

ARTÍCULO TÉCNICO

Luis C. Arreaza¹
 Hugo R. Jiménez¹
 Dora E. Sánchez¹
 Leonardo Sánchez¹

ABSTRACT

Title: Determination of allantoin excretion by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in milk serum from Holstein cows fed kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*).

An experiment was carried out to determine allantoin excretion in late lactation dairy cows, using tree multiparous (four lactations or more) Holstein cows, fed exclusively on kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*). The experiment was completed in 14 days, with 7 days of diet adjustment and 7 days of milk sampling and feed intake measurement. Allantoin measurement was performed both by HPLC and colorimetric methods. The estimated rumen microbial nitrogen was compared with that obtained from the CNCPS prediction, using simple regression analysis. The daily allantoin value was used to calculate allantoin production and total microbial N, which was correlated with the OM digested during the seven experimental days. Measurements of allantoin by HPLC ranged from 2.74 to 7.99 mMol L⁻¹ which corresponded to 260.4 ± 32 g d⁻¹ of microbial N, or 1628 g d⁻¹ of microbial protein. Feed intake was 12.1 kg DM d⁻¹ per cow (2.35% live weight). Efficiency of microbial synthesis was 55.3 g kg⁻¹ of OM digested. Results by the chromatographic method were similar to those reported elsewhere and the estimation of Mic N was similar to that estimated with CNCPS (18% bias). When DMI was added to the model, estimated Mic N was closer to the CNCPS prediction (13% bias). Results suggest that allantoin quantification by HPLC, is a reliable method to determine allantoin concentration in milk serum.

Key words: Ruminants, purine derivatives, allantoin analysis, milk.

Abbreviation key: CNCPS, Cornell Net Carbohydrate and Protein System; HPLC, High Performance Liquid Chromatography; MS, dry matter; ODM, digested organic matter.

¹ Respectivamente, Zootecnista; Biólogo; Licenciada en Química y MVZ Ph.D. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, C.I. Tibaitatá, Km. 14 Vía Mosquera, Colombia.

* Trabajo realizado en 2001 en desarrollo del Plan para la Modernización de la Ganadería, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural bajo el Convenio 094 de 2001.

Determinación de la excreción total de alantoína en suero de leche por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) en vacas Holstein alimentadas con pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*)^{*}

RESUMEN

Se realizó un experimento con vacas Holstein con el fin de medir la excreción de alantoína en la leche. Se utilizaron tres hembras en la fase final de la lactancia, pertenecientes al hato de ordeño del C.I. Tibaitatá, que se alimentaron bajo confinamiento con pasto Kikuyo cortado diariamente de praderas pastoreadas por el hato completo. El experimento tuvo una duración de 14 días: siete de acostumbamiento y siete de muestreo, durante los cuales las vacas se alimentaron dos veces por día. Se medía el forraje ofrecido y el rechazado al día siguiente; así mismo, se tomaron 200 ml de leche de cada hembra, en los dos ordeños, durante los siete días de muestreo. Se midió el valor diario de alantoína en suero de leche, valor que se utilizó para calcular la cantidad digerida de nitrógeno microbiano y para relacionarla con la materia orgánica digerida (MOD). Estos resultados se compararon con los generados en simulación por el programa CNCPS. Con el método colorimétrico los resultados fueron variables y poco satisfactorios. Con HPLC, la concentración de alantoína en suero de leche varió entre 2.74 mMol y 7.99 mMol L⁻¹. Los valores calculados de flujo de N microbiano al intestino fueron de 260.4 ± 32 g día⁻¹, equivalentes a 1.628 g de proteína microbiana digerida. El consumo de forraje fue de 12.1 kg de MS vaca día⁻¹ (2.35% del peso vivo). La eficiencia de la síntesis de proteína microbiana estimada fue de 55.3 g kg⁻¹ de MOD. La cuantificación cromatográfica de alantoína se acercó a los valores reportados por la literatura y a las estimaciones de NM obtenidas por simulación con CNCPS (18 % de desviación). Cuando se incluyó el consumo de MS, la estimación de NM se acercó al valor de simulación (13% de desviación), considerándose que la cuantificación de alantoína por HPLC es un método aceptable.

Palabras clave: Rumiantes, derivados purínicos, análisis alantoína, leche.

Abreviaturas usadas: CNCPS, Cornell Net Carbohydrate and Protein System; HPLC, High Performance Liquid Chromatography; MS, materia seca; MOD, materia orgánica digestible.

INTRODUCCIÓN

LA CANTIDAD DE PROTEÍNA microbiana sintetizada en el rumen de los herbívoros es un factor que es necesario tener en cuenta en los sistemas modernos de estimación de la proteína disponible para digestión intestinal (Czauderna y Kowalczyk, 1997; Kahn y Nolan, 1992). El abastecimiento de proteína microbiana por unidad de alimento ingerido (g N microbiano /kg de materia orgánica fermentable, MOF) representa entre 60 y 85% de los requerimientos de proteína cruda (PC) para el mantenimiento, el crecimiento, la gestación y la lactancia en rumiantes domésticos (Storm *et al.*, 1983). Sin embargo, la determinación de la proteína microbiana que escapa al rumen es una labor complicada y tediosa, que requiere de animales canula-

dos y la diferenciación analítica entre la proteína de origen dietario y la bacteriana. Puesto que la proteína microbiana generada en el rumen es la principal fuente de aminoácidos requeridos por el rumiante, su cuantificación se hace necesaria con el fin de desarrollar sistemas eficientes de suplementación, especialmente en los países tropicales donde la proteína es el nutriente más costoso y escaso (McDowell 1992, Nsahlai *et al.*, 2000). Topps y Elliot (1965), fueron los primeros en visualizar el contenido de alantoína y el ácido úrico, presentes en la orina de los mamíferos herbívoros, como un indicador de la cantidad de biomasa microbiana digerida en el intestino. Vercoe (1976), demostró que el consumo de MS digestible estaba estrechamente corre-

lacionada con la excreción de alantoína en la orina de bovinos y búfalos; Kahn y Nolan (1992) encontraron una relación similar en ovinos.

Se ha observado una relación directa entre la excreción urinaria de derivados purínicos DP ($r = 0.537$; $P < 0.001$) y la producción de nitrógeno microbial en ovejas y una relación linear significativa entre la excreción de alantoína urinaria y el consumo de materia orgánica digestible en ovejas, así como la excreción de alantoína urinaria y el consumo de materia seca digestible en novillos y recientemente, se ha sugerido que la excreción de alantoína en leche correlaciona positivamente con el flujo de nitrógeno microbial (Timmerman *et al.*, 2000).

La disponibilidad de técnicas analíticas para derivados purínicos de ácidos nucleicos de origen microbial, se refiere casi exclusivamente a muestras de orina en herbívoros (Topps y Elliot, Fujihara, Balcells, Chen, Nsahlai, Verbic, Subba) y poco a muestras de leche (Timmerman *et al.*, Giesecke *et al.*, Shingfield y Offer) o plasma sanguíneo (Czauderna y Kowalczyk), lo cual es una dificultad mayor debido a que la colección de orina diaria en animales grandes es problemática, de alto costo y de difícil aplicación bajo condiciones de pastoreo. La determinación cuantitativa de derivados purínicos en leche de herbívoros se visualiza como un método práctico y aplicable para una rápida evaluación de la dieta y el consumo de forrajes en condiciones de pastoreo, aunque necesariamente, requiere de más experimentación y refinamiento en los métodos de laboratorio.

El propósito de este trabajo fue estandarizar el método de estimación de proteína microbial basado en la excreción de alantoína en leche de bovinos, como una herramienta indispensable para la investigación de la calidad de los recursos alimenticios y la predicción del consumo y de requerimientos nutricionales de los bovinos en Colombia.

Materiales y métodos

El trabajo se desarrolló en el C.I. Tibaitatá. En el experimento se utilizaron tres vacas Holstein adultas con más de cuatro lactancias y en la fase final de producción de leche, para estimar la capacidad de producción de proteína microbial de los animales con dietas exclusivamente de forraje (Kikuyo).

Manejo y alimentación de los animales experimentales. Los animales se confinaron en corrales individuales y se les suministró diariamente forraje de Kikuyo cortado de los potreros pastoreados por el resto del hato, dos veces por día a las 8:00 y a las 15:00. Se registró el peso del forraje ofrecido y el rechazado al día siguiente y se enviaron muestras de estos forrajes al laboratorio para determinar su calidad y corregir el consumo de acuerdo con el grado de deshidratación del forraje rechazado. Durante siete días de acostumbramiento sólo se midió el consumo de forraje hasta que éste fue constante; en los siguientes siete días, se continuó la medición del consumo de forraje de kikuyo y se tomaron muestras de leche (200 ml) a cada vaca en cada ordeño (dos ordeños por día a las 7:00 y las 14:00 horas).

Análisis de laboratorio. El forraje suministrado a las vacas se analizó en el laboratorio para materia seca (MS), materia orgánica (MO), proteína cruda (PC), fibra detergente neutra (FDN), lignina y cenizas, de acuerdo a los métodos AOAC (1995) y Van Soest *et al.* (1991), nitrógeno insoluble en detergente neutro (NIDA), nitrógeno insoluble en detergente ácido (NIDN) de acuerdo con Licitra *et al.* (1996), respectivamente. La composición se detalla en la Tabla 1.

Las muestras de leche (200 ml) se llevaron al laboratorio e inmediatamente se colocaron al baño de María (39° C); se les adicionaron 5 ml de solución de cuajo (222 mg de renina/ml). El coágulo se removió y se almacenó una alícuota de suero (15 ml) en tubos de centrífuga a -20° C, hasta su análisis. Posteriormente se desproteinizaron con TCA al 5% en una relación 1:1, dejando en reposo durante una noche en refrigerador a 4° C para remover la grasa; posteriormente, se centrifugó a 3.500 rpm por 15 minutos. El sobrenadante fue filtrado y se tomó una alícuota de 700 µl para derivatización, agregando 50 µl de

azul de timol como indicador en tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se agregaron 100 µl de 0.6M NaOH o más hasta asegurar un pH por encima de 9.2. Las muestras se calentaron posteriormente en baño de María a 85° C por una hora. Y se agregaron 280 mL de 2,4 dinitro-fenilhidrazina (1 g l⁻¹ en HCL 2M), se continuó calentando por 20 minutos, se dejó enfriar y se centrifugaron a 15.000 rpm. El sobrenadante se pasó por filtro de 22 µm para inyectar a la columna directamente. Para la determinación de la concentración de alantoína en suero se utilizó la técnica cromatográfica de acuerdo a Chen *et al.*, (1997). Como patrón se utilizó alantoína pura grado AR (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.).

Cromatografía. Las condiciones cromatográficas que se establecieron de acuerdo con Chen *et al.* (1990) fueron: Cromatógrafo líquido Shimadzu LC-6A con controlador Shimadzu SCL-6B, detector SPD-6AV UV-VIS, auto inyector SIL-6B e integrador C-R4A. La fase estacionaria fue realizada en columna Nucleosil 100-5 C18, 150 x 6 mm e ID con tamaño de partícula de 5 micrones. Precolumna Nucleosil 100-5 C18 de 25 x 2mm ID. La fase móvil consistió en: solvente A, acetonitrilo al 15% en ácido acético 0.01M y solvente B acetonitrilo al 99%. El flujo se estableció en 1 ml min⁻¹. y el volumen de inyección fue de 20 µl. La lectura se registró a 360 nm, con atenuación 6. Horno a temperatura ambiente y la corrida tomó una duración de 25 minutos.

Las tasas de degradación ruminal de las fracciones de carbohidratos del pasto Kikuyo se determinaron por medición de la acumulación de gas en incubaciones *in vitro* (Pell y Schofield, 1995). El consumo de forraje, los análisis bromatológicos y de degradación de los carbohidratos del forraje se utilizaron para correr simulaciones con el CNCPS y hacer comparaciones en la estimación del flujo de N microbial en el duodeno.

Tabla 1. Composición química del forraje de kikuyo ofrecido a vacas Holstein durante 14 días experimentales bajo confinamiento.

Descripción	MS %	MO %	PC %	NNP ¹ %Psol	PIDA ² % PC	PIDN ³ % PC	FDN %	Lignina %	Ceniza %
Ofrecido	30.18	88.25	8.61	8.9	3.3	35.06	64.41	7.1	11.75
rechazado	47.22	---	---	---	---	---	---	---	---

1 - NNP = Nitrógeno no proteico
2 - PIDN = Proteína insoluble en detergente neutro
3 - PIDA = Proteína insoluble en detergente ácido

Para realizar la simulación con CNCPS (Fox *et al.*, 2001), se tomaron en cuenta el peso de los animales, los días posparto y la condición fisiológica, que en el caso de las vacas en estudio fue el período final de lactancia el estado de gestación. Adicionalmente, se introdujeron las variables ambientales obtenidas de la estación meteorológica del C.I. Tibaitatá. Los valores de NDT, energía y proteína degradable fueron calculados por el programa; los demás valores se obtuvieron del análisis químico de las muestras (Tabla 2).

En el experimento se utilizaron las ecuaciones de regresión encontradas por Timmerman *et al.* (2000) para calcular el flujo de nitrógeno microbiano (NM) al intestino:

$$NM \text{ (g/d)} = 119 + 23.2 * \text{alantoína (mMol/d)} - 1.5 * \text{leche, (kg/d)} \quad (r^2 = 0.44) \quad (1)$$

$$NM \text{ (g/d)} = -18.0 + 28.2 * \text{alantoína (mMol/d)} - 2.8 * \text{leche (kg/d)} + 8.0 * \text{MS (kg/d)} \quad (2)$$

En la primera ecuación se considera la leche (kilogramos por día, kg/d) como variable fija, mientras en la segunda, se introduce la variable del consumo en kilogramos de materia seca por día (MS en kg día⁻¹).

Análisis estadístico. La información se analizó para buscar diferencias entre variables bajo un diseño experimental completamente al azar. El modelo utilizado para el procedimiento GLM (*General Linear Model*) corriendo bajo SAS fue:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + \epsilon_{ij}$$

Donde, Y_{ij} son las observaciones individuales (alantoína en leche, g/d); μ , el promedio general; A_i , el efecto de vaca; B_j , el efecto día; y ϵ_{ij} el error asumido independiente y normalmente distribuido.

Para analizar la relación entre alantoína (Y), leche (X1) y consumo de materia orgánica (X2) se realizó una regresión simple sin intercepto entre variables de acuerdo con el modelo:

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 X1_i + \beta_2 X2_j + \epsilon_{ij}$$

Resultados y discusión

Comportamiento animal. El consumo de forraje por parte de las vacas fue constante durante los 14 días, con ligeras variaciones de un día a otro y una tendencia decreciente. La producción

de leche fue baja porque los animales se hallaban en la fase final de lactancia y por no haber sido suplementados con granos o concentrados (Tabla 3).

El consumo de MS estuvo dentro de lo esperado para el tamaño de los animales con un valor promedio de 12 kg d⁻¹ por vaca (2.3% del peso vivo). No hubo diferencias en consumo ni en producción de leche entre animales ($P > 0.05$).

Condiciones cromatográficas. En el estándar de alantoína se presentaron dos picos correspondientes a los isómeros cis y trans de las 2,4-difenilhidrazonas del ácido glioxílico que se forman cuando el ácido glioxílico reacciona con la dinitro-

fenilhidrazina (DNPH). Los dos isómeros se identificaron de acuerdo con el orden de elusión, como alantoína A y B. Los picos tercero y cuarto se identificaron como azul de Timol y la DNPH respectivamente. En las muestras de suero de leche solamente apareció el pico del isómero B de alantoína. También se observó un pico no identificado inmediatamente después del pico B (Figura 1). El tiempo de retención para el pico de alantoína A en el estándar fue de 6.72±0.182 min. Y para el pico B, tanto en estándar como en suero de leche, fue de 10.65±0.054 min. El azul de timol se presentó a 11.6 ± 0.01 min y el de la DNPH a los 12.28 ± 0.004 min. Los picos de la alantoína se identi-

Tabla 2. Valores de energía y proteína calculados por CNCPS (v5) en el forraje consumido por las tres vacas en el estudio.

Nutriente	Pasto Kikuyo	Sal mineral
Proteína Cruda %MS	8.6	0.00
NDT ¹ (% MS)	47	-8.00
Proteína degradable (%PC)	7.8	0.00
Energía Metabolizable (Mcal /kg)	1.64	-0.80
ENm (Mcal /kg)	1.05	-0.52
ENg (Mcal/kg)	0.00	0.00
Prot. Soluble (% PC)	40.0	0.00
NNP (% P-Sol)	10.0	0.00
PIDN ² (% PC)	15.0	0.00
PIDA ³ (% PC)	3.3	0.00

1- NDT = Nutrientes digestibles totales
2- PIDN = proteína insoluble en detergente neutro
3- PIDA = proteína insoluble en detergente ácido

Tabla 3. Comportamiento de vacas Holstein alimentadas con forraje de kikuyo bajo confinamiento. Consumo diario de materia seca.

Vaca	Consumo MS kg		Leche mañana (litros)		Leche tarde (litros)	
	Media	ds*	media	ds	media	ds
9036	12.2 ^a	0.76	3.0	0.58	2.1	0.38
9608	12.1 ^a	1.99	2.4	0.53	1.9	0.38
9022	12.3 ^a	0.79	2.0	0.00	1.3	0.49
Medias	12.2	1.25	2.5	0.601	1.8	0.54

* ds = desviación estándar

Tabla 4. Concentración de alantoína medida en suero de leche por HPLC, en cada ordeño y en el día. Los valores son promedios de siete mediciones en cada animal.

Variable	Vaca 1	Vaca 2	Vaca 3	Media**	DS
Alantoína mañana*	0.980 ^a	1.08 ^a	1.01 ^a	1.025 ^a	0.285
Alantoína tarde*	1.045 ^a	1.00 ^a	0.890 ^a	0.980 ^a	0.294
Alantoína día*	1.010 ^a	1.04 ^a	0.950 ^a	1.010	0.227

* Valores con superíndice igual en las filas no son estadísticamente diferentes ($P < 0.001$).

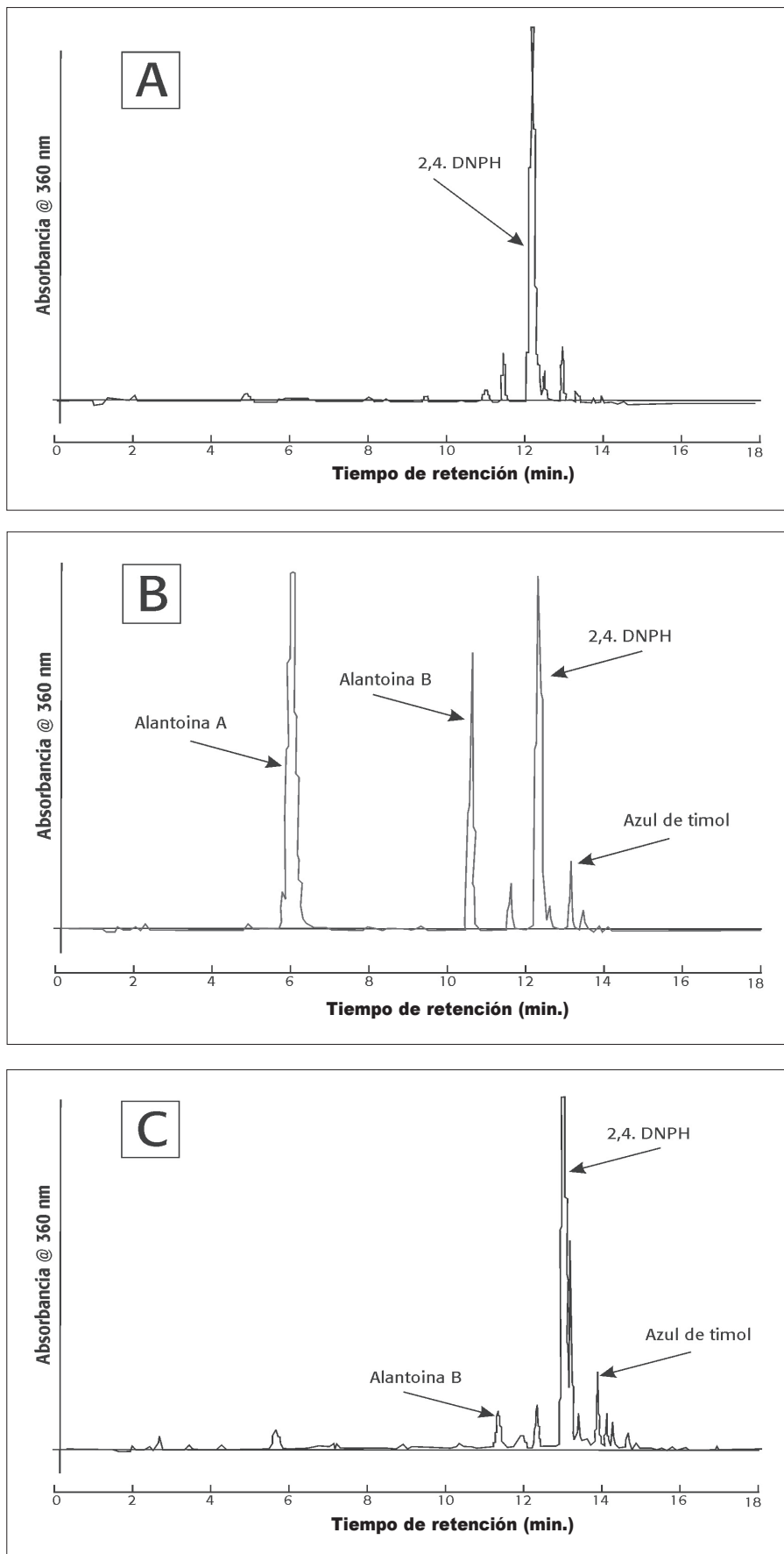


Figura 1. Cromatogramas de estándares de alantoína y de muestras de leche obtenidos con cromatógrafo Shimadzu LC-6A. (A) solventes; (B) estándar de alantoína (127 $\mu\text{Mol/L}$); (C) muestra de suero de leche.

caron mediante la adición de estándar de alantoína en concentración media y alta a una muestra de leche. Mediante esto se comprobó que los picos no identificados no corresponden a la alantoína.

La ecuación encontrada para la cuantificación de alantoína B en muestras de leche es del tipo lineal $Y = 2064X + 1764.2$ ($r^2 = 0.9991$). Para confirmar y documentar la confiabilidad de los resultados obtenidos, el método se validó mediante las pruebas de linealidad, precisión, sensibilidad y exactitud, de acuerdo con los protocolos estadísticos establecidos (Quattrocchi *et al.*, 1992). Por su parte, Czauderna y Kowalczyk (1997), utilizando derivatización con precolumna, encontraron una recuperación que oscilaba entre 95 y 106 % para alantoína y oxipurinas en plasma, concluyendo que el método era satisfactorio en precisión y sensibilidad de acuerdo con Quattrocchi *et al.* (1992).

La excreción de alantoína en leche medida por colorimetría (480 nm) fue alta pero hubo dificultades para obtener repetibilidad en los resultados. Los valores para concentración de alantoína por cromatografía en la leche de la mañana y la tarde fueron de $1.02 \text{ mg ml}^{-1} \pm 0.28$ en la leche de la mañana y $0.98 \text{ mg ml}^{-1} \pm 0.29$ en la leche de la tarde. La concentración media en los 7 días fue de $1.01 \text{ mg ml}^{-1} \pm 0.453$ para las tres vacas (Tabla 4).

Timmerman y otros (2000) encontraron una relación positiva entre alantoína en leche y flujo de nitrógeno microbial al intestino, la que fue consistente en un amplio rango de dietas y estados fisiológicos. En este trabajo no se encontró una relación positiva entre materia seca consumida, materia orgánica digerida y el N microbial calculado ($r = 0.18$, $P > 0.05$). La regresión sin intercepto entre alantoína (mMol d^{-1}), leche producida y materia orgánica consumida no tuvo correlación (leche $r = 0.134$, $P > 0.25$; MO consumida $r = 0.137$, $P < 0.002$).

Los valores para alantoína en leche encontrados fueron similares a los encontrados por Timmerman y otros (2000). La variación diaria fue alta para los días y la excreción de alantoína fue diferente entre días ($P < 0.001$) pero no entre vacas ($P > 0.65$) y tampoco por nivel de producción de leche ($p > 0.18$). La concentración de alantoína diaria fue baja, lo cual se atribuye al hecho que en la determinación, el pico de alantoína A no apareció en las muestras de leche y por lo tanto no se tuvo en cuenta. Shingfield y Offer (1998), trabajando con leche direc-

tamente a 214 nm, obtuvieron un único pico de alantoína con una recuperación del 97%. Los rangos de concentración encontrados fueron entre 60-300 $\mu\text{mol L}^{-1}$, lo cual depende de la dieta y el nivel de producción. Según estos autores, sus resultados estuvieron en acuerdo con los reportados por Giesecke *et al.* (1994). Los rangos de concentración en este trabajo estuvieron entre 2.74 y 7.99 mMol L^{-1} de alantoína (21 observaciones).

Las estimaciones para flujo de N microbial al intestino, calculadas con los modelos de Timmerman *et al.* (2000), fueron similares, pero la variación fue alta debido a diferencias entre días (Tabla 5). La estimación del N microbial, incluyendo el consumo voluntario de MS, se alejó menos (13%) de la predicción a pesar de la baja precisión en la medición de consumo y a que este es afectado por factores de manejo cuando se mide en animales confinados (Tabla 6). Timmerman *et al.* (2000) encontraron que el NM tuvo una relación significativa ($P < 0.001$) cuando se añadió al modelo el consumo de materia seca en los 10 experimentos realizados. En el presente trabajo, cuando se adicionó el consumo de materia seca al modelo, la estimación del NM fue más baja si bien presentó alta correlación con el modelo que únicamente incluía leche (Figura 2).

Nsahlai *et al.* (2000), trabajando con muestreos periódicos de la orina de novillos, no encontraron una correlación aceptable entre el total de alantoína y derivados purínicos (DP) excretados, la materia seca, la materia seca digestible y el consumo de materia orgánica, pero sí encontraron correlación entre la excreción diaria de alantoína y DP con la MO digestible consumida ($r = 0.66$ y 0.64 respectivamente). En el presente experimento no hubo correlación entre la MS consumida y la alantoína excretada en leche, o entre el nitrógeno microbial estimado y el consumo de MO. Johnson *et al.* (1998), no encontraron correlación positiva entre la alantoína excretada en orina y el N microbial en intestino a través de seis experimentos, pero sí encontraron una correlación positiva dentro de cada experimento. Sin embargo, concluyeron que la medición de alantoína en leche no es útil para predecir la producción de N microbial entre vacas a diferentes estados de lactancia. Estos resultados contradictorios entre reportes, y en los resultados encontrados, suponen necesaria la "refinación" de los actuales y el desarrollo de nuevos métodos y técnicas

Tabla 5. Cuadrados mínimos de las medias para las variables alantoína por HPLC y nitrógeno microbial calculado con los modelos 1 (variable producción de leche) y 2 (producción de leche y consumo materia seca), en suero de leche de vacas Holstein con dieta de kikuyo.

Variable	Alantoína		Flujo N microbial	
	g/d	mMol/d	modelo1 g./d	modelo2 g./d
Media general	1.01	6.4	260.4	247.5
Animal				
9022	0.95	6.01	253.7	241.0
9036	1.05	6.60	263.0	250.7
9608	1.03	6.48	264.6	250.7
día				
1	1.17	7.43	284.9	269.9
2	0.85	5.35	236.3	216.5
3	0.88	5.60	242.6	225.5
4	0.67	4.21	211.3	183.6
5	1.30	8.20	303.4	298.4
6	1.14	7.18	279.3	276.3
7	1.04	6.57	265.1	262.0

Tabla 6. Estimación del flujo de N microbial al intestino, incluyendo la variable consumo de materia seca, de acuerdo a los modelos de Timmerman *et al.* (2000). Modelo 1: regresión con leche como segunda variable independiente. Modelo 2: regresión con consumo de MS como tercera variable independiente.

Modelo	N microbial g /día
(1) $\text{NM} = 119 + 23.2 \cdot \text{alantoína (mMol d}^{-1}) - 1.5 \cdot \text{leche (kg d}^{-1})$	260.4 ± 33.1
(2) $\text{NM} = -18.0 + 28.2 \cdot \text{alantoína (mMol d}^{-1}) - 2.8 \cdot \text{leche (kg d}^{-1}) + 8.0 \cdot \text{MS (kg d}^{-1})$	247.5 ± 42.7
(3) NM según CNCPS	214.3 ± 3.8

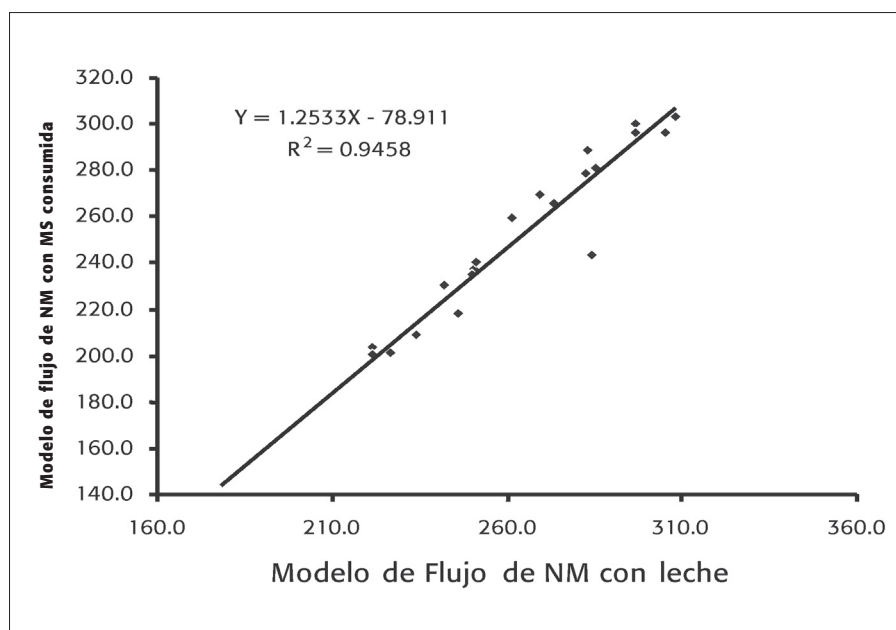


Figura 2. Relación entre los dos Modelos de Timmerman *et al.* (2000) para la estimación del flujo de nitrógeno microbial (NM) al intestino de vacas lecheras en fase final de lactancia alimentadas con pasto kikuyo.

que permitan cuantificar mejor los derivados purínicos excretados en leche.

Conclusiones

La técnica cromatográfica utilizada se acercó a los valores de la simulación y a los valores reportados por Timmerman *et al.* (2000), y en consecuencia, se puede considerar como un método aceptable para esta determinación. La simulación con CNCPS predijo unos valores más bajos con respecto a los cálculos con el modelo de Timmerman y otros, hecho que se atribuyó a una estimación menor del consumo de MS por el CNCPS (9.77 kg vs. 12.2 kg MS/día observados). Sin embargo, hubo diferencias entre los cromatogramas del estándar y las muestras de leche, en los cuales no apareció el pico del isómero A de la alantoína, lo que sugiere que la preparación del suero de leche requiere de una mejor técnica para desproteinizar y desgrasar y así evitar interferencias en la detección del metabolito por métodos cromatográficos.

La determinación de la alantoína que se excreta en la leche, como herramienta para predecir el consumo voluntario en vacas bajo pastoreo, requiere mayor investigación ya que los modelos de predicción del flujo de NM al intestino utilizados en el presente trabajo mostraron una correlación aceptable. La investigación futura en este campo requerirá, tanto medir el consumo voluntario mediante marcadores, como estimar el flujo de nitrógeno al duodeno en animales canulados y bajo un rango amplio de dietas basadas en forrajes, además de cuantificar la excreción de alantoína en orina y en leche en vacas secas y en diferentes fases de lactancia.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC. 2003. Official Methods of Analysis. 17th ed. W. Horowitz (eds.). AOAC International, 481 N. Frederick Ave., Suite 500, Gaithersburg, MD 20877-2417.

ARC. 1994. The nutrient requirements of ruminant livestock. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough. UK.

Balcels, J.J.; A. Guado; C. Castrillo and J. Gasa. 1991. Urinary excretion of allantoin precursors by sheep after different rates of purine infusion into the duodenum. *J. Agric. Sci.* 116: 309-317.

Chen, B.X.; D. J. Kylie and E. R. Ørskov. 1993. Measurement of allantoin in urine and plasma by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization. *Journal of Chromatography, B*, 617:241-247.

Czaundera, M. and J. Kowalczyk. 1997. Simultaneous measurement of allantoin, uric acid, Xantine and hypoxanthine in blood by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography, B*. 704:89-98.

Fox, D.G.; T.P. Tylutki; M.E. van Amburgh; L.E. Chase; A. N. Pell; T.R. Overton; L.O. Tedeschi; C.N. Rasmussen; V.M. Durban. 2001. The Net Carbohydrate and Protein System for Evaluating Herd Nutrition and Nutrient Excretion. Animal Science Department, Mimeo 213. Cornell University, Ithaca, N.Y. 236 p.

Fujihara, T.; E.R. Ørskov; P.J. Reeds and D.J. Kyle. 1987. The effect of Protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *J. Agric. Sci.* 109:7-12.

Johnson, L.M.; J. H. Harrison and R.E. Riley. 1998. Estimation of the flow of microbial nitrogen to the duodenum using urinary uric acid or Allantoin. *J. Dairy Sci.* 81: 2408-2420.

Giesecke, D.; L. Ehrentreich; M. Stangassinger and F. Ahrens. 1994. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:2376-2381.

Kahn, L. P. and J.V. Notan. 1993. Prediction of microbial yield from the rumen using urinary excretion of purine derivatives and studies of the kinetics of labeled purines. In: Proc. of a final research coordination meeting of an FAO/IAEA. Coordinated Research Programme. Vienna, 30 March - 3 April 1992. IAEA. pp: 109-121.

Licitra, G.; T.M. Hernandez and P.J. van Soest. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 57:374.

Mc Dowell, R.E. 1992. Dual-purpose cattle production in sustainable agriculture systems. FAO. Informe de la Mesa Redonda sobre Investigación, Capacitación y Transferencia de Tecnología en Producción Bovina de Doble Propósito en el Trópico. Veracruz, México, 12-16 Octubre, 1992. pp: 113-132.

Nsahlai, I.V.; P.O. Osuji; N.N. Umunna. 2000. Effect of form and quality of feed on the concentrations of purine derivatives in urinary spot samples, daily microbial N supply and Predictability of intake. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 85:223-238.

Quattrocchi, O.A.; Abelaira, S.I.; Laba, R. E. 1992. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Editorial Artes Gráficas S.A. Buenos Aires. Pp: 301-327.

SAS Institute. 1994. SAS /STAT User's Guide. Volume 2. GLM-VARCOMP. SAS Institute Inc., Cary, NC, pp:891-996.

Shingfield, K. J.; N.W. Offer. 1998. Determination of allantoin in bovine milk by

High-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography, B*, 706:342-346.

Storm, E.; E. R. Ørskov and R. Smart. 1983. The nutritive value of rumen microorganisms in ruminants. 2 The apparent digestibility and net utilization of microbial N for growing lambs. *Br. J. Nutr.* 52:

Subba, B. Desh, 1997. Purine nitrogen Index, a possible parameter for rapid feedevaluation in Ruminants. Thesis MSc, Department of Agriculture, University of Aberdeen, UK. Pp:1- 79.

Timmerman, S.J. Jr.; L. M. Jonson; J.H. Harrison and D. Davidson. 2000. Estimation of the Flow of microbial nitrogen to the duodenum using milk uric acid or allantoin. *J. Dairy Sci.*, 83:1286-1299.

Topps J.M. ; R.C. Elliot. 1965. Relationship between concentrations of ruminal nucleic acid excretion of purine derivatives by sheep. *Nature.* 205: 498-499.

Van Soest, P.J.; J.B. Robertson and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.

Vercoe, J.E. 1976). Urinary allantoin excretion and digestible dry matter intake in cattle and buffalo. *J. Agric. Sci. Cambridge.* 86:613-615.

Verbic, J.; X.B. Chen; N.A. Macleod and E.R. Ørskov. 1990. Excretion of purine derivatives by Ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *J. of Agric. Sci, Cambridge.* 114:243-248.

Young, E.G. and C.F. Conway. 1977. Allantoin determination. *Analytical Biochemistry*, 79:612-613.

Zinn, R.A. and F.N. Owens. 1986. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. *Can. J. Anim. Sci.* 66:157-166.