



**PROPIEDADES ANTIMETANOGÉNICAS *IN VITRO* DE ALGUNAS  
PLANTAS ADAPTADAS A LAS CONDICIONES DE SABANA INUNDABLE  
DEL DEPARTAMENTO DE ARAUCA, COLOMBIA**

**[*IN VITRO* ANTIMETHANOGENIC PROPERTIES OF SOME PLANTS  
ADAPTED TO THE FLOODABLE SAVANNA CONDITIONS OF ARAUCA  
DEPARTMENT, COLOMBIA]**

**M. Vélez-Terranova\*, R. Campos Gaona and H. Sánchez-Guerrero**

*Grupo de Investigación “Conservación, mejoramiento y utilización del ganado criollo Hartón del Valle y otros recursos genéticos animales en el suroccidente colombiano”. Departamento de Ciencia Animal. Universidad Nacional de Colombia. Carrera 32 No 12 -00 Chapinero, Vía Candelaria, Palmira - Valle del Cauca - Colombia*

*E-mails: omvelezt@unal.edu.co; rcamposg@unal.edu.co; hsanchezgu@unal.edu.co*  
*\*Corresponding author*

**RESUMEN**

Se evaluó el potencial metanogénico y calidad nutricional de diecinueve plantas adaptadas a las épocas seca y lluviosa de las sabanas inundables del departamento de Arauca. Cada planta se incubó anaeróticamente con fluido ruminal a 39°C por 24h y después del periodo de incubación se determinó la producción de gas, metano, ácidos grasos volátiles y degradación de la materia seca. Entre las plantas se encontraron valores de proteína cruda entre 6.87-28.22%; la fibra detergente neutra estuvo entre 35.2 – 71.26%, mientras que el extracto etéreo, cenizas y carbohidratos no fibrosos (CNF) presentaron valores entre 1.35 – 6.65, 2.43 – 11.47 y 5.27 – 35.64 %, respectivamente. La producción de gas y metano se correlacionaron significativamente ( $r = 0.84$ ). Las especies *Galactia jussiaeana*, *Belencita nemorosa*, *Ambrosia peruviana* y *Enterolobium schomburgkii* presentaron altos valores de degradación de MS (45.40 - 49.13%), AGV'S (0.84 – 1.37 mmol) y bajas producciones de metano (2.18 - 6.90 ml/g MS degradada), parámetros similares o superiores a los encontrados en la especie *Leucaena leucocephala*. Los resultados sugieren que estas plantas presentan compuestos útiles para reducir la metanogénesis ruminal sin afectar la digestibilidad de la dieta, sin embargo se requieren próximos estudios para evaluar persistencia del efecto antimetanogénico, dosis, consumo y desempeño animal.

**Palabras claves:** Sabana inundable; Plantas adaptadas; Metano; Ruminantes.

**SUMMARY**

The methanogenic potential and nutritional quality of nineteen plants adapted to the dry and rainy seasons of the Arauca floodable savannas was evaluated. Each plant was incubated anaerobically with rumen fluid at 39 °C for 24h, after incubation period, gas production, methane, volatile fatty acids and dry matter degradation was determined. Among the plants, crude protein values ranged between 6.87-28.22%; neutral detergent fiber was between 35.2 - 71.26%, while the ether extract, ash and nonstructural carbohydrate levels ranged between 1.35 - 6.65, 2.43 - 5.27 and 11.47 - 35.64%, respectively. Gas production and methane were significant correlated ( $r = 0.84$ ). The species *Galactia jussiaeana*, *Belencita nemorosa*, *Ambrosia peruviana* and *Enterolobium schomburgkii* showed high values of dry matter degradation (45.40 - 49.13%), VFA (0.84 - 1.37 mmol) and low methane production (2.18 - 6.90 ml / g DM degraded). These parameters were similar or better to those found in the species *Leucaena leucocephala*. The results suggest that these plants present useful compounds to reduce ruminal methanogenesis without affecting the diet digestibility, however further studies are required to assess the persistence of antimethanogenic effect, dosage, consumption and animal performance.

**Key words:** Floodable savanna; Adapted plants; Methane; Ruminants.

## INTRODUCCIÓN

En latinoamérica, la actividad ganadera es cuestionada fuertemente por generar altos niveles de gases de efecto invernadero, en especial metano (CH<sub>4</sub>) (Ribeiro *et al.*, 2015). En Colombia, la fermentación entérica genera el 19% de las emisiones nacionales de metano y el 47.5% de las emisiones del sector agropecuario (Banco mundial *et al.*, 2014). Las altas producciones de este gas, están asociados en gran parte a las ineficiencias productivas de los sistemas ganaderos determinados por el uso de dietas altamente fibrosas y de baja calidad (Ribeiro *et al.*, 2015).

El metano se produce durante la digestión anaerobia de los componentes orgánicos de los alimentos por parte de los microorganismos ruminales (bacterias, hongos, protozoarios), generándose en el proceso ácidos grasos volátiles (AGV'S) que sirven como fuente energética para el animal, y otros gases como H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> los cuales son usados por las bacterias metanógenas para formar CH<sub>4</sub> el cual se eliminan vía eructo (Martín *et al.*, 2009; Jansen, 2010). El metano representa una pérdida de 2-12% de la energía bruta consumida por el animal (Johnson y Johnson 1995), por lo tanto cualquier estrategia que permita reducir la metanogénesis ruminal incrementará la eficiencia de utilización de los alimentos mejorando el desempeño productivo de los rumiantes (Tadesse, 2014).

Una alternativa de mitigación natural que esta ganado atención en la nutrición animal, es el uso de los metabolitos secundarios de las plantas (Bodas *et al.*, 2012; Lascano y Cárdenas, 2010). Existen evidencias que demuestran que ciertos compuestos naturales presentan propiedades antimicrobiales, las cuales pueden ser usadas contra grupos metanogénicos en el rumen (Santra *et al.*, 2012). Compuestos como las saponinas, taninos, aceites esenciales, flavonoides, compuestos organosulfurados, etc han demostrado reducir la metanogénesis ruminal, sin embargo su efecto depende del tipo de metabolito y su concentración (Patra y Saxena, 2010; Bodas *et al.*, 2012; Vélez *et al.*, 2014).

Actualmente, se han realizado múltiples esfuerzos en varios países para identificar plantas y sus metabolitos secundarios que permitan reducir la producción de metano entérico (Bodas *et al.*, 2008; García-González *et al.*, 2008; Durmic *et al.*, 2010; Banik *et al.*, 2013) ya que pueden ser una opción viable de mitigación si se incluyen en la dieta de los animales (Buddle *et al.*, 2011; Grainger *et al.*, 2009; Jensen, 2012).

Las plantas producen metabolitos secundarios como medio de defensa al ataque de insectos, microorganismos y de adaptación a ambientes adversos (temperatura, humedad, intensidad de luz, sequía, etc) (Ramakrishna y Aswathanarayana, 2011). Se han identificado más de 200.000 estructuras definidas de estos compuestos, encontrándose alta variabilidad la cual está relacionada con las condiciones geográficas y ambientales a las que se encuentra sometida la planta (Patra y Saxena, 2010).

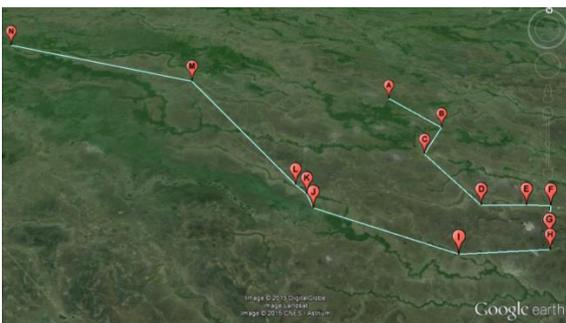
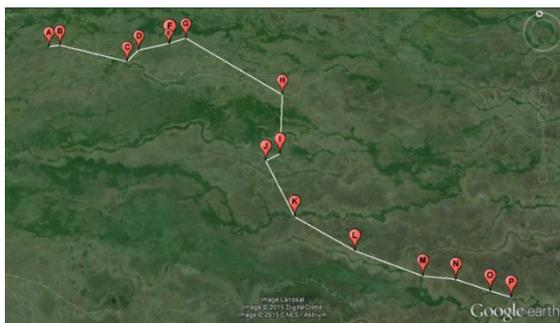
La Orinoquía es una de las principales regiones ganaderas de Colombia, cuenta con alrededor de 4.2 millones de cabezas de ganado (Lafaurie, 2011), donde el 39% de la población se encuentra entre los departamentos de Arauca y Casanare bajo condiciones de sabana inundable. En la zona, la actividad ganadera se desarrolla en pastoreo extensivo con plantas nativas adaptadas a la dinámica de inundación y sequía (Peñuela *et al.*, 2011). Esta diversidad de flora y condiciones ambientales características de la zona, constituyen un escenario ideal para la identificación de plantas y sus metabolitos con propiedades antimetanogénicas, las cuales podrían ser consideradas como alternativas nutricionales en los sistemas ganaderos de la región, o para ser usadas en el aislamiento de los metabolitos secundarios responsables de la acción antimetanogénica, y de esta forma poder utilizarlos como aditivos en las dietas de rumiantes. Por esta razón, el objetivo del presente estudio es evaluar la producción de metano y otros parámetros fermentativos de plantas nativas de la sabana inundable adaptadas a condiciones de inundación y sequía en la Orinoquía Colombiana.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección del material vegetal

En la zona existe un régimen monomodal, con una época de lluvias (abril- noviembre) y una época seca (diciembre- marzo). Durante los meses finales de cada época (lluvias y seca) y con la ayuda de un botánico y personal de la región se realizaron trayectos previamente establecidos a través de las sabanas inundables de Arauca (Figura 1), donde se realizaron puntos de observación en lugares que presentaron cambios en la vegetación, topografía y suelo de acuerdo a lo propuesto por Shultze-Kraft (1979). En los puntos de observación se tomaron muestras (aprox. 500g) por triplicado, de las hojas y tallos de las plantas que por su abundancia, mostraban señales de adaptación en cada una de las épocas. Las muestras se recolectaron en bolsas negras de polietileno y fueron almacenadas bajo refrigeración (4-6 °C) hasta su traslado al laboratorio donde fueron congeladas a -20 °C. En el laboratorio, las muestras

de una misma especie se unieron, para garantizar una muestra representativa. Posteriormente, las plantas se secaron en un horno de ventilación forzada a 60°C por 48 h y fueron molidas a través de un tamiz de 1 mm en un molino Wiley (Arthur H. Thomás Company, Philadelphia), para finalmente ser almacenadas en recipientes plásticos oscuros.



**Figura 1.** Recorridos realizados durante las épocas de lluvia (superior) y seca (inferior) en condiciones de sabanas inundables del Departamento de Arauca.

En la época de lluvias se recorrió un transecto de aproximadamente 83 Km en donde se realizaron 16 puntos de observación, mientras que durante la época seca el recorrido fue de aproximadamente 110 Km con 14 puntos de observación.

### Evaluación nutricional

La composición nutricional de las plantas se analizó siguiendo las metodologías propuestas por la AOAC (2000). La materia seca (MS) se estimó por gravimetría (AOAC 934.01), la proteína cruda (PC) por el método de Kjeldahl usando el factor  $N \times 6.25$  (AOAC 97605), las cenizas (CEN) por el método de eliminación de compuestos orgánicos por combustión (AOAC 948.05), el extracto etéreo (EE) por el método soxhlet (AOAC 920.39) y la fibra detergente neutra por la metodología propuesta por Van Soest (1991). Los carbohidratos no fibrosos (CNF) se calcularon al a través de la siguiente fórmula:  $100 - PC - FDN - EE - Cenizas$ .

### Prueba de Fermentación *in vitro*

Para las pruebas de fermentación, se utilizó la técnica de producción de gas siguiendo una metodología adaptada de Theodorou et al. (1994). El fluido ruminal se obtuvo de tres vacas criollas adultas de la raza Hartón del Valle con un peso vivo promedio de 480 kg, las cuales pastoreaban potreros compuestos de *Cynodon plectostachyus* y *Panicum máximum* (MS: 89.4%; PC: 13.8%; FDN: 65%; FDA: 35.7%; Lig: 6.9%), y se complementaban con heno de arroz, MS: 90.8%; PC: 8%; FDN: 69%; FDA: 43.3%; Lig: 8.2%). La colecta se realizó a primera hora en la mañana (8:00 am) a través de sonda oro-ruminal. El inóculo obtenido fue almacenado en termos previamente atemperados a 39 °C y trasladado al laboratorio, donde se filtró a través de paños de gasa y se saturó con CO<sub>2</sub>. El líquido ruminal de cada animal se utilizó por separado y cada uno sirvió como repetición para el análisis estadístico.

Las incubaciones se realizaron en frascos de 125 ml, en los cuales se pesó y adicionó 1g de cada planta + 85 ml de medio de cultivo según McDougall (1948). Posteriormente se sellaron anaerómicamente con tapas de caucho y agrafes de aluminio, para luego ser guardados bajo refrigeración. El día del experimento, los frascos se atemperaron a 39 °C en un baño maría, y se inocularon a través de la tapa de caucho con 10 ml de fluido ruminal, dejando que el proceso de fermentación se realizara durante 24h. En el experimento se evaluaron 20 tratamientos con tres repeticiones, las cuales estaban determinadas por los inóculos utilizados. También se incluyeron controles (eg, inóculo) para corregir los gases generados por los microorganismos presentes en el líquido ruminal (López et al., 2007).

Después de las 24h de fermentación, se midió la presión del gas usando un transductor (PS 100-2BAR, Sper Scientific Ltd.), al cual se le acopló una jeringa de 60 ml que sirvió para estimar el volumen del gas generado. Este proceso se realizó hasta que la presión dentro del frasco fuera igual a la presión ambiental, lo cual se pudo notar con una lectura cero en el lector digital del transductor. Con los datos de presión y volumen se estimó una ecuación de regresión ( $Y = -4.49 + 6.42 X - 0.10 X^2$  donde Y representa el volumen de gas producido por cada unidad de presión (X);  $R^2 = 0.98$ ) que sirvió para corregir los volúmenes de gas por la presión atmosférica del laboratorio de acuerdo a lo propuesto por Posada et al. (2006) y López et al. (2007). Para determinar la concentración de metano, se tomaron muestras de los gases generados y se inyectaron en viales de 10 ml para luego ser analizados por cromatografía de gases, usando un cromatógrafo Shimadzu (GC-2014) equipado con una columna (4m H-D 80/100, 0.7m S-Q y 1.5 P-N, temperatura 120 °C) y un detector de

ionización de llama (FID, temperatura 250°C). Se usó nitrógeno como gas de arrastre con un flujo ajustado a 30.83mL/min. La inyección de la muestra se realizó a través del llenado de la válvula de muestreo del equipo con 2 ml de los gases.

Los ácidos grasos volátiles totales (AGV), se estimaron a partir de la formula  $AGV_{(mmol)} = -0.00425 + 0.0222$  (ml gas a las 24 h) propuesta por Getachew *et al.* (2002), la cual se basa en la alta relación existente entre el volumen de producción de gas en 24h y los AGV'S ( $R^2=0.94$ ).

Para estimar la MS degradada, los residuos se filtraron inmediatamente a través de crisoles de porcelana perforados en el fondo tipo Gooch y se secaron a 105 °C por 48h. El porcentaje de MS degradada se estimó por diferencia de peso antes y después del proceso de fermentación.

### Análisis estadístico

El diseño experimental tuvo un arreglo completamente al azar, y los datos fueron sometidos a análisis de varianza de una vía, utilizando el software estadístico InfoStat (2013). Cuando se encontraron diferencias entre medias de tratamientos, se usó la prueba de promedios LSD (Least significant differences -  $P<0.05$ ).

Se estimaron correlaciones de Pearson para determinar las relaciones entre las características nutricionales y los parámetros fermentativos que fueron determinados (producción de gas, metano y degradación de la MS). Las correlaciones se declararon significativas con un  $P<0.05$ .

La ecuación de regresión entre presión y volumen de gas se estimó con la opción regresión lineal del paquete estadístico mencionado anteriormente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características de las plantas colectadas en cada época se muestran en la Tabla 1. En total se tomaron muestras de 19 especies de plantas, de las cuales 14 fueron obtenidas en la época de lluvias y 5 durante la época seca. En general se puede observar que predominan las especies arbóreas y herbáceas. En este experimento también se incluyó la especie *Leucaena leucocephala* para que sirviera como punto de referencia, ya que es una especie arbórea tropical usada frecuentemente a nivel mundial en la alimentación de rumiantes debido a su alto aporte de nutrientes y su efecto negativo sobre la metanogénesis ruminal (Barros-Rodríguez *et al.*,

2014; Meale *et al.*, 2012; Molina *et al.*, 2013; Soltan *et al.*, 2012; Gaviria *et al.*, 2015).

### Composición nutricional

Se encontró una alta variación en la calidad nutricional de las plantas estudiadas (Tabla 2). Los valores de MS estuvieron entre 11.64 – 51.06 %, siendo las especies *H. courbaril* y *E. diversifolia* las de mayor y menor valor respectivamente. La PC presentó valores entre 6.87 – 30.78%. Entre las plantas nativas, *S. occidentalis* fue la que presentó mayor contenido de PC (28.22%), mientras que en *C. americana* se encontraron los menores valores. Para FDN, los niveles se encontraron en un rango 35.2 – 71.26%. El máximo valor de FDN se encontró en *E. jelskiana* mientras que el menor valor fue para *S. occidentalis*. Por su parte el EE varió entre 1.35 – 6.65%, encontrándose el mayor contenido en la especie *S. laurifolium* y el menor en *S. diversifolia*. Las cenizas presentaron valores entre 2.43 – 11.47%, encontrándose los mayores y menores valores en las especies *V. brasiliana* y *B. virgilioides* respectivamente. Los valores de CNF estuvieron entre 5.27 – 35.64 siendo las plantas *E. jelskiana* y *S. multijuga* las de menor y mayor valor respectivamente. Los resultados indican que las especies estudiadas presentan altos contenidos proteicos y de minerales, similares a los reportados para otras especies arbóreas y arbustivas (Isah *et al.*, 2012; Shenkute *et al.*, 2012).

Siguiendo la escala de clasificación de especies propuesta por FAO (2012), de acuerdo al contenido de PC, 8 de las especies estudiadas se consideran muy buenas (*V. brasiliana*, *S. occidentalis*, *G. jussiaeana*, *M. ancylopoda*, *S. saman*, *E. chomburgkii*, *A. peruviana* y *B. nemorosa*), 10 son consideradas como buenas (*H. courbaril*, *E. jelskiana*, *S. laurifolium*, *C. grandis*, *E. fusca*, *H. suaveolens*, *E. diversifolia*, *G. ulmifolia*, *B. virgilioides* y *S. multijuga*) y solo una especie (*C. americana*) es considerada aceptable. Esta clasificación muestra que la mayoría de las especies estudiadas podrían ser útiles para suplir las deficiencias proteicas que se encuentran comúnmente en sistemas de producción animal tropical, y por lo tanto brindan alternativas nutricionales que podrían ser integradas exitosamente dentro de los sistemas productivos (FAO, 2012; Amata, 2014), sin embargo, para garantizar la utilización a futuro de estas especies, es necesario realizar otros experimentos que permitan dar a conocer la respuesta animal con relación al consumo, palatabilidad, efectos anti-nutricionales y desempeño animal (Shenkute *et al.*, 2012).

**Tabla 1.** Lista de las plantas colectadas durante las épocas de lluvias y sequía en condiciones de sabana inundable

Época	Nombre común	Nombre científico	Familia	Constitución
Lluvia	Estoraque	<i>Vernonanthura brasiliiana</i>	Asteraceae(compositae)	Arbustiva
	Algarrobo	<i>Hymenaea courbaril</i>	Caesalpiniaceae	Arbórea
	Brusca	<i>Senna occidentalis</i>	Caesalpiniaceae	Herbácea
	Junco	<i>Eleocharis jelskiana</i>	Cyperaceae	Herbácea
	Caña fistola	<i>Sapium laurifolium</i>	Euphorbiaceae	Arbórea
		<i>Cassia grandis</i>	Fabaceae	Arbórea
	Bucare	<i>Galactia jussiaeana</i>	Fabaceae	Herbácea voluble
		<i>Erythrina fusca</i>	Fabaceae	Arbórea
	Mastranto	<i>Hyptis suaveolens</i>	Lamiaceae(Labiatae)	Herbácea
	trébol	<i>Marsilea ancylopoda</i>	Marsilaceae	Herbácea
	Samán	<i>Samanea saman</i>	Mimosaceae	Arbórea
	Cara caro	<i>Enterolobium schomburgkii</i>	Mimosaceae	Arbórea
	Boro	<i>Eichornia diversifolia</i>	Pontederiaceae	herbácea
	Guácimo	<i>Guazuma ulmifolia</i>	Sterculiaceae(Malbaceae)	Arbórea
Seca	Altamisa	<i>Ambrosia peruviana</i>	Asteraceae	Herbácea
	Manirito	<i>Belencita nemorosa</i>	Capparaceae	Arbustiva
	Chaparro	<i>Curatella americana</i>	Dilleniaceae	Arbórea
	Alcornoco	<i>Bowdichia virgilioides</i>	Fabaceae	Arbórea
	Casabe	<i>Senna multijuga</i>	Fabaceae	Arbórea

#### Asociación entre características nutricionales y fermentativas

Se encontró una correlación positiva entre PC y MSD ( $r = 0.78$ ;  $P=0.0001$ ), resultados similares fueron reportados por Njidda y Nasiru. (2010) y Getachew et al. (2004). Lo anterior indica que a mayores contenidos proteicos, se encontraron mayores niveles de degradación de la materia seca. Estos resultados concuerdan con los hallazgos obtenidos *in vitro* e *in vivo*, donde la estimación de la digestibilidad de la MS a través de modelos de regresión, depende en gran parte de PC (Plaizier y Li, 2013; Khazaal et al., 1995). La FDN y MSD presentaron una correlación negativa ( $r = -0.60$ ;  $P=0.0054$ ), lo que sugiere una menor MSD a niveles más altos de FDN. Diversos estudios reportan el efecto negativo de la FDN sobre la digestibilidad de la MS, dado a que esta actúan como una barrera que limita el acceso de las enzimas microbiales a los polisacáridos de la pared celular (Njidda y Nasiru, 2010; Bezabih et al., 2013). También se encontró una correlación negativa entre la producción de gas y la MS ( $r = -0.47$ ;  $P=0.0369$ ). Resultados similares fueron encontrados por Arigbede et al. (2006). Lo anterior puede estar determinado en gran parte, por los altos contenidos proteicos y de minerales de las plantas evaluadas, los cuales son degradados *in vitro* generando poco o nada de gas durante el proceso (Getachew et al., 2004).

A pesar de que la producción de metano no mostró ninguna correlación significativa con las características nutricionales, si lo hizo con la producción de gas ( $r = 0.84$ ;  $P < 0.0001$ ). Este resultado sugiere, que el metano se incrementó a medida que se presentaron mayores volúmenes de gas ( $CH_4 = -4.13 + 0.10 * \text{Producción Gas}$ ;  $R^2 = 0.71$ ). Esta relación se debe a que la producción de gas se da principalmente cuando los alimentos son fermentados a acetato y butirato (Getachew et al., 2004), durante la formación de estos compuestos se libera  $CO_2$  el cuál es utilizado por las bacteria metanogénicas para la formación de metano (Moss et al., 2000). De esta manera, altos volúmenes de gas se asocian con mayor formación de metano.

#### Producción de metano y otros parámetros fermentativos

Para la evaluación del potencial metanogénico de las plantas estudiadas, se usó como punto de referencia la especie *leucaena leucocephala*. En esta especie se encontraron valores de degradación de MS de 41.5%, AGV'S de 1.02 mmol y niveles de producción de gas y metano de 111 y 6.94 ml/g MS degradada respectivamente. Resultados similares fueron reportados por Gameda y Hassen (2015); Meale et al. (2012); Sallam et al. (2010) y Asaolu et al. (2014). La Tabla 3 muestra las características fermentativas de las especies consideradas en este estudio.

**Tabla 2.** Composición nutricional (%) de las especies seleccionadas

Especie	MS	PC	FDN	EE	CENIZAS	CNF
<i>V. brasiliiana</i>	29.27	16.95	49.83	4.77	11.47	16.98
<i>H. courbaril</i>	51.06	11.85	57.13	6.25	3.53	21.24
<i>S. occidentalis</i>	20.86	28.22	35.2	3.34	10.28	22.96
<i>E. jelskiana</i>	20.92	11.82	71.26	1.78	9.87	5.27
<i>S. laurifolium</i>	31.2	12.7	56.88	6.65	5.55	18.22
<i>C. grandis</i>	43.96	13.8	55.75	2.11	4.01	24.33
<i>G. jussiaeana</i>	31.24	19.1	60.61	2.26	6.9	11.13
<i>E. fusca</i>	29.22	13.86	62.76	2.52	5.75	15.11
<i>H. suaveolens</i>	25.58	14.84	54.02	5.91	9.43	15.80
<i>M. ancylopoda</i>	11.76	23.88	55.69	1.45	11.45	7.53
<i>S. saman</i>	40.88	23.12	56.4	3.26	4.14	13.08
<i>E. chomburgkii</i>	35.59	24.94	56.46	3.03	7.79	7.78
<i>E. diversifolia</i>	11.64	10.51	64.4	1.35	10.13	13.61
<i>G. ulmifolia</i>	26.32	9.87	69.44	2.31	7.58	10.80
<i>A. peruviana</i>	24.75	24.51	41.66	5.53	10.32	17.98
<i>B. nemorosa</i>	24.84	21.72	43.88	3.83	7.44	23.13
<i>C. americana</i>	35.83	6.87	59.33	2.07	7.36	24.37
<i>B. virgilioides</i>	32.38	13.02	54.26	2.8	2.43	27.49
<i>S. multijuga</i>	41.86	12.77	46.61	2.5	2.48	35.64
<i>L.leucocephala</i>	27	30.78	36.96	2.46	6.71	23.09

MS: Materia seca; PC: proteína cruda; FDN: fibra detergente neutra ; EE: extracto etéreo; CNF: carbohidratos no fibrosos

**Tabla 3.** Características fermentativas *in vitro* de las plantas evaluadas después de 24 h de incubación

Especie	Producción de gas (ml/g MSD)	Metano (ml/g MSD)	AGV (mmol)	MSD (%)
<i>V. brasiliiana</i>	116 a	6.48 b	0.90 b	34.77 d
<i>H. courbaril</i>	83 b	2.81 c	0.42 c	23.16 f
<i>S. occidentalis</i>	91 b	7.01 b	1.41 a	69.73 a
<i>E. jelskiana</i>	113 a	8.1 b	0.90 b	35.73 d
<i>S. laurifolium</i>	134 a	13.52 a	0.94 b	31.70 e
<i>C. grandis</i>	37 c	0.16 c	0.17 d	21.39 f
<i>G. jussiaeana</i>	129 a	6.47 b	1.37 a	48.01 b
<i>E. fusca</i>	117 a	7.39 b	0.91 b	35.11 d
<i>H. suaveolens</i>	108 a	4.33 b	0.61 c	28.56 e
<i>M. ancylopoda</i>	113 a	5.23 b	1.12 b	45.03 b
<i>S. saman</i>	47 c	0.24 c	0.31 c	30.32 e
<i>E. chomburgkii</i>	84 b	3.99 b	0.84 b	45.40 b
<i>E. diversifolia</i>	88 b	4.82 b	0.55 c	27.98 e
<i>G. ulmifolia</i>	106 a	5.13 b	0.53 c	22.55 f
<i>A. peruviana</i>	91 b	2.18 c	0.86 b	49.13 b
<i>B. nemorosa</i>	111 a	6.90 b	1.16 b	47.69 b
<i>C. americana</i>	87 b	2.15 c	0.41 c	21.32 f
<i>B. virgilioides</i>	36 c	0.27 c	0.18 d	23.22 f
<i>S. multijuga</i>	80 b	5.03 b	0.64 c	36.19 d
<i>L.leucocephala</i>	111 a	6.94 b	1.02 b	41.55 c
Error estándar	6.33	1.05	0.08	1.41

MSD: Materia seca degradada

AGV: ácidos grasos volátiles de cadena corta

Medias en la misma columna con diferente letra son diferentes significativamente ( $P < 0.05$ ).

Se encontraron plantas con diferentes potenciales de degradación de MS después de 24h de fermentación. Las especies *A. peruviana*, *G. jussiaeana*, *B. nemorosa*, *E. chomburgkii* y *M. ancylopoda* no presentaron diferencias en los valores de degradación MS ( $P<0.05$ ), los cuales estuvieron entre 45.03 - 49.13%. Estos valores fueron superiores a los encontrados en la especie *L. leucocephala* ( $P<0.05$ ). El mayor valor de degradación de MS se obtuvo en la especie *S. occidentalis* ( $P<0.05$ ), alcanzando un nivel de 69.73%, similar a lo reportado para otras especies como *Acacia tortilis*, *Moringa oleifera* y *Ziziphus mucronata* con valores de degradación superiores al 70% (Njidda y Nasiru, 2010).

En los volúmenes de gas por unidad de MS degradada se presentaron diferencias entre las especies de plantas evaluadas ( $P<0.05$ ). Las especies que mostraron los mayores volúmenes fueron *S. laurifolium*, *G. jussiaeana*, *E. fusca*, *V. brasilian*, *E. jelskiana*, *M. ancylopoda*, *L. leucocephala*, *B. nemorosa*, *H. suaveolens*, y *G. ulmifolia* con valores que estuvieron entre 106.33 y 134 ml/g MS degradada.

Se encontraron diferencias entre las estimaciones de AGV'S en las plantas bajo estudio ( $P<0.05$ ). En las especies *B. nemorosa*, *M. ancylopoda*, *S. laurifolium*, *E. fusca*, *A. peruviana*, *V. brasiliana*, *E. jelskiana* y *E. chomburgkii* se encontraron valores similares a la de la planta *L. leucocephala* ( $P<0.05$ ). Las especies *S. occidentalis* y *G. jussiaeana* fueron las que presentaron los mayores valores de AGV'S con 1.41 y 1.37 mmol respectivamente ( $P<0.05$ ).

En la producción de metano por unidad de MS degradada también se presentaron diferencias entre las especies ( $P<0.05$ ). Doce de las plantas mostraron niveles de producción de metano similares a las encontradas en la especie *L. leucocephala* ( $P<0.05$ ) con valores entre 3.99 - 8.10 ml/g MS degradada. Las plantas *V. brasiliana*, *E. jelskiana*, *E. fusca*, *H. suaveolens*, *E. diversifolia*, *G. ulmifolia* y *S. multijuga* se degradaron menos que *L. leucocephala* ( $P<0.05$ ), pero generaron los mismos volúmenes de metano. Otro grupo de plantas entre las que se encuentran *H. courbaril*, *C. americana*, *B. virgilioides*, *S. saman* y *C. grandis* mostraron los niveles de producción de metano más bajos ( $P<0.05$ ) con valores entre 0.16 - 2.81 ml/g MS degradada, sin embargo este efecto se produjo por los bajos porcentajes de degradación de MS en estas plantas (Durmic et al., 2010) los cuales fueron en promedio 42.5% menores al valor encontrado en la planta *L. leucocephala*.

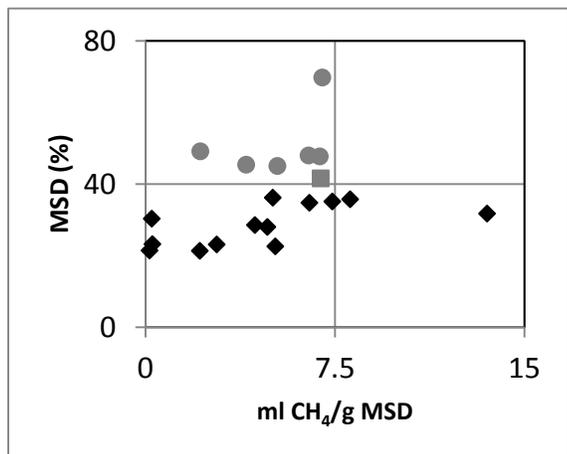
Uno de los principales mecanismos de acción que tienen los metabolitos secundarios para reducir la

metanogénesis ruminal es a través de la disminución en la digestibilidad de la dieta. Este mecanismo es de poco interés ya que reduce la eficiencia de utilización de los alimentos por los animales (Bodas et al., 2012; Vélez et al., 2014). Un concepto aceptado en nutrición de rumiantes es la selección de alimentos altamente digestibles, que promuevan una mayor síntesis de nutrientes (proteína microbiana y AGV'S) y una menor producción de metano (Makkar, 2005; Blummel et al., 1997). En el presente estudio, las especies *S. occidentalis*, *A. peruviana*, *B. nemorosa*, *G. jussiaeana*, *E. chomburgkii* y *M. ancylopoda* presentaron los mayores valores de degradación de MS y bajos niveles de producción de metano (Figura 2). Al considerar los otros parámetros de fermentación, se puede observar que en estas especies también se encontraron las mayores concentraciones de AGV'S, sin embargo se presentaron diferencias ( $P<0.05$ ) en cuanto a los volúmenes de producción de gas siendo las especies *G. jussiaeana*, *B. nemorosa* y *M. ancylopoda* las que mostraron volúmenes superiores a *S. occidentalis*, *A. peruviana* y *E. chomburgkii* (110.67-128.67 Vs 83.67 - 91.33 ml/g MS degradada, respectivamente).

En los sistemas de fermentación *in vitro*, los sustratos degradados son convertidos en AGV'S, gases (principalmente  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$ ), agua y células microbianas (Getachew et al., 1998; Makkar, 2005). La producción de gas refleja cuanto del sustrato degradado se utilizó principalmente para la formación de AGV'S (acetato, propionato y butirato) (Getachew et al., 1998). Los altos volúmenes de gas y porcentajes de degradación encontrados en las especies *G. jussiaeana*, *B. nemorosa* y *M. ancylopoda* sugieren que estas plantas promueven la formación de AGV'S, en especial acetato y butirato los cuales están relacionados con generar incrementos en los volúmenes de producción de gas (Getachew et al., 2004). A pesar de que el metano se relaciona con la formación de acetato y butirato (Posada y Noguera, 2005), y de la correlación positiva que se encontró entre el metano y producción de gas, en las especies *G. jussiaeana*, *B. nemorosa* y *M. ancylopoda* se encontraron niveles de producción de metano similar a la de la especie *L. leucocephala*, indicando que existen otros mecanismos de mitigación de metano ruminal, en los que pueden estar involucrados la presencia de metabolitos secundarios.

En las plantas *S. occidentalis*, *A. peruviana* y *E. chomburgkii* que presentaron altos porcentajes de degradación de MS pero con menores volúmenes de gas, la baja producción de metano pudo estar determinada por un cambio en las proporciones de AGV'S promoviendo una mayor síntesis de propionato, un compuesto cuya formación reduce los hidrógenos requeridos para la metanogénesis ruminal (Janssen, 2010). Los alimentos que promueven la

síntesis de propionato usualmente presentan bajos volúmenes de gas, ya que durante su formación solo se libera el gas requerido para la neutralización del ácido (Getachew *et al.*, 2004; Posada y Noguera, 2005). Dada la relación inversa que existe entre la formación de biomasa microbiana y la producción de gas por sustrato degradado, también se puede considerar que estas plantas destinaron una mayor proporción de MS degradada para la producción de proteína microbiana (Blummel *et al.*, 1997; Gaviria *et al.*, 2015).



**Figura 2.** Relación entre MS degradada y producción de metano después de 24h de fermentación. *Leucaena leucocephala* (■); especies con efecto deseado (●)

Los resultados del presente estudio indican que las especies *G. jussiaeana*, *B. nemorosa*, *A. peruviana* y *E. chomburgkii* podrían ser útiles para reducir la metanogénesis ruminal, sin afectar la disponibilidad de nutrientes para el animal. Las especies *M. ancylopoda* y *S. occidentalis* a pesar de reducir la producción de metano, su utilización en la nutrición de rumiantes presenta ciertas limitantes. En la planta *M. ancylopoda* al ser una especie acuática, se encontraron contenidos de MS bajos (11.76%), lo que limita su uso a gran escala. Por su parte, en la especie *S. occidentalis* se han reportado casos de intoxicación en bovinos por el consumo de esta planta especialmente de sus semillas (Mussart *et al.*, 2013; Carmo *et al.*, 2011). De esta manera, estas plantas se convierten en candidatas para la realización de otros ensayos que permitan aislar los compuestos que puedan estar ejerciendo un efecto negativo sobre la producción de metano a nivel ruminal, y evaluarlos posteriormente como aditivos a las dietas de rumiantes.

Durante las pruebas de fermentación, cada planta fue evaluada como un único sustrato, representando la

dieta base de los animales. Dado que las especies *G. jussiaeana*, *B. nemorosa*, *A. peruviana* y *E. chomburgkii* que fueron las que mostraron los mejores resultados en cuanto a la menor producción de metano sin afectar la degradación de la materia seca, presentan constituciones de tipo herbácea, arbustiva o arbórea, su uso en la nutrición de rumiantes sería más ventajosa si se consideraran como complemento a una dieta base. Por esta razón se hace necesario realizar próximos experimentos que permitan identificar los niveles de inclusión adecuados de cada una de estas plantas para lograr reducir la metanogénesis ruminal sin afectar la disponibilidad de nutrientes para los animales.

## CONCLUSIONES

Los recorridos realizados, demostraron que bajo condiciones de sabana inundable es posible encontrar diversidad de especies de plantas entre las que predominan las de tipo herbáceas, arbustivas y arbóreas. Las plantas presentaron en su mayoría una calidad nutricional buena, con altos contenidos proteicos lo que las convierte en alternativas nutricionales que podrían ser útiles para suplir las deficiencias de este nutriente que se encuentran comúnmente en condiciones tropicales.

Entre las características fermentativas *in vitro* de algunas plantas, se encontró que las especies *G. jussiaeana*, *B. nemorosa*, *A. peruviana* y *E. chomburgkii* no afectaron la degradación de la materia seca, y además lograron reducir la producción de metano a niveles comparables o superiores a los encontrados en *L. leucocephala*, una de las especies más usada como suplemento en la dieta de rumiantes. Los resultados sugieren que estas plantas presentan compuestos útiles para reducir la metanogénesis ruminal y que podrían ser consideradas como alternativas nutricionales en la región, sin embargo es necesario la realización de otros experimentos que permitan confirmar el efecto antimetanogénico de las plantas cuando interactúan con una dieta base, como es su consumo por parte de los animales y posibles efectos negativos sobre el bienestar animal.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira - Convocatoria del programa nacional de proyectos para el fortalecimiento de la investigación, la creación y la innovación en posgrados de la Universidad Nacional de Colombia 2013-2015.

## REFERENCIAS

Amata. I.A. 2014. The use of non-conventional feed resources (NCFR) for livestock feeding in

- the tropics: a review. *Journal of Global Biosciences* Vol. 3(2): 604-613.
- AOAC. 2000. *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. 17<sup>th</sup> Edition. W. Horwitz (ed.). Volume 1. Agricultural Chemicals. Contaminants and Drugs.
- Arigbede, O. M., Anele, U. Y., Olanite, J. A., Adekunle, I. O., Jolaosho. O. A., Onifade, O. S. 2006. Seasonal *in vitro* gas production parameters of three multi - purpose tree species in Abeokuta, Nigeria. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 18, Article #142.
- Asaolu, V. O., Odeyinka, S. M., Binuomote, R. T., Odedire, J. A. Babayemi, O. J. 2014. Comparative nutritive evaluation of native *Panicum maximum*, selected tropical browses and their combinations using *in vitro* gas production technique. *Agriculture and Biology Journal of North America* 5(5): 198-208.
- Banco Mundial; CIAT; CATIE. 2014. *Agricultura climáticamente inteligente en Colombia. Serie de perfiles nacionales de agricultura climáticamente inteligente para América Latina*. Washington D.C.: Grupo del Banco Mundial.
- Banik, B.K., Durmic, Z., Erskine, W., Ghamkhar, K., Revell, C. 2013. *In vitro* ruminal fermentation characteristics and methane production differ in selected key pasture species in Australia. *Crop & Pasture Science*. 64: 935–942.
- Barros-Rodríguez, M., Sandoval-Castro, C.A., Solorio-Sánchez, J., Sarmiento-Franco, L.A., Rojas-Herrera, R., Klieve, A.V. 2014. *Leucaena leucocephala* in ruminant nutrition. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 17: 173 – 183.
- Bezabih, M., Pellikaan, W. F., Tolera, A., Khan, N. A., Hendriks, W. H. 2013. Chemical composition and *in vitro* total gas and methane production of forage species from the Mid Rift Valley grasslands of Ethiopia. *Grass and Forage Science* 69: 635-643.
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., López, S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*. 176:78– 93.
- Blummel, M., Makkar, H.P.S., Becker, K., 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 77: 24–34.
- Buddle, B.M., Denis, M., Attwoo, G.T., Altermann, E., Janssen, P.H., Ronimus, R.S., Pinares-Patiño, C.S., Muetzel, S., Wedlock, D.N. 2011. Review Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *The Veterinary Journal*. 188:11–17.
- Carmo, P.M.S., Irigoyen, L.F., Lucena, R.B., Figuera, R.A., Kommers, G.D., Claudio S.L. 2011. Spontaneous coffee senna poisoning in cattle: Report on 16 outbreaks. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 31(2):139-146.
- Durmic, Z., Hutton, P., Revell, D.K., Emms, J., Hughes, S., Vercoe, P.E. 2010. *In vitro* fermentative traits of Australian woody perennial plant species that may be considered as potential sources of feed for grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 160: 98–109.
- FAO. 2012. Use of lesser-known plants and plant parts as animal feed resources in tropical regions. by Emmanuel S. Quansah & Harinder P.S. Makkar. *Animal Production and Health Working Paper*. No. 8. Rome.
- García-González, R., López, S., Fernández, M., Bodas, R., González, J.S. 2008. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. 147: 36–52.
- Gaviria, X., Naranjo, J.F., Barahona, R. 2015. Cinética de fermentación *in vitro* de *Leucaena leucocephala* y *Megathyrsus maximus* y sus mezclas, con o sin suplementación energética. *Pastos y Forrajes*. 38(1): 55-63.
- Gemeda, B. S., Hassen. A. 2015. Effect of Tannin and Species Variation on *In vitro* Digestibility, Gas, and Methane Production of Tropical Browse Plants. *Asian Australas. Journal of Animal Science*. 28:188-199
- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H.P., Becker, K. 1998. *In vitro* measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 72: 261-281.
- Getachew, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2002. Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *Journal of Agricultural Science (Camb.)*. 139: 341–352.
- Getachew, G., Robinson, P.H., DePeters, E.J., Taylor, S.J. 2004. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 111: 57–71.
- Grainger, C., Clarke, T., Auld, M.J., Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Waghorn, G.C., Eckard, R.J. 2009. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion

- from grazing dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*. 89: 241–251.
- InfoStat. 2013. software estadístico versión 1613-2013. Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Isah, O.A., Fayemi, P.O., Gazaly, M.B., Aderinboye, R.Y. 2012. Nutritional characteristics of four browse plants consumed by free-ranging ruminants in Western part of Nigeria. *African Journal of Agricultural Research* 7(12): 1944-1949.
- Janssen, P. H. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Science and Technology*. 160: 1–22.
- Jensen, L.T. 2012. Livestock foraging behavior in response to sequence and interactions among alkaloids, tannins, and saponins. Doctoral thesis. Utah State University.
- Johnson, K.A., Johnson, D.E. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*. 73:2483-2492.
- Khazaal, K.A., Dentinho, M.T., Ribeiro, J.M., Ørskov, E.R., 1995. Prediction of apparent digestibility and voluntary intake of hay fed to sheep: comparison between using fibre components, *in vitro* digestibility or characteristics of gas production or nylon bag degradation. *Animal Science*. 61, 527–538.
- Lascano, C. E., Cárdenas, E. 2010. Alternatives for methane emission mitigation in livestock systems. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 39:175-182.
- López, S., Dhanoa, M. S., Dijkstra, J., Bannink, A., Kebreab, E., France, J. 2007. Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*. 135:139–156.
- Makkar, H.P.S. 2005. *In vitro* gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. *Animal Feed Science and Technology*. 123–124 : 291–302.
- Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M. 2009. Methane mitigation in ruminants: from microbes to the farm scale. *Animal*. 4(3):351-365.
- McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of Sheep's saliva. *Biochemistry Journal*. 43:99-109.
- Meale, S.J., Chaves, A.V., Baah, J., McAllister, T.A. 2012. Methane Production of Different Forages in *In vitro* Ruminal Fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. Vol. 25. No. 1: 86 – 91
- Molina, I. C., Cantet, J. M., Montoya, S., Correa Londoño, G.A., Barahona Rosales, R. 2013. Producción de metano *in vitro* de dos gramíneas tropicales solas y mezcladas con *Leucaena leucocephala* o *Gliricidia sepium*. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 8 (2): 15-31.
- Moss, A., Jouany, J. P., Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales De Zootechnie*. 49: 231–253
- Mussart, N.B., Koza, G.A., Lértora, J., Álvarez Chamale, G.M., Coppo, J.A. 2013. Intoxicación por “cafetillo” (*Cassia occidentalis*) en bovinos del nordeste argentino. *Revista Veterinaria*. 24(2): 138-143.
- Njidda, A.A., Nasiru, A. 2010. *In vitro* Gas Production and Dry Matter Digestibility of Tannin-Containing Forages of Semi-Arid Region of North-Eastern Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition*. 9 (1): 60-66.
- Patra, A., Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*. 71:1198–1222.
- Peñuela, L., Fernández, A., Castro, F., Ocampo, A. 2011. Uso y manejo de forrajes nativos en la sabana inundable de la Orinoquía. *Fundación Horizonte Verde. Universidad de los Llanos – Unillanos*. Pp. 6 – 65.
- Plaizier, J. C. and Li, S. 2013. SHORT COMMUNICATION: Prediction of *in vitro* dry matter digestibility with the ANKOM Daisy II system of ruminant feeds using the gas production technique. *Canadian Journal of Animal Science*. 93: 399 - 402.
- Posada, S.L., Noguera, R.R. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*. Vol. 17, Art. #36.
- Posada, S.L., Noguera, R., Bolívar, D. 2006. Relación entre presión y volumen para la implementación de la técnica *in vitro* de producción de gases en Medellín. Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. Volume. 19(4): 407-414.
- Ramakrishna, A., Aswathanarayana. G. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plants Signaling & Behavior*. 6(11): 1720-1731.
- Ribeiro, L.G., Machado, F.S., Campos, M.M., Guimaraes, R., Tomich, T.R., Reis, L.G. Coombs, C. 2015. Estrategias de mitigación de metano entérico en rumiantes: revisión de literatura. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 28:124-143.
- Sallam, S.M.A., Bueno, I.C., Godoy, P.B., Nozella, E. F., Vitti, D.M.S., Abdalla. A.L. 2010. Ruminal fermentation and tannins bioactivity

- of some browses using a semi-automated gas production technique. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12: 1 – 10.
- Santra, A., Saikia, A., Baruah, K.K. 2012. Scope of rumen manipulation using medicinal plants to mitigate methane production. *Journal of Pharmacognosy*. 3(2):115-120.
- Schultze-kraft, R. 1979. Colección de germoplasma en el campo. Manual para la colección, preservación y caracterización de recursos forrajeros tropicales. CIAT. Cali-Colombia. pp 9-14.
- Shenkute, B., Hassen, A., Assafa, T., Amen, N., Ebro, A. 2012. Identification and nutritive value of potential fodder trees and shrubs in the mid rift valley of Ethiopia. *The Journal of Animal & Plant Sciences*. 22(4): 1126-1132.
- Soltan, Y.A., Morsy, A.S., Sallam, S.M.A., Louvandini, H., Abdalla, A.L. 2012. Comparative *in vitro* evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 21: 753–766.
- Tadesse, G. 2014. Rumen Manipulation for Enhanced Feed Utilization and Improved Productivity Performance of Ruminants: A review. *Momona Ethiopian Journal of Science*. Volume 6(2):3-17.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 48. 185-197.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3583 – 3597.
- Vélez, O.M., Campos, R., Sánchez, H. 2014. Uso de metabolitos secundarios de las Plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 17: 489 – 499.

*Submitted September 18, 2015 - Accepted November 24, 2015*