Efecto de la inclusión de ensilado de haba forrajera en la dieta de vacuno lechero sobre la ingestión voluntaria y la producción y composición de la leche

S. Baizán¹, F. Vicente¹, N. Barhoumi¹, I. Feito², L. Rodríguez² y A. Martínez-Fernández^{1,*}

- Área de Nutrición, Pastos y Forrajes. Servicio de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). 33300. Villaviciosa (Asturias), España
- ² Programa de Investigación Forestal. Servicio de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). Finca Experimental La Mata. 33825. Grado (Asturias), España

Resumen

Se cuantificó el contenido de compuestos secundarios (fenoles totales y taninos condensados) del haba en monocultivo, del raigrás italiano en monocultivo y del intercultivo de haba y raigrás, desde forraje verde hasta su inclusión como ensilado en raciones unifeed para vacas lecheras. Se evaluó el efecto de la inclusión de estos ensilados sobre la ingestión voluntaria y sobre la producción y composición química de leche. Para ello, se asignaron al azar 3 raciones unifeed formuladas con ensilado de haba (60% de la materia seca de la ración), raigrás italiano (46%) e intercultivo haba-raigrás (52%), a 9 vacas frisonas distribuidas en 3 grupos siguiendo un diseño en cuadrado latino de 3 x 3. El haba en monocultivo fue el forraje más rico en compuestos secundarios. La concentración de dichos compuestos disminuvó con los procesos de prehenificado y ensilado y se diluyó en la ración con la inclusión de nuevos ingredientes hasta no mostrar diferencias significativas entre dietas. Los valores de ingestión de materia seca de raciones no presentaron diferencias significativas entre dietas (10,29; 10,24 y 10,78 kg de materia seca d⁻¹ para haba, intercultivo de haba-raigrás y raigrás italiano respectivamente). Se observaron diferencias estadísticas en la producción de leche en beneficio de las vacas alimentadas con raciones a base del ensilado de raigrás italiano (P<0,001). La presencia de haba en la ración mejoró significativamente la composición en grasa y proteína de la leche, de manera que al corregir la producción de leche por grasa se anularon las diferencias entre dietas. La presencia de haba en la ración indujo un mayor contenido en urea de la leche.

Palabras clave: Leguminosas, fenoles totales, taninos condensados, producción láctea.

Abstract

Effect of faba bean silage in dairy cow diets on voluntary intake, milk production and composition of milk

The content of secondary compounds (total phenols and condensed tannins) of monocultures of faba bean and Italian ryegrass and faba-ryegras intercrop, from fresh forage to silage and their later inclusion in unifeed rations for dairy cows was measured. The effects of these silages on voluntary intake, dairy production and milk chemical composition were evaluated. For this purpose, three unifeed rations

^{*} Autor para correspondencia: admartinez@serida.org https://doi.org/10.12706/itea.2018.021

were formulated with faba bean (60% of the ration dry matter), Italian ryegrass (46%) or faba-ryegras intercrop (52%) silages, and were randomly assigned to 9 Holstein-Friesian cows divided into 3 groups following a 3 x 3 Latin square design. The faba bean monoculture was the forage with the highest content in secondary compounds. The concentration of these compounds decreased through the wilting and silage processes, and their content was diluted in the ration with the inclusion of new ingredients promoting no significant differences among diets. The dry matter intake of unifeed rations did not show significant differences among diets (10.29, 10.24 and 10.78 kg dry matter d⁻¹ for faba bean, faba-ryegras intercrop and Italian ryegrass respectively). Statistical differences were observed in milk production with the highest values for cows fed rations based on Italian ryegrass silage (P<0.001). The presence of faba bean in the ration improved significantly the milk fat and protein proportion, so, after correcting milk production by fat the differences between diets disappeared. The presence of faba bean in the rations induced higher urea content in milk.

Keywords: Legumes, total phenols, condensed tannins, dairy production.

Introducción

El sector agrícola se enfrenta al desafío de aumentar su producción para suplir la creciente demanda de alimentos, al tiempo que debe ser más eficiente en el uso de los recursos naturales, adaptarse a los nuevos patrones climáticos y hacer una contribución positiva al medio ambiente y la sociedad. Las explotaciones agrarias deben afrontar esta nueva realidad y cambiar sus prácticas agrícolas habituales por otras más sostenibles, ya que según afirma García-Azcárate (2011), "no hay contradicción entre agricultura sostenible y agricultura competitiva, simplemente porque si la agricultura no es sostenible, simplemente no será".

El manejo tradicional utilizado en las explotaciones lecheras de la Cornisa Cantábrica para intensificar la producción forrajera consiste en una rotación anual de dos cultivos (raigrás italiano y maíz forrajero). Esta rotación forrajera es altamente productiva pero no cumple con los requerimientos actuales orientados hacia una agricultura más sostenible, ya que constituye un abuso de gramíneas, es muy exigente en abonos nitrogenados y, repetida de forma continuada, tiene un efecto negativo sobre la fertilidad del suelo (Jiménez-Calderón et al., 2018). La sus-

titución del maíz como cultivo de verano es difícil por su elevada rentabilidad (Martínez-Fernández et al., 2011), por lo que es preciso buscar nuevos cultivos de invierno que puedan sustituir al raigrás italiano.

Baizán et al. (2015) indican que cultivos multifuncionales como las leguminosas forrajeras (haba, altramuz y trébol violeta) se presentan como una gran oportunidad para solventar estos desafíos agronómicos y ambientales, destacando el haba forrajera, tanto en monocultivo como asociada con raigrás italiano, como una alternativa invernal sostenible al raigrás italiano en las condiciones edafoclimáticas de la Cornisa Cantábrica, debido a su elevado rendimiento, su alto contenido en proteína, por mejorar el perfil edáfico (Baizán et al., 2017) y no requerir aporte complementario de nitrógeno en primavera.

Revisiones bibliográficas como las de Lüscher et al. (2014) y Preissel et al. (2015) describen también el potencial de las leguminosas, destacando propiedades como la menor dependencia de fertilizantes nitrogenados, menores emisiones de gases de efecto invernadero y nitratos, y mayor autosuficiencia proteica en la explotación agroganadera, lo que permitiría ayudar a los agricultores a reducir costes y a proteger el medio ambiente. Jiménez-Calderón et al. (2018) corroboran estos resultados

con un intercultivo de haba y colza. Sin embargo, Jiménez-Calderón (2017), observó una reducción significativa en la ingestión voluntaria en vacuno lechero con las dietas formuladas con ensilado de este intercultivo, que achacó a la presencia de glucosinolatos en la colza o de compuestos secundarios en el haba.

Los compuestos secundarios presentes en las leguminosas, aunque en el pasado fueron considerados como antinutricionales, pueden tener efectos beneficiosos en la alimentación de rumiantes, al inhibir la oxidación de las grasas y mejorar la utilización de las proteínas de la dieta, incrementando así la eficiencia de producción de carne, lana y leche (Mueller-Harvey, 2006; Waghorn, 2008). Además, pueden afectar positivamente a la sanidad de los rumiantes cuando son utilizados como alternativas antiparasitarias (Frutos et al., 2008) y pueden actuar como reductores de la emisión de ciertos contaminantes como nitrógeno y metano (Baumont et al., 2016). Por otro lado, Copani et al. (2014) señalan que los taninos tienen un efecto positivo en la calidad del ensilado, al limitar la degradabilidad de la proteína mejorando eficazmente el valor de nitrógeno del ensilado e incrementando la fermentación láctica en el silo.

La concentración y composición de compuestos secundarios dependen de la especie vegetal, variedad, órgano de la planta, estación del año y método de conservación (Lüscher et al., 2014). Dentro de este grupo de compuestos, los más habituales son los taninos condensados, compuestos polifenólicos presentes en las plantas que desempeñan un papel de defensa contra herbívoros y patógenos. Sin embargo, algunos autores indican que una concentración elevada de taninos condensados en la dieta (> 50 g kg⁻¹ de materia seca –MS–) causa una menor ingesta de alimento debido a su efecto astringente (Min et al., 2003; Frutos et al., 2004).

El contenido medio en taninos condensados en el haba es muy variable, desde 5 a 56,4 g kg⁻¹

MS (Vilariño et al., 2009; Molina-Alcaide, 2016). Sin embargo, es importante señalar que los contenidos de estos compuestos deben ser interpretados con precaución, ya que el uso de diferentes metodologías de análisis y de diferentes estándares (quebracho, ácido tánico, catequina, cianidina, delfinidina, estándar interno de la propia planta, etc.) pueden dar lugar a resultados muy diferentes y por ello muy equívocos (Frutos et al., 2004).

Por todo lo expuesto, se considera que el haba forrajera es una alternativa al raigrás italiano en cuanto a rendimiento y suficiencia proteica, además de por sus múltiples servicios ecosistémicos. Sin embargo, al ser una leguminosa con presencia de compuestos secundarios, antes de recomendar este cultivo a los ganaderos para que lo integren en sus explotaciones es necesario comprobar su efecto sobre la ingestión, así como sobre la producción y composición de la leche.

Por consiguiente, los objetivos de este trabajo fueron dos. En primer lugar, caracterizar el contenido en fenoles totales y taninos condensados del haba forrajera en monocultivo o asociada con raigrás italiano, desde forraje verde hasta el ensilado, así como de las raciones *unifeed* que incluyan a éste último y, en segundo lugar, evaluar si el contenido de estos compuestos afecta a la ingestión y a la producción y composición de la leche.

Material y métodos

Ensayo agronómico: cultivos forrajeros y ensilados

El ensayo se llevó a cabo en la finca experimental del SERIDA de Villaviciosa (43° 28′ 20″ N, 5° 26′ 10″ O; 10 msnm) en Asturias (España). Se utilizó una superficie de tres hectáreas sin irrigación, dividida en tres parcelas colindantes, con un suelo de textura francoarenosa (75,77% arena – 13,48% limo –

10,76% arcilla). Se realizó un abonado de fondo previo a la siembra, de acuerdo con los resultados del análisis del suelo, siguiendo las recomendaciones de Martínez-Fernández y Argamentería-Gutiérrez (2013) para un suelo de fertilidad media, incorporando 60 unidades fertilizantes (UF) de N, 60 UF de P₂O₅ y 130 UF de K₂O. Las parcelas se sembraron (30/10/2015) con un monocultivo de haba forrajera (HB, Vicia faba, L., cv. 'Prothabon 101' a 150 kg ha-1), un monocultivo de raigrás italiano (RI, Lolium multiflorum, Lam., cv. 'Barextra' a 50 kg ha⁻¹), y un intercultivo de haba y raigrás (HBRI) con una dosis de siembra de 75+25 kg ha-1 respectivamente. En la parcela de RI se realizaron dos cortes para ensilar en la primavera de 2016 (el 13 de abril y 30 de mayo) cuando el RI se encontraba en estado fenológico de pre-espigado. Tras el primer corte para ensilar, se añadieron 60 UF complementarias de N en cobertera. En el monocultivo de HB y el intercultivo HBRI no se utilizó N complementario de cobertera para aprovechar la capacidad de fijar N atmosférico de la leguminosa, y ambas parcelas se aprovecharon en un único corte el 21 de abril de 2016 con las habas en estado de floración. Tras un periodo de prehenificado de 24 horas sobre el terreno, para que la materia seca del forraje estuviera en torno a un 25% y asegurar una correcta fermentación, los forrajes (HB, RI y HBRI) fueron ensilados en forma de rotopacas. Se tomaron muestras de los forrajes en verde en el momento de la cosecha, tras la prehenificación y posteriormente de los correspondientes ensilados para la determinación de principios nutritivos, compuestos secundarios (taninos condensados y fenoles totales) y estimación del aporte energético de cada cultivo.

Ensayo de alimentación

Los ensilados de HB, primer corte de RI y HBRI se utilizaron en un ensayo de alimentación de vacuno lechero realizado entre el 10 de

octubre y el 7 de diciembre de 2016, bajo las condiciones establecidas en el Real Decreto 53/2013 de protección de animales utilizados en experimentación. Se utilizaron 9 vacas frisonas, distribuidas al azar en 3 grupos, en un diseño en cuadrado latino de 3 tratamientos x 3 períodos. Al inicio del experimento, las vacas se encontraban en el segundo tercio de lactación con un peso vivo promedio de 664 (± 61,9) kg y una producción media de leche diaria de 36,3 (± 5,01) kg. Cada periodo de ensayo constaba de 21 días, incluyendo 14 días de adaptación a la dieta y 7 de control de la ingestión y de la producción de leche, y de toma de muestras de las raciones y de la leche. Los tratamientos consistieron en 3 raciones unifeed formuladas con los ensilados en estudio junto con paja de cebada y concentrado (Tabla 1).

Las raciones fueron ofertadas ad libitum en pesebre como complemento a un pastoreo diario de 18 horas en praderas polifitas. En el momento del ordeño, las vacas recibían un concentrado suplementario ofertado en función de la producción de leche. Al inicio de cada periodo de muestreo, se realizó un control de producción de la parcela de pastoreo para determinar la disponibilidad de pasto. El consumo de las raciones unifeed fue registrado mediante un sistema de monitorización de ingestión voluntaria y el consumo de concentrado en ordeño mediante un dispensador de pienso instalado en el robot de ordeño. La ingestión de hierba en pastoreo se estimó según el método de rendimiento animal propuesto por Macoon et al. (2003). Se tomaron muestras diarias de cada una de las raciones unifeed, y semanales de la hierba durante el pastoreo y del concentrado en ordeño. La producción de leche se registró en los ordeños de mañana y tarde, muestreando la leche tres veces por semana en días alternos en ambos ordeños mediante un muestreador automático acoplado al robot de ordeño.

Tabla 1. Cantidades de ingredientes (% MS), composición química (% MS) y contenido en energía metabolizable (MJ kg⁻¹ MS) de las diferentes raciones *unifeed* ofertadas en el ensayo de alimentación *Table 1. Ingredient content (% DM), chemical composition (% DM) and metabolizable energy content (MJ kg⁻¹ DM) of unifeed rations offered in the feeding trial*

RI ¹	HBRI ²	HB ³			
45,91	_	-			
-	52,37	-			
-	_	60,46			
5,66	4,71	4,14			
48,43	42,92	35,40			
29,87	30,61	35,07			
87,84	88,97	89,38			
14,75	15,40	14,63			
4,55	4,08	3,52			
20,53	26,19	27,52			
41,81	47,55	48,94			
23,87	27,72	28,91			
10,03	9,33	9,32			
	45,91 - 5,66 48,43 29,87 87,84 14,75 4,55 20,53 41,81 23,87	45,91 – 52,37 – 5,66 4,71 48,43 42,92 29,87 30,61 87,84 88,97 14,75 15,40 4,55 4,08 20,53 26,19 41,81 47,55 23,87 27,72			

¹Monocultivo de raigrás italiano de primer corte; ²Intercultivo haba forrajera-raigrás italiano (60% - 40%); ³Haba forrajera en monocultivo; ⁴Copos de maíz termoaplastados (44%); harina de extracción de soja tostada (34%); maíz (4,73%); pulpa de remolacha azucarera (6,21%); sales de ácidos grasos de palma (2,63%); cebada (2,20%); semilla de algodón (2,20%); bicarbonato de sodio (1,85%); carbonato de calcio (0,70%); cloruro de sodio (0,66%); fosfato bicálcico (0,62%); corrector vitamínico mineral (0,20%).

Determinaciones analíticas

El valor nutritivo de los forrajes verdes y prehenificados, de sus correspondientes ensilados y de las raciones *unifeed* ensayadas fue determinado en el Laboratorio de Nutrición del SERIDA, acreditado por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC, Expediente LE/930) conforme a los criterios recogidos en la norma UNE-EN-ISO/IEC 17025. Las muestras fueron secadas a 60°C durante 24 h (de la Roza-Delgado et al., 2002) y molidas a un tamaño de partícula de 0,75 mm para su análisis de materia seca, cenizas, proteína bruta, extracto etéreo, fibra bruta, fibra neutro detergente y fibra ácido detergente mediante espectroscopía del infrarrojo cercano (NIR) (FOSS NIRSystem 5000, Silver Spring, MD, USA). La digestibilidad de la materia orgánica se estimó según Riveros y Argamentería (1987) a partir de la digestibilidad enzimática de la materia orgánica, estimada por NIR, y de los

contenidos de proteína bruta y fibra neutro detergente. La energía metabolizable (EM) se estimó tomando el valor promedio de la EM calculada por las ecuaciones propuestas por el Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF, 1984) y el Agricultural Development and Advisory Service (ADAS, 1985) a partir de la materia orgánica digestible (MOD) en los forrajes y de la materia orgánica, proteína bruta, extracto etéreo, fibra bruta y extractos libres de nitrógeno en las mezclas *unifeed*.

La determinación del contenido en compuestos secundarios (fenoles totales y taninos condensados) de los forrajes (frescos, prehenificados y ensilados) y sus correspondientes raciones unifeed se realizó en el laboratorio del Centro Tecnológico Forestal y de la Madera (CETEMAS, Carbayín-Siero, Asturias). No se llevó a cabo la determinación de estos compuestos en el pasto debido a que la composición botánica de éste incluye más de un 60% de Lolium perenne, Bromus spp. y Agrostis spp., especies con escasa o nula presencia de fenoles totales y taninos. Los extractos para la cuantificación de compuestos fenólicos se obtuvieron, según el protocolo descrito por Sanz et al. (2010), partiendo de 1 g de muestra liofilizada y molida en nitrógeno líquido, a la que se añadieron 100 mL de metanol: agua (50:50, v/v). La determinación de fenoles totales se realizó utilizando una modificación del método de Folin-Ciocalteu (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2011) para adaptar los volúmenes a una microplaca de 96 pocillos. En cada pocillo se adicionaron 10 μL de muestra, 215 μL de H₂O, 15 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA) y 60 µL de Na₂CO₃ (20%, m/v). En cada placa se incluyó un blanco (metanol) y una curva patrón de ácido gálico (0,0125 - 0,6 mg mL⁻¹) (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA). Tras agitar e incubar 30 min a 25°C se realizó la lectura espectrofotométrica a 750 nm. Los resultados fueron expresados como ma equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca (mg EAG g-1 MS). La cuantificación de taninos condensados se realizó según el método de Sun et al. (1998) mediante el ensayo de la vainillina. Este método se modificó para adaptar los volúmenes a una microplaca de 96 pocillos. En cada pocillo se adicionaron 50 µL de muestra, 125 µL de vainillina 1% (m/v, en metanol) y 125 μ L de H₂SO₄ 25% (v/v, en metanol). En cada placa se incluyó un blanco (metanol) y una curva patrón de (+)- Catequina hidratada (0,015 - 0,5 mg mL⁻¹) (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA). Tras agitar e incubar 15 min a 30°C se realizó la lectura espectrofotométrica a 500 nm. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de (+)- Categuina por gramo de materia seca (mg EC g⁻¹ MS).

El consumo de fenoles totales y taninos condensados (g día-1) se estimó multiplicando el contenido de estos compuestos presentes en las raciones *unifeed* por la cantidad de MS de la ración ingerida.

El análisis en nutrientes de la leche se realizó en el Laboratorio interprofesional lechero y agroalimentario de Asturias (LILA, Llanera, Asturias) mediante equipos de reflectancia de infrarrojo medio FTIR acreditados por ENAC (Expediente LE/476). La cantidad de leche individual producida diariamente fue corregida por el 4% de grasa.

Análisis estadístico

Todos los resultados fueron analizados mediante el software estadístico R (R Core Team, 2016). Los resultados de fenoles totales y taninos condensados, así como la composición química de los forrajes (verdes y prehenificados), de sus correspondientes ensilados y de las raciones *unifeed* fueron contrastados mediante un análisis de varianza utilizando el tipo de forraje y el método de conservación como factores principales. Para la ingestión voluntaria y producción de leche se realizó un análisis de varianza considerando el tipo de forraje y período como efectos fijos y la vaca como efecto aleatorio.

Resultados

En la Tabla 2 se muestra el contenido en proteína bruta (PB), materia orgánica digestible (MOD) y energía metabolizable (EM) de los forrajes en verde, prehenificados y ensilados, y de las raciones elaboradas con dichos ensilados. El mayor aporte proteico corresponde al monocultivo de HB, mientras que el RI es el forraje con mayor contenido en MOD y EM. Tras la elaboración de las raciones, el contenido en PB se iguala (P>0,05), ya que di-

Tabla 2. Contenido en proteína bruta (% PB), materia orgánica digestible (% MOD) y energía metabolizable (EM, MJ kg⁻¹ MS) en el forraje verde en corte directo, prehenificado, ensilado y en las raciones *unifeed* elaboradas a partir de los ensilados de los forrajes ensayados (los resultados se expresan referidos a materia seca)

Table 2. Crude protein content (% CP), organic matter digestibility (% OMD) and metabolizable energy (ME, MJ kg⁻¹ DM) in fresh forage, wilted forage, silage and unifeed rations elaborated with the silages of tested forages (results expressed on dry matter basis)

	RI ¹	HBRI ²	HB ³	e.e.m. ⁴	Р
Proteína bruta (% PB)					
Forraje verde	8,50 ^{a A}	10,83 ^{ab A}	11,99 ^{b A}	1,135	*
Forraje prehenificado	8,53 ^{a A}	10,02 ^{ab A}	12,58 ^{b AB}	1,008	**
Forraje ensilado	11,24ª A	12,34 ^{ab AB}	13,41 ^{b AB}	0,561	**
Raciones unifeed	14,75 ^B	15,40 ^B	14,63 ^B	0,946	NS
e.e.m. ⁴	0,855	0,894	1,039		
P	***	***	*		
Materia orgánica digestible (% MOD)					
Forraje verde	75,52°	67,10 ^{b B}	49,80 ^a	1,741	***
Forraje prehenificado	71,08 ^b	64,76 ^{b B}	46,16 ^a	2,938	***
Forraje ensilado	73,29 ^b	55,55 ^{a A}	54,39 ^a	3,338	***
Raciones unifeed	ND ⁵	ND	ND		
e.e.m. ⁴	1,967	2,685	3,425		
P	NS	**	NS		
Energía metabolizable (EM, MJ kg-1 MS)					
Forraje verde	12,08 ^{c C}	10,70 ^{b A}	7,39 ^{a A}	1,135	***
Forraje prehenificado	11,37 ^{b B}	10,36 ^{b A}	7,39 ^{a A}	1,008	***
Forraje ensilado	11,73 ^{b BC}	8,89 ^{a B}	8,70 ^{a B}	0,561	***
Raciones unified	10,03 ^{b A}	9,33 ^{a B}	9,32 ^{a B}	0,946	**
e.e.m. ⁴	0,261	0,362	0,493		
P	***	***	***		

¹Monocultivo de raigrás italiano de primer corte; ²Intercultivo haba forrajera-raigrás italiano (60% - 40%); ³Haba forrajera en monocultivo; ⁴Error estándar de la media. ⁵No determinado. Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre tipo de forraje. Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tipo de conservación.

chas raciones se formularon para ser isoproteícas. En cuanto a la EM, aunque se procuró que las raciones fueran isoenergéticas, la mayor proporción de concentrado finalmente utilizada para elaborar la ración con el ensilado de RI para alcanzar el mismo nivel de PB hizo que aparecieran diferencias significativas entre tratamientos (P<0,05), con un valor energético ligeramente superior con la ración a base de ensilado de raigrás (10,03 vs. 9,33 vs. 9,32 para MJ kg⁻¹ MS para las raciones de RI, HBRI y HB, respectivamente).

En la Tabla 3 se detalla el contenido en fenoles totales y taninos condensados de los tres forrajes evaluados desde que son cosechados hasta que pasan a formar parte de la ración ofertada a las vacas. Se puede observar que el contenido en fenoles totales del HB en monocultivo y del intercultivo HBRI es muy superior (P<0,001) al de RI en monocultivo en el forraje verde. Tras el proceso de prehenificación, la concentración de fenoles totales disminuye significativamente respecto a los contenidos observados en los forrajes recién cortados. No existen diferencias en la concentración de fenoles entre el prehenificado y el ensilado.

La concentración de taninos condensados en HB es significativamente superior (P<0,05) a la de RI, tanto en el forraje verde como en el pre-

Tabla 3. Contenido en fenoles totales y en taninos condensados en el forraje verde en corte directo, prehenificado, ensilado y en las raciones *unifeed* elaboradas a partir de los ensilados de los forrajes ensayados

Table 3. Total phenols and condensed tannins contents in fresh forage, wilted forage,

silage and unifeed rations elaborated with the silages of tested forages

	RI ¹	HBRI ²	HB ³	e.e.m. ⁴	Р
Fenoles totales (mg EAG g ⁻¹ MS) ⁵					
Forraje verde	13,05 ^{a B}	33,44 ^{b C}	40,72 ^{b C}	3,263	***
Forraje prehenificado	7,99ª ^A	17,45 ^{b B}	22,25 ^{c B}	1,048	***
Forraje ensilado	10,24ª AB	17,74 ^{b B}	18,75 ^{b B}	1,844	**
Raciones unifeed	6,87 ^A	8,05 ^A	9,73 ^A	1,235	0,067
e.e.m. ⁴	1,473	1,989	2,103		
P	***	***	***		
Taninos condensados (mg EC g ⁻¹ MS) ⁶					
Forraje verde	0,67 ^{a B}	0,86 ^{ab B}	1,01 ^{b B}	0,106	*
Forraje prehenificado	0,42ª AB	0,41 ^{a A}	0,82 ^{b B}	0,055	***
Forraje ensilado	0,44 ^{A B}	0,45 ^A	0,39 ^A	0,184	NS
Raciones unifeed	0,24 ^A	0,26 ^A	0,29 ^A	0,035	NS
e.e.m. ⁴	0,122	0,103	0,071		
Р	**	***	***		

¹Monocultivo de raigrás italiano de primer corte; ²Intercultivo haba forrajera-raigrás italiano (60% - 40%); ³Haba forrajera en monocultivo; ⁴Error estándar de la media; ⁵Equivalentes de ácido gálico; ⁶Equivalentes de catequina. Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre tipo de forraje. Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tipo de conservación.

henificado, desapareciendo las diferencias (P>0,05) con el ensilado. En las raciones *unifeed* elaboradas, tanto la concentración de fenoles totales como la de taninos condensados se diluye, no observándose diferencias significativas en el contenido de taninos condensados (P>0,05), aunque se observó una tendencia a la significación estadística (P=0,067) en el contenido de fenoles, con una mayor concentración en la ración *unifeed* elaborada con HB respecto a la elaborada con RI.

Como se puede observar en la Tabla 4, no existen diferencias significativas (P>0,05) ni en el peso vivo al inicio o al final del experimento, ni en la variación diaria de peso vivo de los animales en función de la dieta ingerida. El consumo de MS de las raciones *unifeed*, de pienso y de hierba tampoco presentó diferencias significativas entre las dietas (P>0,05) siendo la in-

gestión total diaria de MS de las vacas similar entre tratamientos. El consumo diario de fenoles totales provenientes de la ración *unifeed* ofertada presentó diferencias significativas entre dietas (P<0,001), con un mayor consumo en la dieta elaborada con ensilado de HB. Sin embargo, el consumo diario de taninos condensados procedente de la ración *unifeed* fue similar entre dietas (P>0,05).

Los efectos de las diferentes raciones ensayadas sobre la producción y composición de la leche se muestran en la Tabla 5. La producción de leche fue menor en las vacas alimentadas con HB y HBRI presentando diferencias significativas frente a la ración elaborada con ensilado de RI (P<0,001). El efecto tratamiento influyó sobre el contenido de grasa y proteína de la leche (P<0,001), obteniéndose las mayores concentraciones para ambas varia-

Tabla 4. Peso vivo (kg), variación del peso corporal de las vacas (kg día-1) y consumo de materia seca de alimentos (kg MS día-1 vaca-1) y de fenoles y taninos (g día-1) a partir de las raciones unifeed durante el ensayo de alimentación

Table 4. Body weight (kg), variation of body weight (kg day¹) and total dry matter intake of feed (kg DM day¹ cow¹) during the feeding trial and phenols and tannins (g day¹) from the unified rations

	RI ¹	HBRI ²	HB ³	e.e.m. ⁴	Р	
Peso vivo inicial	656	650	652	7,718	NS	
Peso vivo final	658	655	660	8,965	NS	
Variación de peso	0,38	0,88	1,25	0,858	NS	
Unifeed	10,78	10,24	10,29	0,972	NS	
Concentrado en ordeño	4,29	4,14	4,10	0,264	NS	
Hierba	11,60	10,54	14,26	3,763	NS	
Total	26,67	24,92	28,65	3,624	NS	
Fenoles	73,45ª	82,16 ^{ab}	98,83 ^b	8,131	***	
Taninos	2,56	2,61	2,88	0,249	NS	

¹Monocultivo de raigrás italiano de primer corte; ²Intercultivo haba forrajera-raigrás italiano (60% - 40%); ³Haba forrajera en monocultivo; ⁴Error estándar de la media. Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre tipo de forraje.

Tabla 5. Producción (kg día⁻¹) y composición (g kg⁻¹) de la leche de las vacas alimentadas con los diferentes forrajes considerados en el ensayo de alimentación Table 5. Milk yield (kg day⁻¹) and milk composition (g kg⁻¹) of dairy cows fed the different forages considered in the feeding trial

	RI ¹	HBRI ²	HB ³	e.e.m. ⁴	Р
Producción de leche	34,42 ^b	32,81ª	32,11ª	1,720	***
Leche corregida por grasa	31,63	30,61	30,67	2,041	NS
Grasa	34,50 ^a	35,10 ^a	37,10 ^b	3,128	***
Proteína	30,60 ^a	30,10 ^a	32,90 ^b	1,645	***
Lactosa	47,40	47,60	47,20	1,794	NS
Extracto seco magro	85,20	84,60	85,80	2,862	NS
Urea (mg L ⁻¹)	212,57ª	271,12 ^b	348,38 ^c	10,259	***

¹Monocultivo de raigrás italiano de primer corte; ²Intercultivo haba forrajera-raigrás italiano (60% - 40%); ³Haba forrajera en monocultivo; ⁴Error estándar de la media. Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre tipo de forraje.

bles con el tratamiento HB. Tras el cálculo de producción de leche corregida al 4% de grasa no hubo diferencias entre tratamientos (P>0,05). Tampoco se observaron diferencias (P>0,05) entre tratamientos en los contenidos en lactosa y extracto seco magro. El contenido de urea también fue significativamente diferente (P<0,001) entre dietas.

Discusión

En el ámbito de los pastos, la familia botánica con mayor contenido en proteína es la de las leguminosas. Por tanto, como era esperable, y coincidiendo con otros estudios en la misma zona geográfica y con los mismos forrajes de invierno (de la Roza-Delgado et al., 2004; Baizán et al., 2015), el mayor contenido en PB corresponde al monocultivo de HB, tanto en verde como prehenificado. Sin embargo, Borreani et al. (2009) reportan unos valores más altos, tanto en forraje verde (20% vs. 12% PB sobre MS en nuestro ensayo) como preheni-

ficado (21% vs.13%). Esta diferencia puede deberse a diferencias ambientales y/o de manejo. El HB es una leguminosa de alto porte, que puede alcanzar una altura de 1,5 a 2 m y cuyos tallos tienen más del 50% de fibra ácido detergente y más del 10% de lignina (Heuzé et al., 2016). Esto se refleja en el menor porcentaje de MOD encontrado en HB y HBRI frente al RI. Por otra parte, las gramíneas en general contienen más hidratos de carbono no estructurales (almidón o azúcares) que las leguminosas. Por ello, el valor energético de HB, tanto en monocultivo como en asociación, no puede competir con el RI que, al igual que en los ensayos realizados por Baizán et al. (2015), fue el cultivo que presentó mayor contenido energético respecto a las otras dos alternativas ensayadas.

Los taninos condensados se encuentran extensamente distribuidos en las plantas dicotiledóneas, en especial en las leguminosas, y se manifiestan con poca frecuencia en gramíneas (Waghorn, 2008). Heuzé et al. (2016) reportan una concentración media de tani-

nos condensados en todas las variedades de Vicia faba de 4,8 mg EC g⁻¹ MS y, para las variedades bajas en taninos, de 0,1 mg EC g-1 MS. El contenido varía en función del genotipo de la planta. Las flores de los cultivares ricos en taninos muestran una gran mancha negra en los pétalos que suelen ser de color rosa pálido, rosa o rojo, mientras que los cultivares bajos en taninos tienen flores blancas (Crépon et al., 2010). Duc et al. (1999) estudiaron el contenido de taninos en las semillas de haba de 12 genotipos diferentes. Las variedades de invierno con flores coloreadas 'Bourbon' y 'Fabiola' presentaron concentraciones de 8 y 10,4 mg EC g⁻¹ MS, respectivamente, mientras que las variedades de invierno con flores blancas 'Glacier' y 'Fabiola ZT' contenían 0,2 mg EC g⁻¹ MS. En el presente estudio se utilizó la variedad 'Prothabon 101' de flores blancas, con un contenido en taninos condensados de 1,01 mg EC g⁻¹ MS en la planta entera. Hay que considerar que la concentración de taninos condensados depende, además de la variedad de haba y de la parte de la planta analizada, de los procedimientos de extracción y del patrón de referencia con el que se expresa la cantidad obtenida (Frutos et al., 2004), haciendo difícil la comparación de resultados.

Los taninos condensados descienden con el prehenificado, aunque este descenso solo fue significativo en HBRI. En un estudio realizado por Copani et al. (2014) con esparceta, también se observó un descenso en el contenido de taninos condensados del forraje verde al prehenificado (35,6 y 25,6 g kg⁻¹ MS, respectivamente), aunque la diferencia tampoco fue estadísticamente significativa. Estos autores hipotetizan que los taninos condensados no se degradan a temperatura ambiente, por lo que la cantidad de taninos condensados se mantiene entre el forraje fresco y el prehenificado.

Se observó una disminución, significativa en el caso del HB y HBRI, de la concentración de taninos condensados tras el proceso de ensilado. Un estudio llevado a cabo por Gefrom et al. (2013), en el que se observa una importante reducción de fenoles totales (32-51% para haba y guisante respectivamente) y de taninos condensados (75% para haba y guisante) tras el proceso de ensilado, atribuye dicha disminución a la capacidad que tienen las bacterias epifitas responsables de la fermentación para degradar estos compuestos. Estos autores proponen este método de conservación como una forma fiable de reducir los compuestos antinutricionales que se atribuyen a las leguminosas, aunque señalan que la tasa de reducción de fenoles y taninos no se incrementa con el uso de aditivos para ensilar.

Entre los efectos negativos vinculados al consumo de taninos que se han estudiado, los trabajos se han centrado principalmente en la disminución de la ingestión voluntaria. Como el efecto de los taninos depende de la concentración, y ésta a su vez de la especie, variedad y órgano de la planta, los resultados que se encuentran en la literatura sobre su efecto son muy diversos, y en algunos casos pueden parecer contradictorios. Varios autores (Min et al., 2003; Frutos et al., 2004) señalan que la ingestión de especies vegetales con un elevado contenido de taninos condensados, en general por encima de 50 g kg⁻ ¹ de MS, reduce significativamente la ingestión voluntaria. Esta recomendación se basa, principalmente, en estudios con especies de Lotus, y puede no ser aplicable a otras especies (Mueller-Harvey, 2006). Además, los diferentes métodos de análisis y estándares utilizados pueden conducir a resultados ambiguos. En el presente trabajo, la inclusión de HB en la ración no deprimió el consumo, ya que el contenido en taninos del forraje verde está por debajo de la concentración considerada como limitante para deprimir la ingestión y, además, este contenido disminuyó con el proceso de ensilado y finalmente se diluyó con la elaboración de la ración unifeed. En un trabajo realizado por Baizán et al. (2017) con dietas y animales similares, la ingestión tampoco se vio deprimida por la inclusión del ensilado de haba en la ración. Sin embargo, estudios realizados por Jiménez-Calderón (2017) con raciones elaboradas con un intercultivo de haba y colza, mostraron una reducción significativa en la ingestión voluntaria en comparación con raciones elaboradas con raigrás italiano. Los resultados encontrados en este trabajo, junto con los de Baizán et al. (2017), inducen a pensar que el efecto depresivo sobre la ingestión en raciones con haba y colza pudo ser debido a los glucosinolatos de la colza (Pailan y Singhal, 2007) y no a la presencia del haba forrajera.

Las vacas alimentadas con RI tuvieron una mayor producción de leche, y un menor contenido en grasa de la misma, posiblemente debido al mayor contenido en energía que presenta esta dieta. Aunque hubiera sido de esperar una mayor concentración de proteína de la leche, se puede especular que la proteólisis que tiene lugar cuando se corta el forraje incrementaría la desaminación microbiana en el rumen, lo que resultaría en una disminución en la absorción de proteínas en el intestino y en un aumento del amoníaco en plasma (Kaufmann et al., 2012). En cualquier caso, el incremento en volumen de leche por animal normalmente lleva apareiada una disminución de los sólidos totales. Cuando la producción de leche se corrigió al 4% de grasa las diferencias de producción no fueron significativas. Por lo tanto, la excreción de grasa total, estimada como producción de leche (kg día-1) por contenido en grasa (g kg⁻¹), fue de 1187 g día⁻¹ en el tratamiento RI, siendo similar a la del tratamiento HB (1191 q día⁻¹). Se observó lo mismo en la excreción diaria de proteína (1053 g día⁻¹ para el RI y 1056 g día-1 para el HB). La excreción de grasa y proteína del intercultivo de HBRI fue ligeramente menor en comparación con ambos monocultivos (1151 g día-¹ para la grasa y 987 g día⁻¹ para la proteína). En consecuencia, a la hora de buscar una alternativa forrajera más sostenible, que mejore la suficiencia proteica de la explotación, permitiendo reducir la compra de proteína externa, sin afectar la producción de leche, las raciones de HB son de gran interés. Baizán et al. (2017) y Jiménez-Calderón (2017) no observaron diferencias en la concentración de grasa y proteína, pero si en la de urea, con intercultivos de haba con colza. El resultado de urea observado en este estudio para el HB se encuentra por encima del rango óptimo establecido por Salcedo-Díaz y Villar-Bonet (2015), que está entre 210 y 320 mg L⁻¹. El nivel de urea en leche es un reflejo del consumo de proteína dietética (Wittwer et al., 1999), y puede ser atribuido a un exceso de proteína en la dieta o a una ineficiente utilización de la misma (Vicente, 2002). Factores como la relación proteína/energía de la dieta o la relación proteína no degradable/degradable en el rumen pueden afectar al contenido de urea en leche (Baker et al., 1995). Si el aporte de energía con la dieta con haba forrajera fue el adecuado, lo que se refleja en su mayor concentración de proteína en la leche, también se esperaría una excreción de urea menor. Por ello, la mayor excreción de urea con dicha dieta puede estar relacionada con el mayor contenido en nitrógeno amoniacal respecto al nitrógeno total en el ensilado de haba forrajera, tanto en monocultivo (16,04% N-NH₃) como asociada con RI (16,32% N-NH₃), que en el ensilado de raigrás italiano en monocultivo (6,04% N-NH₃).

Conclusiones

La inclusión de ensilado de haba forrajera en raciones *unifeed* no afecta negativamente a la ingestión voluntaria, aunque reduce la producción de leche. Sin embargo, la mayor concentración de grasa en la leche de vacas alimentadas con haba forrajera da como resultado que no haya diferencias significativas entre dietas en la producción de leche corregida para un 4% de grasa. El haba forra-

jera también incrementa la concentración de proteína y urea en leche. Los resultados de este trabajo confirman que el haba forrajera es una alternativa viable al raigrás italiano para rotar con maíz forrajero.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el INIA a través del proyecto RTA 2012-00065-C05-01, cofinanciado con fondos FEDER. Silvia Baizán es beneficiaria de un contrato predoctoral FPI-INIA.

Bibliografía

- ADAS (1985). Compound feed evaluation for the ruminants. Technical Bulletin 85/21. Ministry of Agricultural, Fisheries and Food. Reading, UK. 2 pp.
- Baizán S, Vicente F, González MA, González-García C, de la Roza-Delgado B, Soldado- Cabezuelo A, Martínez-Fernández A (2015). Alternativas forrajeras sostenibles como cultivo invernal en zonas templadas. Pastos 45 (2): 23-32.
- Baizán S, Martínez-Fernández A, Vicente F (2017). Evaluación del ensilado de haba forrajera como alternativa al ensilado de raigrás italiano en la alimentación de vacuno lechero. En: XVII Jornadas sobre Producción Animal (Ed. Olazoila AM, Abecia A, Blanco M, Bernués A, Calvo JH, Latorre MA, Palacio J, Ripoll G), pp. 123-125. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA), 30-31 de mayo, Zaragoza, España.
- Baker LD, Ferguson JD, Chalupa W (1995). Responses in urea and true protein of milk to different protein feeding schemes for dairy cows. Journal of Dairy Science 78: 2424-2434.
- Baumont R, Bastien D, Férard A, Maxin G, Niderkorn G (2016). Les intérêts multiples des légumineuses fourragères pour l'alimentation des ruminants. Fourrages 227: 171-180.

- Borreani G, Revello Chion A, Colombini S, Odoardi M, Paoletti R, Tabacco E (2009). Fermentative profiles of field pea (*Pisum sativum*), faba bean (*Vicia faba*) and white lupin (*Lupinus albus*) silages as affected by wilting and inoculation. Animal Feed Science and Technology 151: 316-323.
- Copani G, Ginane C, Le Morvan A, Niderkorn V (2014). Bioactive forage legumes as a strategy to improve silage quality and minimize nitrogenous losses. Animal Production Science 54: 1826-1829.
- Crépon K, Marget P, Peyronnet C, Carrouée B, Arese P, Duc G (2010). Nutritional value of faba bean (*Vicia faba L.*) seeds for feed and food. Field Crops Research 115: 329-339.
- de la Roza-Delgado B, Martínez-Fernández A, Argamentería-Gutiérrez A (2002). Determinación de materia seca en pastos y forrajes a partir de la temperatura de secado para análisis. Pastos 32: 91-104.
- de la Roza-Delgado B, Martínez-Fernández A, Soldado A, Argamentería A (2004). Evolución de la producción y ensilabilidad de la asociación triticale-haboncillos, según estado de desarrollo. En: Pastos y ganadería extensiva. (Ed. García B, García A, Vázquez BR, Zabalgogeazcoa I) pp. 273-278. Sociedad Española para el Estudio de los Pastos. 10-14 de mayo, Salamanca, España.
- Duc G, Marget P, Esnault R, Le Guen J, Bastianelli D (1999). Genetic variability for feeding value of faba bean seeds (*Vicia faba*): Comparative chemical composition of isogenics involving zero-tannin and zero-vicine genes. Journal of Agricultural Science 133: 185-196.
- Frutos P, Hervás G, Giráldez FJ, Mantecón AR (2004). Review: Tannins and ruminant nutrition. Spanish Journal of Agriculture Research 2: 191-202.
- Frutos P, Moreno-Gonzalo J, Hervás G, García U, Ferrreira LMM, Celaya R, Toral PG, Ortega-Mora LM, Ferre I, Osoro K (2008). Is the anthelmintic effect of heather supplementation to grazing goats always accompanied by anti-nutitional effects? Animal 2: 1449-1456.
- García-Azcárate T (2011). Una visión agronómica de propuesta de la futura PAC para después de 2013. Mundo del Agrónomo 17, 24-26.

- Gefrom A, Ott EM, Hoedtke S, Zeyner A (2013). Effect of ensiling moist field bean (*Vicia faba*), pea (*Pisum sativum*) and lupine (*Lupinus spp.*) grains on the contents of alkaloids, oligosaccharides and tannins. Animal Physiology and Animal Nutrition 97: 1152-1160.
- Heuzé V, Tran G, Delagarde R, Lessire M, Lebas F (2016). Faba bean (*Vicia faba*). Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. Disponible en: https://www.feedipedia.org/node/4926 (19 diciembre 2017).
- Jiménez-Calderón, JD (2017). Producción sostenible de leche de vaca mediante pastoreo y cultivos forrajeros obtenidos con fertilización orgánica. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, España.
- Jiménez-Calderón JD, Martínez-Fernández A, Benaouda M, Vicente F (2018). A winter intercrop of faba bean and rapeseed for silage as a substitute for Italian ryegrass in rotation with maize. Archives of Agronomy and Soil Science 64: 983-993. DOI: 10.1080/03650340.2017.1406080.
- Lüscher A, Mueller-Harvey I, Soussana JF, Rees RM, Peyraud JL (2014). Potential of legume-based grassland-livestock systems in Europe: a review. Grass and Forage Science 69: 206-228.
- Kaufmann LD, Dohme-Meier F, Münger A, Bruckmaier RM, van Dorland HA (2012). Metabolism of grazed vs. zero-grazed dairy cows throughout the vegetation period: hepatic and blood plasma parameters. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 96: 228-236.
- Macoon B, Sollenberger LE, Moore JE, Staples CR, Fike JH, Portier KM (2003). Comparison of three techniques for estimating the forage intake of lactating dairy cows on pasture. Journal of Animal Science 81: 2357-2366.
- MAFF (1984). Energy allowances and feeding systems for ruminants, 2nd ed. Reference Book 433. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, UK, 85 pp.
- Martínez-Fernández A, Carballal-Samalea A, de la Roza-Delgado B, Soldado-Cabezuelo A, Modroño-Lozano S, Argamentería-Gutiérrez A (2011). Ensayos de variedades de maíz para ensilar en Asturias (1996-2011). Diferencias entre varie-

- dades actuales y obsoletas y su relación con la venta de semillas. Pastos 41 (2): 211-227.
- Martínez-Fernández A, Argamentería-Gutiérrez A (2013) Recomendaciones para la fertilización de praderas y cultivos forrajeros anuales en zonas templado-húmedas. Afriga 102: 100-110.
- Min BR, Barry TN, Attwood GT, McNabb WC (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. Animal Feed Science and Technology 106: 3-19.
- Molina-Alcaíde E. (2016). Las leguminosas en nutrición de rumiantes. XXVIII Foro de Colaboración Público-Privada. Leguminosas. Producción y consumo. Una revolución pendiente. 15 marzo 2016, Madrid (España). Disponible en: http://wwwsp.inia.es/Investigacion/OtrasUni/TransferenciaTecnologia/ForosINIA/Legumin/Lists/Presentaciones/Attachments/28/27EduardaMolinaEEZ.pdf (Consultado: 2 mayo 2018).
- Mueller-Harvey I (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. Journal of the Science of Food and Agriculture 86: 2010-2037.
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (2011). Compedium of International Methods of Analysis, Method OIV-MA-AS2-10 R2009 1 (extract of ISO 78-2:1999 Standars).
- Pailan GH, Singhal KK (2007). Effect of dietary glucosinolates on nutrient utilization, milk yield and blood constituents of lactating goats. Small Ruminant Research 71: 31-37.
- Preissel S, Reckling M, Schläfke N, Zander P (2015). Magnitude and farm-economic value of grain legume pre-crop benefits in Europe: A review. Field Crops Research 175: 64-79.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en: https://www.R-project.org (Consultado: 19 diciembre 2017).
- Riveros E, Argamentería A (1987). Métodos enzimáticos de la predicción de la digestibilidad in vivo de la materia orgánica de forrajes. I. Forrajes verdes. II. Henos. III. Ensilados y pajas. Avances en Producción Animal 12: 49-75.

- Salcedo-Díaz G, Villar-Bonet A (2015). Interpretación del contenido de urea en leche. Claves para su minimización en las explotaciones de Cantabria. Ed. Consejería de Medio Rural, Pesca y Alimentación, Gobierno de Cantabria. Santander, España, 64 pp.
- Sanz M, Cadahía E, Esteruelas E, Muñoz MA, Fernández de Simón B, Hernández T, Estrella I (2010). Phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) heartwood. Effect of toasting at cooperage. Journal of Agriculture Food and Chemistry 58: 9631-9640.
- Sun B, Ricardo-da-Silva JM, Spranger I (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 4267-4274.
- Vicente F (2002). Informe técnico I. Relación entre la concentración de urea en leche y el manejo nutricional del ganado vacuno lechero. Serie

- Guías Agroganaderas 2ª Ed. SERIDA. KRK Ediciones. Oviedo, Asturias (España), 29 pp.
- Vilariño M, Métayer JP, Crépon K, Duc G (2009). Effects of varying vicine, convicine and tannin contents of faba bean seeds (*Vicia faba* L.) on nutritional values for broiler chicken. Animal Feed Science Technology 150: 114-121.
- Waghorn G (2008). Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-progress and challenges. Animal Feed Science and Technology 147: 116-139.
- Wittwer FG, Gallardo P, Reyes J, Opitz H (1999). Bulk milk urea concentrations and their relationship with cow fertility in grazing dairy herds in Southern Chile. Preventive Veterinary Medicine 38: 159-166.

(Aceptado para publicación el 4 de mayo de 2018)