EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE COLECCIÓN PARCIAL DE ORINA PARA BOVINOS MACHOS

Autor: González, Ana Clara

Director: Pagella, José Horacio

Codirector: Belmonte, Valeria

Tribunal de Evaluación: Ferri, Carlos María y Rabotnikof, Celia

Cátedra: Anatomía y Fisiología Animal

Carrera: Ingeniería Agronómica

Institución: Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam)

Año: 2011

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Pág.

Resumen ____ ***3***

Introducción ____ ***4***

Antecedentes sobre la colección de orina en pastoreo ____ *6*

Hipótesis ____ *9*

Objetivo ____ *10*

Materiales y métodos ____ ***10***

Trabajo experimental con animales ____ *10*

Trabajo de laboratorio para el análisis de muestras de orina ____ *14*

Cálculos y tratamiento estadístico de la información ____ *16*

Resultados y discusión ____ ***17***

Conclusiones ____ ***20***

Agradecimientos ____ ***21***

Bibliografía ____ ***22***

LISTADO DE FIGURAS, FOTOS Y CUADROS

Pág.

Fig. 1. Ácido benzoico total (ABT) urinario y su origen metabólico en rumiantes. 5

Fig. 2. Diseño de dispositivo de colección parcial de orina (DCPO) utilizado para novillos en pastoreo 9

Fig. 3. Cromatograma, obtenido por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), típico de separación de los compuestos ácido benzoico libre (AB) y sus derivados conjugados ácido hipúrico (AH) y ácido benzoil glucurónido (ABG), correspondiente a muestra de orina. 19

Fig. 4. Concentración de ácido benzoico total (ABT) en la orina obtenida mediante el dispositivo colector parcial de orina (DCPO) y en el total diario de orina excretada (TDOE) 20

Foto 1. Novillo preparado para la colección total de orina y heces en pastoreo 7

Foto 2. Novillito alojado en brete individual, sobre piso con pendiente leve. 12

Foto 3. Toma de heno para preparar las raciones diarias individuales. 13

Foto 4. Pastura de *Digitaria eriantha* que se utilizó como fuente de forraje. 13

Foto 5. Tubo colector para retener la orina caída sobre el piso recubierto con goma (CP). 13

Foto 6. Operación de vaciado de bolsa colectora de heces. 14

Foto 7. Muestra de orina para conservación a -20ºC. 14

Cuadro 1. Valores descriptivos de las variables consumo de forraje (*n*=18), digestibilidad de la dieta (*n*=18) y excreción urinaria (*n*=15). 19

Cuadro 2. Discrepancia entre los valores de concentración de ácido benzoico total (ABT) en la orina acumulada en el dispositivo colector parcial de orina (DCPO) y en el total diario de orina excretada (TDOE) 20

RESUMEN

El ácido benzoico total (ABT), como biomarcador urinario que incluye al ácido benzoico libre (AB) y sus formas conjugadas ácido hipúrico (AH) y ácido benzoil glucurónido (ABG), tiene potencial para predecir el consumo de forrajes por rumiantes. Sin embargo, la colección del total diario de orina excretada (TDOE) constituye una limitación metodológica importante, especialmente en condiciones pastoriles, al emplear dicha clase de biomarcador. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficiencia de un dispositivo colector parcial de orina (DCPO) para bovinos machos, como estimador de la concentración de ABT en el TDOE. Se realizó un ensayo a galpón, alojando tres novillitos Holando Argentino en bretes individuales, cuyo piso, inclinado y revestido de una lámina de caucho, tuvo adosado en su parte posterior un recipiente contenedor tubular plástico (CP) para recuperar la orina derramada desde los DCPOs por rebase. El ensayo duró doce días consecutivos, con mediciones y muestreos en los cinco últimos. El alimento dispensado a los animales consistió en heno de *Digitaria eriantha* Steudel ssp. eriantha cv Irene, asignado *ad libitum* en dos suministros diarios de igual peso. Tras cada suministro de forraje, se registraron los volúmenes de orina retenidos en el DCPO y en el CP y se tomaron muestras urinarias, en las que se cuantificaron las tres formas del ABT por cromatografía. La ponderación de las concentraciones de ABT de las muestras obtenidas, por los volúmenes correspondientes de colección registrados, permitió componer las concentraciones de ABT para el TDOE. Al contrastar estos valores con los de las muestras tomadas de las colecciones del DCPO, se observó que la concentración de ABT en la orina de colección parcial fue inferior ($p<0,01$) a la de la colección total correspondiente. Se concluye que el DCPO resultó inadecuado como medio para estimar la excreción del biomarcador en el TDOE, bajo el protocolo experimental utilizado.

Palabras clave: ácido benzoico total, forraje, pastoreo, muestreo urinario.

INTRODUCCIÓN

En Argentina, la producción ganadera de rumiantes se basa en el pastoreo de forrajeras perennes, verdeos estacionales y pastizales naturales, incluyéndose también rastrojos de cosecha de cultivos graníferos. Dicha utilización directa del forraje se complementa, habitualmente, con el suministro de henos, silajes y suplementos energéticos, proteicos y minerales.

Dada la trascendencia que tienen los forrajes en nuestro país, por ser los principales componentes de las dietas del ganado herbívoro, resulta fundamental describir su calidad para sostener la producción animal. Una de las variables que mejor explica la calidad forrajera es el consumo dietario, de manera que es muy importante tenerla en cuenta al momento de tomar decisiones vinculadas a la planificación y manejo de la producción ganadera, así como en la selección de genotipos de forrajes y animales de producción.

Para estimar el consumo de forraje por rumiantes en pastoreo, en las últimas décadas se ha enfatizado el uso de biomarcadores, como por ejemplo *n*-alcanos fecales y ácido benzoico total (ABT) urinario (Mayes *et al.*, 1995). Según Kohlmeier (1991), el término biomarcador hace referencia a cualquier compuesto químico que, medido en materiales biológicos tales como orina, materia fecal, sangre, saliva, leche, etc., sirve como variable respuesta para indicar el grado de exposición del animal a una variable causal, la que normalmente sería la dieta en un problema nutricional. Los compuestos que conforman el ABT urinario -ácido benzoico libre (AB), ácido hipúrico (AH) y ácido benzoil glucurónido (ABG)- tienen un anillo bencénico en su estructura que, al ser muy resistente a la transformación por agentes químicos y/o biológicos, les confiere una gran ventaja en su uso como biomarcadores (Pagella, 1998). La excreción urinaria de ABT, mayoritariamente en la forma de AH, se correlaciona positivamente con el consumo de alimentos lignocelulósicos (Chen *et al.*, 1993;

Pagella *et al.*, 1997a), siendo insignificante el aporte endógeno en la orina (Martin, 1969; Matsuoka *et al.*, 1988). Los ácidos hidroxicinámicos, precursores de ligninas en las plantas vasculares, son los constituyentes dietarios que dan origen al ABT urinario (Pagella *et al.*, 1997b) (Fig. 1).

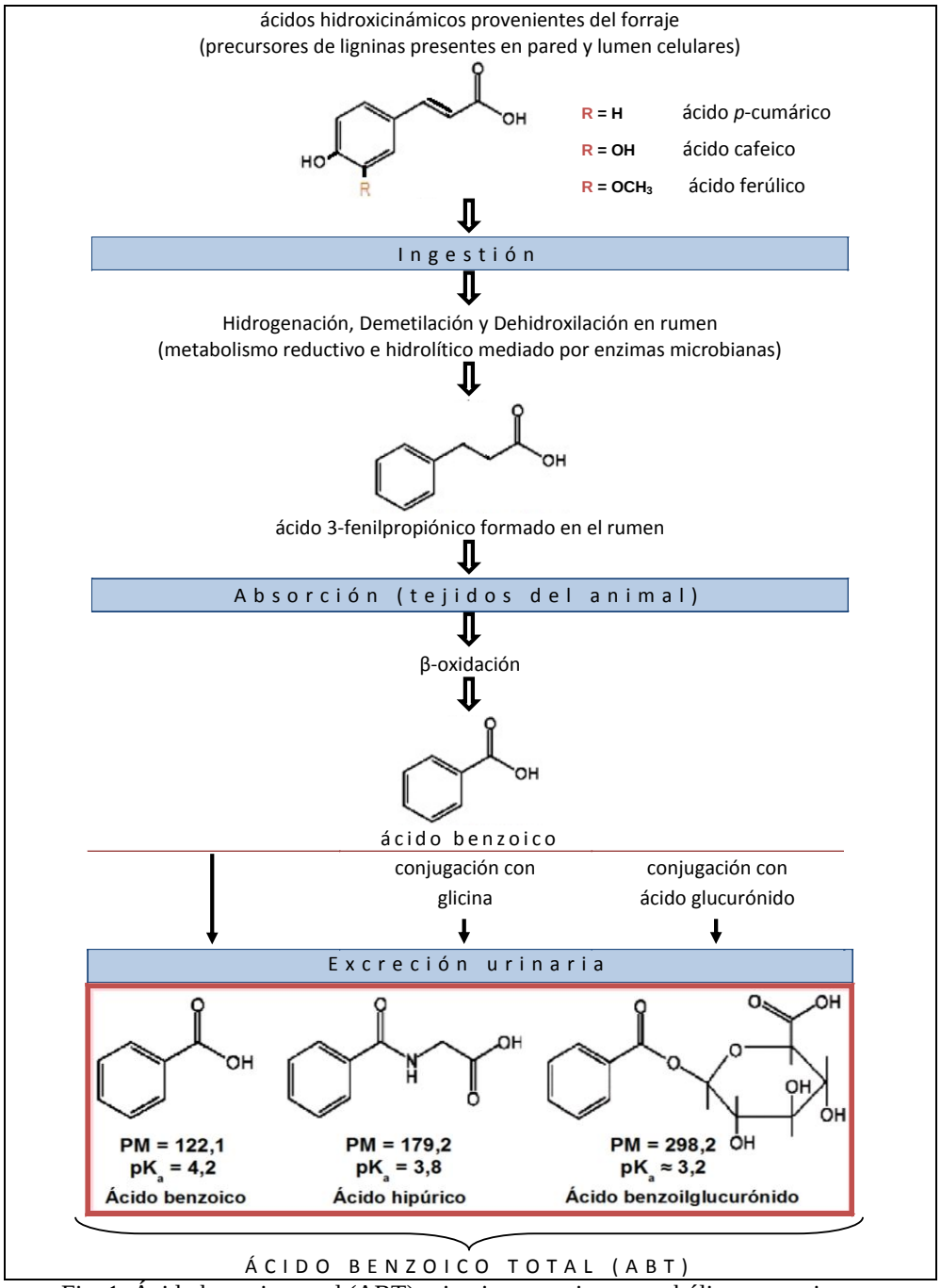

Fig. 1. Ácido benzoico total (ABT) urinario y su origen metabólico en rumiantes.

No obstante, para la aplicación extendida de todo biomarcador urinario, la colección del total diario de orina excretada (TDOE) impone, fundamentalmente en la situación pastoril, un gran obstáculo metodológico.

ANTECEDENTES SOBRE LA COLECCIÓN DE ORINA EN PASTOREO

El uso de biomarcadores urinarios en pastoreo, como es el caso del ABT excretado en la orina de rumiantes, no sólo es importante en estudios nutricionales (consumo dietario, digestión, balance de nitrógeno, metabolismo energético), sino también en estudios concernientes al campo de las ciencias veterinarias, vinculados con problemas de fisiología, farmacología y patología, o seguimientos de trazabilidad en relación a la dieta que ha recibido el animal. Sin embargo, tales estudios adolecen de una restricción que muchos investigadores evitan afrontar: la inexistencia de metodologías adecuadas, de sencilla aplicación, para muestrear orina en pastoreo. Varios fueron, y siguen siendo, los intentos para idear un sistema de colección urinario, principalmente en bovinos y ovinos, que sea portado por el animal, fácil de manipular, adaptable a una amplia variedad de condiciones y que cause el mínimo efecto negativo en su salud y conducta.

A continuación se mencionarán algunos trabajos publicados sobre distintos tipos de métodos, aplicables a la colección de orina de bovinos machos en pastoreo. El hecho de recurrir a machos radicó en la mayor facilidad para obtener una buena dotación de orina limpia, libre de contaminación con heces y secreciones vaginales, comparada con la obtenida de hembras. En éstas la colección urinaria exige, por las cuestiones antes mencionadas, el empleo de artilugios (catéteres, sondas, arneses) que muchas veces resultan muy incómodos o que, incluso, requieren de alguna preparación quirúrgica para colectar la orina, lo que podría impactar negativamente en su bienestar, fisiología, conducta normal y producción de excreta.

Como método invasivo aplicado a novillos, Allen (1974) describió la cateterización de la uretra para la colección total de orina. Sin embargo, este procedimiento quirúrgico resultó inconveniente debido al riesgo de infección de la uretra y a la posibilidad de liberación y pérdida del catéter, además de afectarse, posiblemente, el volumen de colección urinaria (Kurien *et al.*, 2004). Por otro lado, se han publicado trabajos en los que se describen métodos no invasivos, en los que se recurre al empleo de dispositivos colocados alrededor del prepucio. Por ejemplo, Border *et al.* (1963) diseñaron un mecanismo para la colección por gravedad del TDOE, constituido por un receptáculo colector de doble fondo, conectado por tubos plásticos a cisternas de almacenamiento, que se sujetaron al cuerpo del animal por medio de un arnés. En la Foto 1 se muestra un novillo preparado con el mencionado colector urinario, además de una bolsa colectora de heces. Este dispositivo complejo, que también incluía un sistema complicado de válvulas de no retorno, no se sometió a pruebas de validación que estudiaran eventuales pérdidas de orina colectada.

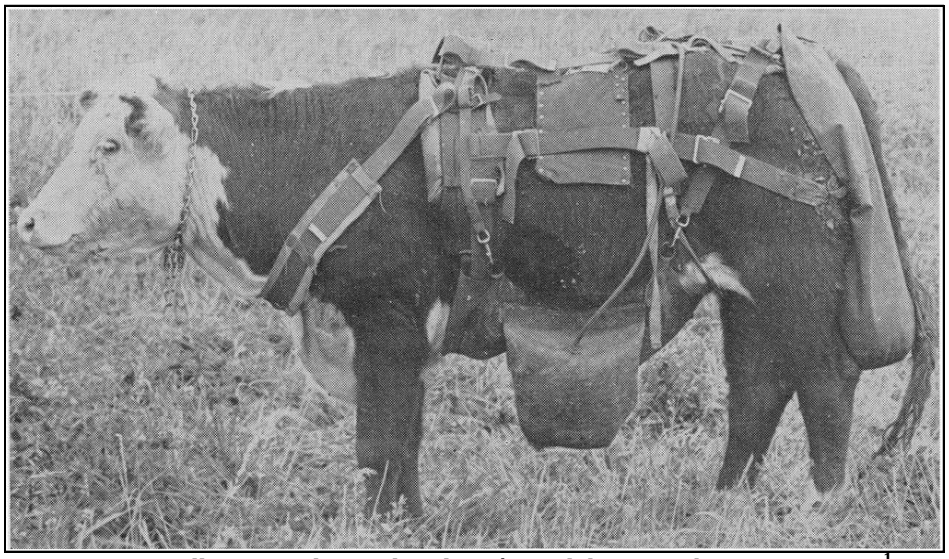

Foto 1. Novillo preparado para la colección total de orina y heces en pastoreo[1]

[1] Fotografía tomada del trabajo de Border *et al.* (1963)

Betteridge y Andrewes (1986) desarrollaron un tipo especial de sistema colector, basado en el bombeo de la orina volcada en un receptáculo adosado al área prepucial de novillos, para de allí conducirla a cisternas de almacenamiento. El mismo se empleó para efectuar, en simultáneo, la medición del flujo de orina y el almacenamiento de sólo una fracción del volumen total de micción. Al producirse una micción, la orina que ingresa al receptáculo colector activa automáticamente un dispositivo medidor de flujo y, al mismo tiempo, el bombeo de un 25% del volumen de micción hacia un contenedor plástico de 4,5l de capacidad. Una limitación de este sistema es la necesidad de contar con una bomba alimentada por baterías que el animal debe llevar fijada a su lomo, así como el recipiente contenedor de orina, aunque este último sería de menor volumen respecto al dispositivo descripto anteriormente.

Por otro lado, algunos investigadores optaron por la colección parcial de orina, expresando la concentración urinaria de metabolitos, utilizados como biomarcadores, relativa a la concentración de otro metabolito urinario como la creatinina. Siguiendo este enfoque, Pagella (1998) diseñó un dispositivo colector parcial de orina (DCPO) formado por un tubo de película de polietileno, como único elemento constitutivo, que pendiendo en forma de “u” se adosó, por un extremo, alrededor del prepucio y, por el otro y hacia craneal de dicho órgano, se sujetó al abdomen sin sellarse. Una bolsa de hule, sujeta por arnés, se utilizó para proteger externamente al tubo, ya que se desarrolló para ser empleado en condiciones de pastoreo (Fig. 2). Debido al diseño del DCPO, si el volumen de orina acumulado excediera su capacidad, o si el animal se echara comprimiendo el tubo de polietileno, gran parte de la orina se perdería por rebase a través del extremo abierto. Sin embargo, aún quedaría un remanente disponible para el muestreo. Otro atributo de su diseño es que, por su sencillez, determinaría en los animales un menor disconfort, respecto a los otros tipos de dispositivos colectores antes

citados. Como otras ventajas, se pueden mencionar el hecho de eludir la preparación quirúrgica de animales y su bajo costo de construcción.

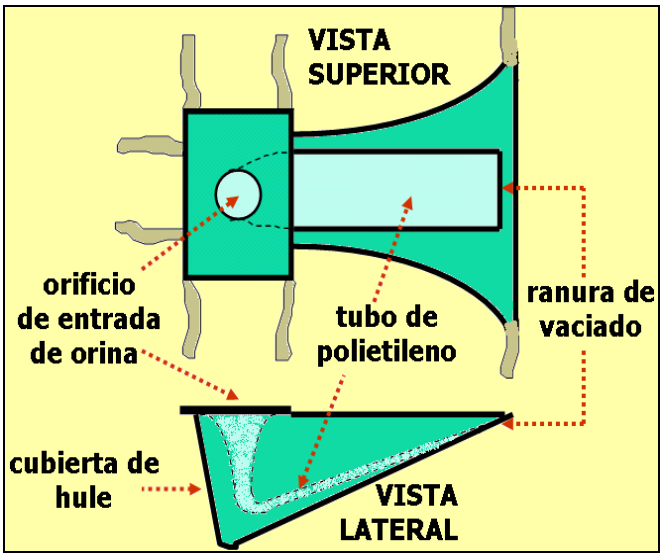

Fig. 2. Diseño de dispositivo de colección parcial de orina (DCPO) utilizado para novillos en pastoreo[2]

El DCPO fue utilizado por Pagella (1998) bajo el supuesto de que, durante el período de colección, se acumula orina que resulta de una mezcla a la que contribuyen distintos eventos sucesivos de micción. Sin embargo, el mismo no fue sometido a pruebas de validación, en cuanto a evaluar el grado en que, la concentración de metabolitos urinarios de sus colecciones parciales, se asemeja a la de la colección total de orina.

HIPÓTESIS

"La concentración de ABT en muestras de orina retenidas en el DCPO, es representativa de la correspondiente al TDOE".

---

[2] Adaptado de Pagella (1998)

OBJETIVO

El objetivo del trabajo fue evaluar si el DCPO desarrollado por Pagella (1998) se constituye en un buen medio para estimar la concentración de ABT en el TDOE. Al efecto, se contrastaron las concentraciones de dicho biomarcador en las muestras de orina procedentes del DCPO y del TDOE.

MATERIALES Y MÉTODOS

TRABAJO EXPERIMENTAL CON ANIMALES

Se realizó un ensayo con animales en confinamiento, alimentados a base de forraje, en el "Galpón de Metabolismo" de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam). Tres novillitos Holando Argentino, de 277(±12) kg de peso vivo (PV), procedentes de la unidad de tambo de la misma institución, se alojaron en bretes individuales. En el brete (Foto 2), cada novillito se ubicó sobre un piso conformado por una plataforma de madera levemente inclinada, con caída hacia caudal del animal, y revestida en superficie por una lámina de caucho sintético. Para reducir parcialmente su desplazamiento, el animal estuvo contenido frontal y lateralmente por una baranda de metal, a la que fue sujetado por medio de una cadena y bozal. Además, cada brete contó con un comedero de chapa y un bebedero de plástico. El agua de bebida fue provista *ad libitum*, con renovación periódica. El único alimento suministrado a los animales fue heno de *Digitaria eriantha* Steudel ssp. eriantha cv Irene (Foto 3). El forraje para confeccionar dicho heno se cosechó en estado de rebrote estival, hacia fines del mes de febrero, luego de un corte de limpieza de la pastura realizado unos 45 días antes (Foto 4). La alimentación fue *ad libitum*, siendo el nivel de asignación diario de materia seca (MS) de heno de 90,43(±3,09) g/kg $PV^{0,75}$. El forraje henificado se

dispensó en dos suministros diarios de igual masa, uno matutino, a las 09:00 hs, y otro vespertino, a las 16:00 hs. La alimentación de los animales experimentales con dicho forraje se inició a corral, siete días antes de comenzar el ensayo en los bretes. El período experimental del ensayo, con los animales alojados en los bretes individuales, se extendió durante doce días consecutivos, divididos en dos etapas: (a) de pre-medición, abarcando los primeros siete días, y (b) de muestreo, correspondiente a los cinco días restantes. La etapa (a) tuvo por finalidad el acostumbramiento de los novillitos a la condición de confinamiento, así como el ajuste de la alimentación con forraje a nivel *ad libitum* (excedente diario de alrededor del 10% sobre el total de la MS asignada). Culminada esta etapa de pre-medición, en el día 8 del ensayo se dio comienzo a la etapa (b), colocando a cada animal, mediante un juego de correas a modo de arnés, una bolsa de goma para la colección total de heces y un DCPO. La orina de rebase de los DCPOs, derramada sobre la plataforma a modo de piso de los bretes, se recuperó en un recipiente contenedor tubular plástico (CP) adosado en el extremo posterior del brete. La plataforma, gracias a su diseño de plano inclinado, facilitó que la orina fluyera por gravedad y sea captada por el CP (Foto 5). En esta segunda etapa se procedió diariamente a: (1) colectar y pesar, inmediatamente luego del suministro matutino de alimento, el material que resultó como rechazo del heno suministrado en el comedero el día anterior; (2) vaciar las bolsas colectoras de heces dos veces al día (Foto 6), pesar las heces contenidas en ellas, registrar sus pesos y extraer una muestra; (3) medir y registrar, por la mañana y por la tarde, el volumen de orina contenida en los DCPOs y CPs y, seguidamente, extraer una muestra de ambas vías de colección para determinar la concentración de ABT. Las muestras urinarias obtenidas de los DCPOs, de la mañana y la tarde y correspondientes a cada animal, se mezclaron (Foto 7) y, seguidamente, se colocaron en freezer a -20º C, con la finalidad de ser preservadas hasta su análisis.

Por otro lado, durante la etapa experimental de mediciones, y con el sentido de caracterizar su valor nutritivo, se tomaron muestras del forraje suministrado diariamente a los animales. Dichas muestras fueron secadas y molidas a través de tamiz de 1mm para, posteriormente, determinar en ellas la digestibilidad *in vitro* (Tilley and Terry, 1963), las concentraciones de fibra-detergente neutro (Goering y Van Soest, 1970) y de proteína bruta por el método semi-micro Kjeldahl (Nx6,25). Asimismo, a través del registro de la cantidad diaria de MS de forraje ofrecido, forraje rechazado y heces excretadas, se estimó la digestibilidad *in vivo* de la MS (DMS), como variable de caracterización del valor nutritivo de la dieta.

Foto 2. Novillito alojado en brete individual, sobre piso con pendiente leve.

Foto 3. Toma de heno para preparar las raciones diarias individuales.

Foto 4. Pastura de *Digitaria eriantha* que se utilizó como fuente de forraje.

Foto 5. Tubo colector para retener la orina caída sobre el piso recubierto con goma (CP).

Foto 6. Operación de vaciado de bolsa colectora de heces.

Foto 7. Muestra de orina para conservación a -20ºC.

TRABAJO DE LABORATORIO PARA EL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE ORINA

Con el fin de determinar la concentración de ABT, como AB, AH y ABG, en las muestras colectadas de orina, se utilizó un método de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase reversa, tomando como referencia el trabajo de Chen *et al.* (1996). Para ello se empleó un equipo HPLC marca Hewlet Packard serie 1090, provisto de bomba ternaria, sistema de degasificación en línea, dispositivo de inyección automática, detector de haz de diodos y un soporte informático HP Chem versión VA 8.03 para el sistema de captura de datos. La columna analítica usada fue de la marca Varian Pursuit, de 250 mm de longitud y 4,6 mm de

diámetro interno, rellena con material pelicular a base de octadecilsilano (C18) de 3 µm de diámetro de partícula. La fase móvil o eluente de la cromatografía estuvo constituida por: (1) una fase acuosa, ajustada a pH 2,5 con ácido fosfórico 85%, la que incluyó 5 g/l de fosfato diácido de potasio y 10 ml/l de trietil amina, y (2) una fase orgánica compuesta de acetonitrilo. Se trabajó bajo un régimen isocrático con una relación 75:25 para la proporción fase acuosa:fase orgánica. El caudal de elución fue 1,0 ml/min y el volumen de inyección de muestra 10 µl. Las inyecciones se efectuaron por duplicado para cada muestra. La separación cromatográfica se realizó a 40ºC y a una presión del sistema de 10 Mpa. La longitud de tiempo de la corrida cromatográfica fue establecida en 10min. El detector se ajustó para trabajar a una longitud de onda fija, la que fue seleccionada por análisis de barrido espectral en UV (longitudes de onda entre 200 a 400 nm) utilizando soluciones madre de cada compuesto objeto del análisis. El valor de longitud de onda seleccionado para la rutina de trabajo del detector fue de 230 nm, teniendo en cuenta que se observaron máximos de absorbancia de 228 nm para AH, 229 nm para AB y 234 nm para ABG, con un hombro secundario alrededor de los 275 nm para los tres compuestos. Para la preparación de la solución patrón, se utilizaron reactivos de altísima pureza (≥98%) provistos por la firma Sigma-Aldrich, en el caso de AB y AH, y por LC Scientific Inc., Ontario, Canadá, para el caso de ABG. Para ello, con cada compuesto se preparó una solución madre a la concentración de 0,4 mg/ml, utilizando metanol como solvente. La solución patrón final se preparó transfiriendo 2 ml de cada solución madre a un matraz aforado, y completando hasta un volumen total de 10 ml por agregado de mezcla acuosa-orgánica del eluente. De este modo, las concentraciones de cada una de las especies químicas en la solución patrón resultaron ser de 0,66 mmol/l para AB, 0,45 mmol/l para AH y 0,27 mmol/l para ABG. Las muestras de orina almacenadas, una vez descongeladas, se agitaron manualmente durante 30

segundos inmediatamente antes de tomar una alícuota para su análisis. Utilizando una micropipeta calibrada, de cada muestra de orina se tomó un alícuota de 1 ml que se colocó en un matraz aforado, y se diluyó hasta un volumen final de 10 ml utilizando una solución buffer conformada por acetato de sodio 1M ajustado a un pH de 5,0, por adición de ácido acético glacial. Esta dilución se transfirió luego a un tubo de ensayo de centrífuga para exponerse a agitación por ultrasonido durante 15 min a temperatura ambiente. Retirada la muestra del baño por ultrasonido, se la llevó a una centrífuga de mesa para someterla a una fuerza centrífuga relativa de 2000 xg durante 15 min. Inmediatamente antes de la inyección, se realizó una segunda dilución del sobrenadante con la mezcla acuosa-orgánica del eluente, para llegar finalmente a una muestra diluida 50 veces.

CÁLCULOS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LA INFORMACIÓN

Con los resultados de las determinaciones de laboratorio, se realizó la ponderación de las concentraciones de ABT de las muestras de orina por sus respectivos volúmenes de colección registrados, lo que permitió componer la concentración de ABT para el TDOE. Para cada animal, estos valores se contrastaron con los observados en las muestras tomadas del DCPO, utilizando la prueba de observaciones apareadas, considerándose a los días como repeticiones, y se analizó a cada animal por separado. Con respecto a la utilización del citado modelo estadístico, deben mencionarse restricciones que condujeron a ello. En primer lugar, el diseño original del ensayo con novillitos en confinamiento se circunscribió a los objetivos de otro proyecto de investigación, en el que sólo interesaba obtener un volumen suficiente de orina para estudios de laboratorio. Por otro lado, como limitación del ensayo realizado a galpón, sólo pudo utilizarse un número reducido de animales, y su condición de encierre en bretes no pudo extenderse a un período de tiempo más prolongado, debido a la poca libertad de

movimiento que sufrieron en los bretes. Esto fue llevando, inevitablemente, a que presentaran dificultades para sostenerse en pie, al acalambrarse sus extremidades, cuando el período de encierre se aproximó a las dos semanas. Para la realización del análisis estadístico, los datos se procesaron usando el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al*., 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La realización de este ensayo permitió obtener una buena dotación de orina limpia de ambas vías de colección (DCPO y CP), para someterse a la determinación de la concentración de ABT. El heno que se ofreció a los animales, como único alimento, se caracterizó por poseer una DIVMS de 59,6(±2,5) % y concentraciones de FDN/MS de 74,3(±1,2) % y de PB/MS de 6,50(±0,31) %. Como respuesta a las condiciones experimentales, los novillitos exhibieron los niveles promedio de consumo voluntario de heno, DMS y volumen de excreción urinaria diaria que se muestran en el Cuadro 1. El consumo voluntario se asoció a un remanente de forraje de 11,9(±5,7) % de la MS ofrecida diariamente. Las muestras urinarias analizadas produjeron cromatogramas bastante sencillos en los que las especies químicas AB y AH tuvieron los picos predominantes, siendo ABG un metabolito menor o insignificante (Fig. 3). Es posible que, tanto AH como ABG, sufrieran hidrólisis durante el período de almacenaje de las muestras de orina para dar origen a AB. Es importante recordar que, el protocolo seguido para la colección de muestras de orina no permitió la adición de substancias preservantes. De todas maneras, el objetivo principal del trabajo fue determinar la concentración de ABT en sus tres formas posibles (AB, AH y ABG). Los antecedentes relevados no dan indicios de métodos HPLC en los que se determinara la especie química ABG en forma directa, por lo que, el presente trabajo tendría la originalidad de haber investigado ABG, mediante HPLC, en un fluido biológico como la orina. La concentración de ABT en el TDOE, calculada para los

tres animales, promedió 53,11(±3,16) mmol/kg de MS consumida de forraje, valor que se ubica dentro del rango de 22-133 mmol/kg de MS mencionado por Martin (1975) para rumiantes. Dado que la ingesta comprendió forraje henificado de una gramínea de síndrome fotosintético C4, se hubiese esperado que la excreción urinaria de ABT de los novillitos fuera más elevada. Esta hipótesis responde a que se ha encontrado que los principales precursores de ABT urinario son ácidos hidroxicinámicos (Pagella *et al.*, 1997b), compuestos que están en mayor concentración en el forraje de gramíneas C4, comparado con el de gramíneas C3 y leguminosas (Cherney *et al.*, 1989). Sin embargo, otro factor a considerar es que, al avanzar el estado fenológico del forraje, la excreción urinaria de ABT tiende a disminuir (Martin, 1970). Ello se explica por la biotransformación, en los tejidos vegetales, de los precursores de ABT a compuestos que conforman las unidades estructurales del biopolímero de las ligninas. Si se tienen en cuenta los valores observados para las variables DIVMS, FDN/MS y PB/MS, que caracterizaron el valor nutritivo del heno utilizado como alimento, se puede inferir que una gran proporción de los ácidos hidroxicinámicos pudieron haberse transformado en componentes de las ligninas, quedando así no disponibles como precursores de ABT.

Durante el período de colección urinaria, el DCPO permitió retener un 23,3(±17,7) % del volumen total diario de orina eliminado por los animales. La concentración de ABT medida en las colecciones de DCPO resultó, para cada caso, en una subestimación ($p<0,01$) de la correspondiente al TDOE, cuya magnitud resultó variable entre días y animales (Fig. 4 y Cuadro 2). La subestimación consistente ($\bar{x}$=28,4%) indica que el DCPO produjo valores de concentración de ABT no representativos de los correspondientes al TDOE. Ello podría atribuirse a la simultaneidad del muestreo urinario y suministro de alimento, considerando una asincronía entre excreción urinaria de ABT y absorción de sus precursores dietarios. La concentración tan baja de ABT observada en el día 5, para el animal 1, coincidió con una

condición manifiesta de disconfort del mismo y un volumen muy escaso de orina retenido en el DCPO.

Contemplando el estrés manifestado por los animales, al estar confinados por varios días en bretes individuales, y la dificultad para implementarse un mejor método estadístico que permita analizar la eficiencia del DCPO, se sugiere, para futuras experiencias, aumentar la cantidad de animales y utilizarlos como repeticiones de tratamiento.

Por otro lado, sería interesante estudiar si la discrepancia de concentraciones de ABT entre DCPO y TDOE puede reducirse, por ejemplo, al practicarse la colección de muestras de orina en forma desfasada al suministro de alimento.

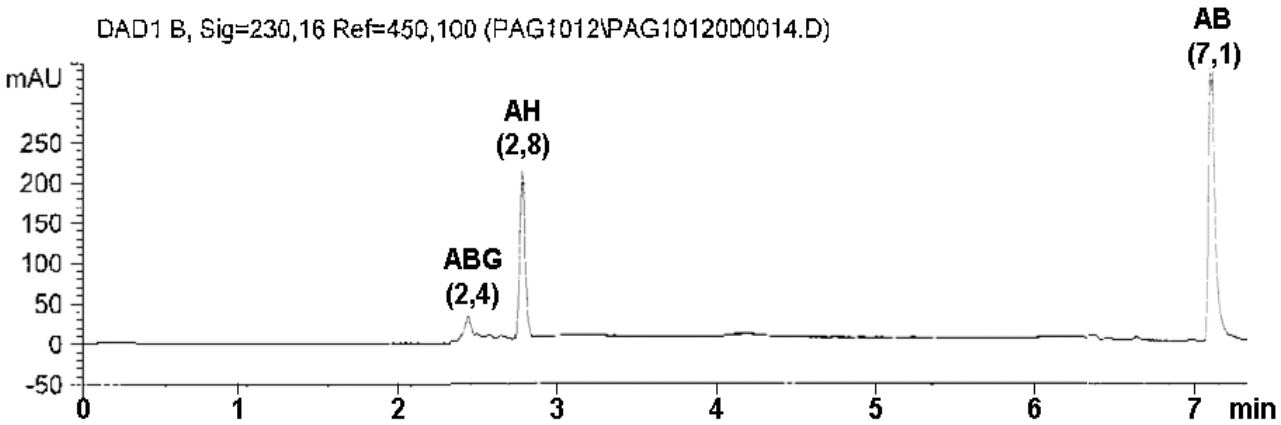

Fig. 3. Cromatograma, obtenido por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), típico de separación de los compuestos ácido benzoico libre (AB) y sus derivados conjugados ácido hipúrico (AH) y ácido benzoil glucurónido (ABG), correspondiente a muestra de orina.

Cuadro 1. Valores descriptivos de las variables consumo de forraje (*n*=18), digestibilidad de la dieta (*n*=18) y excreción urinaria (*n*=15).

Variable de respuesta animal	Media	Desviación estándar
Consumo voluntario de forraje (g MS/kg $PV^{0,75}$/d)	79,6	4,8
Digestibilidad *in vivo* de la MS	0,5641	0,0534
Excreción diaria de orina (ml/kg $PV^{0,75}$)	47,7	12,9

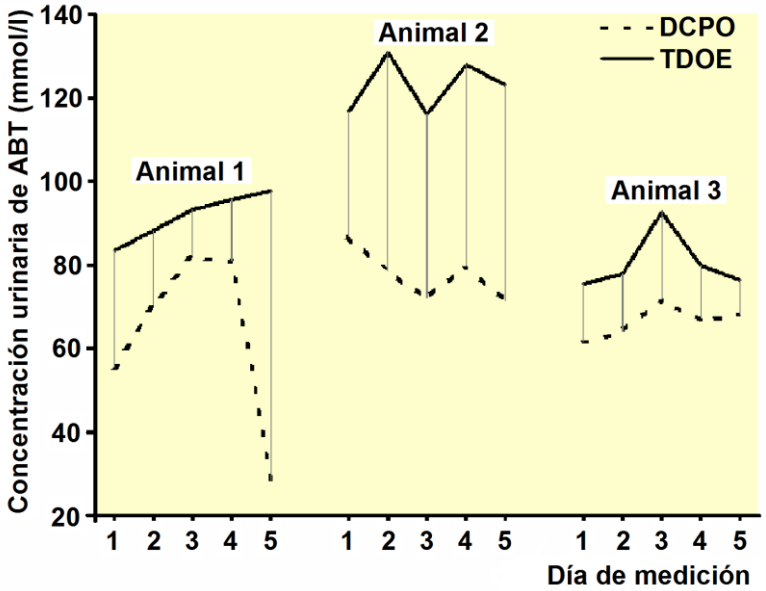

Fig. 4. Concentración de ácido benzoico total (ABT) en la orina obtenida mediante el dispositivo colector parcial de orina (DCPO) y en el total diario de orina excretada (TDOE)

Cuadro 2. Discrepancia entre los valores de concentración de ácido benzoico total (ABT) en la orina acumulada en el dispositivo colector parcial de orina (DCPO) y en el total diario de orina excretada (TDOE)

Animal	Día	mmol ABT/L orina DCPO	mmol ABT/L orina TDOE	mmol/L orina ABT DCPO	mmol/L orina ABT TDOE	% subestimación de ABT en el TDOE
1	1	55.172	83.468	63.279	91.624	30.9
	2	70.002	88.249			
	3	82.008	93.071			
	4	80.833	95.644			
	5	28.381	97.686			
2	1	86.744	116.608	77.584	122.925	36.9
	2	78.415	130.891			
	3	71.989	115.905			
	4	79.568	127.983			
	5	71.203	123.239			
3	1	61.476	75.305	66.337	80.352	17.4
	2	63.794	77.701			
	3	71.683	92.682			
	4	66.835	79.739			
	5	67.897	76.335			
Total						28.4

CONCLUSIONES

Se concluye que el DCPO, bajo el protocolo experimental implementado en el presente estudio, fue inadecuado para estimar la concentración de ABT en el TDOE. La presente investigación es, aparentemente, original al haber determinado en forma directa, por HPLC, el metabolito ABG en orina.

AGRADECIMIENTOS

"La gratitud en silencio no sirve a nadie".[3]

Quiero expresar mi profundo agradecimiento, por su apoyo directo o indirecto, a las siguientes personas que hicieron posible la culminación con éxito de este trabajo de tesis de graduación:

Al Dr. José Horacio Pagella por haber confiado en mi persona y permitirme la oportunidad de ser su tesista de grado, compartiendo su sabiduría y experiencia científica en un marco de confianza y afecto paternal. Gracias por su paciencia, ayuda, consejos y por el apoyo y ánimo brindados durante la dirección de mi Trabajo Final de Graduación.

A la Lic. Valeria Belmonte por sus valiosas contribuciones y sugerencias, en su función como co-directora.

A los evaluadores, M.Ed. Celia Rabotnikof y Dr. Carlos Ferri, por la atenta lectura de este trabajo, sus correcciones, valiosas críticas, comentarios y acertados aportes.

Al Lic. Pablo González, responsable técnico del trabajo con instrumental cromatográfico, del Centro de Investigaciones Experimentales de la Universidad de Morón, por el excelente servicio analítico prestado.

A los Señores Sergio Lardone, Juan Rodríguez y Héctor Gandit, sin cuya ayuda no hubiese sido posible la realización del ensayo con animales.

A mis padres que desde pequeña me inculcaron, enfática y reiteradamente, valores tan imprescindibles como la honestidad, la integridad, el compromiso, la responsabilidad, la dedicación, el respeto, la gratitud y la cooperación. Gracias por recordarme continuamente, a modo de estímulo, que la perseverancia, el sacrificio y el esfuerzo algún día darían frutos. Gracias por su constante acompañamiento y apoyo emocional y económico en esta aventura que significó la carrera.

A Jadi y Karime Viano y a Irma Becker por su ayuda y apoyo incondicionales, y sus consejos e inmenso afecto.

Gracias a Dios por darme su ayuda intangible, pero siempre presente, y permitirme lograr esta meta. *"Un sólo pensamiento de gratitud hacia el cielo, es la oración más perfecta".*[4]

---

[3] Gladys Bronwyn Stern, realmente llamada Gladys Bertha Stern, nació en 1890 y murió en 1973. Escritora y crítica literaria inglesa.

[4] Gotthold Ephraim Lessing, nació el 22 de enero de 1729 y murió el 15 de febrero de 1781. Poeta alemán.

BIBLIOGRAFÍA

Allen, S.D. (1974). A method for bladder catheterization of the male calf. Laboratory Animal Science **24**, pp. 96-98.

Betteridge, K. and Andrewes, W.G.K. (1986). A device for measuring and sampling urine output from free-grazing steers. Journal of Agricultural Science **106**, pp. 389-392.

Border, J.R., Harris, L.E. and Butcher, J.E. (1963). Apparatus for obtaining sustained quantitative collections of urine from male cattle grazing pasture or range. Journal of Animal Science **22**, pp. 521-525.

Chen, X.B., Mejía, A.T., Pagella, J.H., Kyle, D.J. and Ørskov, E.R. (1993). Urinary excretions of purine and benzoic acid derivatives as an indication of microbial protein supply and cellulosic feed intake. In Proceeding of the 22nd Rumen Function Conference, Vol. 22, pp. 15. Chicago, USA.

Chen, X.B., Pagella, J.H., Bakker, M.L. and Parra, O. (1996). Determination of aromatic metabolites in ruminant urine by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography, Series B: Biomedical Applications **682**, pp. 201-208.

Cherney, J.H., Anliker, K.S., Albrecht, K.A. and Wood, K.V. (1989). Soluble phenolic monomers in forage crops. Journal of Agriculture and Food Chemistry **37**, pp. 345-350.

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González L., Tablada, M., Robledo, C.W. (2011). InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

Goering, H.K. and Van Soest, P.J. (1970). Forage fiber analysis: apparatus, procedures, and some applications. Agriculture Handbook No. 379. Washington, D.C., USA: United States Department of Agriculture.

Kohlmeier, L. (1991). What you should know about your marker. In Biomarkers of Dietary Exposure, Proceedings of the 3rd Meeting on Nutritional Epidemiology, pp. 15-25 [F.J. Kok and P. van't Veer, editors]. London, UK: Smith-Gordon and Nishimura.

Kurien, B.T., Everds, N.E. and Scofield, R.H. (2004). Experimental animal urine collection: a review. Laboratory Animals **38**, pp. 333–361.

Martin, A.K. (1969). The urinary excretion of aromatic acids by starved sheep. British Journal of Nutrition **23**, pp. 715-725.

Martin, A.K. (1970). The urinary aromatic acids excreted by sheep given S24 perennial ryegrass cut at six stages of maturity. British Journal of Nutrition **24**, pp. 943-959.

Martin, A.K. (1975). Metabolism of aromatic compounds in the rumen. Proceedings of the Nutrition Society **34**, pp. 69A-70A.

Matsuoka, S., Kogawa, S. and Fujita, H. (1988). Changes in urinary excretion of nitrogenous compounds with progressing of starvation in sheep. Japanese Journal of Zootechnical Science **59**, pp. 752-754.

Mayes, R.W., Dove, H., Chen, X.B. and Guada, J.A. (1995) Advances in the use of faecal and urinary markers for measuring diet composition, herbage intake and nutrient utilisation in herbivores. In Recent Developments in the Nutrition of Herbivores, pp. 381-406 [M. Journet, E. Grenet, M.H. Farce, M. Theriez and C. Demarquilly, editors]. Paris, France: INRA Editions.

Pagella, J.H. (1998). Urinary Benzylated Compounds as Potential Markers of Forage Intake and Metabolism of their Precursors in Ruminants. PhD. Thesis, University of Aberdeen, Scotland, UK.

Pagella, J.H.; Chen, X.B.; Stritzler, N.P. y Ørskov, E.R. (1997*a*). Uso potencial de ácido benzoico urinario como marcador interno para predecir consumo de forraje por rumiantes en pastoreo. Revista Argentina de Producción Animal **17**, suplemento 1, pp. 20.

Pagella, J.H., Chen, X.B., MacLeod, N.A., Ørskov, E.R. and Dewey, P.J.S. (1997*b*). Excretion of benzoic acid derivatives in urine of sheep given intraruminal infusions of 3-phenylpropionic and cyclohexanecarboxylic acids. British Journal of Nutrition **77**, pp. 577-592.

Tilley, J.M.A. and Terry, R.A. (1963). A two stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. Journal of the British Grassland Society **18**, 104-111.