



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL DE EXTRACTOS DE
QUILLAJA SAPONARIA MOLINA SOBRE LA PRESENTACIÓN DE
CUADROS CLÍNICOS Y GANANCIA DIARIA DE PESO EN
TERNERAS DE CRIANZA ARTIFICIAL**

Francisca Andrea Briceño Cortés

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: RICHARD CHRISTIAN ARANCIBIA BERRÍOS
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE
2016



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL DE EXTRACTOS DE
QUILLAJA SAPONARIA MOLINA SOBRE LA PRESENTACIÓN DE
CUADROS CLÍNICOS Y GANANCIA DIARIA DE PESO EN
TERNERAS DE CRIANZA ARTIFICIAL**

Francisca Andrea Briceño Cortés

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

Nota Final:

Profesor Guía: Richard Arancibia Berríos.

Profesor Corrector: Carlos Núñez Poblete.

Profesor Corrector: Mario Duchens Arancibia.

SANTIAGO, CHILE
2016

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, por su apoyo, confianza y comprensión incondicional. Las personas que inculcaron en mí el valor para emprender esta etapa de mi vida, y la perseverancia para finalizarla exitosamente. Agradezco cada palabra de aliento, cada abrazo y cada mirada de apoyo. Gracias por confiar y creer en mí.

A mi profesor guía, el doctor Richard Arancibia Berríos. Gracias por guiar el término de mi etapa universitaria y por sus enseñanzas como profesor y guía. Agradezco su gran apoyo y la oportunidad que me dio de formar parte de este proyecto, fue un gusto trabajar a su lado.

A mis correctores, los doctores Carlos Núñez Poblete y Mario Duchens Arancibia. Por su apoyo en la realización de este proyecto. Sus consejos fueron fundamentales para superar los obstáculos que se presentaron.

Al doctor Fabricio Cuevas. Por su apoyo infinito y por creer y enseñarme a creer en mis capacidades y aptitudes.

Finalmente agradezco a mis amigos. Gracias por ser mi familia en estos años de universidad, por su apoyo incondicional y por las interminables horas de risas y estudios que pasamos juntos.

ÍNDICE DE CAPITULOS

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.Saponinas.	3
2.1.1. Saponinas de la <i>Quillaja saponaria</i> Molina.	3
2.1.1.1. Actividad Inmunoestimulante.	5
2.1.1.2. Actividad Permeabilizante de Membranas.	6
2.1.1.3. Efecto Estimulador del Crecimiento.	7
2.1.1.4. Actividad Antiviral.	8
2.1.1.5. Actividad Antibacteriana.	9
2.1.1.6. Actividad Antiprotozoaria.	9
2.1.1.7. Actividad Larvicida.	11
2.2. Sistema Intensivo de Crianza Artificial de Terneras.	11
2.2.1. Manejo del Calostro.	12
2.2.2. Desinfección del Cordón Umbilical.	13
2.2.3. Alojamiento y Medio Ambiente.	14
2.3.Principales Enfermedades de los Terneros.	15
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
3.1. Hipótesis.	18
3.2. Objetivo General.	18
3.3. Objetivos Específicos.	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1. Animales y Manejo.	19

4.2. Capacitación.	20
4.3. Registro de Eventos Clínicos.	20
4.4. Medición y Registro de Pesos.	21
4.5. Medición de Proteínas Séricas Totales.	21
4.6. Recopilación de datos y Análisis estadístico.	21
4.6.1. Presentación de Eventos Clínicos.	22
4.6.2. Peso y Ganancia Diaria de Peso.	22
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
5.1. Presentación de Eventos Clínicos.	23
5.2. Pesos.	27
5.3. Ganancia Diaria de Peso.	29
6. CONCLUSIONES	32
7. BIBLIOGRAFÍA	33
8. ANEXOS	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1: Frecuencia de terneras sanas y enfermas según grupo de tratamiento durante el periodo de estudio.	23
Figura 2: Peso corporal (promedio \pm error estándar) corregidos por el nivel de proteínas séricas totales y peso al nacimiento de cada grupo, evaluados cada 15 días desde el inicio del estudio hasta los 60 días.	26
Figura 3: Ganancias diarias de pesos (promedio \pm error estándar) corregidos por el nivel de proteínas séricas totales y peso al nacimiento de cada grupo, evaluados cada 15 días desde el inicio del estudio hasta los 60 días.	28

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos extractos de *Quillaja saponaria* Molina, sobre la presentación de cuadros clínicos y ganancia diaria de peso en terneras de crianza artificial. Se utilizaron 30 terneras Holstein provenientes de una lechería de alta producción, ubicada en la comuna de Chimbarongo. Las terneras fueron asignadas aleatoriamente a tres grupos a medida que nacieron. El grupo I correspondió al grupo control, a cuyas terneras se les dio 2 gramos de fructosa. Las terneras del grupo II recibieron 2 gramos del extracto de quillay Nutrafito Q, el cual contenía un 6% de saponinas, mientras que las terneras del grupo III recibieron 0,6 gramos del extracto de quillay QP 1000 ®, con una concentración de un 20% de saponinas. Ambos grupos recibieron una concentración total de 120 mg. de saponinas totales. Los productos fueron disueltos en el sustituto de leche y administrados oralmente, una vez al día durante los primeros 60 días de vida.

Se calculó la frecuencia de terneras enfermas y el número de días en los que se presentaron terneras enfermas en cada grupo, los que fueron comparados mediante una prueba de diferencia de proporciones chi – cuadrado. El peso y la ganancia diaria de cada grupo fueron medidos cada 15 días, y analizados a través de un análisis de varianza multivariado. Se consideraron como covariables el peso al nacimiento y el nivel de proteínas séricas totales, el cual fue determinado a partir de muestras de sangre tomadas los días 2, 6 y 10 de vida.

Pese a que los grupos tratados con los extractos de quillay Nutrafito Q y QP 1000 ® presentaron una mayor frecuencia de terneras enfermas (5 y 6 terneras enfermas, respectivamente) en comparación al grupo control (2 terneras enfermas), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de terneras enfermas entre los grupos en estudio ($p = 0,20$ entre grupos I – II; $p = 0,68$ entre grupos II – III), no obstante, se observó una tendencia ($p = 0,09$) a una mayor frecuencia de terneras enfermas en el grupo tratado con el extracto QP 1000 ® en comparación a las terneras del grupo control. En relación al número de días en los que se presentaron terneras enfermas, se observó una baja frecuencia (2, 6 y 8 de 600 días en los grupos control, Nutrafito Q y QP 1000 ®,

respectivamente). No se registraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de días en los que se presentaron terneras enfermas, entre los grupos en estudio ($p = 0,17$ entre grupos I – II; $p = 0,60$ entre grupos II – III), no obstante, se observó una fuerte tendencia ($p = 0,06$) a una mayor frecuencia de días en las que hubo terneras enfermas en el grupo tratado con el extracto QP 1000 ® en comparación al grupo control.

En cuanto al peso corporal, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en estudio ($p = 0,56$). El peso fue fuertemente influenciado por el nivel de proteínas séricas totales ($p < 0,0001$) y el peso al nacimiento ($p < 0,0001$). No se registraron diferencias significativas en las ganancias de pesos entre los grupos en estudio ($p = 0,81$). Adicionalmente éstas no fueron influenciadas por el nivel de proteínas séricas totales ($p = 0,15$) ni por el peso al nacimiento ($p = 0,94$).

Se concluyó que la administración oral de los extractos de *Quillaja saponaria*, ya sea como Nutrafito Q y QP 1000 ® en dosis de 120 mg. en una lechería bajo estas condiciones de crianza artificial no tienen efecto sobre el estado sanitario y productivo de las terneras los primeros 60 días de vida.

Palabras claves: Terneras, Extractos de *Quillaja saponaria* Molina, Eventos clínicos, Ganancia diaria de peso.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of two extracts of *Quillaja saponaria* Molina on the incidence of clinical disease and daily gain weight in calves in artificial rearing. Thirty Holstein calves from a high-production dairy farm, located in the town of Chimbarongo, were used. Calves were randomly assigned to three groups as they were born. The group I corresponded to the control group, where the calves received 2 grams of fructose. Calves in Group II received 2 grams of Nutrafito Q quillay extract which contained 6% saponin, while calves in group III received 0.6 grams of QP 1000 ® quillay extract with a concentration of 20% saponin. Both groups received a total concentration of 120 mg of total saponins. The products were dissolved in milk substitute and administered orally, once a day for the first 60 days of life.

The frequency of sick calves and the number of days that each group had disease was calculated, which were compared by a chi - square test of difference of proportions. Body weight and daily weight gain for each group were measured every 15 days and analyzed through a multivariate analysis of variance. Birth weight and total serum protein level, which was determined from blood samples taken on days 2, 6 and 10 of life, were considered as covariates

Even though the groups treated with Nutrafito Q and QP 1000 ® quillay extracts had a higher frequency of sick calves (5 and 6 calves, respectively) compared to the control group (2 calves), no statistically significant differences were observed ($p > 0.05$) in the number of sick calves among the study groups ($p = 0.20$ between groups I – II; $p = 0.68$ between groups II - III). However, a trend was observed ($p = 0.09$) to a higher frequency of sick calves in the group treated with QP 1000 ® extract compared to calves in the control group. Regarding to the number of days in which were sick calves, a low frequency was observed (2, 6 and 8 of 600 days in the control groups, Nutrafito Q and QP 1000 ®, respectively). No statistically significant differences ($p > 0.05$) in the number of days in which were sick calves was observed among the study groups ($p = 0.17$ between groups I – II, and $p = 0.60$ between groups II - III). However, a strong trend was observed ($p = 0.06$) towards a higher

frequency of days in which there were sick calves in the group treated with QP 1000 ® extract compared to the control group.

Regarding body weight, no significant differences between the study groups were observed ($p = 0.56$). Body weight was strongly influenced by of total serum protein level ($p < 0.0001$) and birth weight ($p < 0.0001$). No significant differences in daily weight gain were observed among the study groups ($p = 0.81$). Additionally, daily weight gain was not influenced by the level of total serum protein ($p = 0.15$) nor birth weight ($p = 0.94$).

It was concluded that oral administration of extracts of *Quillaja saponaria*, either as Nutrafito Q and QP 1000 ®, in doses of 120 mg. in a dairy under these artificial rearing conditions has no effect on the health and productive status of calves on the first 60 days of life.

Keywords: Calves, *Quillaja saponaria* Molina extracts, clinical events, daily weight gain.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de un sistema productivo lechero, la crianza artificial de las terneras es una de las etapas de mayor cuidado por parte del médico veterinario. El *status* sanitario de las terneras representa un gran impacto económico a largo plazo, asociado a la presencia de enfermedades, costos de tratamientos, disminución en la ganancia diaria de peso, secuelas productivas y reproductivas, así como eventuales muertes de las terneras (Gorden y Plummer, 2010).

Las patologías digestivas y respiratorias son las de mayor presentación dentro de un sistema de crianza intensivo. La deshidratación por diarrea es la causa más común de muerte en las terneras desde el nacimiento hasta los 30 días de edad (Lorenz *et al.*, 2011a); asimismo las enfermedades respiratorias determinan tasas de crecimiento más lentas y una disminución en la productividad (Lorenz *et al.*, 2011b). Para prevenir la presentación de estos cuadros, el desarrollo y mantenimiento de la inmunidad son esenciales; sin embargo, los programas de vacunación en terneros son difíciles de efectuar debido a la compleja naturaleza de su sistema inmunológico, por lo que la inmunidad de las terneras depende, exclusivamente, de la transferencia pasiva de anticuerpos preformados, mediante el consumo de calostro (Gorden y Plummer, 2010; Lorenz *et al.*, 2011b). No obstante, pese a la administración oportuna de calostro y al adecuado manejo de las condiciones ambientales, no siempre es posible lograr un óptimo nivel de protección, siendo este un punto crítico en un sistema de crianza artificial (Gorden y Plummer, 2010).

Por otra parte, evidencia empírica ha demostrado que extractos de diferentes plantas otorgan beneficios en términos de estimular el sistema inmunológico y prevenir enfermedades (Turner *et al.*, 2002). Se ha descrito que las saponinas derivadas de extractos de *Quillaja saponaria* Molina presentan una fuerte actividad inmunoestimulante, favoreciendo la respuesta inmunológica humoral y celular (Marciani *et al.*, 2001). Es reconocido además su efecto permeabilizante de membranas celulares, lo que favorecería la transferencia de anticuerpos y el crecimiento animal (Moses *et al.*, 2014). Adicionalmente se han descrito sus propiedades antivirales, antibacterianas, antiprotozoarias, antifúngicas y larvicidas (Lacaille-Dubois y Wagner, 1996).

Actualmente ha surgido la necesidad de encontrar alternativas a la utilización de antibióticos en la alimentación animal, que logren promover el crecimiento y prevenir enfermedades en etapas tempranas de la vida (Turner *et al.*, 2002). Por esta razón, el presente estudio, propone evaluar y comparar la eficacia de dos productos a base de extractos de *Quillaja saponaria* Molina, sobre la presentación de cuadros clínicos y ganancia diaria de peso, a fin de establecer su rol como suplemento dietario en los sistemas de crianza artificial en terneras.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Saponinas

Las saponinas son una familia de glucósidos anfifílicos que se encuentran ampliamente distribuidas en plantas superiores y en algunas fuentes animales como invertebrados marinos (Pen *et al.*, 2006; Podolak *et al.*, 2010). Su nombre deriva del latín *sapo* que significa jabón (Podolak *et al.*, 2010), nombre dado por su propiedad tensoactiva que le permite formar soluciones coloidales al disolverse en agua y generar una espuma estable (Sparg *et al.*, 2004; Roner *et al.*, 2010).

Estos glucósidos están constituidos por un núcleo lipofílico, también llamado aglicona, a la cual mediante enlaces glucosídicos se ligan una o más cadenas hidrofílicas, comúnmente azúcares como glucosa, galactosa, metilpentosa, ramnosa o ácido glucurónico (Francis *et al.*, 2002; Roner *et al.*, 2010). En función de su núcleo, estas moléculas se clasifican en dos grandes grupos. El primer grupo lo componen las saponinas esteroidales cuya aglicona contiene 27 átomos de carbono, encontrándose presentes, casi exclusivamente, en plantas angiospermas de la familia Liliopsida. El segundo grupo lo constituyen las saponinas triterpenoides, compuestas por un núcleo de 30 átomos de carbono, comúnmente encontradas en plantas angiospermas de la familia Magnoliopsida (Sparg *et al.*, 2004; Pen *et al.*, 2006; Podolak *et al.*, 2010). En algunos casos, ambos tipos de saponinas pueden acumularse en una misma planta como es el caso de la avena (Podolak *et al.*, 2010).

Estas moléculas se encuentran presentes en las raíces, corteza y frutos de una gran diversidad de plantas, cumpliendo aparentemente una función en los mecanismos de defensas de éstas al presentar propiedades bactericidas, fungicidas y repeliendo el ataque de insectos (Chapagain *et al.*, 2007).

2.1.1 Saponinas de la *Quillaja saponaria* Molina

Uno de los modelos vegetales más estudiados actualmente es el árbol *Quillaja saponaria* Molina, comúnmente conocido como quillay. Este árbol perenne perteneciente a la familia

Rosaceae es nativo de Perú, Bolivia y Chile. Su corteza es gruesa y sus hojas grandes y coriáceas (Pelah *et al.*, 2002; Kirk *et al.*, 2004; Sparg *et al.*, 2004). La corteza de este árbol se ha caracterizado por ser rica en saponinas triterpenoides, identificándose al menos 60 tipos diferentes mediante la técnica de espectrometría de masa. Las saponinas triterpenoides se constituyen a partir de un ácido quillaico común, al cual se enlazan diferentes oligosacáridos en los carbonos 3 y 28 por lo que las diferencias entre los miembros de este grupo de saponinas surgen del nivel de oxidación del esqueleto de ácido quillaico, número de azúcares, su ubicación y restos acilo (Guo *et al.*, 1998; Nord y Kenne, 1999; Roner *et al.*, 2010). Se ha demostrado que la orientación espacial del núcleo lipofílico, así como la composición de los hidratos de carbono de las cadenas laterales se relacionan directamente con las funciones de las saponinas (Holtshausen *et al.*, 2009).

La purificación de la corteza del quillay resulta en la obtención de extractos de *Q. saponaria* ampliamente comercializados. Existen extractos semipurificados, entre un 75 y 80% de pureza, tales como el extracto Quil-A, una mezcla de más de 25 tipos de saponinas diferentes (Kirk *et al.*, 2004; Moses *et al.*, 2014), también se pueden obtener extractos altamente purificados (90% de pureza) tales como el extracto QS-21A (Kirk *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006).

Múltiples son los usos de las saponinas de *Quillaja saponaria*. En la industria de alimentos son clasificadas por la *US Food and Drug Administration* (FDA) como “generalmente reconocidas como seguras” para el consumo humano (Pen *et al.*, 2006), siendo utilizadas como agentes espumantes y potenciadores del sabor (Makkar *et al.*, 1998). Asimismo son utilizadas en la industria cosmética como aditivos de shampoo (Sparg *et al.*, 2004). Sin embargo, en la industria farmacéutica es donde existe el mayor interés debido a sus potenciales efectos biológicos tales como su función inmunoestimulante, permeabilizante de membranas y estimulador del crecimiento. Adicionalmente se han descrito propiedades antivirales, antibacterianas y antiprotozoarias (Sparg *et al.*, 2004; Moses *et al.*, 2014). En contraste, algunos autores han descrito en las saponinas de *Q. saponaria* múltiples efectos negativos, tales como disminución de la ingesta de alimento, reducción en la ganancia de peso, timpanismo ruminal, fotosensibilización, inhibición de la captación activa de

nutrientes incluyendo vitaminas y minerales, y reducción de la fertilidad (Cheeke, 1996; Quin y Xu, 1998; Shimoyamada *et al.*, 1998).

Lo anterior demuestra que pese a las numerosas investigaciones, los resultados no han sido del todo concluyentes, existiendo aún discrepancia en cuanto a sus propiedades y mecanismos de acción (Sparg *et al.*, 2004).

2.1.1.1 Actividad Inmunoestimulante

Las saponinas del quillay tienen la capacidad de estimular la respuesta inmune mediante la producción de linfocitos T citotóxicos y una respuesta inmune Th1 contra antígenos exógenos; permitiendo así su utilización en vacunas de subunidades y vacunas contra patógenos intracelulares (Marciani *et al.*, 2001). Se ha demostrado que el grupo aldehído de este triterpeno es el responsable de estimular la respuesta inmune Th1, mientras que su fracción ácido grasa participa en la formación de las células T citotóxicas (Marciani *et al.*, 2001). Esta propiedad les permite actuar por sí mismas como adyuvantes; es decir, compuestos no necesariamente inmunogénicos, pero que en conjunto con el antígeno mejoran la respuesta inmune (Kim *et al.*, 2006). Adicionalmente, les permite formar parte de complejos inmunoestimulantes (ISCOM), un tipo de adyuvante que tiene la ventaja de reducir la dosis necesaria de antígeno y potenciar la inmunidad tanto humoral como celular (Guo *et al.*, 1998; Pham *et al.*, 2006).

Un estudio realizado por Kensil *et al.* (1991), informó sobre la purificación, aislamiento y caracterización parcial de diversas saponinas derivadas de la corteza de *Q. saponaria*. Se demostró que entre estos componentes, los que presentaban una mayor actividad adyuvante fueron los complejos de saponinas QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21A, siendo este último uno de los más prometedores, dada su gran capacidad de potenciar la respuesta inmune y su bajo perfil tóxico. No obstante, el complejo QS-21A se presenta como un componente menor en la corteza de quillay por lo que actualmente se realizan múltiples investigaciones para su síntesis química (Kim *et al.*, 2006; Adams *et al.*, 2010).

Un inconveniente en el uso de estos glucósidos como adyuvantes es su potencial tóxico, lo que ha limitado su uso como adyuvante parenteral. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que la administración oral tiende a disminuir su toxicidad, debido a que sus productos de degradación no serían absorbidos por el intestino y por lo tanto no ingresarían al torrente sanguíneo. Sin perjuicio de lo anterior, informes inmunológicos indican que las saponinas administradas por vía oral logran de igual forma un efecto inmunoestimulante (Yoshikoshi *et al.*, 1995; Sjolander y Cox, 1998; Kirk *et al.*, 2004).

Otra desventaja en el uso de estas saponinas como adyuvantes es su sensibilidad a la temperatura. Se ha reportado en países tropicales, en donde los trabajos en terreno dificultan el adecuado almacenamiento y la conservación de cadenas de frío, que las altas temperaturas inducen la pérdida de la porción lipofílica de las saponinas mediante un proceso químico conocido como desacilación. Como resultado de esta pérdida estructural ocurren cambios significativos en las propiedades inmunoestimulantes de las saponinas, inhibiendo el estímulo en la producción de linfocitos T citotóxicos, así como de la respuesta inmune Th1; promoviendo en su lugar una respuesta Th2. Este hallazgo indica que los adyuvantes no sólo son capaces de mejorar la respuesta inmune, sino también son capaces de modificar el tipo de respuesta inmune. Adicionalmente, se ha demostrado que esta hidrólisis ocurre más lentamente a concentraciones elevadas de saponinas, sin embargo estas concentraciones son potencialmente tóxicas para el huésped (Marciani *et al.*, 2001).

Pese a estos inconvenientes, actualmente las saponinas del árbol del quillay son utilizadas en vacunas animales tales como la vacuna de la rabia, fiebre aftosa, mastitis bovina, babesiosis y leucemia felina (Van Setten y Van de Werken, 1996; Marciani *et al.*, 2001).

2.1.1.2 Actividad Permeabilizante de Membranas

Las saponinas de *Q. saponaria* Molina presentan la capacidad de permeabilizar las membranas celulares, lo que explicaría algunos de sus efectos biológicos, en particular la citotoxicidad de estos triterpenoides (Roner *et al.*, 2010). Se ha descrito que la porción lipofílica de las saponinas forma complejos insolubles con el colesterol de las membranas

celulares, formando poros estables que llevan a la reorganización de la arquitectura de la bicapa lipídica (Pelah *et al.*, 2002; Podolak *et al.*, 2010; Roner *et al.*, 2010; Moises *et al.*, 2014). Un estudio en que se analizó la capacidad de permeabilizar membranas celulares de saponinas derivadas de 47 plantas diferentes, demostró que no todas las saponinas presentan esta actividad; atribuyéndose esta capacidad al tipo de aglicona y azúcar presente en la cadena lateral (Sparg *et al.*, 2004). Asimismo, esta reestructuración de la bicapa causaría alteraciones en los hidratos de carbono con carga negativa presentes en la superficie celular (Podolak *et al.*, 2010).

2.1.1.3 Efecto Estimulador del Crecimiento

La participación de los extractos de saponinas triterpenoides en el crecimiento animal ha sido ampliamente analizada (Ilsley *et al.*, 2005). Un estudio realizado por Francis *et al.* (2001), en el que se midió el efecto de la inclusión de *Q. saponaria* Molina en las dietas de tilapias (*Oreochromis niloticus*) durante un periodo de 14 días, concluyó que la tasa de crecimiento y el aumento de peso en los peces suplementados, especialmente en las hembras, fue significativamente mayor al grupo control. Sin embargo, se observó que las tilapias hembras suplementadas, suprimieron su actividad reproductiva, anulando el desove. Aparentemente, estos triterpenos alterarían los niveles plasmáticos de la hormona luteinizante causando alteraciones en la actividad reproductiva, lo que llevaría a una redistribución de nutrientes explicando el mayor crecimiento y aumento de peso (Francis *et al.*, 2001).

En otro estudio se observó que la administración de extractos de quillay en la dieta de carpas (*Cyprinus carpio*), resultó en un mayor crecimiento y eficiencia metabólica, (Francis *et al.*, 2002). Este aumento en la tasa de crecimiento se explicaría por un incremento en la absorción de los nutrientes a nivel intestinal producto de la mayor permeabilidad de las paredes intestinales causada por *Q. saponaria* Molina (Francis *et al.*, 2001).

Por el contrario, un estudio realizado por Turner *et al.* (2002) sobre los efectos en la suplementación, sobre el crecimiento y la función inmune de cerdos infectados con

Salmonella typhimurium, no observó ningún efecto en la ganancia diaria de peso en comparación con el grupo control. Asimismo, otra investigación realizada por Ilsley *et al.* (2005) sobre los efectos de la suplementación de saponinas en el crecimiento de lechones, concluyó que no hubo efectos sobre el crecimiento y ganancia diaria de peso de estos, pese a que los grupos con dietas suplementadas tendieron a consumir una mayor cantidad de alimento en comparación con el grupo control. Una alta concentración de saponinas en las dietas podría explicar los resultados anteriores. Elevadas dosis de saponinas son conocidas por causar daño en las vellosidades del epitelio intestinal, reduciendo el área de absorción de nutrientes y suprimiendo la producción enzimática (Kirk *et al.*, 2004; Ilsley *et al.*, 2005).

2.1.1.4 Actividad Antiviral

El efecto antiviral de las saponinas de *Q. saponaria* ha sido demostrados en múltiples estudios, no obstante, su mecanismo de acción no ha sido dilucidado del todo (Roner *et al.*, 2007). Por una parte, se ha postulado que la interacción de las saponinas con las envolturas virales conduciría a la destrucción directa de estos agentes; mientras que por otro lado, se cree que las saponinas interaccionarían con las membranas de las células huésped produciendo la pérdida del sitio de unión viral. Lo anterior, sumado a la fuerte actividad inmunoestimulante de las saponinas, reducirían la infección por un virus (Roner *et al.*, 2010).

Un estudio *in vitro* en el que se adicionaron concentraciones crecientes de extractos de quillay a cultivos celulares en monocapa infectados con reovirus y rotavirus, demostró que no hubo una reducción en la infectividad de estos virus a las células, y se observó que la actividad antiviral de estas saponinas sólo ocurrió a concentraciones superiores, altamente tóxicas para las líneas celulares. Esto demuestra que extractos del quillay administrados a concentraciones bajo los niveles tóxicos, no logran interrumpir las envolturas virales y proteínas de la cápside (Roner *et al.*, 2010).

No obstante, el mismo estudio demostró que el tratamiento previo a la infección de las células huésped, con bajas concentraciones de *Quillaja saponaria*, logra bloquear

completamente la fijación de reovirus y rotavirus a estas células, reduciendo la propagación de los virus a células no infectadas y proporcionándoles resistencia a la infección durante 24 horas (Roner *et al.*, 2010).

2.1.1.5 Actividad Antibacteriana

Se ha observado que la capacidad antibacteriana de la *Q. saponaria* se encuentra directamente relacionada con la concentración de saponinas. Así por ejemplo, un estudio *in vitro* realizado por Sen *et al.* (1998) en el que se evaluó el efecto de extractos de saponinas de *Q. saponaria* y *Yucca schidigera* en distintas concentraciones sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, demostró que el incremento paulatino de las concentraciones de estas saponinas produjo un leve aumento en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) hasta llegar a un punto en donde el número de UFC disminuyó significativamente. Se concluyó que bajas concentraciones de estas saponinas producen un ligero aumento en la permeabilidad de *E. coli*, mejorando el transporte de nutrientes y estimulando el crecimiento. Por otra parte, altas concentraciones de saponinas actúan contrariamente, aumentando excesivamente la permeabilidad de *E. coli* y produciendo la muerte de estas bacterias. Adicionalmente este estudio demostró que las saponinas derivadas de *Yucca schidigera* son más potentes que las del quillay en la modulación del crecimiento de *E. coli*. Esto podría atribuirse a las diferencias estructurales de estas saponinas, en cuanto al núcleo esterooidal de la *Yucca* y al núcleo triterpenoide de la *Quillaja saponaria*.

2.1.1.6 Actividad Antiprotozoaria

El efecto antiprotozoario de la *Q. saponaria* Molina, se encuentra determinado por la unión de las saponinas al colesterol de las membranas protozoarias, generando daños irreversibles en la integridad de las membranas celulares y la consecuente lisis celular (Makkar *et al.*, 1998; Roner *et al.*, 2010). Esta actividad ha sido ampliamente estudiada en sistemas de fermentación ruminal, en donde se ha observado que la disminución en la población

protozoaria genera una consecuente influencia en la fermentación ruminal y sus productos (Makkar *et al.*, 1998).

Un estudio *in vitro* realizado por Makkar *et al.* (1998) en donde se observó el efecto antiprotozoario de diversas saponinas sobre protozoos del sistema ruminal, concluyó que la gran mayoría de la saponinas, incluidas las saponinas de *Q. saponaria*, presentaban actividad antiprotozoaria. Adicionalmente este estudio demostró que la supresión de los protozoos ruminales conlleva a una serie de ventajas para los rumiantes tales como el establecimiento de una mayor masa microbiana, la mejora en el flujo de proteína microbiana ruminal, el aumento de la eficiencia de utilización de alimento y la disminución de gases contaminantes como CO₂ y CH₄ (Makkar *et al.*, 1998; Pen *et al.*, 2006). Esto sugiere que las saponinas fragmentarían los nutrientes de tal forma que una mayor proporción del sustrato digerido iría a la formación de masa bacteriana, mientras que una menor proporción formaría ácidos grasos volátiles y gases contaminantes (Makkar *et al.*, 1998). Por otra parte, el 25 % de la metanogénesis ruminal se asocia a los protozoos ciliados, por lo que es de esperar que una disminución en la población protozoaria ocasione una merma en la emisión de metano (Holtshausen *et al.*, 2009). Otro estudio en el que se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de *Q. saponaria* sobre la fermentación ruminal y metanogénesis *in vitro*, demostró que el número de protozoos disminuyó linealmente con el aumento de la concentración de *Q. saponaria*. No obstante, la tasa de emisión de CO₂ aumentó linealmente con la adición de extractos de *Quillaja saponaria*, mientras que la tasa de emisión de metano no se vió afectada. Posiblemente las saponinas de *Q. saponaria* promueven un mayor crecimiento de las bacterias metanogénicas (Pen *et al.*, 2006).

Si bien la capacidad antiprotozoaria de las saponinas del quillay ha sido demostrada, no todos los estudios han sido concordantes, así lo demuestran estudios realizados por Sliwinski *et al.* (2002) y Hristov *et al.* (2003), en los que no se encontró ningún efecto supresor del crecimiento protozoario por parte de las saponinas.

2.1.1.7 Actividad Larvicida

Un estudio realizado por Pelah *et al.* (2002) demostró que extractos de saponinas de la corteza del quillay, presentan actividad larvicida contra el mosquito *Aedes aegypti*, vector de las enfermedades del dengue, fiebre amarilla y encefalitis humana. Adicionalmente presentaron efectos larvicida contra el mosquito *Culex pipiens*, vector de enfermedades tales como el virus del Nilo occidental, filariasis, encefalitis virales y malaria. Los resultados indicaron que estas saponinas causan el 100% de la mortalidad en las larvas de tercer y cuarto estado de estos mosquitos, no obstante, no se observó un efecto tóxico sobre la capacidad de eclosión de los huevos. El efecto larvicida sería explicado por la acción permeabilizante de membranas y consecuente daño en la integridad de las membranas celulares.

2.2 Sistema Intensivo de Crianza Artificial de Terneras

La crianza de las terneras es una etapa fundamental en una explotación bovina lechera. Desde el nacimiento, las terneras inician un proceso tendiente a alcanzar su máximo desarrollo y potencial productivo con el fin de convertirse en vaquillas de reemplazo, siendo para esto fundamental criar terneras sanas, en un ambiente adecuado y sin riesgo de enfermar (Soberon *et al.*, 2012).

Un sistema de crianza ampliamente utilizado es el sistema intensivo de crianza artificial, éste tiene como principal objetivo acelerar la transición de las terneras desde lactantes a rumiantes, por lo que las crías son separadas de las madres inmediatamente después de su nacimiento e ingresan a un sistema en el que se les provee lo necesario en cuanto a alimentación, medio ambiente, sanidad y manejos, asegurando así el correcto crecimiento y desarrollo de las terneras (Rothet *et al.*, 2009).

Pese a la gran eficiencia de este sistema, la alta tasa de morbilidad de enfermedades, sus costos asociados, así como la mortalidad de las terneras, constituyen las principales pérdidas económicas. No obstante, identificar los factores que contribuyen en la expresión

de enfermedades y abordarlos mediante adecuadas prácticas de manejo y cuidados de la ternera recién nacida permite minimizar estas pérdidas (Mee, 2008; Mahony, 2016).

2.2.1 Manejo del Calostro

Al momento del nacimiento el sistema inmune de las terneras es inmaduro e incapaz de generar una adecuada inmunidad humoral (Elizondo, 2007). Adicionalmente, la estructura placentaria epitelicorial cotiledonaria de los bovinos, impide la transferencia de inmunoglobulinas (Igs) desde la sangre materna a la fetal. En consecuencia, los terneros nacen agammaglobulinémicos y por lo tanto, su inmunidad dependerá exclusivamente de la absorción de inmunoglobulinas calostrales luego del nacimiento, proceso denominado transferencia de inmunidad pasiva (Elizondo, 2007; Godden, 2008; Arroyo y Elizondo, 2014; Armengol y Fraile, 2016).

El éxito en la transferencia de inmunidad pasiva es clave en el manejo de las terneras, ésta determinará la salud y sobrevivencia de las crías. Se ha establecido que para lograr una adecuada inmunidad se requiere de una concentración de IgG en suero de al menos 10 mg/mL (Elizondo, 2007). Ésta concentración de IgG no sólo reduce las tasas de morbilidad y mortalidad antes del destete, sino que también presenta beneficios a largo plazo, tales como, reducción de la tasa de mortalidad post destete, aumento de la tasa de ganancia y eficiencia alimenticia, disminución de la edad al primer parto, mejora en la producción láctea de la primera y segunda lactancia y disminución de la tasa de eliminación durante la primera lactancia (Godden, 2008).

No obstante, lograr una exitosa transferencia de inmunidad pasiva no siempre es posible. Existen factores condicionantes de la transferencia de inmunidad pasiva, tales como, el tiempo que transcurre entre el nacimiento y la administración de calostro, el volumen suministrado, la concentración de Igs, la contaminación bacteriana del calostro y el método de administración (Elizondo, 2007 ; Arroyo y Elizondo, 2014).

Es reconocido que un calostro de alta calidad es aquel que tiene una concentración de IgG superior a 50 g/L. Sin embargo, no siempre es conocida esta concentración, por lo que se

recomienda que las terneras consuman en la primera hora de vida 1 galón (3, 87 litros) de calostro o el 10 a 12 % de su peso corporal en una primera toma y posteriormente, si el calostro es de una calidad regular o mala, suministrar una segunda toma de 2 litros las 6 horas de vida (Arancibia, 2009). Por otra parte, estudios indican que la administración de calostro por medio de una sonda esofágica logra mayores niveles de proteínas séricas totales que las terneras calostradas por amamantamiento o mamadera (Elizondo y Rodríguez, 2013; Arroyo y Elizondo, 2014).

Inconvenientes en uno o más de estos factores conllevan a una absorción insuficiente de Igs, condición denominada falla en la transferencia de inmunidad pasiva (FTIP) (Arroyo y Elizondo, 2014). Esta FTIP puede ser estimada a través de la medición de proteínas séricas totales (PST) por medio de la técnica de refractometría ya que existe una alta correlación entre las PST y la IgG los primeros días de vida (Rothet *et al.*, 2009). Es así como Quigley (2002) estableció que la transferencia de inmunidad pasiva es exitosa cuando la concentración de PST supera los 5,5g/dL, medianamente exitosa entre 5,0 y 5,4 g/dL e incompleta cuando la concentración de PST es inferior a 5,0 g/dL. Por otra parte, Donovan *et al.* (1998), Calloway *et al.* (2002) y Windeyer *et al.* (2014) han establecido que la FTIP ocurre cuando los niveles de PST son menores a 5,2 g/dL, siendo esta una concentración equivalente a 10 mg/mL de IgG en suero.

La FTIP genera en los recién nacidos ganancias diarias de peso subóptimas y una predisposición a la presentación de enfermedades tales como severos cuadros de diarrea y enfermedades respiratorias, con un consecuente aumento en la tasa de mortalidad (Elizondo y Rodríguez, 2013; Arroyo y Elizondo, 2014). En Estados Unidos por ejemplo, se reporta una mortalidad de terneras en etapa de pre destete de un 8 a 11%, de los cuales aproximadamente el 35% se atribuyen a una FTIP (USDA, 2010).

2.2.2 Desinfección del Cordón Umbilical

Uno de los manejos sanitarios más relevantes para las terneras es la desinfección del cordón umbilical. Éste es un método seguro, fácil y barato de prevenir infecciones umbilicales y

septicemias ya que permite disminuir la colonización bacteriana del ombligo, no obstante, no reduce la exposición de las terneras a microorganismos patógenos, por lo que es fundamental que este manejo se acompañe de la correcta higiene del corral de maternidad, especialmente del suelo (Mee, 2008).

Se recomienda la desinfección del cordón y un área de 5 centímetros alrededor con antisépticos tópicos mediante inmersión o aspersion, dentro de las primeras 2 horas de vida. Los antisépticos más utilizados son soluciones de tintura de yodo al 7 ó 10 % y clorhexidina. Otra solución frecuentemente utilizada es la povidona yodada al 10%, no obstante, estudios in vitro han demostrado su alta citotoxicidad retardando la cicatrización de la herida (Mee, 2008).

2.2.3 Alojamiento y Medio Ambiente

Otro factor importante a considerar en la crianza de las terneras es el medio ambiente y su alojamiento. Los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos a las variaciones de las condiciones climáticas, incidiendo éstas directamente en su estado sanitario y situándolas como importante causal de enfermedades (USDA, 2016).

El adecuado aislamiento de los corrales es fundamental para evitar variaciones extremas de temperatura en invierno y mantener un ambiente fresco en verano. La zona de confort de las terneras varía en una temperatura entre 10 y 21 °C, lograr este rango dependerá del número de terneras, el área de la superficie total, el material de las camas, la temperatura exterior, la humedad, la ventilación y el material de construcción. Adicionalmente, adecuados sistema de calefacción y ventilación pueden favorecer la mantención de una temperatura óptima (Heinrichs y Radostits, 2001).

Por otra parte, la humedad relativa debe variar idealmente entre un 70% a 80%. Una alta humedad y bajas temperaturas promueven la condensación de agua en las paredes, techos e incluso en las propias terneras, provocando enfriamientos, malestar y un aumento en la incidencia de enfermedades del tracto respiratorio. Cerrar las entradas de aire del galpón es una alternativa para la prevención de esta situación, sin embargo esto genera una

disminución en la tasa de ventilación, promoviendo la presentación de infecciones por aerosol, por lo que en estas circunstancias es fundamental proveer de calor adicional a las terneras (Heinrichs y Radostits, 2001).

La ventilación del galpón debe permitir la mantención de una adecuada temperatura corporal y evitar el exceso de humedad relativa. Adicionalmente debe asegurar el flujo de partículas de polvo, gases nocivos y agentes infecciosos, evitando corrientes de aire que aumenten la pérdida de calor de las terneras (Heinrichs y Radostits, 2001). La acumulación de amonio que se produce en ambientes húmedos y con mala ventilación, irritan las mucosas de las vías respiratorias, predisponiendo a las terneras a la presentación de tos y neumonías (Lanuza, 2006).

Se debe proporcionar a las terneras un ambiente limpio y seco. Las camas deben ser de paja o arena y la limpieza se debe realizar diariamente evitando la acumulación del material fecal que pueda contribuir a la propagación de agentes patógenos (Lanuza, 2006).

2.3 Principales Enfermedades de los Terneros

Dentro de las enfermedades de mayor presentación se encuentran las diarreas neonatales y enfermedades respiratorias. Éstas tienen efectos sustanciales en el bienestar, supervivencia y productividad futura de las terneras, además conllevan un fuerte impacto económico que incluye los costos de tratamiento, aumento de la tasa de mortalidad, disminución de la tasas de crecimiento y aumento en la edad del primer parto (Windeyer *et al.*, 2014).

Así por ejemplo, Kaneene y Hurd (1990), estimaron que los costos anuales generados por problemas gastrointestinales y enfermedades respiratorias en terneras en etapa de pre destete fueron de US\$ 33,46 y US\$ 14,71 por ternera, respectivamente. Por otra parte, estudios anteriores informaron que la morbilidad general de presentar alguna de estas enfermedades fue de un 35% (Waltner-Toews *et al.*, 1986), mientras que los riesgos de incidencia de diarrea neonatal y enfermedad respiratoria bovina fueron de 29 y 39% respectivamente (Donovan *et al.*, 1998).

La diarrea neonatal del ternero es la causa más común de mortalidad en el periodo pre destete (USDA, 2010). Según estudios realizados por Uetake (2013) su mortalidad puede alcanzar hasta un 20%, no obstante, Lanuza (2006) indica que la mortalidad varía entre el 3 y 60 % de los enfermos.

Los agentes infecciosos asociados a la diarrea de terneros incluye patógenos virales tales como rotavirus, coronavirus y norovirus (Arroyo y Elizondo, 2014; Di Felice *et al.*, 2015), bacterias como *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* tipo C y *Salmonella* spp. (Lanuza, 2006) y algunos protozoos como *Cryptosporidium* y coccidios (Mahony, 2016). No obstante, también pueden presentarse debido a problemas nutricionales o alimentos mal conservados (Lanuza, 2006).

Por otra parte, la enfermedad respiratoria bovina es la segunda causa más común de muerte en terneras en etapa de pre destete y la más frecuente en el ganado lechero destetado (USDA, 2010). Ésta enfermedad presenta una etiología multifactorial y comúnmente se presenta posterior a eventos que comprometen el sistema inmune, tales como, fallas en la transferencia de inmunidad pasiva, infecciones virales, mala calidad del aire, hacinamiento y estrés (Love *et al.*, 2015).

Agentes bacterianos asociados a esta enfermedad son *Manheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somnus* y *Mycoplasma bovis*. Por otra parte dentro de los agentes virales se encuentran el virus sincicial respiratorio bovino, herpes virus bovino tipo 1 y virus de la parainfluenza tipo 3 (Love *et al.*, 2015; Pardon *et al.*, 2015).

Las cifras anteriormente descritas, promueven el uso de medicamentos para prevenir estas enfermedades, siendo una práctica común utilizarlos en el sustituto lácteo. Un estudio realizado en Estados Unidos por USDA (2016), reveló que el 37,6 % de las lecherías utiliza medicamentos en el sustituto lácteo, siendo los más utilizados lasalocid (12,7%), decoquinato (11,5%), y neomicina y oxitetraciclina (9,0%).

Si bien es cierto, en Chile no existen estudios relacionados con el uso de fármacos en los sustitutos, es de conocimiento público que las lecherías recurren a estas prácticas para disminuir la presencia de enfermedades respiratorias y digestivas. Además, en los últimos

años se ha generado una alta resistencia a antimicrobianos, por lo que el uso de éstos debe ser necesariamente disminuido (Pardon *et al.*, 2015). Por otra parte, sustancias sintéticas como antibióticos y hormonas esteroidales, utilizadas como aditivos en la dieta de los animales con el propósito de disminuir enfermedades y aumentar la eficiencia de utilización del alimento, actualmente se encuentran prohibidas en varios países (Francis *et al.*, 2002).

En este contexto, el estudio de la utilización de productos naturales como aditivos en la dieta, tales como, las saponinas de *Q. saponaria* Molina resulta de gran valor y utilidad ya que su potencial inmunoestimulante, permeabilizante de membranas, estimulador del crecimiento animal y su actividad intrínseca contra agentes nocivos, no sólo permitiría disminuir el uso de fármacos, sino además reduciría el riesgo de las terneras a presentar enfermedades los primeros meses de vida.

En el siguiente proyecto de memoria de título, se propone evaluar y comparar el efecto de dos productos a base de extracto de *Q. saponaria* (QP 1000® y Nutrafito Q) sobre la presentación de cuadros clínicos y ganancia diaria de peso en terneras. Lo anterior, permitirá evaluar su posible incorporación como suplemento dietario en sistemas de crianza artificial de terneras.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

La administración oral de extractos de *Quillaja saponaria* Molina, mejora el estado sanitario y productivo en terneras de lechería bajo un sistema de crianza artificial, durante los primeros meses de vida.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de dos extractos de *Quillaja saponaria* Molina, sobre la presentación de cuadros clínicos y ganancia diaria de peso en terneras de crianza artificial.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.3.1 Relacionar la presentación de eventos clínicos con la suplementación oral de extractos de *Quillaja saponaria* Molina, a distintas presentaciones, en terneras de crianza artificial.
- 3.3.2 Relacionar la ganancia diaria de peso con la suplementación oral de extractos de *Quillaja saponaria* Molina, a distintas presentaciones, en terneras de crianza artificial.
- 3.3.3 Determinar diferencias en la presentación de eventos clínicos y ganancia diaria de peso entre dos presentaciones de productos a base de extractos de *Quillaja saponaria* Molina.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Animales y Manejo

El presente estudio se llevó a cabo en una crianza artificial de una lechería de alta producción, ubicada en la Escuela Agrícola Las Garzas, Ruta 5 Sur, Km 150, comuna de Chimbarongo, región del Libertador Bernardo O'Higgins. Se utilizaron 30 terneras lactantes, raza Holstein, las que fueron sometidas a un mismo manejo luego de su nacimiento. Todas las terneras recibieron el calostro de su madre, correspondiente al 10% del peso corporal inmediatamente después de su nacimiento; posteriormente, fueron mantenidas en jaulas individuales durante todo el tiempo que duró el estudio. En este periodo, recibieron cuatro litros diarios de sustituto lácteo (Sprayfo Blue ®), divididos en dos administraciones, además de agua y concentrado de iniciación para terneros en crecimiento a libre disposición.

Las terneras fueron asignadas aleatoriamente, a medida que nacieron, a tres grupos de estudio. El grupo I correspondió al grupo control, el cual recibió un placebo correspondiente a 2 gramos de fructosa. Al grupo II, se le administraron 2 gramos del producto Nutrafito Q, correspondiente a un producto en polvo derivado directamente de madera molida del quillay y posteriormente seleccionada por granulometría fina, sin sufrir procesos previos de purificación, obteniéndose una concentración de un 6% de saponinas. El grupo III, recibió 0,6 gramos del producto QP 1000 ®, correspondiente a un producto en polvo, purificado a partir de la extracción acuosa de *Quillaja saponaria* Molina y posteriormente deshidratado mediante secado spray, obteniéndose una concentración de un 20% de saponinas. De este modo, ambos grupos recibieron una concentración total de 120 mg. de saponinas. Considerando que el peso vivo de las terneras al momento de nacer fluctuó entre 30 y 40 kilogramos, la dosis evaluada fue de entre 3 a 4 mg/Kg de peso vivo. Los productos fueron disueltos en el sustituto de leche y administrados oralmente, una vez al día durante los primeros 60 días de vida.

4.2. Capacitación

Previo al inicio del estudio se capacitó al técnico agrícola encargado del área de crianza para efectuar la correcta administración del placebo y extractos de quillay. Para esto, se hizo entrega de un protocolo de administración con las respectivas instrucciones de cada grupo, indicando la forma de administración, la cantidad correspondiente en gramos y el tiempo de administración (anexo 1).

Posteriormente se indicó la forma de realizar el examen clínico de las ternera, enfatizando cada uno de los puntos evaluados en la Tabla de calificación del estado de salud de las terneras “*Calf Health Scoring Chart*” (McGuirk, 2008) (anexo 2); con el propósito de asignar una puntuación correcta a cada *ítem*. Adicionalmente se hizo entrega de las fichas de registro de eventos clínicos (anexo 3), fichas de registro de tratamientos (anexo 4), así como de las fichas de registro de pesajes (anexo 5), indicándose la forma y el momento en que debían ser pesadas las terneras.

4.3. Registro de Eventos Clínicos

Desde el día del nacimiento y hasta los 60 días de vida, las terneras fueron sometidas a un examen clínico diario, según la Tabla de calificación del estado de salud de las terneras (McGuirk, 2008) en donde se registraron parámetros tales como temperatura, tipo de heces, presencia de tos y secreciones nasales, oculares y óticas (anexo 2). A cada parámetro le fue asignado un puntaje los que posteriormente fueron sumados obteniendo un puntaje total. Las terneras que obtuvieron un puntaje total igual o superior a cinco fueron consideradas enfermas por lo que recibieron tratamiento según correspondiera. La ocurrencia de estos eventos clínicos y sus resultados fueron registrados diariamente en las fichas de eventos clínicos (anexo 3). Adicionalmente los tratamientos realizados fueron registrados en la ficha de tratamiento individual (anexo 4).

4.4. Medición y Registro de Pesos

Con la finalidad de estimar la ganancia diaria de peso las terneras fueron pesadas en una balanza digital al momento de su nacimiento y posteriormente cada 15 días hasta finalizar el estudio. Los pesos fueron registrados en las fichas de cada ternera (anexo 5).

4.5. Medición de Proteínas Séricas Totales

Pese a no ser uno de los objetivos de este estudio, se estimó la transferencia de inmunidad pasiva de cada una de las terneras. Para esto se tomaron muestras de sangre los días 2, 6 y 10 de vida. Se desinfectó la zona de punción con alcohol al 70%, y posteriormente se extrajeron 5 mL de sangre mediante venopunción yugular empleando el sistema de tubos al vacío (Vacutainer® B-D, Franklin Lakes, USA). Posteriormente, se dejó reposar la muestra 24 horas para su coagulación en forma espontánea a temperatura ambiente; las muestras que no coagularon durante este periodo fueron centrifugadas a 3.500 rpm durante 15 minutos correspondiente a una fuerza de centrífuga relativa 823 RCF (xg). El suero resultante de ambos procesos, se extrajo con una pipeta Pasteur y depositó en tubos de microcentrífuga de 2 mL, los que fueron congelados para la posterior lectura de proteínas séricas totales (PST) mediante refractometría clínica. Una vez obtenidas las tres lecturas se calculó el promedio y se estimó el nivel de transferencia de inmunidad pasiva de cada una de las terneras. El nivel de transferencia de inmunidad pasiva fue posteriormente utilizado para determinar su influencia sobre el peso y la ganancia diaria de peso de cada ternera.

4.6. Recopilación de Datos y Análisis Estadístico

Luego de iniciado el proceso de obtención de datos se visitó la Escuela Agrícola Las Garzas cada 14 días para recopilar la información de las fichas de registros y evaluar la correcta obtención de los datos. La información fue tabulada en una base de datos Microsoft Excel® y analizada con el software estadístico INFOSTAT.

4.6.1. Presentación de Eventos Clínicos

Una vez registrados los eventos clínicos se determinó la frecuencia de terneras enfermas de acuerdo a la Tabla de calificación del estado de salud de las terneras (McGuirk, 2008), y el número de días en los que se presentaron terneras enfermas en cada grupo. Las frecuencias de presentación de terneras enfermas y la proporción de días en las que se presentó enfermedad de cada grupo, se compararon mediante una prueba de diferencia de proporciones de Chi – cuadrado con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

4.6.2. Peso y Ganancia Diaria de Peso

El peso en cada control y la ganancia diaria de peso entre controles, fueron evaluados a través de un análisis de varianza multivariado. Las variables consideradas fueron el peso al control y las ganancias diarias de peso de cada grupo, medidas cada 15 días durante el periodo de estudio. En cada caso el modelo incluyó los efectos del tratamiento y periodo de muestreo. Además, se consideraron como covariables el nivel de proteínas séricas totales y peso al nacimiento. Adicionalmente se caracterizaron las curvas de cada una de las variables para los tres grupos. Por medio de este análisis se determinó si existían diferencias estadísticamente significativas de los pesos y las ganancias diarias de peso entre los grupos en estudio. El nivel de significancia exigido fue de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Presentación de eventos clínicos

De acuerdo a la tabla de calificación del estado de salud de las terneras, valores comprendidos entre 0 y 4 son variaciones de un estado de salud aceptable. Una sumatoria de eventos clínicos mayor o igual a 5, indica que la ternera examinada presentó signos clínicos de enfermedad que requirieron de un tratamiento específico. De acuerdo a este criterio, se observó una alta frecuencia de terneras enfermas, alcanzando un 43% (13 de un total de 30 terneras en estudio). La frecuencia fue mayor en las terneras tratadas con QP 1000 ® enfermando un total de 6 de las 10 terneras del grupo, frente a 5 terneras enfermas tratadas con Nutrafito Q, mientras que en el grupo control se observaron sólo 2 terneras enfermas (Figura 1).

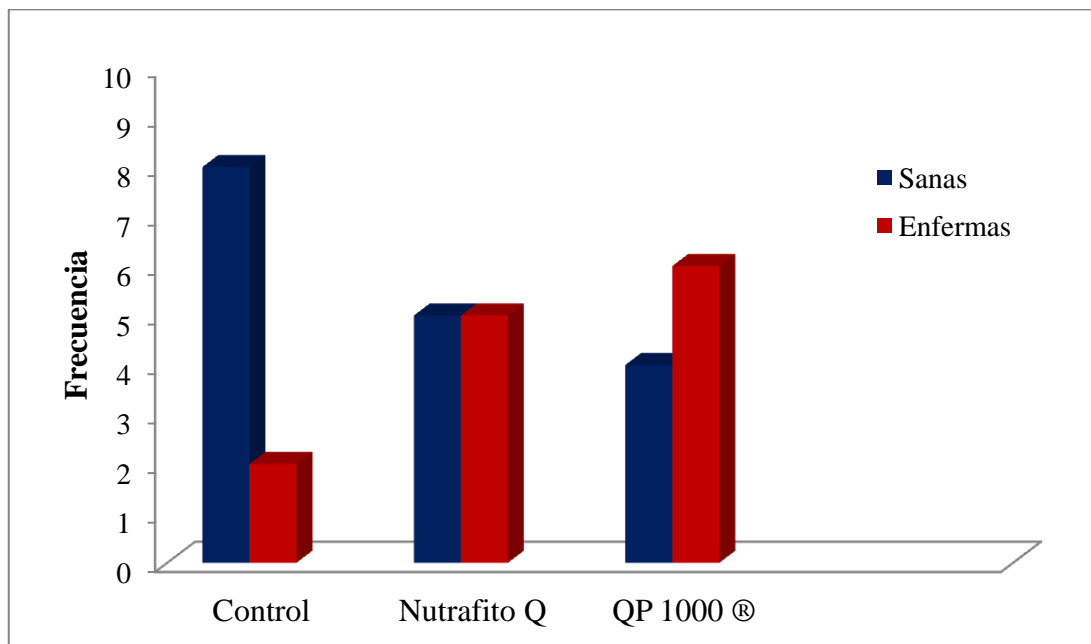


Figura 1. Frecuencia de terneras sanas y enfermas según grupo de tratamiento durante el periodo de estudio.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en el número de terneras enfermas, entre los grupos en estudio ($p = 0,20$ entre grupos I – II y $p = 0,68$ entre grupos II – III), no obstante, se observó una tendencia ($p = 0,09$ entre grupos I – III) a una mayor frecuencia de terneras enfermas en el grupo tratado con el extracto QP 1000 ® en comparación a las terneras del grupo control.

En relación a la proporción de días en los que se presentaron terneras enfermas, se observó en todos los grupos una baja frecuencia. En el grupo control se registró un 0,33% (2 de 600 días), mientras que los grupos tratados con Nutrafito Q y QP 1000 ® alcanzaron un 1% (6 de 600 días) y un 1,33% (8 de 600 días), respectivamente. El total de las terneras enfermaron antes de los 30 días de edad. Entre los grupos en estudio no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en cuanto al número de días en los que se presentaron terneras enfermas ($p = 0,17$ entre grupos I – II y $p = 0,60$ entre grupos II – III), no obstante, se observó una fuerte tendencia ($p = 0,06$ entre los grupos I – III) a una mayor frecuencia de días en que hubo terneras enfermas en el grupo tratado con el extracto QP 1000 ® en comparación al grupo control.

En cuanto al número de terneras enfermas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los 2 grupos tratados con extractos de *Quillaja saponaria* Molina, en dosis de 120 mg totales, y el grupo control. Estos resultados concuerdan con los reportados por Turner *et al.* (2002) en el que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de enfermedad en lechones destetados, suplementados con extractos de quillay en dosis de 125, 250 y 500 mg/kg, y posteriormente desafiados con *Salmonella typhimurium*, y el grupo control. Asimismo, Isley *et al.* (2005) no registraron diferencias estadísticamente significativas en la presentación de cuadros clínicos, ni en los días en que se presentó enfermedad, en lechones destetados, suplementados con extractos de quillay en dosis de 300 y 750 mg/kg y el grupo control, pese a observar un estímulo en la respuesta inmunológica de los lechones tratados, aumentando las concentraciones séricas de IgG e IgA. Es reconocido que altas dosis de quillay presentan un efecto citotóxicos, produciendo daño en las vellosidades del epitelio intestinal lo que llevaría a una disminución en la absorción intestinal de inmunoglobulinas (Gee *et al.*, 1997). Adicionalmente, estudios

realizados por Turner *et al.* (2002) sugieren que altos niveles de inclusión de quillay en las dietas de lechones deprimen la función fagocítica de las células blancas.

Por otra parte, Trujillo *et al.* (2006) reportó diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de enfermedades respiratorias, observando una disminución en la presentación de signos clínicos respiratorios en terneros suplementados con extractos de quillay en dosis de 225 y 375 mg/día. Se ha descrito que las saponinas del quillay estimulan la respuesta inmune promoviendo la producción de linfocitos T citotóxicos y una respuesta inmune Th1 (Marciani *et al.*, 2001). Por otra parte, la actividad permeabilizante de membranas de las saponinas permitiría una mayor captación de antígenos a nivel del intestino delgado, formando complejos, entre las saponinas y el antígeno, que facilitarían el transporte del antígeno al citosol de las células presentadoras de antígenos (Lenarczyk *et al.*, 2004). Adicionalmente, la actividad permeabilizante de membranas mejoraría la permeabilidad de las paredes intestinales, facilitando el transporte de moléculas grandes como las inmunoglobulinas (Seeman, 1974).

En este estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de terneras enfermas, ni en el número de días en los que se presentaron terneras enfermas entre los grupos tratados con extractos de *Q. saponaria* y el grupo control. Una posible explicación para estos resultados podría ser la baja dosis utilizada, en comparación con los estudios anteriormente mencionados. Dosis de 120 mg/día no serían suficientes para establecer evidencia de una mejoría en el estado de salud de las terneras, no obstante, tampoco provocaría un efecto perjudicial en la salud. Otra posible explicación para estos resultados es el tamaño muestral utilizado, en donde un número de 30 terneras aumentaría el riesgo de presentar un error estadístico tipo II obteniendo falsos negativos. No obstante, Francis *et al* (2001, 2002) obtuvieron diferencias significativas en sus estudios, en los que utilizaron un total de 15 peces (5 individuos por grupo). Asimismo, Trujillo (2006) utilizó un tamaño muestral de 24 terneros (8 terneros por grupo) obteniendo diferencias estadísticamente significativas. Cabe destacar que este efecto inmunoestimulantes podría definirse más claramente en una investigación en la que además de evaluar signos clínicos de enfermedad, se llevaran a cabo análisis serológicos para medir concentraciones de

proteínas de fase aguda e inmunoglobulinas, como lo hicieron Turner *et al.* (2002) e Isley *et al.* (2005) en sus investigaciones.

Por otra parte, si bien no se registraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de terneras enfermas, ni en el número de días en los que se presentaron terneras enfermas entre los grupos en estudio, se observó una tendencia estadística a que en el grupo tratado con el extracto QP 1000 ® se presentase un mayor número de terneras enfermas y un mayor número de días de enfermedad, en comparación al grupo control. Esta situación no puede ser atribuible a la dosis empleada en este estudio, así como tampoco a un bajo estado inmunológico ya que el promedio de las proteínas séricas totales, evaluadas los días 2, 6 y 10 de todas las terneras del estudio fue superior 5,0 g/dL (anexo 6), descartándose una falla en la transferencia de inmunidad pasiva. Por otro lado, existe la posibilidad de que estas tendencias sean el resultado del tamaño muestral utilizado, por lo que sería de gran utilidad repetir este estudio con un mayor número de terneras. No obstante, cabe mencionar que estas tendencias no aseguran la repetibilidad de éstos resultados en un estudio con un mayor tamaño muestral, como tampoco la obtención de diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, se sugiere que la presencia de terneras enfermas en el grupo suplementado con QP 1000 ®, se encuentra dentro de las probabilidades de encontrar individuos enfermos en una población de distribución normal, lo que es atribuible a factores individuales y /o externos no identificados en este estudio.

5.2. Pesos

Los promedios de los pesos corregidos por el nivel de proteínas séricas totales y peso al nacimiento de cada grupo, evaluados cada 15 días desde el inicio del estudio hasta los 60 de duración se presentan en la figura 2. Las curvas son características de una curva de crecimiento típica, donde el peso de las terneras aumenta a medida que avanza el tiempo.

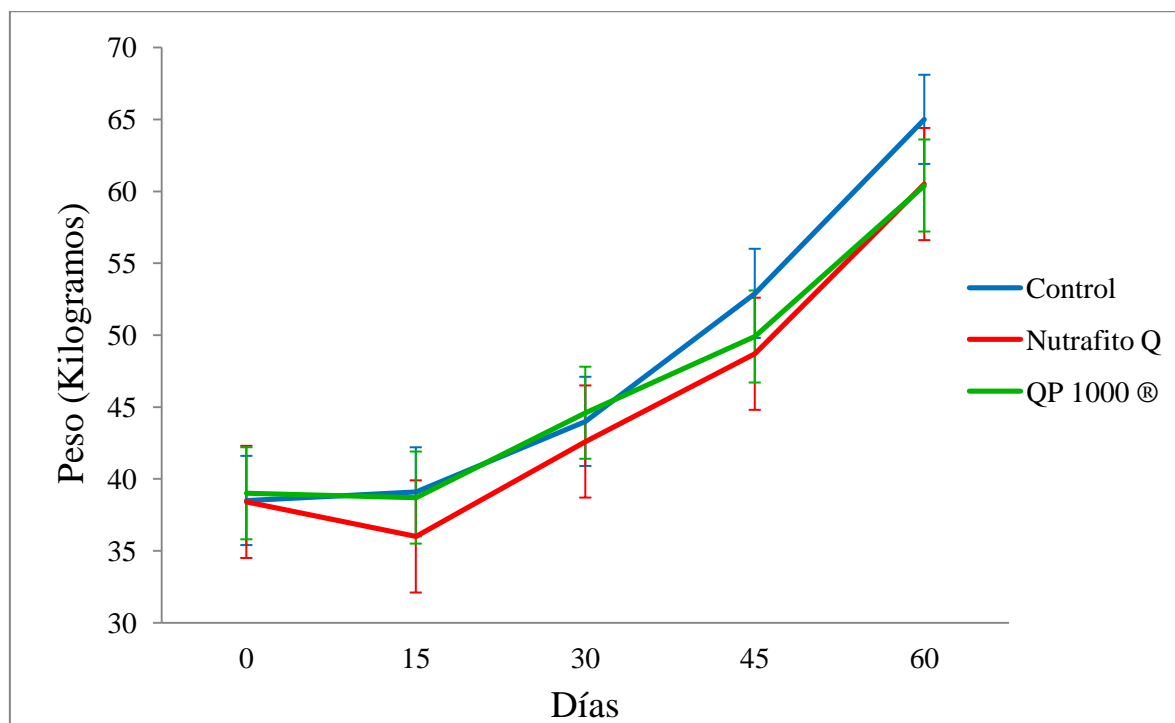


Figura 2. Peso corporal (promedio \pm error estándar) corregidos por el nivel de proteínas séricas totales y peso al nacimiento de cada grupo, evaluados cada 15 días desde el inicio del estudio hasta los 60 días.

En el grupo control se aprecia que el peso promedio aumenta progresivamente en cada uno de los periodos. Los pesos promedios de este grupo, evaluados al nacimiento y día 30, son similares a los pesos de las terneras tratadas con QP 1000®, no obstante, estos pesos son mayores que los obtenidos en las terneras tratadas con Nutrafito Q para los mismos periodos de tiempo. En general, los pesos del grupo control evaluados en los días 45 y 60 fueron mayores que los pesos obtenidos en las terneras tratadas con Nutrafito Q y QP 1000

® para los mismo periodos, alcanzando un peso promedio máximo de 65 kilogramos al termino del estudio.

Por otra parte, en las terneras tratadas con Nutrafito Q y QP 1000 ®, se observa una disminución del peso promedio a los 15 días de vida con respecto al peso promedio al nacimiento, presentándose, en el caso de las terneras tratadas con Nutrafito Q, una mayor pendiente, es decir, el peso disminuyo más rápidamente que en las terneras tratadas con QP 1000 ®.

Al comparar las terneras tratadas con Nutrafito Q y QP 1000 ®, se observa que los pesos promedios de las terneras tratadas con Nutrafito Q, desde el nacimiento hasta el día 45 de estudio, son notoriamente menores que el de las terneras tratadas con QP 1000 ®, no obstante, su peso promedios final es levemente mayor, alcanzando 60,5 kilogramos en comparación con 60,4 kilogramos obtenidos por las terneras tratadas con QP 1000 ®.

Los pesos fueron fuertemente influenciado por el nivel de proteínas séricas totales ($p < 0,0001$) y por el peso al nacimiento ($p < 0,0001$), no obstante, no existen diferencias estadísticamente significativas en los pesos promedio evaluados para cada periodo entre los grupos en estudio ($p = 0,56$).

5.3. Ganancia Diaria de Peso

Las ganancias diarias de peso se representan en la figura 3 como los promedios de las ganancias diarias de pesos, corregidos por el nivel de proteínas séricas totales y peso al nacimiento de cada grupo, evaluadas cada 15 días desde el inicio del estudio hasta los 60 días.

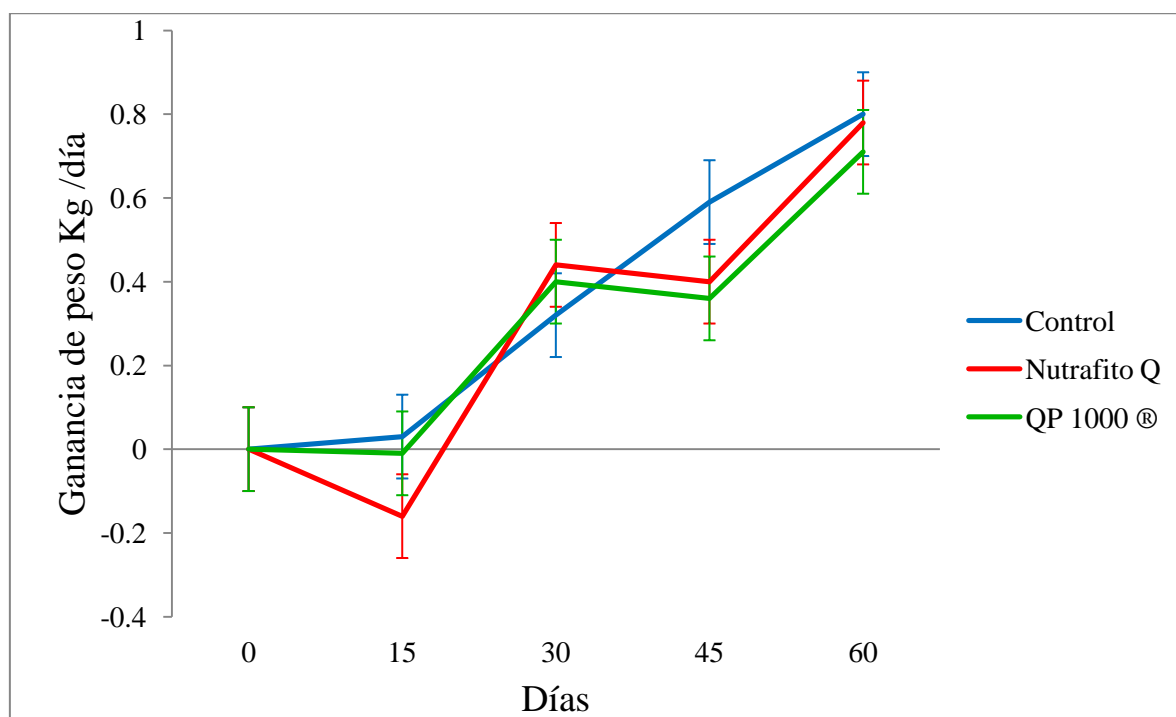


Figura 3. Ganancias diarias de pesos (promedio \pm error estándar) corregidos por el nivel de proteínas séricas totales y peso al nacimiento de cada grupo, evaluados cada 15 días desde el inicio del estudio hasta los 60 días.

Se aprecia que en el grupo control la ganancia diaria de peso promedio aumenta progresivamente en cada uno de los periodos, siendo notoriamente mayores que las ganancias diarias de pesos alcanzadas por las terneras tratadas con Nutrafito Q y QP 1000®, con excepción de la ganancia obtenida al día 30, en donde las terneras tratadas con Nutrafito Q y QP 1000® alcanzaron una ganancia diaria de peso de 0,44 y 0,4 kilogramos, respectivamente, en comparación a los 0,32 kilogramos alcanzados por el grupo control.

Terneritas tratadas con Nutrafito Q y QP 1000 ® presentan una disminuci3n de la ganancia diaria de peso promedio a los 15 d1as, obteniendo promedios -0,16 y -0,01 kilogramos, respectivamente. Pese a la marcada baja en el promedio de ganancia diaria de peso en las terneritas tratadas con Nutrafito Q a los 15 d1as, la pendiente formada entre los d1as 15 y 30 es mayor para este grupo, lo que indica que si bien las terneritas perdieron r1pidamente peso luego de nacidas, tambi3n ganaron peso a una mayor velocidad en el siguiente periodo en comparaci3n a los otros grupos.

Al comparar las terneritas tratadas con Nutrafito Q y QP 1000 ®, se observa que la ganancia diaria de peso promedio de las terneritas tratadas con QP 1000 ®, desde el d1a 30 hasta finalizado el estudio, es menor que los promedios de ganancias diarias de peso obtenidos por el grupo tratado con Nutrafito Q. No se registraron diferencias significativas en las ganancias de pesos promedio evaluados para cada periodo, entre los grupos en estudio ($p = 0,81$), adicionalmente se observ3 que la ganancia diaria de peso no fue influenciada por el nivel de prote1nas s3ricas totales ($p = 0,15$) ni por el peso al nacimiento ($p = 0,94$).

Resultados similares reportaron Turner *et al.* (2002) en donde lechones destetados, suplementados con extractos de quillay en dosis de 125, 250 y 500 mg/kg, y posteriormente desafiados con *Salmonella typhimurium*, no registraron diferencias estad1sticamente significativas con el grupo control en cuanto a la ganancia diaria de peso y el consumo diario de alimento. De modo similar, Isley *et al.* (2005) no obtuvo diferencias en el crecimiento y ganancia diaria de peso de lechones destetados, suplementados con extractos de quillay en dosis de 300 y 750 mg/kg y el grupo control, pese a observar una tendencia a un mayor consumo de alimento en los grupos tratados con quillay. Altas dosis de saponinas son conocidas por causar da1o en las vellosidades del epitelio intestinal, reduciendo el 1rea de absorci3n de nutrientes y suprimiendo la producci3n enzim1tica, lo anterior conlleva a una menor eficiencia de alimentaci3n y del aumento de peso (Gee *et al.*, 1997).

Por el contrario, estudios realizados por Francis *et al.* los a1os 2001 y 2002 en los que se observ3 el efecto de la inclusi3n de 150 y 300 mg/kg de *Q. saponaria* en las dietas de tilapias (*Oreochromis niloticus*) y carpas (*Cyprinus carpio*), sobre la tasa de crecimiento y aumento de peso, observaron diferencias significativas entre los grupos tratados y los

grupos controles. Este aumento en la tasa de crecimiento se explicó por un incremento en la absorción de los nutrientes a nivel intestinal producto de la mayor permeabilidad de las paredes intestinales causada por *Q. saponaria*. Se ha observado que membranas celulares tratadas con saponinas han desarrollado poros de aproximadamente 40 a 50 Å. Adicionalmente, se ha demostrado que la inclusión de extractos de quillay en las dietas de carpas, estimula la producción de enzimas intestinales y hepáticas, promoviendo una mejor digestión de los nutrientes (Seeman, 1974).

En este estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el grupo control con respecto a los pesos y la ganancia diaria. Probablemente estos resultados respondan a la dosis utilizada, en donde 120 mg de extractos de *Quillaja saponaria* Molina no serían suficientes para estimular una mayor absorción de nutrientes a nivel intestinal.

En síntesis, de acuerdo a los resultados del presente estudio, se sugiere que bajo este diseño experimental, la utilización de los extractos de *Quillaja saponaria* Molina, Nutrafito Q y QP 1000 ®, en dosis de 120 mg. no tienen efectos sobre el estado sanitario y productivo en terneras bajo las condiciones de crianza artificial utilizadas. Se sugiere la realización de estudios adicionales donde se contemple un mayor tamaño muestral, así como el ensayo de diferentes dosis de extractos de quillay. Se recomienda incluir una mayor variabilidad en el nivel de inmunidad adquirida de las terneras al inicio del ensayo. Es posible que los efectos beneficiosos del quillay sean más evidentes en terneras con un bajo nivel de inmunidad, y por lo tanto, con un mayor riesgo de sufrir enfermedades digestivas y respiratorias, a diferencia de las utilizadas en el presente estudio. Esto permitiría la medición más exhaustiva del efecto inmunoestimulante de la *Quillaja saponaria* Molina.

Cabe mencionar que si bien los efectos de extractos de quillay han sido ampliamente estudiados en cerdos y peces, los resultados obtenidos no han sido concordantes, existiendo una alta variabilidad en los resultados en función de las dosis de extractos de quillay utilizadas. En la especie bovina estos estudios son escasos por lo que esta investigación es un aporte más al estudio del efecto de la *Quillaja saponaria* Molina en terneras suplementadas oralmente, en un sistema de crianza artificial.

6. CONCLUSIONES

- No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos Nutrafito Q, QP 1000 ® y el grupo control, sobre la presentación de eventos clínicos y la cantidad de días en los que se presentaron eventos clínicos.
- No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el grupo control sobre el peso y la ganancia diaria.
- La administración oral de los extractos de *Quillaja saponaria* Molina, Nutrafito Q y QP 1000 ®, en dosis de 120 mg, en una lechería bajo estas condiciones de crianza artificial, no tienen efecto sobre el estado sanitario y productivo de las terneras en los primeros 60 días de vida.

7. BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, M.M.; DAMANI, P.; PERL, N.; WON, A.; HONG, F.; LIVINGSTON, P.O.; RAGUPATHI, G.; GIN, D.Y. 2010. Design and synthesis of potent *Quillaja* saponin vaccine adjuvants. *J. Am. Chem. Soc.* 132 (6): 1939 – 1945.

ARANCIBIA, R. 2009. Manejo del ternero recién nacido. *TecnoVet.* 15 (1): 23 – 26.

ARMENGOL, R.; FRAILE, L. 2016. Colostrum and milk pasteurization improve health status and decrease mortality in neonatal calves receiving appropriate colostrum ingestion. *J.Dairy Sci.* 99 (5): 1 – 8.

ARROYO, J.J.; ELIZONDO, J.A. 2014. Prevalencia de falla en la transferencia de inmunidad pasiva en terneras de lechería. *Agron. Mesoam.* 25 (2): 279 – 285.

CALLOWAY, C.D.; TYLER, J.W.; TESSMAN, R.K.; HOSTETLER, D.; HOLLE, J. 2002. Comparison of refractometers and test endpoints in the measurement of serum protein concentration to assess passive transfer status in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221 (11): 1605 – 1608.

CHAPAGAIN, B.P.; WIESMAN, Z.; TSROR, L. 2007. *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Ind. Crop. Prod.* 26 (2): 109 – 115.

CHEEKE, P.R. 1996. Biological effects of feed and forage saponins and their impact on animal production. *Adv. Exp. Med. Biol.* 405 (1): 377 – 385.

DI FELICE, E.; MAUROY, A.; DAL POZZO, F.; THIRY, D.; CECI, C.; DI MARTINO, B.; MARSILIO, F.; THIRY, E. 2015. Bovine noroviruses: A missing component of calf diarrhea diagnosis. *Vet. J.* 207 (1): 53 – 62.

DONOVAN, G.A.; DAHOO, I.R.; MONTGOMERY, D.M.; BENNETT, F.L. 1998. Associations between passive transfer immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA. *Prev. Vet. Med.* 34 (1): 31 – 46.

- ELIZONDO, J.A.; RODRÍGUEZ, J.** 2013. Transferencia de inmunidad pasiva en terneras de lechería que reciben calostro por dos métodos diferentes. *NAT.* 7 (1): 1 – 13.
- FRANCIS, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K.** 2001. Effects of *Quillaja* saponins on growth, metabolism, egg production and muscle cholesterol in individually reared Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Phys C.* 129 (2): 105 – 114.
- FRANCIS, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K.** 2002. Dietary supplementation with a *Quillaja* saponin mixture improves growth performance and metabolic efficiency in common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Aquaculture.* 203 (3): 311 - 320.
- GEE, J.M.; WAL, J.M.; MILLER, K.; ATKINSON, H.; GRIGORIADOU, F.; WIJNANDS, W.; PENNINKS, A.H.; WORTLEY, G.; JOHNSON, I.T.** 1997. Effect of saponin on the transmucosal passage of β – lactoglobulin across the proximal small intestine of normal and β – lactoglobulin sensitized rats. *Toxicology.* 117 (2-3): 219 – 228.
- GODDEN, S.** 2008. Colostrum management for dairy calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 24 (1): 19-39.
- GORDEN, P.J.; PLUMMER, P.** 2010. Control, management, and prevention of bovine respiratory disease in dairy calves and cows. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26 (2): 243 – 259.
- GUO, S.; KENNE, L.; LUNDGREN, L.; RÖNNBERG, B.; SUNDQUIST, B.** 1998. Triterpenoid saponins from *Quillaja saponaria*. *Phytochemistry.* 48 (1): 175 – 180.
- HEINRICHS, A.; RADOSTITS, O.** 2001. Health and production management of dairy calves and replacement heifers. In: Radostits, O. (Ed.). *Herd Health. Food animal production medicine.* W.B. Saunders Company. Philadelphia, USA. pp. 333 – 395.
- HOLTSHAUSEN, L.; CHAVES, A.V.; BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M.; MCALLISTER, T.A.; ODONGO, N.E.; CHEEKE, P.R.; BENCHAAAR, C.** 2009. Feeding saponin – containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92 (6): 2809 – 2821.

- HRISTOV, A.N.; IVAN, M.; NEILL, L.; MCALLISTER, T.A.** 2003. Evaluation of several potential bioactive agents for reducing protozoal activity in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 105 (1-4): 163 – 184.
- ILSLEY, S.E.; MILLER, H.M.; KAMEL, C.** 2005. Effects of dietary *Quillaja* saponin and *Curcumin* on the performance and immunestatus of weaned piglets. *J. Anim. Sci.* 83 (1): 82 – 88.
- KANEENE, J.B.; HURD, H.S.** 1990. The national animal health monitoring system in Michigan III. Cost estimates of selected dairy cattle diseases. *Prev. Vet. Med.* 8 (2-3): 127 – 140.
- KENSIL, C.R.; PATEL, U.; LENNICK, M.; MARCIANI, D.** 1991. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J. Immunol.* 146 (2): 431 – 437.
- KIM, Y.; WANG, P.; NAVARRO, M.; ROHDE, B.; DERRYBERRY, J.; GIN, D.** 2006. Synthetic studies of complex immunostimulants from *Quillaja saponaria*: Synthesis of the potent clinical immunoadjuvant QS-21A_{api}. *J. Am. Chem. Soc.* 128 (36): 11906 – 11915.
- KIRK, D.; REMPEL, R.; PINKHASOV, J.; WALMSLEY, A.** 2004. Application of *Quillaja saponaria* extracts as oral adjuvants for plant-made vaccines. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 4 (6): 947 – 958 .
- LACAILLE-DUBOIS, M.A.; WAGNER, H.** 1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine.* 2 (4): 363 – 386.
- LANUZA, F.** 2006. Crianza de terneros y reemplazos de lechería. **In:** Navarro, H; Sielbad, E; Celis, S. Manual de producción de leche para pequeños y medianos productores. Instituto de investigaciones agropecuarias (INIA). Centro regional de investigación Remehue. Osorno, Chile. pp 104 – 111.

- LENARCZYK, A.; THUY, T.T.; RANE, D.; MAWAROS, J.; PEARSE, M.; HAMILTON, R.; COX, J.; LUFT, T.; GARDNER, J.; SUHRBIER, A.** 2004. ISCOM based vaccines for cancer immunotherapy. *Vaccine*. 22(8): 963 – 976.
- LORENZ, I.; FAGAN, J.; MORE, S.J.** 2011a. Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhea in pre-weaned calves. *Irish Vet. J.* 64 (1): 9.
- LORENZ, I.; MEE, J.F.; EARLEY, B.; MORE, S.J.** 2011b. Calf health from birth to weaning. I. General aspects of disease prevention. *Irish Vet. J.* 64 (1): 10.
- LOVE, W.J.; LEHENBAUER, T.W.; KARLE, B.M.; HULBERT, L.E.; ANDERSON, R.J.; VAN EENENNAAM, A.L.; FARVER, T.B.; ALY, S.S.** 2016. Survey of management practice related to bovine respiratory disease in preweaned calves on California dairies. *J. Dairy Sci.* 99 (2): 1483 – 1494.
- MAHONY, T.J.** 2016. Untangling the complexity of diseases such as calf diarrhoea is crucial to future productivity. *Vet. J.* 210 (1): 3 – 4.
- MAKKAR, H.; SEN, S.; BLÜMMEL, M.; BECKER, K.** 1998. Effects of fractions containing saponins from *Yucca shidegera*, *Quillaja saponaria*, and *Acacia auriculiformis* on rumen fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 46 (10): 4324 – 4328.
- MARCIANI, D.; PATHAK, A.; REYNOLDS, R.; SEITZ, L.; MAY, R.** 2001. Altered immunomodulating and toxicological properties of degraded *Quillaja saponaria* Molina saponins. *Int. Immunopharmacol.* 1 (4): 813 – 818.
- MCGUIRK, S.M.** 2008. Disease management of dairy calves and heifers. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 24 (1): 139 – 153.
- MEE, J.F.** 2008. Newborn dairy calf management. *Vet. Clin. Food Anim.* 24 (1): 1 – 17.
- MOSES, T.; PAPADOPOULOU, K.; OSBOURN, A.** 2014. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49 (6): 439 – 462.

- NORD, L.I.; KENNE, L.** 1999. Separation and structural analysis of saponins in a bark extract from *Quillaja saponaria* Molina. Carbohydr. Res. 320 (1-2): 70 – 81.
- PARDON, B.; ALLIËT, J.; BOONE, R.; ROELANDT, S.; VALGAEREN, B.; DEPREZ, P.** 2015. Prediction of respiratory disease and diarrhea in veal calves based on immunoglobulin levels and the serostatus for respiratory pathogens measured at arrival. Prev. Vet. Med. 120 (20): 169 – 176.
- PHAM, H.L.; ROSS, B.P.; MCGEARY, R.P.; SHAW, P.N.; HEWAVITHARANA, A.K.; DAVIES, N.M.** 2006. Saponins from *Quillaja saponaria* Molina: isolation, characterization and ability to form immuno stimulatory complexes (ISCOMs). Curr. Drug Deliv. 3 (4): 389 – 397.
- PELAH, D.; ABRAMOVICH, Z.; MARKUS, A.; WIESMAN, Z.** 2002. The use of commercial saponin from *Quillaja saponaria* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. J. Ethnopharmacol. 81 (3): 407 – 409.
- PEN, B.; SAR, C.; MWENYA, B.; KUWAKI, K.; MORIKAWA, R.; TAKAHASHI, J.** 2006. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on in vitro ruminal fermentation and methane emission. Anim. Feed Sci. Technol. 129 (3-4): 175 – 186.
- PODOLAK, I.; GALANTY, A.; SOBOLEWSKA, D.** 2010. Saponins as cytotoxic agents: a review. Phytochem. Rev. 9 (3): 425 – 474.
- QUIGLEY, J.** 2002. Passive immunity in the new born calves. Adv. Dairy. Technol. 14 (1): 273 – 292.
- QUIN, G.W.; XU, R.S.** 1998. Recent advances in bioactive natural products from Chinese medicinal plants. Med. Res. Rev. 18 (6): 375 – 382.
- RONER, M.; SPRAYBERRY, J.; SPINKS, M.; DHANJI, S.** 2007. Antiviral activity obtained from aqueous extracts of the Chilean soap bark tree (*Quillaja saponaria* Molina). J. Gen. Virol. 88 (1): 275 – 285.

- RONER, M.; TAM, K.; KIESLING, M.** 2010. Prevention of rotavirus infections *in vitro* with aqueous extracts of *Quillaja saponaria* Molina. *Future Med. Chem.* 2 (7): 1083 – 1097.
- ROTH, B.A.; BARTH, K.; GYGAX, L.; HILLMAN, E.** 2009. Influence of artificial vs. mother – bonded rearing on sucking behavior, health and weight gain in calves. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 119 (3-4): 143 – 150.
- SEEMAN, P.** 1974. Ultrastructure of membrane lesions in immune lysis, osmotic lysis and drug induced lysis. *Fed. Proc.* 33 (10): 2116 – 2124.
- SEN, S.; MAKKAR, H.P.S.; MUETZEL, S.; BECKER, K.** 1998. Effect of *Quillaja saponaria* saponins and *Yucca schidigera* plant extract on growth of *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 27 (1): 35 – 38.
- SHIMOYAMADA, M.; IKEDO, S.; OOTSUBO, R.; WATANABE, K.** 1998. Effect of soybean saponins on chymotryptic hydrolyses of soybean proteins. *J. Agric. Food Chem.* 46 (12): 4793 – 4797.
- SJOLANDER, A.; COX, J.C.** 1998. Uptake and adjuvant activity of orally delivered saponin and ISCOM TM vaccines. *Adv. Drug Deliv.* 34 (2): 321 – 338.
- SLIWINSKI, B.J.; SOLIVA, C.R.; MACHMULLER, A.; KREUZER, M.** 2002. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101 (1): 101 – 114.
- SOBERON, F.; RAFFRENATO, E.; EVERETT, R.W.; VAN AMBURGH, M.E.** 2012. Preweaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 95 (2): 783 – 793.
- SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; STANDEN, J.** 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* 94 (2-3): 219 – 243.
- TRUJILLO, B.; MORAGA, L.; FOLCH, H.; CONCHA, C.; CORTÉS, H.** 2006. Responses of stressed suckling calves to oral administration of *Quillaja* extract. *Congreso de Buiatria. Valdivia.*

- TURNER, J.L.; DRITZ, S.S.; HIGGINS, J.J.; HERKELMAN, K.L.; MINTON, J.E.** 2002. Effects of a *Quillaja saponaria* extract on growth performance and immune function of weanling pigs challenged with *Salmonella typhimurium*. J. Anim. Sci. 80 (7): 1939 – 1946.
- UETAKE, K.** 2013. Newborn calf welfare: A review focusing on mortality rates. Anim. Sci. J. 84 (2): 101 – 105.
- USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE.** 2010. Dairy 2007, Heifer calf health and management practices on U.S. dairy operations, 2007. USDA:APHIS:VS:CEAH. Fort Collins, CO.
- USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE.** 2016. Dairy 2016, Dairy cattle, management practices in the United States, 2014. USDA:APHIS:VS:CEAH:NAHMS. Fort Collins, CO.
- VAN SETTEN, D.C.; VAN DE WERKEN, G.** 1996. Molecular structure of saponins from *Quillaja saponaria* Molina. Adv. Exp. Med. Biol. 404 (1): 185 – 193.
- WINDEYER, M.C.; LESLIE, K.E.; GODDEN, S.M.; HODGINS, D.C.; LISSEMORE, K.D.; LEBLANC, S.J.** 2014. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. Prev. Vet. Med. 113 (2): 231 – 240.
- WALTNER-TOEWS, D.; MARTIN, S.W.; MEEK, A.H.** 1986. Dairy calf management, morbidity and mortality in Ontario Holstein herds. IV: Association of management with mortality. Prev. Vet. Med. 4 (1): 159 – 171.
- YOSHIKOSHI, M.; KAHARA, T.; YOSHIKI, Y.** 1995. Metabolism and nonabsorption of soybean hypocotyl saponins in the rat model. Acta Aliment. 24 (4): 355 – 364.

8. ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de administración del placebo y los extractos de *Quillaja saponaria* Molina entregada al técnico agrícola encargado del área de crianza.

ADMINISTRACIÓN DE PRODUCTOS SEGÚN GRUPO

Grupo I	Disolver 2 gramos de fructosa en 2 litro de sustituto lácteo (Sprayfo Blue ®). Administrar oralmente una vez al día durante los primeros 60 días de vida.
Grupo II	Disolver 0,6 gramos del producto QP 1000 ® en 2 litro de sustituto lácteo (Sprayfo Blue ®). Administrar oralmente una vez al día durante los primeros 60 días de vida.
Grupo III	Disolver 2 gramos del producto Nutrafito Q en 2 litro de sustituto lácteo (Sprayfo Blue ®). Administrar oralmente una vez al día durante los primeros 60 días de vida.

Anexo 2: Tabla de calificación del estado de salud de las terneras.

<i>Calf Health Scoring Chart</i>	
Puntaje	Temperatura
0	37,7° - 38,2° C.
1	38,3° - 38,8° C.
2	38,9° - 39,4° C.
3	39,5° C o más.
Puntaje	Heces
0	Normal
1	Semisólidas, pastosas
2	Semilíquidas, pero consistentes
3	Líquida
Puntaje	Descarga Nasal
0	Serosa normal
1	Pequeña cantidad, turbia y unilateral
2	Gran cantidad, turbia y bilateral
3	Copiosa, mucopurulenta y bilateral
Puntaje	Tos
0	Ninguna
1	Al inducir tose una vez
2	Inducida repetida o espontánea ocasional
3	Espontánea repetida
Puntaje	Ojos y Oídos
0	Normales
1	Pequeña descarga ocular
2	Moderada descarga ocular bilateral, oreja levemente caída
3	Gran descarga ocular densa, cabeza inclinada o ambas orejas caídas

(McGuirk, 2008)

Anexo 3: Ejemplo de ficha de registro de eventos clínicos utilizada.

Grupo:											
Número del Ternero:											
Fecha de Nacimiento:											
	Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	TEMPERATURA										
0	37,7 - 38,2										
1	38,3 - 38,8										
2	38,9 - 39,4										
3	39,5 +										
	DESCARGA NASAL										
0	Normal										
1	Pequeña cantidad, turbia unilateral										
2	Turbia bilateral										
3	Copiosa, mucopurulenta										
	FECAS										
0	Normal										
1	Semi sólida, pastosa										
2	Semi líquida, pero consistente										
3	Líquida										
	TOS										
0	Ninguna										
1	Inducida, tociendo sólo una vez										
2	Repetida o espontánea ocasional										
3	Espontánea repetida										
	OJOS U OIDOS										
0	Normal										
1	Pequeña descarga ocular										
2	Moderada descarga ocular u oreja con levemente caída										
3	Cabeza inclinada o las dos orejas caídas										
	PUNTAJE TOTAL										

Anexo 4: Ejemplo de ficha de registro de tratamientos utilizada.

Grupo:				
Número del Ternero:				
Fecha de Nacimiento:				
Fecha	Enfermedad	Temperatura	Tratamiento	Dosis

Anexo 5: Ejemplo de ficha de registro de pesos utilizada.

Grupo:	
Número del Ternero:	
Fecha de Nacimiento:	
Peso	Kilogramos
Día 0	
Día 15	
Día 30	
Día 45	
Día 60	

Anexo 6: Promedios de la concentración de proteínas séricas totales, evaluadas a los días 2, 6 y 10, de las terneras en estudio.

Grupo	N° de ternera	PST promedio (g/dL)
Grupo I	8065	6,3
	8078	5,9
	8057	6,5
	8073	6,9
	8036	6,9
	8025	5,0
	8044	6,3
	8031	5,6
	8008	5,1
	3706	6,2
Grupo II	8075	7,0
	8064	5,5
	8055	5,3
	8043	5,2
	8048	5,1
	8024	7,7
	8030	6,9
	3708	5,7
	8007	6,5
	3700	5,1
Grupo III	8094	5,3
	8059	6,1
	8066	6,3
	8047	6,1
	8050	5,2
	8027	5,4
	8037	5,2
	8006	7,1
	3697	5,5
	3707	6,0