. Some effects of a supplementary cellulase preparation on feed utilization by ruminants. J. Dairy Sci. 43(10): 1460-1464.
- Lee, B., A.L. Pometto, A. Demici, and P.N. Hinz, 1998. Media evaluation for the production of microbial enzymes. J. Agric. Food Chem. 46: 4775-4778.

- León A., 2003. Consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de henos de gramíneas tropicales nativas y ensilaje de sorgo y el efecto de la suplementación con residuos fermentados de pescadería. MS Tesis. Universidad de Puerto Rico. RUM. 62. pp.
- Lewis, G.E., C.W. Hunt, W.K. Sanchez, R. Treacher, G.T. Pritchard, and P. Feng, 1996. Effect of direct fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. *J. Anim. Sci.* 74: 3020-3028.
- López-Soto, M.A., E. Arellano González, A. Barreras Serrano, V.M. González Vizcarra, D. May García, A. Plascencia Jorquera y R. AveryZinn, 2006. Influencia de una enzima fibrolítica exógena y el proceso de maceración en un forraje de baja calidad sobre digestión y función ruminal en vacas Holstein secas. *Vet. Méx.*, 37 (3): 275-289.
- Mairena J., J.R. Alaniz, M.A. Rocha y V. Valdivia, 2008. Consumo de alimentos y ganancia de peso con una dieta de guacimo (guazuma ulmifolia) y pasto estrlla. <http://www.plusformacion.com/Recursos/r/Consumo-alimentos-ganancia-peso-una-dieta-guacimo-guazuma-ulmifolia-pasto-estrlla>
- McAllister, T.A., A.N. Hristov, K.A. Beauchemin, L.M. Rode, and K.J. Cheng, 2001. Enzymes in ruminant diets. In M.R. Bedford and G.G. Partridge (ed) *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, CAB International. Londres, UK. pp. 273-298.
- McAllister, T.A., S.J. Oosting, J.D. Popp, Z. Mir, L.J. Yanke, A.N. Hristov, R.J. Treacher, and K.J. Cheng, 1999. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 79:353–360.
- McDowell, L.R., 1985. *Nutrition of grazing ruminants in warm climates*. Academic Press. Orlando, FL. 443 pp.
- McDowell, R.E., 1975. *Bases biológicas de la producción animal en zonas tropicales*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 692 pp.
- Mejía H., J., 2002. Consumo voluntario de forraje por rumiantes en pastoreo. Universidad de Guanajuato, México. *Acta Universitaria*, 12(3): 56-63.
- Minson, D.J., 1990. *Forage in ruminant nutrition*. Academic Press. San Diego, CA.
- Moore, K.J. and R.D. Hatfield, 1994. Carbohydrates and forage quality. In: G.C. Jr.Fahey, M.C. Collins, D.R. Mertens, &L.E. Moser, (ed.) *Forage Quality, Evaluation, and Utilization*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI. 229–280 pp.
- Morgavi, P.D., A.K. Beauchemin, L.V. Nsereko, M.L. Rode, A.T. McAllister, and D.A. Iwaasa, 2001. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. *J. Anim. Sci.* (79): 1621-1630.

- National Research Council, 2001. Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition, Committee on Animal Nutrition, National Academies Press. "5. Protein and Amino Acids." Nutrient Requirements of Dairy Cattle: 7th Rev. Ed., Washington, DC.
- National Research Council (NRC), 1985. Ruminant nitrogen usage. National Academic Press, Washington, DC.
- Newman, Y.C., T.R. Sinclair, A.S. Blount, M.L. Lugo, and E. Valencia, 2007. Forage production of tropical grasses under extended day length at subtropical and tropical latitudes. *Envir. Exper. Botany*, 61 (1): 18-24.
- Officer DI., 2000. Feed Enzymes. In J.P.F. D' Mello: Farm Animal Metabolism and Nutrition. (ed) The Scottis Agricultural College, Edinburgh, U.K. Disponible en: www.cabi.org/bookshop/ReadingRoom/0851993788/3788ch19.pdf2000:448.
- ORIL (Oficina para la Reglamentación de la Industria Lechera), 2008. Informe anual año fiscal 2007–2008. Estado Libre Asociado de Puerto Rico. Departamento de Agricultura. San Juan, P. R.
- Ørskov, E.R., F.D. DeB Hovell, and F. Mould, 1980. The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. *Trop. Anim. Prod.* 5: 195 – 213.
- Pérez L., O., 2008. Establecimiento y manejo de especies forrajeras para producción bovina en el trópico bajo. CORPOICA. C.I. La Libertad. Villavicencio, Colombia.
- Peters, A., P. Lebzien, U. Meyer, U. Borchert, M. Bulang, and G. Flachowsky, 2010. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and nutrient digestion in dairy cows. *Arch. Anim. Nutri.* 64 (3): 221-237.
- Pinos-Rodríguez, J.M., S.S. González, G.D. Mendoza, R. Bárcena, M.A. Cobos, A. Hernández, and M.E. Ortega, 2002. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 80 (11): 3016-3020.
- Pirela M., F., 2005. Valor nutritivo de los forrajes tropicales. En: C. González-Stagnaro, E. Soto-Belloso (eds.) Manual de Ganadería Doble Propósito. Ediciones Astro Data, S.A. Maracaibo-Venezuela. VIII (1): 176-182.
- Pitman W.D., 2001. Environmental constraints to tropical forage plant adaptation and productivity. In A. Sotomayor-Ríos and W.D. Pitman (eds.) Tropical Forage Plants. Development and Use. CRC Press LLC. Boca Raton, FL. 401 p.
- Preston, T.R. and M.B. Willis, 1974. Intensive Beef Production. 2nd ed. Pergamon Oxford, U.K.
- Preston, T.R. y R.A. Leng, 1989. Ajustando los sistemas de producción pecuaria a los recursos disponibles. Aspectos básicos y aplicados del nuevo enfoque sobre la nutrición de rumiantes en el trópico. CONDRIT, Cali, Colombia. 312 pp.

- Raggi-Saini, L.A., 1988. Regulación del consumo voluntario de alimentos en rumiantes. Monografías de Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. 10 (2): 13.
- Ramírez, R., R. Gonzalo y F. López, 2002. Factores estructurales de la pared celular que afectan su digestibilidad. Ciencia UANL, 5(2): 180-188
- Ramos, J.A., G.D. Mendoza, E. Aranda, C.M. García y R. Bárcena, 1995. Caracterización del nitrógeno del pasto estrella con dos sistemas: proteína metabolizable y proteína cruda digestible. Rev. Fac. Agron. (LUZ), 12: 209-220
- Ravelo, G., A. Fernández, M. Bobadilla, N.A. MacLeod, T.R. Preston, and A.A. Leng, 1978. Glucose metabolism in cattle on sugar cane based diets: a comparison of rice polishings and cassava root meal. Trop. Anim. Prod. 3: 12-N.
- Rodríguez, A.A., J.L. Martínez, R. Macchiavelli, and E.O. Riquelme, 2001. Microbial sucesion, fermentation end products, aerobic stability of guinea grass ensiled with various doses of additive containing bacterial inoculant and fibrolytic enzymes. Agric. Univ. P.R. 85:151-164.
- Rodríguez, J.L., E. Valencia, and A.A. Rodríguez, 2007. Liquid urea by product as additive to improve intake and digestibility of grass hay. Preliminar study. J. Anim. Sci. Vol. 85, Suppl. 1, T142.
- Rojo, R., G.D. Mendoza, C.M. García, J.R. Bárcena y E.M. Aranda, 2000. Consumo y digestibilidad de pastos tropicales en toretes con suplementación nitrogenada y *Saccharomyces cerevisiae*. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 17:358.
- Romero, J.J., A.T. Adesogan, K.G. Arriola, and M.A. Zarate, 2011. Improving the potency and reliability of fibrolytic enzymes for enhancing tropical forage utilization by livestock. Animal Sciences Department. University of Florida, Gainesville, FL. 6 pp.
- Roncedó, C.S. y H.E. Pérez, 2005. Intersiembrado de cuatro leguminosas tropicales en una pastura degradada de grama rhodes (*Chloris gayana*). Fac. Agron. Zoot., UNT, Tucumán. INTA. pp. 7.
- Ruiz, O., Y. Castillo, J.I. Aguilera, C. Arzola, C. Rodríguez, J.A. Jiménez y H. Rubio, 2006. Cascarrilla de avena tratada con urea y un aditivo enzimático en el consumo, la digestibilidad y la cinética ruminal de novillos. Rev. Cubana Cienc. Agr. 40 (4): 433-438.
- Ruralticnova, 2011. Nutrición y alimentación del ovino. Requerimientos nutricionales. <http://www.slideshare.net/Ruralticnova/i-requerimientos-nutricionalesdelosovinos>
- Sánchez, J.M., 2001. Curso 'Actualización en la Nutrición del Ganado Lechero'. LANCE. Balsa. Atenas, Costa Rica. Escuela de Zootecnia-Centro de Investigaciones en Nutrición Animal. Universidad de Costa Rica. Feednet, San José, C.R.

- Sandoval C., B., 2007. Características agronómicas y nutricionales de asociaciones de gramíneas y leguminosas tropicales, M.S. Tesis. Recinto Universitario de Mayagüez, Universidad de Puerto Rico, 102 pp.
- Shultz, E., C.F. Chicco, L.E. Canas y T.A. Shultz, 1974. Urea, biuret y su combinación como suplementos de nitrógeno para ovinos. *Rev. Agron. Trop.* 24 (6): 493-504.
- Silvestre, R., N.A. Macleod, and T.R. Preston, 1977. Voluntary intake and live weight gain of cattle given chopped sugar cane and solutions of molasses containing different concentrations of urea. *Trop. Anim. Prod.* (2): 1-12
- Skerman, P.J. and F. Riveros, 1990. *Dichanthium annulatum* (Forsk.) Stapf. Tropical grasses. FAO publications. Rome.
- Sotomayor-Rios, A., J. Vélez-Santiago, S. Torres-Rivera, and S. Silva, 1976. Effect of three harvest Intervals on yield and composition of nineteen forage grasses in the humid mountain region of Puerto Rico. *J. Agric. Univ. P. R.* 60 (3): 294-309.
- Souza, O. y I.E. Dos Santos, 2002. Digestibilidad *in vivo*, balance de nitrógeno e ingestión voluntaria en ovinos alimentados con paja de cebada tratada con urea. *Arch. Zootec.* 51: 361-371.
- Souza, O. y I.E. Dos Santos, 2006. Aprovechamiento de los residuos agropecuarios tratados con urea en la alimentación animal. Curso de zootecnia ceca/ UFAL. www.produccion-animal.com.ar
- Sultan, J.I., I. Rahim, H. Nawaz, and M. Yaqoob, 2008. Nutritive value of marginal land grasses of northern grasslands of Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 40(1): 249-258.
- Sutton, J.D., R.H. Phipps, D.E. Beever, D.J. Humphries, G.F. Hartnell, J.L. Vicini, and D.L. Hard, 2003. Effect of method of application of a fibrolytic enzyme product on digestive processes and milk production in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 86:546
- Szasz, J.I., T.M. McCalmant, C.W. Hunt, A.V. Grove, and L.R. Kennington, 2002. Effect of a fibrolytic enzyme preparation on intake and digestibility of bluegrass seed straw fed to beef cattle. *Proc. Western Section, American Society of Animal Science.* 53: 10-15
- Tejos M., R., 2002. Pastos nativos de sabanas inundables. Caracterización y Manejo. Litografía Megagraf. Barquisimeto, Venezuela. 108 p.
- Tous-Rivera, K., E. Valencia, A. Rodríguez, P. Randel y A.T. Adesogan, 2010. Enzimas exógenas tipo fibrolíticas sobre el consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de heno de pasto guinea (*Panicum máximum* Jacq.). *J. Agric. Univ. PR.* 94(1-2): 131-146.
- Van Soest, J. P., 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2nd. ed. Comstock Publishing Associates. Ithaca, N.Y. 476p.
- Van Soest, P.J., J. Robertson, and B. Lewis, 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3595.

- Varel, V.H. and K.K. Kreikemeier, 1995. Technical Note: Comparison of *in vitro* and *in situ* digestibility methods. *J. Anim. Sci.* 73: 578-582.
- Vega E., M., J. Ramírez de la R., I. Leonard A. y A. Igarza, 2006. Rendimiento, caracterización química y digestibilidad del pasto *Brachiaria decumbens* en las actuales condiciones edafoclimáticas del Valle del Cauto. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*®, ISSN 1695-7504, Vol. VII, n° 05.
- Vicente-Chandler, J., C.R. Caro, F. Abruña y S. Silva, 1983. Producción y utilización intensiva de forrajeras en Puerto Rico. *Boletín* 271. Estación Experimental Agrícola, UPR.
- Viquez R., F. and A.R. Bonilla L., 2002. Effect of pectinase and cellulase addition on *in vitro* digestibility of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Arch. Latinoam. Nutr.* 52(2):151-154.
- Wagner, M.W., K.M. Haustad, D.E. Doornbos, and E.L. Ayers, 1986. Forage intake of rangeland beef cows with varying degrees of crossbred influence. *J. Anim. Sci.* 63: 1484.
- Wallace, J.R., A.J.S. Wallace, N. McKain, L.V. Nsereko, and F.G. Hartnell, 2001. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 79: 1905-1916.
- Wanapat, M., S. Chumpawadee, and P. Paengkoum, 2000. Utilization of urea-treated rice straw whole sugar cane crop as roughage sources for dairy cattle during the dry season. *J. Anim. Sci.* 13(4): 474-477.
- Wang, Y., T.A. McAllister, L.M. Rode, K.A. Beauchemin, D.P. Morgavi, V.L. Nsereko, A.D. Iwaasa, and W. Yang, 2001. Effects of an exogenous enzyme preparation on microbial protein synthesis, enzyme activity and attachment to feeding the rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 85: 325-332.
- Ware, R.A., N. Torrentera, and R.A. Zinn, 2005. Influence of maceration and fibrolytic enzymes on the feeding value of rice straw. *J. Anim. Vet. Advan.* 4(3): 387-392.
- Yalchi, T., J. Seif, and R. Seyed, 2010. Chemical composition and digestibility of urea treated triticale (Straw x Triticosecale). *J. Food Agric. Environ.* 8 (2): 618 – 621.
- Yang, W.Z., K.A. Beauchemin, and L.M. Rode, 2000. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. *J. Dairy Sci.* 83:2512.
- Yang, W.Z., K.A. Beauchemin, and L.M. Rode, 1999. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 391-403.
- Yescas, Y.R., G.R. Bárcena, M.G. Mendoza, M.S González, P.M. Cobos y C.M. Ortega, 2004. Digestibilidad *in situ* de dietas con rastrojo de maíz o paja de avena con enzimas fibrolíticas. *Agrociencia*, 38(1): 23 - 31.

- Yulistiani, D., J.R. Gallagher, and R.J. Van Barneveld, 2003. Intake and digestibility of untreated and urea treated rice straw base diet fed to sheep. *J.I.T.V.8* (1): 8-16.
- Zapata, C., N.E Obispo y Y. Díaz, 2004. Efecto de la sustitución parcial de la proteína de la dieta por urea sobre el consumo voluntario de materia seca y respuesta productiva de corderos. *Zootec. Trop.* 22(1): 29-48.
- ZoBell, D.R., R.D. Weidmeier, K.C. Olson, and R.J. Treacher, 2000. The effect of an exogenous enzyme treatment on production and carcass characteristics of growing and finishing steers. *Anim. Feed Sci. Tech.* 87:279–285.

8 APÉNDICE

Apéndice A. Comportamiento de la pluviometría (milímetros-mm) y la temperatura (Celsius-C) durante la investigación de digestibilidad *in vivo*, Corozal, Puerto Rico (2011)

