

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

EAP. DE MEDICINA VETERINARIA

**Excreción de derivados de purinas en función del nivel
de proteína dietaria en alpacas**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Viviana RUA MARTÍNEZ

ASESOR

Juan OLAZÁBAL LOAYZA

Lima - Perú

2014

DEDICATORIA

A Dios, por mantenerme en pie para seguir mi camino.

A mis padres, Romulo y Francisca por haberme apoyado siempre en esta carrera y porque siempre confiaron mi.

A mí querida abuela Julia por sus valiosos cuidados y preocupación.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Juan Olazábal, mi asesor de tesis, gracias por su gran apoyo y paciencia en todo el desarrollo de la tesis.

Al Consejo Superior de Investigaciones – UNMSM por financiar parte de la tesis.

Al Laboratorio de Bioquímica, Nutrición Animal y Alimentación Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.

Al personal del IVITA-Maranganí por su valioso apoyo.

A mis amigas Mary y Julia por su apoyo y ánimos para continuar.

CONTENIDO

| | Página |
|--|---------------|
| Dedicatoria | ii |
| Agradecimientos | iii |
| Contenido | iv |
| Resumen | vi |
| Abstrac | vii |
| Lista de cuadros | viii |
| Lista de figuras | ix |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 2.1. Proteína en los rumiantes | 3 |
| 2.1.1. Generalidades | 3 |
| 2.1.2. Metabolismo nitrogenado en rumiantes | 3 |
| 2.1.3. Síntesis de proteína microbiana | 5 |
| 2.1.3.1. Factores que influyen en la síntesis de proteína microbiana | 5 |
| 2.1.4. Importancia de la proteína microbiana | 8 |
| 2.2. Importancia de la cuantificación de la proteína microbiana | 10 |
| 2.3. Técnicas utilizadas para la cuantificación de proteína microbiana | 11 |
| 2.3.1. Técnica “in vivo” | 11 |
| 2.3.2. Marcadores microbianos | 12 |
| 2.3.2.1. Marcadores externos | 13 |
| 2.3.2.2. Marcadores internos (MI) | 13 |
| 2.4. Derivados de purinas | 14 |
| | iv |

| | |
|---|----|
| 2.4.1. Generalidades | 14 |
| 2.4.2. Origen de los derivados de purinas | 14 |
| 2.4.3. Metabolismo de las purinas | 15 |
| 2.4.3.1. Relación entre purinas absorbidas y excretadas | 16 |
| 2.4.3.2. Aporte y excreción endógena de purinas | 17 |
| 2.4.3.3. Actividad de la enzima Xantina oxidasa (XO) | 18 |
| 2.4.4. Métodos para la determinación de DP | 20 |
| 2.4.5. Ventajas y desventajas del uso de DP | 21 |
| 2.4.6. Aplicación práctica de DP | 21 |
| 2.5. Características digestivas particulares en CSA | 22 |
| 2.6. Derivados de purinas en CSA | 23 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 26 |
| 3.1. Lugar de estudio | 26 |
| 3.2. Animales experimentales y alojamiento | 27 |
| 3.3. Tratamientos | 27 |
| 3.4. Parámetros evaluados | 28 |
| 3.5. Análisis estadístico | 29 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 30 |
| 4.1. Análisis de proteína cruda en el alimento | 30 |
| 4.2. Excreción de derivados de purinas en orina. | 32 |
| V. CONCLUSIONES | 38 |
| VI. BIBLIOGRAFÍA | 39 |

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la relación de la fibra/proteína sobre la excreción urinaria de derivados de purinas (DP) en alpacas. El diseño experimental utilizado fue cuadrado latino 3 x 3. Se utilizaron tres alpacas machos, enteros, de la raza Huacaya, de 2.5 años de edad, confinados en corrales individuales. El alimento fue suministrado una vez al día y agua *ad libitum*. Los animales fueron sometidos a tres tratamientos a base de heno de avena, las diferentes relaciones de fibra/proteína se obtuvo de acuerdo a diferentes proporciones de tallos y hojas. Los tratamientos evaluados fueron: Tratamiento 1 (T1, hojas de heno de avena, 58.24 de fibra detergente neutro (FDN) y 6.8% proteína cruda (PC)); Tratamiento 2 (T2, hojas y tallo de avena, 66.31% FDN y 6.36% PC) y Tratamiento 3 (T3, tallos de avena, 70.22 FDN y 5.75% PC); cada periodo experimental tuvo una duración de 14 días, diez de acostumbramiento y cuatro de evaluación. Para determinar los niveles de DP en orina se analizaron las muestras mediante Cromatografía Líquida de Alto Performance (HPLC). Los resultados se analizaron a través de un análisis de varianza para un diseño cuadrado latino con un nivel de significación de 0.05. La excreción diaria total de DP fue de 25.51 (T1), 28.07 (T2) y 14.21 (T3) mg/d. La excreción diaria de alantoína, hipoxantina, xantina y la excreción total de DP fue igual ($P < 0.05$) en todos los tratamientos evaluados, estos resultados muestran que no existe influencia de la relación FDN/PC, en los niveles utilizados, en el alimento sobre la excreción de DP en la orina de alpacas.

Palabras clave: alpaca, relación FDN/proteína, derivados de purinas, excreción

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the effect of level of dietary protein on urinary excretion of purine derivatives (PD) in alpacas. The statistical design was Latin square. The animals were subjected to three treatments with oat hay in different proportions of stems and leaves and processed by a grinder 2 cm and separated by a sieve of 0.4 cm. with different levels of crude protein (CP). The treatments were: Treatment 1 (T1, 6.8 PC) everything that passes through the sieve of 0.4 cm); Treatment 2(T2, 6.36 PC) y Treatment 3 (T3, 5.75 PC). Each treatment lasted 14 days and the urine of 11 to 14 days was collected in an acid medium (H₂SO₄). Three male alpacas, integers, the Huacaya breed, a two year and a half old rough, confined in individual pens were used. Feed was supplied once a day and water *ad libitum*. To determine levels of DP in urine samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). Statistical analyzes were performed using PROC GLM procedures of SAS / STAT ® 9.2, with a significance level of 0.05. DP The total daily excretion (mg/d) was found T1 (25.51), T2 (28.07) y T3 (14.21). The daily excretion of allantoin, hypoxanthine, xanthine and total excretion of PD was similar (P < 0.05) in all treatments evaluated, these results show that there is no influence with different levels of PC in raw food on the excretion of PD in urine alpacas.

Keywords: alpaca, purine derivatives, protein, excretion

LISTA DE CUADROS

| | Página |
|---|---------------|
| Cuadro 1. Comparación de la composición aminoacídica de las proteínas microbianas, de la leche y la carne vacuna (Orskov, 1992) | 9 |
| Cuadro 2. Distribución de la enzima xantina oxidasa en tejidos | 19 |
| Cuadro 3. Peso de los animales utilizados | 27 |
| Cuadro 4. Composición química del heno de avena preparado de acuerdo a cada tratamiento | 31 |
| Cuadro 5. Consumo de materia seca (g/d), de fibra detergente neutro (g/d), proteína cruda (g/d), energía metabolizable (Mcal/d), relación de fibra detergente neutra y proteína cruda y relación energía/proteína | 32 |
| Cuadro 6. Excreción diaria de los derivados de purinas en orina según tratamientos (mg/d) | 34 |

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1. Relación entre excreción de derivados de purina (mg/d) y consumo de proteína cruda (g/d) de la dieta 36
- Figura 2. Relación entre excreción de derivados de purina (mg/d) y consumo de fibra detergente neutra (g/d) de las dietas evaluadas 37
- Figura 3. Relación entre excreción de derivados de purina (mg/d) y la relación FDN y PC 37

I. INTRODUCCIÓN

Los rumiantes se distinguen del resto de animales por la adaptación morfofisiológica de la parte anterior de su estómago, que les permite convertir los alimentos fibrosos y proteínas de baja calidad, incluso el nitrógeno no proteico (NNP), en ácidos grasos volátiles y proteína microbiana (PM) (Dewhurst *et al.*, 2000). Diversos estudios sobre PM en vacas y otros rumiantes, señalan que dos tercios a tres cuartos de los aminoácidos absorbidos por el rumiante derivan de la PM, por lo cual es considerada la fuente proteica primaria para estos animales (Muller, 1996). Una forma de cuantificar la producción de PM, es a través de la excreción de derivados de purinas (DP) presentes en la orina. Estos DP son productos del metabolismo de los ácidos nucleicos microbianos y están linealmente correlacionadas con la PM y la absorción diaria está directamente relacionada con la excreción diaria (Chen *et al.*, 1990a y Verbic *et al.*, 1990); además, se sabe que los ácidos nucleicos dietarios no aportan su presencia por ser degradados en el fluido ruminal (Smith y Mcallan, 1970). La cuantificación de los derivados de purinas (DP) surge como una alternativa *in vivo* no invasiva, más simple y económica, ya que no se requiere realizar procesos quirúrgicos en los animales (Tamminga y Chen, 2000).

Los camélidos sudamericanos (CSA) son fuente de fibra, carne, de trabajo y de muchos productos que son indispensables para la subsistencia de un amplio sector de la población alto andina (FAO, 2005). Actualmente, existen 3´592,349 millones de alpacas en el Perú, siendo los departamentos de Puno y Cusco los que concentran la mayor población con 1´427,816 millones y 517,965 mil respectivamente (CENAGRO, 2012). Los CSA presentan características digestivas particulares como tener una alta eficiencia digestiva con alimentos de baja calidad que está relacionada con el mayor tiempo de retención del alimento en su tracto digestivo, siendo mucho más eficientes que otros rumiantes en la extracción de proteína y energía de los forrajes de pobre calidad (San Martín y Bryant, 1989; Fowler, 1998; Sponheimer *et al.*, 2003). Así mismo, pueden reciclar un gran porcentaje de urea a través de la saliva por reabsorción pasiva en los túbulos colectores e ingresar nuevamente al sistema fermentativo, lo cual provee a la población microbiana del nitrógeno necesario, aún cuando la proteína en la dieta es limitada. A cambio, esta población le otorga al animal una calidad alta de PM (Van Saun, 2006; Cabezas, 2007). Además, los CSA pueden hidrolizar mayor cantidad de urea por unidad de tiempo (mmol/h/kg) en el compartimento uno que el bovino y el ovino en el rumen, teniendo como resultado más nitrógeno disponible para la síntesis proteica por los microorganismos (Vallenas, 1991).

Por lo antes mencionado, se planteó el siguiente trabajo, cuyo objetivo fue evaluar la relación de la fibra/proteína sobre la excreción urinaria de derivados de purinas (DP) en alpacas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Proteína en los rumiantes

2.1.1. Generalidades

Los rumiantes se distinguen del resto de los animales por la adaptación morfofisiológica de la parte anterior de su estómago, lo cual les proporciona la ventaja de no requerir proteínas de calidad específica, ya que los microorganismos del rumen digieren las proteínas del alimento y sustancias simples, como urea y otras fuentes de nitrógeno no proteico (NNP), convirtiéndolos en proteína microbiana (PM) de excelente calidad y ácidos grasos volátiles (Dewhurst *et al.*, 2000). Desde el punto de vista nutricional y económico esto se ha explotado utilizando fuentes nitrogenadas no proteicas de bajo costo, permitiendo que los microorganismos sinteticen proteína para satisfacer los requerimientos de aminoácidos del animal (Cunningham, 1999).

2.1.2. Metabolismo nitrogenado en rumiantes

El metabolismo nitrogenado en los rumiantes es el resultado principalmente de la actividad metabólica de los microbios del rumen (Prins *et al.*, 1983). La actividad degradativa de los microbios proteolíticos depende de la estructura de las proteínas, así como el pH ruminal y las especies microbianas presentes en el rumen (Huntington y Archibeque, 2000). La proteína que entra al rumen es rápidamente degradada (RDP) y la porción que no es degradada (RUDP) ingresa al intestino delgado, donde es degradada. La RDP está compuesta por la proteína verdadera y el nitrógeno no

proteico (NNP). La proteína verdadera es degradada a péptidos, aminoácidos y amonio, mientras que el NNP está compuesto del N presente en los ácidos nucleicos, amonio, aminoácidos (AA), pequeños péptidos, amidas y aminas (Bach *et al.*, 2005).

El primer paso en la degradación de la proteína ruminal es el ataque de los microbios ruminales a las partículas (Brock *et al.*, 1982). Alrededor de 30 a 50% de las bacterias ruminales que atacan la partícula alimenticia en el rumen tiene actividad proteolítica (Prins *et al.*, 1983). Las principales bacterias proteolíticas son *Prevotella spp.*, *Butyrivibrio sp.*, *Ruminobacter sp.* y *Selenomonas sp.* (Prins *et al.*, 1983). La proteína alimenticia está compuesta de varios tipos de enlaces por ello se requiere de diferentes proteasas para completar la degradación de la proteína (Wallace *et al.*, 1997). El resultante es amoniaco (NH₃), aminoácidos y péptidos dentro de la célula bacteriana. Dentro de la célula, los péptidos son degradados a AA por peptidasas intracelulares, resultando AA que junto con el NH₃ son utilizados para la síntesis de proteína microbiana. La mayoría de las bacterias ruminales no tienen un mecanismo o sistema de transporte para excretar los AA fuera de la célula, por lo tanto, los AA son desaminados a NH₃ (Tamminga, 1979). La utilización de NH₃ y AA para la síntesis de proteína microbiana o desaminación depende de la energía disponible ruminal (Bach *et al.*, 2005).

Aparte de las bacterias ruminales, los protozoarios también juegan un rol importante en la degradación ruminal de la proteína. Aunque la literatura disponible indica que los protozoarios pueden contribuir con alrededor de 20 a 70 % del total de biomasa ruminal microbiana, su contribución a la salida de proteína microbiana es muy baja por su largo intervalo generacional (6 a 60 h) y menor tasa de recambio (Jouany, 1996).

El NH₃ es absorbido a través de las paredes del tracto gastrointestinal y en promedio un 77 % es absorbido en el retículo - rumen, mientras que la siguiente parte, incluido el intestino delgado, intestino grueso y ciego sólo 33 % (Reynolds y Huntington, 1988), sin embargo, estas proporciones pueden variar con las características de la dieta (Huntington, 1989). El NH₃ absorbido por la pared ruminal llega a la sangre portal representando cerca del 50 % del total del flujo de NH₃ al hígado (Parker *et al.*, 1995). La cantidad de NH₃ absorbido a través de las paredes ruminales es determinado por factores dietarios como ruminales, siendo el más importante la proteína en la dieta que es degradada en el rumen. El NH₃ que es absorbido en la sangre portal es altamente tóxico y puede conducir a una tetania y

muerte del animal, si no se detoxifica. Por lo tanto, el NH_3 que llega al hígado en la sangre portal es detoxificado primariamente a urea en el ciclo de la ornitina (Haussinger, 1983; Haussinger *et al.*, 1992).

La urea hepática tiene dos rutas, se excreta por la orina o es reciclada al tracto gastrointestinal vía la saliva o por una transferencia directa a través de los tejidos epiteliales del tracto digestivo (Reynolds y Kristensen, 2008). Todos los mamíferos tienen un mecanismo de reciclaje de urea hacia el tracto gastrointestinal. Sin embargo, en rumiantes la cantidad de urea reciclada (como una proporción de la urea total hepática – N excretado) varía entre 29 a 99% que es mucho más grande comparado a los no rumiantes (15 a 39%). Esta transferencia de urea al rumen es muy importante en rumiantes, donde la urea puede ser usada como una fuente de N para la síntesis de proteína microbiana (Lapierre y Lobley, 2001).

2.1.3. Síntesis de proteína microbiana

La PM representa la fuente proteica más importante para el metabolismo de los rumiantes (Webster, 1993). Esta se genera de la actividad de los microorganismos ruminales, los cuales la sintetizan utilizando la energía fermentable que se encuentra presente en los alimentos consumidos, junto con los aminoácidos y/o nitrógeno no proteico, producto de la degradación de las proteínas dietarias (Webster, 1992; AFRC, 1996). De la proteína microbiana total (PMCT), un 25% se transforma en ácidos nucleicos, los cuales no pueden ser aprovechados como fuente alimentaria para los rumiantes. Así, solo un 75% de la PMCT corresponde a proteína microbiana verdadera, y de ésta solo un 85% es digestible a nivel intestinal. Por lo tanto, un 63,75% de la PMCT es realmente digestible y corresponde a la proteína microbiana digestible (Webster, 1992; AFRC, 1996). El aporte de nitrógeno microbiano (NM) al animal varía entre 14 y 60 g NM/kg de materia orgánica digestible fermentable en el rumen, variación debida a la influencia de varios factores relativos a la dieta o al ambiente ruminal (Bahadur, 1997).

2.1.3.1. Factores que influyen en la síntesis de proteína microbiana

La síntesis de PM en el rumen se ve afectada por numerosos factores de los alimentos y de los animales. Es conocido que el tipo y cantidad de nutrientes utilizables de la ración, así como, la sincronización de la liberación de dichos nutrientes

en el rumen, afectan a la magnitud de la síntesis microbiana. Actualmente es muy difícil o imposible poder cuantificar a cabalidad todos estos efectos, pero sí se pueden considerar algunos factores relevantes (AFRC, 1996): (a) el aporte de energía a los microorganismos; (b) el aporte de nitrógeno a los microorganismos; (c) el nivel de alimentación de los animales; (d) el efecto de la sincronización de las funciones ruminales y del reciclado ruminal de la PM y (e) el efecto de los factores antinutricionales.

a) El aporte de energía a los microorganismos

La energía es el factor más importante que limita la síntesis de proteína microbiana (Fébel y Fekete, 1996). Las fuentes de carbohidratos se clasifican en dos grupos: las ricas en carbohidratos no estructurales (azúcares, almidones) y las ricas en carbohidratos estructurales (pectinas, celulosa, hemicelulosa) (Patton, 1994). Las características de la fuente de carbohidratos influyen en la tasa de síntesis microbiana. Las menores tasas de crecimiento microbiano se producen cuando se emplea la celulosa como única fuente de energía, pero la degradación de los carbohidratos estructurales depende también de las cantidades de lignina que contenga el alimento (Hespell, 1988). La síntesis de proteína microbiana se incrementa muchas veces por la inclusión de moderadas cantidades de carbohidratos, fácilmente fermentables en la dieta porque aumenta la disponibilidad de sustratos y la tasa de crecimiento de las bacterias asociadas a la fase líquida de la digesta (Dewhurst *et al.*, 2000).

b) El aporte de nitrógeno a los microorganismos.

La estructura de las proteínas de la dieta define su degradación en el rumen y su aporte concreto al N disponible para los microorganismos. La velocidad y extensión de la degradación de la proteína de la dieta depende de los factores descritos anteriormente. El amoníaco es la fuente fundamental de N de los microorganismos ruminales, pero la disponibilidad en la dieta de aminoácidos, péptidos o de ambos, incrementa el crecimiento de bacterias celulolíticas y amilolíticas (Kernick, 1991). Esto puede deberse a su directa incorporación en la proteína microbiana o a que incrementan la disponibilidad de esqueletos carbonados que pueden utilizarse como fuentes de energía o para la síntesis de novo de aminoácidos microbianos (Van Soest, 1994). No se conoce la concentración óptima de péptidos que es necesaria en el rumen para maximizar la síntesis de PM (NRC, 1996). Se estima que las bacterias

necesitan 1.2 g de N/kg de materia orgánica fermentada en el rumen, pero este valor no se puede aplicar a raciones de todo tipo (Bach *et al.*, 2005).

c) El nivel de alimentación de los animales

El aumento del consumo incrementa el flujo de partículas del rumen. De esta forma aumenta el número de bacterias adheridas al alimento que sale del rumen y pasa al abomaso y al duodeno, se reduce el reciclado ruminal de la PM (Van Soest, 1994) y se incrementa el rendimiento microbiano. Sin embargo, algunas dietas altas en concentrados ricos en almidón provocan altos consumos y tienden a reducir la eficiencia de síntesis microbiana. Esto se debe seguramente a los gastos energéticos que implica el mantenimiento de la homeostasis y el pH celular, cuando el pH del rumen disminuye. Al aumentar el consumo voluntario de los animales, se incrementa el flujo de N microbiano desde el rumen (Webster *et al.*, 2003); pero no siempre se halla una correlación entre el consumo voluntario y la producción de PM (Firkins *et al.*, 1984). Se encontró que el suministro de PM al duodeno se incrementaba linealmente, al aumentar el nivel de consumo voluntario. Sin embargo, al expresar el rendimiento microbiano, en función del consumo de materia orgánica digestible, el nivel de consumo no mostró efecto en la producción de PM (Singh *et al.*, 2007).

d) Efecto de la sincronización de las funciones ruminales y del reciclado ruminal de la proteína microbiana.

La síntesis de proteína microbiana se puede maximizar, si se sincroniza la disponibilidad de energía fermentable y de N degradable para los microorganismos en el rumen (Orskov, 1992). Cuando la tasa de degradación de la proteína excede la de los carbohidratos, se pierden grandes cantidades de N en forma de NH_3 . Sin embargo, cuando la tasa de degradación de los carbohidratos excede la de la proteína, la producción de PM puede decrecer (Nocek y Russell, 1988). La fermentación de los carbohidratos tiene poca influencia en la tasa de degradación de las proteínas por las proteasas extracelulares (Fébel y Fekete, 1996). Sin embargo, la degradación ruminal de los carbohidratos aporta la energía en forma de ATP que requieren los microorganismos para su metabolismo. Por tanto, define si los péptidos y aminoácidos que se producen durante la degradación extracelular de las proteínas de la dieta se incorporan a las rutas catabólicas o anabólicas del metabolismo microbiano. Hay contradicciones en la literatura acerca del efecto de la sincronización del suministro de

las fuentes de proteína y carbohidratos. Estudios *in vivo* han indicado respuestas positivas al sincronizar mejor la disponibilidad de N y energía (Matras *et al.*, 1991), mientras que otros realizados *in vitro* no informan efectos satisfactorios (Newbold y Rust, 1992).

e) Efecto de los factores antinutricionales.

Los factores antinutricionales más estudiados son los taninos, aunque existen muchos otros metabolitos secundarios de las plantas que pueden influir en las poblaciones microbianas ruminales (Marrero *et al.*, 2002). Este es el caso de las saponinas, los compuestos cianogénicos y aminoácidos no proteicos, las lectinas, los alcaloides y el ácido oxálico (Kumar y D'Mello, 1995), además de los flavonoides y esteroides (Galindo *et al.*, 2000b). Los taninos afectan la síntesis de PM de diferentes formas (Makkar, 2003), sea directamente por su acción en los microorganismos ruminales (Marrero *et al.*, 2002) o por su interacción con los nutrientes de los cuales dependen para el suministro de energía y N (Hedqvist, 2004). Por su acción bacteriostática y bactericida (Makkar, 1993), estos compuestos afectan la tasa de crecimiento y la síntesis de PM (Min *et al.*, 2002), aunque los mecanismos son menos conocidos que sus reacciones con las proteínas de la dieta (Min *et al.*, 2002). Estudios recientes muestran que muchos metabolitos secundarios de las plantas tienen potencial para modificar favorablemente la fermentación ruminal, cuando se utilizan en concentraciones relativamente bajas. En dosis adecuadas, la eficiencia de síntesis microbiana y el rendimiento microbiano se incrementa al incluir saponinas (Hess *et al.*, 2003) o taninos condensados (Puchala *et al.*, 2005).

2.1.4. Importancia de la proteína microbiana

Los aminoácidos producidos por los microorganismos en el rumen están disponibles para el animal en el intestino delgado, cuando la PM fluye con la digesta hacia las partes bajas del tracto gastrointestinal (Nolan y Dobos, 2005). La proteína metabolizable de los microorganismos ruminales tiene una composición estable, similar a la proteína no degradable de los pastos y tiene un perfil de aminoácidos variable, pero generalmente adecuada (Storm y Orskov, 1983). La importancia de la proteína microbiana en la nutrición de los rumiantes es debido a su composición aminoacídica, similar a la proteína de los principales productos animales (Verbic,

2002). El cuadro 1, muestra la composición aminoacídica de la proteína microbiana, con respecto a la de los aminoácidos de la leche y la carne vacuna.

Cuadro 1. Comparación de la composición aminoacídica de las proteínas microbianas, de la leche y la carne vacuna (Orskov, 1992)

| Aminoácidos(AA) | Proteína microbiana, g AA/100 g proteína | Leche, g/16g N | Músculo, g/16g N |
|------------------------|---|---------------------------|-----------------------------|
| Isoleucina | 5.8 ± 0.7 | 5.6 | 5.1 |
| Leucina | 8.0 ± 0.8 | 10.2 | 8.0 |
| Lysina | 9.2 ± 1.8 | 8.2 | 9.1 |
| Metionina | 2.5 ± 0.6 | 2.9 | 2.7 |
| Cisteína | 1.4 ± 0.9 | 1.0 | 1.3 |
| Fenilalanina | 5.3 ± 0.7 | 5.4 | 4.5 |
| Tirosina | 4.9 ± 0.6 | 4.5 | 3.8 |
| Treonina | 5.7 ± 0.8 | 5.0 | 4.6 |
| Triptófano | 1.5 ± 0.8 | 1.4 | 1.3 |
| Valina | 5.8 ± 0.9 | 7.4 | 5.3 |
| Arginina | 5.3 ± 1.0 | 4.0 | 6.7 |
| Histidina | 2.1 ± 0.5 | 3.0 | 3.7 |
| Alanina | 6.8 ± 1.6 | 3.8 | 6.4 |
| Ácido Aspártico | 11.9 ± 1.6 | 8.5 | 9.6 |
| Ácido Glutámico | 12.4 ± 2.3 | 23.0 | 17.3 |
| Glycina | 5.4 ± 0.5 | 2.2 | 5.6 |
| Prolina | 3.6 ± 1.1 | 9.4 | 5.1 |
| Serina | 4.7 ± 0.6 | 5.9 | 4.5 |
| Ácido Diaminopimérico | 0.8 ± 0.3 | 0 | 0 |

La digestibilidad neta de los aminoácidos en el intestino delgado es de aproximadamente 85%. Los aminoácidos microbianos que se absorben son utilizados por el animal en un 80% (Storm *et al.*, 1983).

2.2. Importancia de la cuantificación de la proteína microbiana

La cuantificación de la PM ha recibido interés por ser una proteína de alta calidad y bajo costo. Se cuantifica la síntesis de PM para estimar cuánto de la proteína de la dieta consumida por el animal, posteriormente degradada en el rumen, es convertido en PM, permitiendo evaluar así la calidad nutritiva de las dietas, ya que esta PM satisface las necesidades de mantención, crecimiento y producción del animal, debido a su alta digestibilidad (Timmermans *et al.*, 2000).

La cuantificación del contenido de proteína microbiana ruminal es un área importante en el estudio de la nutrición proteica de los rumiantes (Valadares *et al.*, 1999), ya que permite predecir el aporte proteico del ambiente ruminal al intestino delgado, con el fin de corregir problemas en la dieta y utilizar de mejor forma el nitrógeno que entregan los forrajes y las fuentes de proteína de mayor costo económico (Dewhurst *et al.*, 2000).

Por ejemplo, en sistemas de producción del trópico, donde los alimentos fibrosos son la base de la dieta, la PM puede aportar el 100% de la proteína disponible para el rumiante (Orskov, 1992). El conocimiento de la cantidad de PM que se sintetiza en estos sistemas permitirá hacer un uso más eficiente de los pastos y forrajes como alimento básico de los rumiantes en esta región, así como de los suplementos (follaje de arbustos y árboles, residuos de cosecha, bloques multinutricionales y concentrados). De esta forma incide positivamente en la competitividad económica y ambiental de la producción ganadera (Posada *et al.*, 2005).

2.3. Técnicas utilizadas para la cuantificación de proteína microbiana

Resulta difícil cuantificar la síntesis microbiana y su flujo desde el rumen, debido a la complejidad del sistema ruminal. A esto se adicionan los problemas técnicos para obtener muestras representativas de la digesta que llega al intestino y del total de microorganismos ruminales. También resulta complejo determinar la cantidad de digesta que fluye del rumen al duodeno y la proporción de PM en la proteína que sale del rumen (Dewhurst *et al.*, 2000).

Existen diversas técnicas para estimar la síntesis de proteína microbiana, entre las que se encuentran:

- Técnica “*in vitro*”, la cual pretende simular las condiciones del rumen, incubando una muestra de alimento con licor buffer ruminal (Miller, 1982).
- Técnica “*in situ*”, permite estimar la concentración de proteína degradable ruminal, incubando alimento en bolsas que se introducen en el rumen (Hvelplund y Weisbjerg, 2000).
- Técnica “*in vivo*”, mide la PM producida en el rumen y la proteína dietaria que se escapa de la degradación ruminal (AFRC, 1996), mediante el uso de cánulas post-ruminales o de animales fistulados (Miller, 1982; Vagnoni *et al.*, 1997; Tamminga y Chen, 2000). Debido a la gran importancia que ha adquirido el bienestar animal en estos últimos años, esta técnica ha recibido rechazo y permitió el desarrollo de métodos no invasivos para la cuantificación de la PM.

2.3.1. Técnica “*in vivo*”

Las técnicas que utilizan animales vivos posibilitan la medición de la PM producida a nivel ruminal, lo que permite calcular su producción efectiva (Webster, 1992; AFRC, 1996) y además, se puede ponderar cuánto es el pasaje ruminal de proteína no degradada desde los alimentos de la dieta al intestino (Santos *et al.*, 1998).

En las canulaciones, generalmente se utilizan animales provistos de cánulas en el rumen y el duodeno, y se determina el flujo duodenal de N no amoniacal (NNA). Posteriormente, es necesario diferenciar el origen del N (microbiano, alimenticio y

endógeno), y para ello se determina la relación marcador/N en la digesta duodenal y en una muestra de microorganismos aislados del rumen o del duodeno de los animales. La relación entre ambos valores (marcador/ N en la digesta duodenal / marcador/N en los microorganismos) representa la fracción nitrogenada de la digesta duodenal que es de origen microbiano. El resto del N que llega al duodeno corresponde a la fracción proteica del alimento no degradada en el rumen y a las secreciones y descamaciones endógenas. Estas técnicas son en exceso trabajosas, requieren de mucho tiempo o de animales preparados quirúrgicamente (Stangassinger *et al.*, 1995; Vagnoni *et al.*, 1997), invasivas, costosas, tediosas y sujetas a error (Tamminga y Chen, 2000), poco concordantes con la preocupación actual por el bienestar animal (Orskov, 2000), reduce el número de animales que se pueden emplear por experimento y crea problemas de baja replicación (Dewhurst *et al.*, 2000).

Existen también métodos que no requieren animales canulados, siendo el más conocido el que se basa en la medición de los derivados púricos en la orina. Es más simple, pues solo requiere la colección total de orina que refleja los cambios en la eficiencia de digestión y absorción de proteína microbiana, no requiere de procesos quirúrgicos en los animales, se requiere contar con instrumental de laboratorio como un espectrofotómetro ultravioleta o un cromatógrafo (Tamminga y Chen, 2000). Este método muestra un gran potencial para simplificarse hasta la recolección parcial de orina, de modo que puede utilizarse en estudios en condiciones de campo (Posada *et al.*, 2005). Esta metodología es recomendada por numerosos autores, que la han utilizado con un alto nivel de confiabilidad y repetitividad en diversos experimentos, ya sea con colección total de orina o a través de la toma de muestras puntuales, en diferentes especies de rumiantes, especialmente bovinos y ovinos (Verbic *et al.*, 1990; Timmermans *et al.*, 2000).

2.3.2. Marcadores microbianos

El marcador (M) debe ser un metabolito que se excrete de manera constante por la orina, que sea independiente tanto del consumo de alimento como de la producción y de la digestión de los MR. Así, es posible expresar la excreción de los DP como la tasa DP/M y a partir de ésta es posible calcular el total de los DP excretados diariamente (Faichney *et al.*, 1995).

Un marcador microbiano «ideal» debería cumplir los siguientes requisitos: (1) ser fácil de determinar y cuantificar, (2) no formar parte de los alimentos que reciben los animales, (3) distribuirse de manera uniforme en todas las especies microbianas ruminales y (4) ser biológicamente estable. Dehority (1995) añade otros 3 requisitos: (5) no ser absorbido en el tracto digestivo, (6) estar en una proporción constante en los microorganismos ruminales en todas las fases de su crecimiento y (7) que todas sus formas (p.e. libre o formando parte de células intactas de microorganismos ruminales o de alguna de sus partes) presenten el mismo ritmo de tránsito a través del tracto digestivo (Broderick y Merchen, 1992).

2.3.2.1. Marcadores externos

Los principales marcadores externos son ^{15}N , ^{35}S y ^{32}P , aunque en algunos estudios se ha determinado la incorporación de compuestos marcados con ^3H y ^{14}C (Chikunya y Miller, 1998). Estos marcadores deben administrarse a los animales para que sean incorporados por los microorganismos ruminales y formen parte de sus estructuras.

El procedimiento más empleado consiste en realizar una infusión continua del marcador en el rumen de los animales durante el período experimental hasta que se alcanzan condiciones de equilibrio («steady state»).

2.3.2.2. Marcadores internos (MI)

La principal característica de los marcadores internos es que son constituyentes de las células microbianas y por ello no necesitan ser administrados a los animales experimentales (Carro, 2001).

Los principales marcadores internos son los ácidos nucleicos (ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN)), las bases púricas (purinas), el ácido diaminopimélico (DAPA), la D-alanina, el ácido aminoetilfosfónico (AEPA), los perfiles de aminoácidos y el ATP (Carro, 2001). Otro metabolito que cumple con los requisitos para ser considerado como MI es la creatinina, ya que se produce a una tasa constante a partir de la fosfocreatina y es distribuida a través del agua corporal (Finco, 1980) y según Brody (1945) es excretada en proporción al peso vivo (N-Creatinina (mg/d) = $12.7 \text{ PV}^{0.896}$) dentro de un amplio rango de pesos (0.02 a 800 kg de PV), es independiente de la dieta (Lindberg y Jacobson, 1990) y se excreta a una tasa constante con un baja variabilidad durante el día (Antoniewicz, 1981; Lindberg, 1989).

2.4. Derivados de purinas

2.4.1. Generalidades

Los derivados de purinas (DP) son metabolitos que se originan de la degradación de las purinas, tanto de origen endógeno como exógeno. Estos DP son la alantoína, el ácido úrico, la xantina e hipoxantina, los cuales son excretados en la orina (Fujihara *et al.*, 1987; Sandoval y Herrera, 1999).

Topps y Elliot (1965) fueron los primeros en demostrar que existía una correlación positiva entre la cantidad de alantoína y ácido úrico excretado en orina y el flujo de ácidos nucleicos al duodeno. Posteriormente numerosos trabajos han demostrado que existe una alta correlación entre la infusión abomasal de ácidos nucleicos con la excreción de los DP urinarios. (Giesecke *et al.*, 1984; Balcells *et al.*, 1991). También se ha demostrado una alta correlación entre la excreción de los DP con la infusión abomasal de microorganismos exógenos (Verbic *et al.*, 1990) y con el consumo de alimento en vacas (Gonda *et al.*, 1994), en cabras (Lindberg, 1985) y en ovejas (Chen *et al.*, 1992b).

La determinación de DP surgió como una alternativa de gran precisión y utilidad, no invasiva, éticamente adecuada y concordante con los derechos de los animales, se ha desarrollado el método de la cuantificación diaria de la excreción urinaria de los derivados de purina, los que permiten calcular la producción de proteína microbiana por fórmulas que emplean dichas cuantificaciones (Vercoe, 1976; Antoniewicz y Pisulewski, 1982; Tamminga y Chen, 2000).

2.4.2. Origen de los derivados de purinas

Los DP excretados en orina se originan de tres fuentes posibles:

- i) Bases púricas de microorganismos ruminales.

Los derivados de purina de origen exógeno provienen mayoritariamente de la degradación de bases púricas, a nivel hepático e intestinal, de ácidos nucleicos de los microorganismos ruminales absorbidos (Smith y McCallan, 1970; Verbic *et al.*, 1990).

ii) Purinas dietéticas.

Sólo una reducida fracción de derivados de purina exógenos proviene de bases púricas del alimento (Verbic *et al.*, 1990). A partir de los estudios de McAllan en 1980 y 1982, se ha considerado que los ácidos nucleicos de origen dietético son degradados en el rumen, y por lo tanto tienen una contribución nula a la excreción de DP. Sin embargo, varios trabajos han demostrado que los DP pueden tener como origen purinas dietéticas que escapan a la digestión ruminal (Perez *et al.*, 1996b). Por tanto, el flujo de purinas dietéticas a intestino delgado dependerá de la naturaleza del sustrato. Así, un alimento sobrepasante y con alto contenido de ácidos nucleicos (por ejemplo; harina de pescado, harina de carne) poseen el potencial de permitir que las purinas resistan el ataque microbiano en rumen y sean sobrepasantes, por ejemplo, 10% harina de pescado y/o carne como suplemento en la dieta resultaría en aproximadamente 6-10% de purinas en duodeno de origen dietético (Perez *et al.*, 1996b). En animales en pastoreo y/o con bajo nivel de suplementación la contribución de purinas dietéticas será nula o mínima.

iii) Purinas de origen endógeno, provenientes de purinas catalizadas en todas las zonas tisulares del organismo animal (McAllan y Smith, 1973; Verbic *et al.*, 1990).

2.4.3. Metabolismo de las purinas

Las exigencias o demandas proteicas de los rumiantes son atendidas mediante absorción intestinal de los aminoácidos provenientes principalmente de la proteína microbiana sintetizada en el rumen y de la proteína dietética no degradada en el rumen (Valadares Filho, 1995). Las purinas son absorbidas prontamente como nucleótidos y bases libres en el lumen del intestino delgado (Stangassinger *et al.*, 1995). Estas purinas absorbidas se transportan hasta el hígado, donde tiene lugar su utilización y degradación. Tras su metabolismo, las purinas se excretan en la orina en forma de alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina, aunque en el ganado vacuno las cantidades de estos dos últimos compuestos son insignificantes (Verbic *et al.*, 1990). La xantina oxidasa es una enzima clave en la degradación de las purinas, tanto en la sangre como en los tejidos, por intermedio de esta la hipoxantina y xantina son convertidas a ácido úrico, siendo este último degradado a alantoína por la acción de la

uricasa, previo a su excreción por la orina (Chen y Gomes 1992a; Lehninger, 1995). La xantina e hipoxantina como tal, no están disponibles para ser utilizadas por el tejido animal (Verbic *et al.*, 1990).

La principal vía de eliminación de los DP es la vía urinaria. Sin embargo algunos de los DP en la sangre también pueden ser eliminados por vía digestiva (vía saliva o a través de la pared intestinal) y por la glándula mamaria a través de la leche, pero cuantitativamente representan una pequeña proporción (Chen *et al.*, 1990a). Una vez que el ácido úrico y la alantoína son secretados dentro del intestino delgado, ya no pueden volver a ser reabsorbidos por el organismo. La cantidad de derivados de purinas eliminados por la vía no renal es función de la concentración plasmática de DP, siendo proporcional a la cantidad de DP que entra a la sangre. Su eliminación se efectúa a una tasa constante de clearance, de cerca de 30% a la hora (Chen y Gomes, 1992).

2.4.3.1. Relación entre purinas absorbidas y excretadas

Las purinas que llegan al duodeno pueden ser absorbidas y posteriormente reutilizadas por el animal o metabolizadas y excretadas en la orina en forma de alantoína y otros metabolitos (McAllan, 1982). Es importante destacar que la extensión de esta degradación enzimática determina los niveles de disponibilidad metabólica de las purinas a ser utilizadas posteriormente por los animales (Stangassinger *et al.*, 1995).

Los DP excretados diariamente están relacionados directamente con la cantidad de purinas absorbidas (cantidad de ácidos nucleicos microbianos absorbidos) por el duodeno y por lo tanto, con la síntesis de proteína microbiana en los rumiantes (Rys *et al.*, 1975; Chen *et al.*, 1991).

Los derivados de purinas excretados en la orina de rumiantes incluyen alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina (Fujihara *et al.*, 1987). Estos cuatro están presentes en la orina de ovinos, caprinos y cérvidos y llamas, sin embargo, solamente se ha encontrado alantoína y ácido úrico en cantidades significativas en la orina de los bovinos y bubalinos. La xantina e hipoxantina no se encuentran presentes en cantidades significativas en la orina de los bovinos y bubalinos, al estar sujetas a la degradación de una amplia variedad de enzimas específicas como guanina

deaminasa, adenosina deaminasa y xantina oxidasa, durante su paso por la mucosa intestinal (Chen *et al.*, 1990a; Stangassinger *et al.*, 1995). En consecuencia a la alta actividad de la xantina oxidasa en la mucosa intestinal, las bases púricas son degradadas a sus derivados más distantes: ácido úrico que posteriormente es convertido en alantoína previo a su excreción. En los bovinos, por tanto, la xantina e hipoxantina no están disponibles para ser utilizadas por el tejido animal (Verbic *et al.*, 1990). Consecuentemente, la alantoína es el DP más importante en los bovinos (Bargo *et al.*, 2002), encontrándose entre un rango descrito para vacas de 89 a 97% (Vagnoni *et al.*, 1997). Respecto a los ovinos la concentración de xantina oxidasa en el tejido es mínima (Chen y Gomes, 1992).

2.4.3.2. Aporte y excreción endógena de purinas

La fracción endógena proviene de los ácidos nucleicos de los tejidos. Su magnitud no es constante entre especies (Orellana *et al.*, 2001), ni dentro de una misma especie (Liang *et al.*, 2004) y no se sabe si es afectada por la producción o por el estado fisiológico de los animales (Gonzalez-Ronquillo *et al.*, 2003).

Existen diversos estudios donde el aporte endógeno de derivados de purinas ha sido evaluado para diversos rumiantes (Lindberg, 1985; Chen *et al.*, 1990a) y es claro ahora que la excreción endógena es mayor en bovinos (0.450-0.560 mmol/kg PV^{0.75}) comparada con la de ovinos y caprinos (0.170-0.200 mmol/kg PV^{0.75}). Existe un efecto (aunque limitado) del aporte de nutrientes sobre la excreción endógena de DP (Giesecke *et al.*, 1984). La excreción endógena está relacionada con el peso metabólico del ganado. Así, cuando éste se ve incrementado, también genera similar efecto en dicha excreción endógena (Chen *et al.*, 1992a). La diferencia en el metabolismo de las purinas ha establecido, que ovinos y *Bos taurus* difieren en cuanto al nivel de excreción endógena de purinas y en la habilidad de utilizar las purinas de origen exógeno. Entonces la excreción de DP provee una medida de la cantidad de ácidos nucleicos microbianos absorbidos por el duodeno y por lo tanto, de la síntesis de PMC en los rumiantes (Rys *et al.*, 1975; Chen *et al.*, 1996).

A pesar de que diferentes grupos de trabajo han determinado valores similares para la excreción urinaria endógena de DP en el ganado ovino, no se conoce bien como se ve afectada esta excreción cuando los animales reciben raciones de diferente calidad y/o a diferentes niveles de ingestión (Balcells *et al.*, 1991).

La excreción urinaria de DP de origen endógeno disminuye a medida que el animal dispone de purinas de origen exógeno (Chen *et al.*, 1992b). Sin embargo, en un estudio más reciente, observaron que la excreción endógena de DP aumentaba al hacerlo la cantidad de concentrado ingerida por los animales, y aumentar por ello el flujo duodenal de purinas (Pérez *et al.*, 1998b). Aunque la contribución de las purinas de origen endógeno a la excreción urinaria de DP es proporcionalmente pequeña (Chen *et al.*, 1992b), una cuantificación precisa de su contribución bajo diferentes circunstancias alimenticias permitiría obtener estimaciones más exactas del flujo duodenal de N microbiano (Stangassinger *et al.*, 1995).

En la orina de los bovinos, tanto las purinas endógenas como las exógenas poseen una composición similar, de aproximadamente 85% de alantoína y 15% de ácido úrico.

2.4.3.3. Actividad de la enzima Xantinoxidasa (XO)

La xantinoxidasa es una enzima altamente versátil que se distribuye extensamente entre especies (de bacterias al hombre) y dentro de varios tejidos en los mamíferos. La XO tiene un papel importante en el catabolismo de las purinas porque cataliza la hidroxilación de purinas, y en particular, de xantina a ácido úrico. La enzima tiene dos formas: la xantinoxidasa y la xantina deshidrogenasa (XDH), y en los mamíferos XDH se puede convertir en XO de forma reversible o irreversible. La XDH/XO cataliza las reacciones de conversión de hipoxantina a xantina, y de xantina a ácido úrico, transfiriendo y aceptando electrones NAD⁺/ oxígeno molecular, y generando radicales libres H₂O₂/O₂ (Li, 2001).

Al-Khalidi y Chaglassian (1965), encontraron que la XO presentaba una alta distribución en los tejidos de los diferentes animales en estudios. Entre los mamíferos examinados la oveja, cerdo gato, camello y cabra tuvieron bajas actividades de enzima sérica en comparación con las observadas en humanos. En contraste, los sueros de vaca, perro y ratón fueron ricos en esta enzima. En el gato, perro vaca y oveja se demostró que la enzima fue abundante en el hígado, mientras que fue escasa en corazón, músculo y cerebro. En la vaca y el perro existió una amplia distribución de la enzima especialmente con valores altos en el pulmón, además en la vaca, en la

mucosa intestinal, el bazo y el riñón también tuvieron cantidades apreciables de la enzima.

En camellos la actividad de la XO fue detectada en hígado (0.038 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) y mucosa intestinal (0.0047 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$), pero estaba ausente en el plasma (IAEA, 2002).

Rivera *et al.*, (2004) en un trabajo con alpacas donde usaron como marcador microbial ^{15}N , determinó la distribución de la enzima xantinoxidasa (XO) en distintos tejidos, estando mayoritariamente en el plasma 0.5770mUE/mL/min, seguido del intestino con 0.3645mUE/g/min, hígado con 0.2908mUE/mL/min y riñón con 0.0441mUE/g/min.

Cuadro 2. Distribución de la enzima xantinoxidasa en tejidos

| Distribución de xantinoxidasa | Alpaca¹ | Ovino² | Bovino² |
|--------------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Suero^a | 0.5770 | 0 | 142 |
| Intestinos^b | 0.3645 | 0.058 | 12 |
| Hígado^b | 0.2908 | 12 | 29 |
| Riñón^b | 0.0541 | 0.0035 | 1.7 |

^a mUE/mL/min; ^b: mUE/g/min.

¹ Rivera *et al.*, 2004

² Al-Khalidi y Chaglassian, 1965

Los valores encontrados fueron levemente superiores a lo reportado en ovinos e inferiores a lo encontrado en bovinos en estudios realizados por al-Khalidi y Chaglassian (1965). La actividad de la enzima XO en los diferentes tejidos en alpacas, explicaría la presencia de todos los DP y la alta proporción de alantoína (Rivera *et al.*, 2004).

2.4.4. Métodos para la determinación de DP

Debido a la gran importancia que ha adquirido el bienestar animal en estos últimos años, se ha desarrollado un método no invasivo para la determinación de la proteína microbiana a partir de la excreción urinaria de los DP es hoy una técnica de uso rutinario en bovinos, ovinos y caprinos (Tamminga y Chen 2000). Este modelo ha sido posible dado que se han identificado los DP en estas especies y se han determinado las relaciones entre la infusión de bases púricas y su recuperación urinaria como DP así como también se ha cuantificado la contribución endógena y la recuperación para resíntesis de ácidos nucleicos del animal (síntesis de rescate) (Chen *et al.*, 1990b).

La determinación de DP es un indicador útil en estudios de nutrición de rumiantes, ya que a partir de ellos es posible calcular la cantidad de ácidos nucleicos microbianos metabolizados por el animal obtenidos de los microorganismos ruminales (MO). Por medio de la excreción de los DP y de la tasa en que se encuentra el nitrógeno de las purinas con respecto al nitrógeno proteico microbiano, es posible estimar la síntesis de nitrógeno proteico microbiano que se realiza en el rumen (Chen y Gomes, 1992). Al relacionar la síntesis de nitrógeno microbiano con la cantidad de alimento consumido, se obtiene el rendimiento (K) de nitrógeno proteico microbiano, el que normalmente se expresa como: K de nitrógeno microbiano/kg materia seca (NM/MS) o nitrógeno microbiano/kg de materia orgánica (NM/MO) o bien como nitrógeno microbiano/kg de materia orgánica degradable en el rumen (NM/MODR) (Chen *et al.*, 1992a).

Una de las principales ventajas de las purinas como marcador microbiano es que su análisis por el método de Zinn y Owens (1986) es simple, rápido y barato. El método consiste en hidrolizar las purinas mediante su tratamiento con una solución de ácido perclórico, seguido por la precipitación de las mismas con nitrato de plata y su cuantificación mediante espectrofotometría. Sin embargo, se observó que la recuperación de purinas de extractos bacterianos ruminales que habían sido añadidos a celulosa, almidón y fibra neutro-detergente era solamente del 50 % cuando se usaba este método (Makkar y Becker, 1999), y propusieron la utilización de la técnica descrita por Balcells *et al.*, 1992 para obtener una recuperación de las purinas cercana al 100 %. Dicha técnica utiliza la cromatografía líquida de alto performance (HPLC), por lo que para llevar a cabo los análisis de purinas se necesita disponer de un equipo de HPLC.

La técnica para obtener la totalidad de los DP excretados diariamente requiere la recolección diaria total de orina, pero para poder hacerla aplicable en animales en producción es necesario simplificarla hasta el punto que sólo baste obtener muestras puntuales de orina. Esta simplificación es posible, ya que la producción de los DP es constante durante el día (Chen *et al.*, 1992a) y la dilución de la orina es posible corregirla mediante la concentración de la muestra urinaria con un marcador interno o externo.

2.4.5. Ventajas y desventajas del uso de DP

i. Ventajas

La utilización de la excreción urinaria de DP para estimar el flujo duodenal de nitrógeno microbiano presenta varias ventajas respecto a otros métodos.

Es una técnica no invasiva, con lo cual los posibles trastornos en el comportamiento alimentario de los animales o en su motilidad digestiva (producidos por la implantación de cánulas) quedan descartados. Por otra parte, esta técnica es relativamente fácil de llevar a cabo en la mayoría de las circunstancias, ya que únicamente se necesita realizar la recogida de la orina de los animales (Carro, 2001)

ii. Desventajas

Se han identificado que existen varias posibles fuentes de error en el método de los derivados de purina, debido a variaciones en: (a) contenido de purina de los microorganismos ruminales, (b) purinas del alimento que escapan a la degradación ruminal, (c) excreción endógena de derivados de purina y (d) distribución variable de derivados de purina entre distintos órganos corporales, como la glándula mamaria, hígado y tracto digestivo (Shingfield y Offer, 1998).

2.4.6. Aplicación práctica de DP

La posibilidad de estimar el flujo duodenal de N microbiano a partir de la concentración de alantoína en la leche (se ha observado que el ácido úrico excretado

en la leche procede en su mayoría del metabolismo de la glándula mamaria (Giesecke *et al.*, 1994)) es especialmente interesante, ya que en las vacas lecheras interesa lograr un alto ritmo de síntesis de proteína microbiana debido a la repercusión que tiene la nutrición proteica no sólo en la producción de leche, sino también en la función reproductora (Ferguson y Chalupa, 1989). Si bien los resultados obtenidos son sólo aproximados, esta técnica resulta muy útil en aquellos casos en los que no se puede predecir la síntesis de proteína microbiana porque no se conoce la energía ingerida por los animales (p.e. cuando los animales reciben forrajes), y no resulta complicado llevarla a cabo, ya que el muestreo de la leche durante el ordeño es una práctica habitual (Stangassinger *et al.*, 1995).

2.5. Características digestivas particulares en CSA

En general, los CSA poseen características digestivas propias. Así, su estómago tiene una actividad más continua que la observada en otros rumiantes y su motilidad es muy diferente a la del retículo-rumen de los rumiantes avanzados (Vallenas, 1965).

Las alpacas están provistas de mecanismos tamponantes más eficientes que los ovinos; a similares concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGV) el pH de ovinos es más bajo que el de alpacas (Vallenas, 1965). Esta condición permitiría a las alpacas tener una mayor producción bacteriana debido a que las condiciones ácidas incrementan los requerimientos energéticos de mantenimiento de las bacterias presentes en el estómago y, además, las bacterias celulolíticas son más sensitivas y tienen una menor producción a bajo pH (San Martín, 1999).

Estudios comparativos entre CSA y otros rumiantes señalan que los CSA retienen el alimento en el tracto digestivo por un mayor tiempo. Se han estimado tiempos de retención del alimento en alpacas de 50.3h, mientras que en ovinos son de 43.2 h. Comparaciones entre llamas y ovinos usando un marcador de la fase sólida dan mayor tiempo de retención en llamas (62 h) que en ovinos (41 h) (San Martín y Bryant, 1988). Las llamas retienen partículas grandes por un periodo de tiempo mayor que el vacuno y el caballo. Así, se señala que el tiempo de retención en llamas para partículas de 0.2-1.0cm es de 60 h (Clemens y Stevens, 1980).

Pruebas comparativas de digestibilidad *in vivo* conducidas entre alpacas y ovinos, así como entre llamas y ovinos, muestran que donde el alimento suministrado tenía menos de 7.5% de proteína cruda la digestibilidad fue mayor en alpacas, y, en aquellas en que el contenido proteico fue mayor que 10.5% no se obtuvieron diferencias (San Martín, 1996). Adicionalmente, pruebas comparativas de digestibilidad *in vivo* entre llamas y ovinos mostraron mayores coeficientes de digestión en llamas que en ovinos, para dietas de baja y mediana calidad, así como coeficientes de digestión comparables entre las dos especies para dietas de alta calidad (San Martín y Bryant, 1988). En conclusión, los CSA son más eficientes que los ovinos en la digestión de alimentos de mediana y baja calidad; esta mayor eficiencia digestiva está relacionada con el tiempo de retención del alimento en el tracto digestivo.

Además del factor de retención, la mayor eficiencia de digestión puede ser debida a la mayor frecuencia de contracciones y a la presencia de sacos glandulares en el estómago. Estas peculiaridades de los CSA les permitirían una más eficiente maceración, mezclado y absorción de la digesta. Por otro lado, la mayor digestibilidad de los alimentos de baja calidad por los CSA podría deberse a la habilidad de estos de mantener una mayor concentración de amoníaco en el C1 y C2 comparado con el ovino. Esto proveería a los CSA más N disponible para la síntesis microbiana, mejorando la digestibilidad (San Martín y Bryant, 1988).

La información sobre consumo en alpacas proviene de estudios comparativos con ovinos bajo condiciones estabuladas. El consumo diario de materia seca como porcentaje de peso vivo en alpacas varía desde 1.08 hasta 2.40 % con un promedio de 1.83 %, variación debida a los diferentes tipos de alimento usados (San Martín y Bryant, 1988). En general, el consumo diario de los CSA es menor que el de ovino y es el resultado de factores asociados como el mayor tamaño corporal y el relativo menor requerimiento de energía en los CSA (San Martín, 1991).

2.6. Derivados de purinas en CSA

La producción de la PM es de interés debido a las características particulares de los CSA; la información al respecto se basa en la medición de DP, donde se ha establecido que en llamas, la excreción está compuesta de alantoína, ácido úrico,

xantina e hipoxantina (en orden de magnitud), pero durante el ayuno se observó que la proporción de xantina más hipoxantina fueron más altos que el ácido úrico (Bakker *et al.*, 1996).

Estudios en alpacas para determinar el aporte endógeno de los DP excretados en la orina, mediante el enriquecimiento del quimo con ^{15}N han mostrado que la recuperación urinaria de las bases púricas (BP) como derivados de purinas fue de 53% en promedio (Rivera *et al.*, 2004), siendo inferior al 85% encontrado en vacunos por (Verbic *et al.*, 1990; Vagnoni *et al.*, 1997). Lo cual se debería a un reciclaje de las BP por el bajo consumo de alimento.

Otro experimento realizado para medir la excreción endógena de DP en alpacas, sometiéndolas a una restricción progresiva de alimento y luego a ayuno por 6 días, observándose que la excreción urinaria diaria de DP y de alantoína disminuyeron con la ingesta a lo largo del experimento, de 683-195 y 593-168 $\mu\text{mol}/\text{kg PV}^{0.75}$ respectivamente (Orellana *et al.*, 2012). En otro experimento se determinó la relación entre la absorción intestinal de las bases púricas y la excreción urinaria de DP mediante el uso de un catéter de infusión ubicado en la parte terminal del tercer compartimento; se encontró una estrecha relación ($r=0.905$) entre la infusión de BP y la excreción urinaria de DP que confirma el uso de la excreción de DP como índice de predicción de la producción microbiana en alpacas. La recuperación intestinal de BP infundidas en alpacas (PD urinaria relación C3-BP: 0.61 ± 0.062) fue similar a los valores registrados en dromedarios ($0,63 \pm 0,068$; Guerouali *et al.*, 2004.) y ovejas (de 0.52 a 0.80%; Chen *et al.*, 1990b; Balcells *et al.*, 1992), pero fue ligeramente inferior a los valores reportados para el mantenimiento y cabras lactantes (0,76 y 0,69; Liang *et al.*, 1999; Orellana *et al.*, 2001). La recuperación urinaria de purinas infundidas fue de un promedio de 0.615(D.E. 0,0006) mmol/día. Posteriormente, se evaluó la respuesta de la excreción urinaria de DP a los niveles de consumo de alimento (100, 75, 50, 20% de la ingesta voluntaria), donde encontraron que la cantidad de excreción de DP en orina aumentó linealmente ($r= 0.867$) con el consumo de materia orgánica digestible (DOMI), y la pendiente de la regresión (16.7mmoles DP/kg DOMI) puede ser asumido como un índice de rendimiento microbiano. La relación entre DOMI y la excreción urinaria de DP se ha reportado anteriormente para otras especies de rumiantes (Laurent *et al.*, 1983; Han *et al.*, 1992; Balcells *et al.*, 1993), y la pendiente estaría directamente relacionada con la eficiencia de la síntesis microbiana. Los resultados confirman esta relación en alpaca (16,7 mmol PD/kg DOMI), que se encuentra dentro

de los determinados para el ganado caprino (12.6; Laurent *et al.*, 1983) y ovejas (18.9-22.3; Balcells *et al.*, 1993). Orellana *et al.* (2012), sugieren que la alpaca puede comportarse como otros camélidos o incluso ovinos en el metabolismo de las purinas según los datos encontrados en los estudios sobre la relación entre la BP intestinales infundidas y la excreción urinaria de DP, la recuperación equimolar de las purinas intestinales y las pérdidas endógenas en el ayuno.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El presente trabajo se realizó en el Fundo “San Marcos” de la estación experimental del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA) Maranganí, localizada a 3727m de altitud y a 14°21'11.4” S 71°09'56.9” W, en el distrito de Maranganí, provincia de Canchis en el departamento del Cusco. El fundo presenta temperatura máxima que varían entre 13 y 14°C, con el punto más alto en el mes de noviembre. La temperatura mínima varía entre -5 y 1.9°C, siendo el punto más bajo en el mes de junio. El promedio de precipitación anual es de 953 mm y la mayor precipitación ocurre en los meses de noviembre a marzo.

La parte experimental duró 42 días y las muestras de orina colectadas fueron procesadas en el Laboratorio del Centro de Control de Insumos y Residuos Tóxicos del Servicio Nacional de Sanidad Agrícola (SENASA). Las muestras de alimento fueron analizadas en el Laboratorio de Bioquímica, Nutrición Animal y Alimentación Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.

3.2. Animales experimentales y alojamiento

Se utilizaron tres alpacas machos, enteros, de la raza Huacaya, de dos años y medio de edad, con un peso promedio de 48.2 ± 1.0 kg, de peso obtenido en una balanza digital con una precisión de 100g. Los animales fueron estabulados individualmente en corrales de 1.5 x 2 m, donde pasaron por una etapa de acostumbramiento de 20 días al consumo del heno de avena (*Avena sativa*) y se les dosificó contra parásitos internos y externos, que fueron desparasitados y una etapa previa de acostumbramiento al encierro en corrales individuales de 1.5 x 2 m, que fueron acondicionados con un comedero y un bebedero, con piso emparrillado que permitía la caída de las heces y orina, durante 42 días.

Cuadro 3. Peso de los animales utilizados

| | Alpacas | | | |
|-----------|---------|-------|-------|----------------|
| | A1 | A2 | A3 | Promedio |
| Peso (kg) | 47.00 | 49.00 | 48.50 | 48.2 ± 1.0 |

3.3. Tratamientos

El diseño experimental utilizado fue un diseño cuadrado latino 3x3. Con tres animales, tres periodos y tres tratamientos. Cada periodo tuvo una duración de 14 d, donde 10 d fueron de acostumbramiento y los últimos cuatro días fueron de colección de información.

El alimento utilizado fue heno de avena (*Avena sativa*), el cual fue picado a 2 cm y pasado por un tamiz de 0.4 cm. para separar hojas de tallos y así lograr las distintas proporciones de cada tratamiento. Se suministró diariamente 700 g de alimento a cada alpaca según cada tratamiento, una vez al día, a las (8:00 h) y agua *ad libitum*.

Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

- Tratamiento 1 (T1): hoja de heno de avena (todo lo que pase por el tamiz).
- Tratamiento 2 (T2): hoja (50%) y tallo (50%)
- Tratamiento 3 (T3): tallo de heno de avena (todo lo que no pase por el tamiz de 0.4 cm).

3.4. Parámetros evaluados

3.4.1. Análisis del alimento

Cada alimento fue analizado para determinar su contenido de materia seca (MS) y proteína cruda (PC) de acuerdo a la AOAC (1997), y de fibra detergente neutra (FDN) como describe Van Soest *et al.* (1991).

3.4.2. Análisis de la orina

3.4.2.1. Colección y almacenamiento de la orina

El día diez de cada periodo experimental se colocó a cada alpaca un arnés con un dispositivo colector de orina, esto se realizó antes de ofrecerles el alimento y se mantuvo por 4 días. El dispositivo estuvo conectado a un recipiente que contenía ácido sulfúrico y agua destilada para mantener el pH de la orina a niveles inferiores a 3, a fin de evitar el crecimiento de agentes bacterianos que destruyan los DP de las muestras (Chen y Gomes, 1992). Cada mañana, antes de suministrar el alimento diario, se colectó la orina, la cual fue medida en una probeta y luego almacenada en un frasco de vidrio debidamente rotulado con fecha, número de animal y cantidad colectada; posteriormente, trasladada al laboratorio del IVITA-Maranganí para extraer 1 ml de cada muestra y agregarle 9 ml de agua purificada, siendo almacenada a -20°C hasta su análisis respectivo.

3.4.2.2. Análisis de las muestras de orina

Las muestras de orina fueron analizadas en el Centro de Control de Insumos y Residuos Tóxicos del Servicio Nacional de Sanidad Agrícola (SENASA), donde los derivados de purina fueron determinados de acuerdo al procedimiento descrito por Chen *et al.* (1990), donde se cuantificó la concentración molar de xantina, hipoxantina, alantoína, ácido úrico y creatinina, mediante la técnica de cromatografía líquida de alto performance.

3.5. Análisis estadístico

El efecto de los niveles crecientes de la relación de FDN/PC (tratamientos) sobre la excreción de DP en orina se estimó mediante análisis de varianza para un diseño de cuadrado latino-sobrecambio simple (Steel *et al.*, 1997) con tres filas (periodos), tres columnas (animales) y tres tratamientos. Así mismo, se realizó análisis de regresión lineal entre la excreción total de DP (Y; mg/d) y el consumo de proteína en la dieta (X; g/d), la excreción total de DP (Y; mg/d) y el consumo de FDN en la dieta (X; g/d) y entre la excreción total de DP (Y; mg/d) y la relación FDN/PC de la dieta (X). Los análisis estadísticos fueron realizados con ayuda del paquete estadístico SAS/STAT® 9.2 (SAS Institute Inc., 2009). En todas las pruebas estadísticas se usó un nivel de significancia de 0.05.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis de proteína cruda en el alimento

En el cuadro 4, se presenta la composición química de las diferentes proporciones de heno de avena utilizados para cada tratamiento evaluado. Se observa que existen niveles diferenciados de FDN y PC en cada uno de ellos, confirmando que el proceso de tamizado realizado generó dietas con diferentes niveles de fibra detergente neutra (FDN) y de proteína. El nivel más bajo de PC se observó en el tratamiento con sólo tallo de avena (5.75 %) y el más alto en aquel alimento que contenía sólo hojas de avena (6.8%). Respecto a los valores de FDN de las dietas utilizadas, se observa que el menor y mayor porcentaje se encuentran en el T1 (hojas) y T3 (tallos), respectivamente; el valor intermedio se observa en la combinación de tallos y hojas. Estos resultados corroboran que las hojas tienen mejor calidad nutritiva que los tallos.

Los resultados obtenidos de PC y FDN están dentro del rango de la información existente para la avena forrajera (López *et al*, 2001, Paredes, 2014). Sin embargo, el contenido de PC de los tallos (T3), es mayor al rango (0.49 a 2.09 %) de otros estudios donde realizaron una separación manual de la avena a fin de determinar su composición química (Cruz, 2007); este mayor nivel de PC de los tallos puede deberse

a al proceso que realizamos para la separación de la avena picada y este permitió la salida de hojas y así se incrementó el contenido de PC de los tallos. Así mismo, se debe tomar en cuenta que la composición química de la avena va a estar influenciada por diversos factores, tales como el estado fenológico en el que se cosecha, la variedad utilizada, la especie, las condiciones climáticas y los sistemas de cultivo.

Cuadro 4. Composición química del heno de avena preparado de acuerdo a cada tratamiento

| Tratamientos | MS¹ | FDN² | PC³ | EM⁴ |
|---------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| T1 (Hojas) | 91.58 | 58.24 | 6.80 | 1.36 |
| T2 (Hojas y tallo) | 88.51 | 66.31 | 6.36 | 1.31 |
| T3 (Tallo) | 90.72 | 70.22 | 5.75 | 1.34 |

¹ MS= Materia seca (%)

² FDN= Fibra detergente Neutra (%)

³ PC= Proteína Cruda (%)

⁴ EM = Energía metabolizable (Mcal/kg MS)

En el cuadro 5, se presenta el consumo de las alpacas en los diferentes tratamientos, el consumo de materia seca se mantuvo uniforme en todos los tratamientos a un nivel de 1.65 % del peso vivo. El consumo de FDN fue mayor en aquellos animales sometidos al tratamiento 3 (554.7 g) y menor en los animales del T1 (460.1 g/d). Respecto al consumo de PC, este fue menor en aquellos animales que consumieron solo tallos (45 g/d) y el más alto consumo de PC en aquellos que consumían hojas (54 g/d), siendo intermedio en aquellos que consumieron la combinación de ambos (50 g/d). El consumo de energía metabolizable fue similar en todos los tratamientos, aproximadamente una Mcal/d.

Al evaluarse la relación de la FDN y la PC esta fue de 8.57, 10.43 y 12.21 para los T1, T2 y T3, respectivamente, observándose que los animales del T3 consumieron un mayor nivel de FDN por unidad de PC consumida. Respecto a la relación entre la PC y EM consumida, observamos que esta fue mayor en aquellos animales que consumían hojas (50) y menor en aquellos animales alimentados con tallos (43) y la combinación de ambos fue intermedio (49). Las relaciones establecidas de PC/EM del experimento se encuentran dentro del rango de otros reportes (Pardo *et al.*, 2008) que trabajaron con vacas y estableció un rango entre 27 a 114 en las relaciones de PC/EM para las evaluaciones que realizaron.

Cuadro 5. Consumo de materia seca (g/d), de fibra detergente neutro (g/d), proteína cruda (g/d), energía metabolizable (Mcal/d), relación de fibra detergente neutra y proteína cruda y relación energía/proteína

| Tratamientos | MS ¹ | FDN ² | PC ³ | EM ⁴ | FDN/PC | PC/EM |
|--------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|--------|-------|
| T1 (Hojas) | 790 | 460.1 | 53.72 | 1.007 | 8.57 | 50 |
| T2 (Hojas y tallo) | 790 | 523.8 | 50.24 | 1.003 | 10.43 | 49 |
| T3 (Tallo) | 790 | 554.7 | 45.43 | 1.005 | 12.21 | 43 |

¹ MS= Materia seca (g/d)

² FDN= Fibra detergente neutro (g/d)

³ PC= Proteína Cruda (g/d)

⁴ EM = Energía metabolizable (Mcal/d)

4.2. Excreción de derivados de purinas en orina.

En el Cuadro 3, se presenta la excreción diaria de DP en la orina de las alpacas sometidas a los diferentes tratamientos; los DP encontrados fueron alantoína, ácido úrico, hipoxantina y xantina; la presencia de estos DP concuerdan con lo reportado en

ovinos (Chen y Gomes, 1995), cabras (Sandoval y Herrera, 1999), alpacas (Orellana *et al.*, 2012; Rivera, 2004) y llamas (Bakker *et al.*, 1996). La diferencia con los DP hallados en vacunos radica en que en estos no se encuentran hipoxantina y xantina, debido a la alta actividad de la enzima xantina oxidasa en los tejidos e hígado de esta especie. La determinación de estos DP corrobora la información que las alpacas tienen una baja actividad de la Xantina oxidasa en los tejidos (Orellana *et al.*, 2012; Rivera 2004), sin embargo, solo en el T2 no se encontró xantina.

Respecto a la cantidad de cada DP encontrado en la orina se observó que la alantoína se presenta en mayor proporción (más del 96 %) en todos los tratamientos evaluados. Esto concuerda con otros reportes en alpacas (Orellana *et al.*, 2012; Rivera, 2004) y en llamas (Bakker *et al.*, 1996), donde determinan la presencia de los DP en orina, siendo alantoína, ácido úrico, xantina más hipoxantina los que se determinan en orden de abundancia encontrada en la orina.

Respecto a las cantidades de DP encontradas en los diferentes tratamientos fueron similares a los valores hallados por Orellana *et al.* (2012) y mayores a los reportados por Rivera (2004), en alpacas; estas diferencias se debe a que la producción de PM está influenciada por muchos factores, como la alimentación, estado fisiológico, edad, etc. La información disponible muestra que la proporción de alantoína aumenta cuando se incrementa el consumo de materia seca mientras el ácido úrico e hipoxantina más xantina disminuyen (Chen *et al.*, 1992). En el presente trabajo, se mantuvo constante el consumo de materia seca, y el utilizar un diseño cuadrado latino permitió que los animales pasen por todos los tratamientos y así el efecto individual no sea expresado y los resultados sean solo efecto de los tratamientos evaluados.

Cuadro 6. Excreción diaria de los derivados de purinas en orina según tratamientos (mg/d)

| Derivados de purinas | Hoja T1 | Hoja y tallo T2 | Tallo T3 |
|-----------------------------|----------------|------------------------|-----------------|
| Alantoína | 24.95 ± 2.37 | 27.35 ± 5.17 | 13.67 ± 22.00 |
| A. úrico | 0.21 ± 0.49 | 0.22 ± 0.45 | 0.41 ± 0.57 |
| Hipoxantina | 0.27 ± 0.73 | 0.50 ± 1.05 | 0.01 ± 0.03 |
| Xantina | 0.08 ± 0.28 | 0 | 0.12 ± 0.36 |
| DP total | 25.51 ± 19.05 | 28.07 ± 20.78 | 14.21 ± 12.12 |

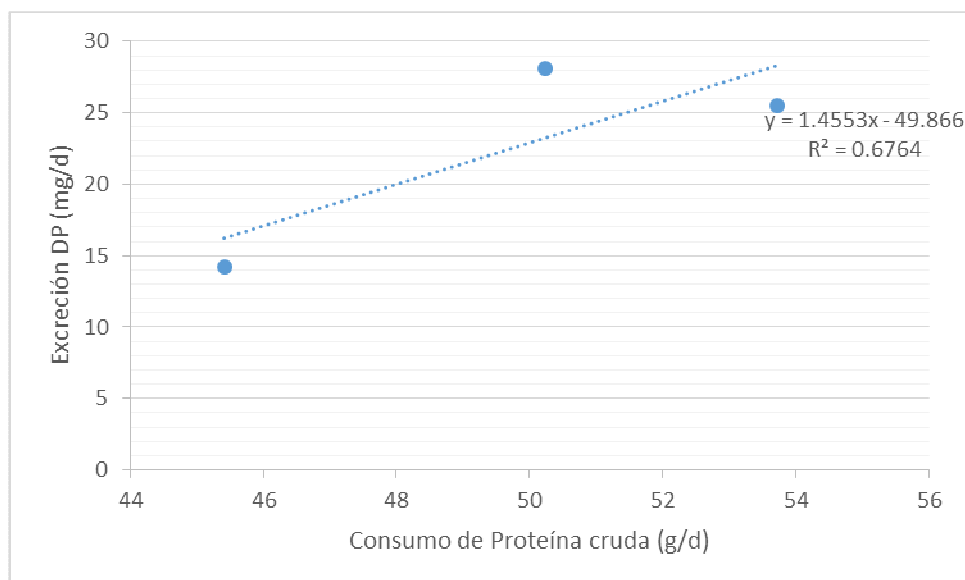
El efecto de los tratamientos evaluados mostró que la excreción total de DP no está influenciada ($P < 0.05$) por la relación FDN/PC utilizado en la dieta de las alpacas, esta respuesta podría deberse a la alta capacidad de las alpacas para reciclar nitrógeno (San Martín, 1996) y posiblemente cuando las alpacas dispusieron de una mayor nivel de FDN y menor de PC (T3) se vieron en la necesidad de disminuir la eliminación renal de urea incrementando su capacidad para reabsorberla (Cirio y Boivin, 1990), previniendo así una reducción excesiva del pool de urea sanguínea. Esta característica adaptativa permitió mantener los niveles necesarios de nitrógeno en el compartimiento 1 de las alpacas para la producción de proteína microbiana y cuando las alpacas tuvieron un consumo menor de PC tuvieron un mayor reciclaje de nitrógeno que cuando recibieron un nivel mayor (T1) de PC y por ello no encontramos diferencias en la excreción de DP con los tratamientos evaluados. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que en el presente estudio evaluamos un rango de consumo de 45.43 a 53.72 g/d de PC para los dos tratamientos extremos y la diferencia fue de solo ocho g de PC por d.

Como se observa en el cuadro 2, la relación de FDN/PC fue incrementándose en cada tratamiento, mostrando mayor disponibilidad de FDN y menor de PC, sin

embargo, si asociamos esto con la producción de DP vemos que no existió diferencias, así mismo, la relación PC/EM consumida de los tratamientos evaluados fueron 50, 49 y 43 para T1, T2 y T3, respectivamente, si asociamos estas relaciones con la producción de DP es probable que las relaciones tan cercanas sean la causa por las que no se encontraron diferencias en la cantidad de DP producidos entre los tratamientos evaluados. Siendo la disponibilidad y sincronización entre la energía y la proteína los factores más importantes para la síntesis microbiana, observamos que las alpacas del T3 (tallos) tuvieron una menor relación y ello permitió que su producción de DP sea igual que aquellos animales que consumieron mayores niveles de PC para la producción de proteína microbiana.

En la figura 1, se muestra la relación lineal entre excreción total de DP (Y; mg/d) y el consumo de proteína cruda de cada tratamiento (X; g/d), se determinó la siguiente ecuación $Y = 1.4553X - 49.866$ ($R^2=0.68$), observamos que el nivel de proteína contribuye a la excreción total de DP; como se reporta la producción de PM está fuertemente influenciada por la cantidad de nitrógeno disponible y el nivel de energía y la ecuación hallada demuestra esto, sin embargo, bajo los niveles evaluados no encontramos diferencias; quizá por el pequeño rango de PC evaluado y la gran eficiencia en la digestión de alimentos de mediana y baja calidad, comparadas con los ovinos (San Martín y Bryant, 1988), lo cual nos sugiere que los camélidos son más eficientes en el reciclaje de nitrógeno con alimentos de pobre calidad.

Figura 1. Relación entre excreción de derivados de purina (mg/d) y consumo de proteína cruda (g/d) de la dieta



En la figura 2, se muestra la relación lineal entre la excreción total de DP (Y; mg/d) y el consumo de FDN de cada tratamiento (X; g/d), la ecuación obtenida fue $Y = -0.0956X + 71.606$ ($R^2 = 0.40$) y en la figura 3, se presenta la relación entre excreción de derivados de purina (Y; mg/d) y la relación FDN/PC (X); la ecuación lineal obtenida fue $Y = -3.0677 + 54.502$ ($R^2 = 0.58$). En ambas ecuaciones se observa un comportamiento similar, el T2 tiene mayor excreción de DP y existe una relación inversa con la excreción de DP tanto para el nivel de FDN como la relación FDN/PC. Se debe tomar en cuenta también que solo se están evaluando tres puntos y quizá el modelo lineal utilizado no esté explicando completamente el comportamiento de la función evaluada.

Figura 2. Relación entre excreción de derivados de purina (mg/d) y consumo de fibra detergente neutra (g/d) de las dietas evaluadas

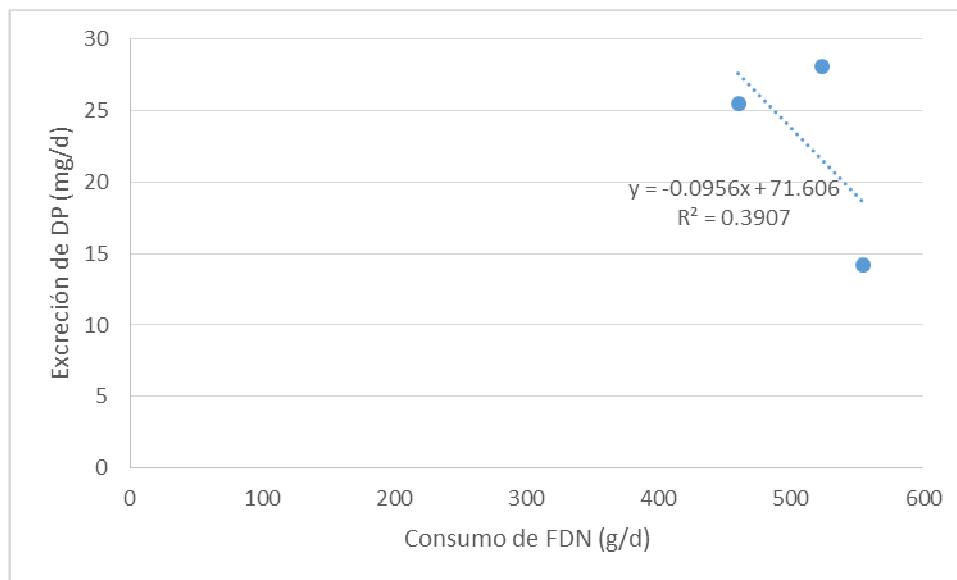
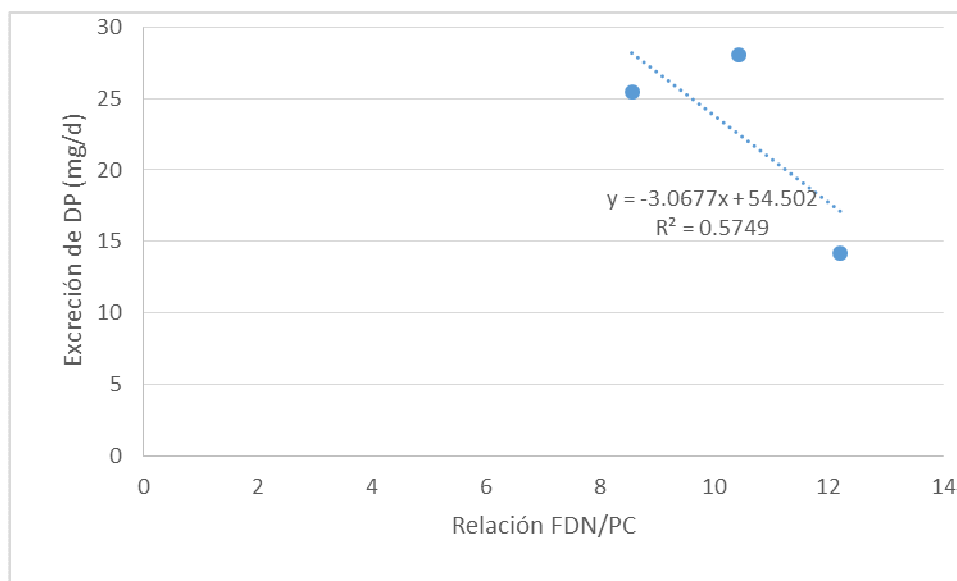


Figura 3. Relación entre excreción de derivados de purina (mg/d) y la relación FDN y PC



V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones del estudio realizado concluimos:

- No existe influencia de la relación de la fibra detergente neutro y la proteína cruda sobre la excreción de DP en la orina de alpacas.
- Todos los derivados de purinas (xantina, hipoxantina, ácido úrico y alantoína) se encuentran presentes en la orina de alpacas.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. **Al-Khalidi UA, Chaglassian TH. 1965.** The species distribution of xanthine oxidase. *Biochem. J.*, 97:318-320.
2. **Antoniewicz A.M, Heinemann, EM, Hanks EM. 1981.** Effect of level of feed intake and body mass on allantoin excretion and the allantoin to creatinine ratio in the urine of sheep, *Rokz. Nauk Zoot.* 8: 49-65.
3. **Antoniewicz AM, Pisulewski PM. 1982.** Measurement of endogenous allantoin excretion in sheep urine. *Journal of Agricultural Science, Cambridge.* 98: 221-223.
4. **Agricultural and Food Research Council (AFRC). 1996.** Necesidades energéticas y proteicas de los rumiantes. Manual de consulta preparado por el Comité Técnico sobre respuestas a los nutrientes del AFRC. Traducido por Sanz, R. Acribia. Zaragoza, España. 175p
5. **AOAC. 1997.** Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists 16th edition (Cunnif P Ed). AOAC International Gaithersburg MD USA.
6. **Bach A, Calsamiglia S, Stern M. 2005.** Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 88: 1
7. **Bahadur D, 1997.** Purine nitrogen index, a posible parameter for rapid feed evaluation in ruminants. Thesis for the degree of Master of Science, University of Aberdeen, UK, 79 p

8. **Bakker ML, Chen XB, Kyle DJ, Orskov ER, Bourke DA. 1996.** Urinary and plasma purine derivatives in fed and fasted llamas (*Lama glama* y *L. guanicoe*). *Com. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 113:367-374.
9. **Balcells J, Guada C, Castrillo J, Gasa. 1991.** Urinary excretion of allantoin precursors by sheep after different rates of purine infusion into the duodenum, *J. Agric. Sci. Camb.* 116: 309-317.
10. **Balcells J, Guada JA, Peiró JM, Parker DS. 1992.** Simultaneous determination of allantoin and oxipurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.*, 575, 153-157.
11. **Balcells J, Guada JA, Castrillo C, Gasa J, 1993.** Rumen digestion and urinary excretion of purine derivatives in response to urea supplementation of sodium-treated straw fed to sheep. *Br. J. Nutr.* 69, 721–732
12. **Bargo F, Muller LD, Delahoy JE, Cassidy TW. 2002.** Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. *J Dairy Sci* 85, 1777-1792.
13. **Brock FM, Fosberg CW, Buchanan Smith JG. 1982.** Proteolytic activity of rumen Microorganism and effects of proteinase inhibitors. *Applies and Enviromental Microbiology.* 44:561.569.
14. **Broderick G, Merchen NR. 1992.** Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *J. Dairy Sci.*, 75, 2618-2632.
15. **Brody S. 1945.** Bioenergetics and growth. New York: Reinhold Publishing Corporation.
16. **Carro MD. 2001.** La determinación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen: comparación entre marcadores microbianos *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* Vol. 16.
17. **CENAGRO, 2012.** Lima: Instituto Nacional de Estadística e Informática-IV CENSO NACIONAL AGROPECUARIO (CENAGRO). [Internet], [26 de abril 2013]. Disponible en: <http://www.inei.gob.pe/>
18. **Chen XB, Hovell FD, De B, Orskov ER, Brown DS. 1990a.** Excretion of purine derivatives by ruminants effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. *Br. J. Nutr.*, 63, 131-142.
19. **Chen XB, Orskov ER, Hovell FD, De B. 1990b.** Excretion of purine derivatives by ruminants: endogenous excretion, differences between cattle and sheep. *Br J Nutr*; 63:121-129.

20. **Chen XB, Orskov ER, Hovell FD. 1991.** The use of purine derivatives as a measure of microbial protein supply in ruminants. Proceedings of the 6th international symposium on protein metabolism and nutrition. 2, 67-70.
21. **Chen XB, Grubic G, Orskov ER, Osuji P. 1992a.** Effect of feeding frequency on diurnal variation in plasma and urinary purine derivatives in steers, *Anim. Prod.* 55: 185-191.
22. **Chen XB, Chen YK, Franklin MF, Orskov ER, Shand WJ. 1992b.** The effect of feed intake and body weight on purine derivative excretion and microbial protein supply in sheep. *J. Anim. Sci.*, 70, 1534-1542.
23. **Chen XB, Gomes MJ. 1992.** Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details. International Feed Resources Unit. Rowett Research Institute, Bucksburn Aberdeen AB2 9SB. Occasional publication. 21 p.
24. **Chen XB, Samaraweera L, Kyle DL. 1996.** Urinary excretion of purine derivatives and tissue xantine oxidase activity in buffaloes with special reference to differences between buffaloes and *Bos taurus* cattle. *Br J Nut* 75,317-407.
25. **Chikunya S, Miller EL. 1998.** The influence of supplementing a rapidly degraded fibre basal diet with different forms of nitrogen on microbial activity in continuous fermenters. In: Proceedings of the BSAS Winter Meeting 1998, BSAS, pp. 169.
26. **Cirio A, Boivin R. 1990.** Urea recycling from the renal pelvis in sheep: a study with ¹⁴C-urea, *Am. J. Physiol. (Renal Fluid Electrolite Physiol.* 27) 258. F1196 – F1202.
27. **Clemens ET, CE Stevens. 1980.** A comparison of gastrointestinal transit time in ten species of mammals. *J. Agric. Sci., Camb.*94:735-737.
28. **Cunningham JG. 1999.** Fisiología veterinaria. 2ª edición. Mc Graw-Hill Interamericana, México.
29. **Cruz A. 2007.** Estudio de la composición química de espigas, hojas y tallos de avenas cultivadas en Hidalgo y Tlaxcala en los ciclos de cultivo 2003 y 2004. Tesis para obtener el título de Licenciado en Química en Alimentos. Universidad Autónoma de Estado de Hidalgo. México. 94 p.
30. **Czuderna M and Kowalczyk J. 2000.** Quantification of allantoin, uric acid, xanthine and hipoxanthine in ovine urine by high-performance liquid

- chromatography and photodiode array detection. *Journal of Chromatography B*. 744: 129-38
31. **Dehority BA. 1995.** Methodology for measuring microbial growth in the rumen. En: *Proceedings of the International Symposium on the Nutrition Requirements of Ruminants*, Universidad Federal de Vicosa, Vicosa-MG-Brazil. pp 121-137.
 32. **Dewhurst R.J, Davies DR, Merry RJ. 2000.** Microbial protein supply from the rumen. *Anim. Feed Sci. Tech.* 85:1-20.
 33. **Faichney GJ, Welch RJ, Brown GH. 1995.** Prediction of the excretion of allantoin and total purine derivatives by sheep from the "creatinine coefficient". *Journal of Agricultural Science, Cambridge.* 125: 425-428.
 34. **FAO, 2005.** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914.
 35. **Fébel H, Fekete S. 1996.** Factors influencing microbial growth and the efficiency of microbial protein synthesis: a review. *Acta Vet. Hung.* 44:39
 36. **Finco D. 1997.** Kidney function In: j. Kaneko. (Ed.) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* (4th, ed.) Academic Press. San Diego, U.S.A. Pp. 441-484.
 37. **Ferguson JD, Chalupa W. 1989.** Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 72, 746-766.
 38. **Firkins JL, Berger LL, Fahey GC, Merchen NR. 1984.** Ruminant nitrogen degradability and escape of met and dry distillers grains and met and dry corn gluten feeds. *J. Dairy Sci.* 67:1936
 39. **Fowler M.1998.** *Medicine and surgery of South American Camelids.* Llama, Alpaca, Vicuña, Guanaco. Ames, Iowa State University Press. Iowa. 391 p.
 40. **Fujihara T, Orskov ER, Reeds PJ, Y Kyle DJ. 1987.** The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *Journal of Agricultural Science, Cambridge (UK.)* 109: 7-12.
 41. **Galindo J, Chongo B, Delgado D, Marrero Y. 2000b.** Manipulación de la fermentación ruminal en dietas fibrosas. Informe final de proyecto. La Habana, Cuba
 42. **Giesecke D, Stangassinger M, Tieme-Yer M. 1984.** Nucleic acid digestion and urinary purine metabolites in sheep nourished by intragastric infusions, *Can. J. An. Sci.* 64: 144-145.

43. **Giesecke D, Ehrentreich L, Stangassinger M, Ahrens F. 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.
44. **Gonda HL, Lindberg JE. 1994.** Evaluation of dietary nitrogen utilization in dairy cows based on urea concentrations in blood urine and milk, and on urinary concentration of purine derivatives, *Acta Agr. Scan. Section A. An. Sc.* 44 (4): 236-345.
45. **Gonzalez-Ronquillo M, Balcells J, Guada JA, Vicente F. 2003.** Purine derivative excretion in dairy cows: endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. *Journal of Dairy Science (USA.)* 86: 1282-1291.
46. **Gueroali A, El Gass Y, Balcells J, Belenguer A, Nolan J. 2004.** Urinary excretion of purine derivatives as an index of microbial protein synthesis in the camel (*Camelus dromedarius*). *Br. J. Nutr.* 92, 225–232.
47. **Han DK, Shin HT, Landis J. 1992.** Effect of level of feed intake on the excretion of purine derivative and purine derivatives to creatinine ratio in the urine of sheep. *Asian Austral. J. Anim.* 5, 465–468.
48. **Haussinger, D. 1983.** Hepatocyte heterogeneity in glutamine and ammonia metabolism and the role of an intercellular glutamine cycle during ureogenesis in perfused rat liver. *Eur. J. Biochem.* 133:269-275
49. **Haussinger D, Lamers WH, Moorman A F. 1992.** Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. *Enzyme* 46:72-93.
50. **Hedqvist H. 2004.** Metabolism of soluble proteins by rumen microorganism and the influence of condensed tannins on nitrogen solubility and degradation. Doctoral Thesis. Swedish University of Agriculture Sci. Uppsala, Sweden. p. 38
51. **Hespell RB. 1988.** Microbial digestion of hemicelluloses in the rumen. *Microb. Sci.* 5:362
52. **Hess HD, Lascano CE, Carulla JE, Díaz TE, Machmüller A, Kreuzer M. 2003.** Potential of forage legumes and of saponin-containing fruits as tropical feed resources to manipulate rumen fermentation and to improve ruminant nutrition. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 3:555
53. **Huntington GB, CK Reynolds. 1987.** Oxygen consumption and metabolite flux of bovine portal-drained viscera and liver. *J. Nutr.* 117: 1167-1173.
54. **Huntington G B. 1989.** Hepatic urea synthesis and site and rate of urea removal from blood of beef steers fed alfalfa hay or a high concentrate diet. *Can. J. Anim. Sci.* 69:215–223.

55. **Huntington GB, Archibeque SL. 2000.** Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. *J Anim Sci.* 2000; 78: 742:749
56. **Hvelplund T, Weisbjerg MR. 2000.** *In situ* techniques for the estimation of protein degradability and postrumen availability. En: Givens, D. I.; Owen, E.; Axford, R. F. E. y Omed, H. M. (eds.) Forage evaluation in ruminant nutrition. Cab International. Wallingford, UK. pp: 233-258.
57. **IAEA/FAO. 2002.** Report on Final Research Co-ordination Meeting. CRP D3.10.21. Development, standardization and validation of nuclear based technologies for estimating microbial protein supply in ruminant livestock for improving productivity. International Atomic Energy Agency. Division of nuclear techniques in food and agriculture. Vietnam.
58. **Jouany JP. 1996.** Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *J. Nutr.*, 126 (1996), pp. 1335S–1346
59. **Kernick BL. 1991.** The effect of form of nitrogen on the efficiency of protein synthesis by rumen bacteria in continuous culture. Doctoral Thesis, University of Natal, Pietermaritzburg. South Africa.
60. **Kumar R, D’Mello JP. 1995.** Antinutritional factors in forage legumes. En: J.P.F. D’Mello & C. Devendra (eds.) *Tropical Legumes in Animal Nutrition.* CAB International. Wallingford. UK. pp. 95
61. **Lapierre H, y GE Lobley. 2001.** Nitrogen recycling in the ruminant: A review. *J. Dairy Sci.* 84(Suppl. E):E223–E236.
62. **Laurent, F., Blanchart, G., Vignon, B., 1983.** Relationship between the urinary excretion of allantoin and nitrogen in lactating goats. In: Arnal, M., Pion, R., Bonin, D. (Eds.), *IV Symposium International de Metabolisme et Nutrition Azotés.* Clermont-Ferrand, France, pp. 175–178.
63. **Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. 1995.** *Principios de bioquímica 2^a edición.* Savier, Sao Paulo, Brasil. Pp 893
64. **Liang JB, Pimpa O, Balcells J, Jelani ZA, Abdullah N. 2004.** An overview on the use of urinary purine derivatives excretion as a method for estimation of rumen microbial protein production in swamp buffaloes and zebu cattle. In: Makkar, H. P. S. y
65. **Liang, J.B., Pimpa, O., Abdullah, N., Jelani, Z.A., Nolan, J.V., 1999.** Estimation of rumen microbial protein production from urinary purine derivatives in zebu cattle and water buffalo. In: *Nuclear Based Technologies for Estimating*

- Microbial Protein Supply in Ruminant Livestock. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 35–42.
66. **Li L. 2001.** Xanthine oxidase. B180 Medical Laboratories. Free Radical and Radiation Biology Program. The University of Iowa. Iowa City, USA.
 67. **Lindberg JE. 1985.** Urinary allantoin excretion and digestible organic matter intake in dairy goats Swedish, *J. Agric. Res.* 15: 31-37.
 68. **Lindberg JE. 1989.** Nitrogen metabolism and urinary excretion of purines in goat kids, *Br. J. Nutr.* 61: 39-321.
 69. **Lindberg JE, Jacobson KG. 1990.** Nitrogen and purine metabolism at varying energy and protein supplies in sheep sustained on intragastric infusion, *Br. J. Nutr.* 64 (2): 359-370.
 70. **Lopez V, Morales S, Cabrera C, Arias M. 2001.** Ingestión y digestibilidad aparente de forrajes por la llama (*Lama glama*). II. heno de trébol rosado (*Trifolium pratense*), heno de ballica (*Lolium multiflorum*), paja de poroto (*Phaseolus vulgaris*) y paja de avena (*Avena sativa*). *Arch. med. vet.*, vol.33, n.2, pp. 145-152.
 71. **Makkar HP. 1993.** Antinutritional factors in foods for livestock. En: Animal Production in Developing Countries. BSAP Occasional Publication No. 16. Edinburgh. p. 69
 72. **Makkar HP, Becker K. 1999.** Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. *Br. J. Nutr.*, 81, 107-112.
 73. **Makkar HP. 2003.** Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Rum. Res.* 49: 241
 74. **McAllan AB. 1980.** The degradation of nucleic acids in the rumen, and the removal of breakdown products from the small intestines of steers. *Br J Nutr.* 44:99-112.
 75. **McAllan AB. 1982.** The fate of nucleic acids in ruminants. *Proc Nutr Soc.* 41:309.
 76. **McAllan AB, Smith RH. 1973.** Degradation of nucleic acids in the rumen. *Br J Nutr.* 29:331-345.
 77. **McMurry J. 2001.** Química Orgánica. (5ta. ed.). International Thomson. México. D.F.

78. **Marrero Y, Galindo J, Aldama AI. 2002.** Efecto de *Arachis pintoii* en la población microbiana ruminal. Su actividad en condiciones *in vitro*. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 36:385
79. **Matras J, Bartle SJ, Preston RL. 1991.** Nitrogen utilization in growing lambs: Effects of grain (starch) and protein sources with various rates of ruminal degradation. J. Anim. Sci. 69: 339
80. **Miller EL. 1982.** Methods of assessing proteins for ruminants, including laboratory methods. En: Miller EL. y Pike IH. (eds.) Protein contribution of feedstuffs for ruminants: application to feed formulation. Butterworth Scientific. London, UK. pp: 18-35.
81. **Min BR, Attwood GT, Barry TN, McNabb WC. 2002.** The effect of condensed tannins from *Lotus corniculatus* on the proteolytic activities and growth of rumen bacteria. J. Anim. Sci. 80:1602
82. **Muller L. 1996.** Managing and feeding high merit cows at pasture. En: British Grassland Society Winter Meeting. Grass & Forage for Cattle of High Genetic Merit. Great Malvern, Great Britain.
83. **Newbold JR, Rust SR. 1992.** Effect of asynchronous nitrogen and energy supply on growth of ruminal bacteria in batch culture. J. Anim. Sci. 70:538
84. **Nocek JE, Russell JB. 1988.** Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. J. Dairy Sci. 71:2070
85. **Nolan JV, Dobos RC. 2005.** Nitrogen Transactions in Ruminants. En: Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. 2nd Edition. CAB International. Wallingford, UK. p. 137
86. **NRC. 1996.** Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th Rev. Ed. Nat. Acad. Sci. Washington, DC.
87. **Orellana P, Boero P, Balcells J, Martín-Orúe SM, Guada JA. 2001.** Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. *Livest Prod Sci* 68, 243-250.
88. **Orellana P, Boero P, Seradj A, Fondevila M, Nolan J, Balcells J. 2012.** Modelling urinary purine derivatives excretion as a tool to estimate microbial rumen outflow in alpacas (*Vicugna pacos*). *Small Ruminant Research* 107, 101-104.
89. **Orskov ER. 1992.** Protein Nutrition in Ruminants. 2nd Edition. Academic Press. New York, EUA

90. **Orskov ER. 2000.** The *in situ* technique for the estimation of forage degradability in ruminants. En: Givens, D. I.; Owen, E.; Axford, R. F. E. y Omed, H. M. (eds.) Forage evaluation in ruminant nutrition. Cab International. Wallingford. pp: 175-188.
91. **Pardo O, Carulla J, Hess H. 2008.** Efecto de la relación proteína y energía sobre los niveles de amonio ruminal y nitrógeno ureico en sangre y leche, de vacas doble propósito del piedemonte llanero, Colombia Rev Colomb Cienc Pecu 2008; 21:387-397.
92. **Paredes J, Olazabal J, San Martín H, Ara M. 2014.** Efecto del nivel de fibra detergente neutra sobre el consumo en alpacas (*Vicugna pacos*) Rev Inv Vet Perú 25(2): 205-212.
93. **Parker DS, MA Lomax, CJ Seal, JC Wilton. 1995.** Metabolic implications of ammonia production in the ruminant. Proc. Nutr. Soc. 54:549–563.
94. **Patton RS. 1994.** Complexities of soluble carbohydrate metabolism in ruminants examined. Feedstuff 66: 13.
95. **Perez JF, Rodriguez CA, Gonzalez J, Balcells J, Guada JA.1996.** Contribution of dietary purine bases to duodenal digesta in sheep. In situ studies of purine degradability corrected for microbial contamination. Anim Feed Sci Technol; 62:251-62.
96. **Perez JF, Balcells J, Guada JA, Castrillo C. 1996.** Determination of rumen microbial-nitrogen production in sheep: a comparison of urinary purine excretion with methods using ¹⁵N and purine bases as markers of microbial-nitrogen entering the duodenum. British Journal of Nutrition (UK.) 75: 699-709.
97. **Perez JF, Balcells J, Guada JA y col. 1997.** Determination of ruminal microbial-nitrogen production in sheep. *Br J Nut*, 75,699-709.
98. **Posada SL, Giraldo LA, Bolívar DM. 2005** Estimación de la síntesis de proteína microbiana a partir de la excreción urinaria de derivados púricos. Livest. Res. Rural Develop. 17:6
99. **Prins RA, Van Rheenen DL, y van Klooster AT. 1983.** Characterization of microbial proteolytic enzymes in the rumen. Leeuwenhoeck A. 49: 585-595.
100. **Puchala R, Min BR, Goetsch AL, Sahlo T. 2005.** The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission of goats. J. Anim. Sci. 83:182.
101. **Reynolds CK, NB Kristensen. 2008.** Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: An asynchronous symbiosis. *J Anim Sci*. 86:E293-E305.

102. **Rivera A. 2004.** Determinación de la contribución endógena de bases púricas mediante la excreción de derivados púricos marcados con nitrógeno-15N en alpacas (*Lama pacos*). Tesis para optar por título de Medicina Veterinaria. Universidad de Concepción. Chillan-Chile.
103. **Rys R, Antoniewitz A, Maciejewicz J. 1975.** Allantoin in urine as an index of microbial protein in the rumen. In Tracer studies on non-protein nitrogen in ruminants, 2nd Edition. IAEA, Viena, Austria.
104. **San Martín F. 1987.** Comparative forage selectivity and nutrition of South American Camelids and Sheep. [Thesis PhD]. Texas Tech Univ, Lubbock.
105. **San Martín F, FC Bryant. 1988.** Nutrition of domesticated south American llamas and alpacas. Small Ruminant Research. 2:191-216
106. **San Martín F. 1991.** Alimentación y Nutrición. En: Avances y Perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. Editor Saúl Fernández Baca. Santiago-Chile.
107. **San Martín F. 1996.** Nutrición en alpacas y llamas. Púb. Cient IVITA No 27 UNMSM-FMV. Lima- Perú.
108. **San Martín F. 1999.** Nutrición y Alimentación de camélidos Sudamericanos. En: Memorias seminario de Reproducción y Nutrición de Camélidos Sudamericanos. Santa Cruz de la Sierra, La Paz, Oruro. Nov. Bolivia.
109. **Sandoval-Castro C, F. Herrera-Gómez. 1999.** Estimación de la síntesis de proteína microbial en rumiantes a través de la medición de los derivados de purina en orina. Rev. Biomed. 10(4): 241-251.
110. **Santos FA, Santos JE, Theurer CB, Huber JT. 1998.** Effects of rumen-undegradable protein on dairy cow performance: a 12-year literature review. Journal of Dairy Science (USA.) 81 (12): 3182-3213.
111. **SAS Institute Inc., 2009.** SAS/STAT® 9.2 User's Guide 2nd ed. Cary: The SAS Institute. 870 p.
112. **Schönhusen Ulrike, Voigt J, Kreienbring F, Teuscher F. 1995.** Bewertung verschiedener Marker für die Messung der Mikrobiellen Stickstoffpassage am Duodenum der Milchkuh. Arch. Anim. Nutr., 48, 147-158.
113. **Shingfield KJ, Offer NW. 1998.** Evaluation of the spot urine sampling technique to assess urinary purine derivative excretion in lactating dairy cows. Animal Science (UK.) 66: 557-568.
114. **Singh M, Sharma K, Dutta N, Singh P, Verma AK, Mehra UR. 2007.** Estimation of Rumen Microbial Protein Supply Using Urinary Purine Derivatives

- Excretion in Crossbred Calves Fed at Different Levels of Feed Intake. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20:1567
115. **Smith R, Mcallan A. 1970.** Nucleic acid metabolism in the ruminant. *British Journal of Nutrition (UK.)* 24: 545-556.
 116. **Sponheimer M, Robinson T, Roeder B, Hammer J, Ayliffe L, Passey B, Cerling T, Dearing D, Ehleringer J. 2003.** Digestion and passage rates of grass hays by llamas, alpacas, goats, rabbits, and horses. *Small Ruminant Res.* 48:149
 117. **Stangassinger M, Chen XB, Lindberg JE, Giesecke D. 1995.** Metabolism of purines in relation to microbial production. In: *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction.* Engelhardt, W.w., Leonhard-Marek, S., Breves, G., Giesecke, D., eds. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, pp. 387-406.
 118. **Storm E, Orskov ER. 1983.** The nutritive value of rumen microorganisms in ruminants. 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen microorganisms. *Br. J. Nutr.* 50: 463
 119. **Storm E, Brown DS, Orskov ER. 1983.** The nutritive value of rumen microorganisms in ruminants. *Br. J. Nutr.* 50:479
 120. **Tamminga S. 1979.** Protein degradation in the forestomach of ruminants. *J. Anim. Sci.*, 49:1615-1630.
 121. **Tamminga S, Chen XB. 2000.** Animal-based techniques for the estimation of protein value of forages. In: Givens, D. I.; Owen, E.; Axford, R. F. E. y Omed, H. M. (eds.) *Forage evaluation in ruminant nutrition.* Cab International. Wallingford, UK. pp: 215-231. CABI Publishing, Wallingford, UK.
 122. **Timmermans SJ, Johnson LM, Harrison JH, Davidson D. 2000.** Estimation of the flow of microbial nitrogen to the duodenum using milk uric acid or allantoin. *Journal of Dairy Science (USA.)* 83 (6): 1286-1299.
 123. **Topps JH, Elliot RC. 1965.** Relationship between concentration of ruminal nucleic acids and excretion of purine derivatives by sheep. *Nature* 1965; 205:498-9.
 124. **Vagnoni DB, Broderick GA, Clayton MK, Hatfield RD. 1997.** Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amount of purines. *J Dairy Sci* 8,1695-1702.
 125. **Valadares Filho SC. 1995.** Eficiência de síntese de proteína microbiana, degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína bruta, em bovinos. *Anais.* pp. 355-388.

126. **Valadares R, Broderick G, Valadares S, Clayton K. 1999.** Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *J Dairy Sci* 82, 2686-2696.
127. **Vallenas A. 1965.** Some physiological aspects of digestion in the alpaca (*Lama pacos*). In: Dougherty RW. (Ed) Physiology of digestion in the ruminant. Washington DC. Butterworth. 147-158.
128. **Vallenas A, 1991.** Características anátomo-fisiológicas. En: Fernández-Baca (Ed.) Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. FAO. Chile.
129. **Van Saun R. 2006.** Nutrient requeriment of South American Camelids: a factorial approach. *Small rumin. Res* 61(2-3): 165-186
130. **Van Soest PJ. 1994.** Nutritional Ecology of the Ruminant. Cornell University Press. Ithaca, NY. p. 261
131. **Verbic JE, Chen XB, Macleod NA, Orskov ER. 1990.** Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers, *J. Agr. Sci. Camb.* 114: 243-248.
132. **Verbic JE. 2002** Factors affecting microbial protein synthesis in the rumen with emphasis on diets containing forages. *Milchproduktion und Rindermast, Dundesanstalt für alpenländische Landwirtschaft Gumpenstein, 8952 Irdning.* p. 1-6
133. **Vercoe JE 1976.** Urinary allantoin excretion and digestible dry-matter intake in cattle and buffalo. *Journal of Agricultural Science, Cambridge (UK.)* 86: 613-615.
134. **Wallace RJ, Onodera R, Cotta MA. 1997.** Metabolism of nitrogen-containing compounds. Eds. P.N. Hobson and C.S. Stewart. *The Rumen Microbial Ecosystem.* 2nd Ed. Eds. Chapman & Hall. London. p. 283
135. **Webster AJ. 1992.** The metabolizable protein system for ruminants. In: Garnsworthy, P. C.; Haresign, W. y Cole, D. J. A. (eds.) *Recent advances in animal nutrition.* Butterworth-Heinemann. Nottingham, UK. pp: 93-110.
136. **Webster AJ. 1993.** Understanding the dairy cow. 2^a ed. Blackwell Science. Oxford, UK. 382 p.
137. **Webster AJ, Kaya S, Djouvinov DS, Kitcherside MA, Glen EF. 2003.** Purine excretion and estimated microbial protein yield in sheep fed diets differing in protein degradability. *Anim. Feed Sci. Tech.* 105:123

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