

Potencial antimetanogénico de recursos forrajeros y subproductos agroindustriales a través de la técnica in vitro de producción de gas

D M Ortiz, S L Posada y R R Noguera

Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias - Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias - GRICA, AA 1226, Medellín, Colombia.

sandra.posada@udea.edu.co

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de niveles crecientes de matarratón (MAT, *Gliricidia sepium*), pulpa de café (PC, *Coffea arabica*), orujo de uva (OU, *Vitis vinifera*) y semilla de algodón (SA, *Gossypium sp.*), en mezcla con forraje, sobre la degradación de la materia seca y la producción de metano (CH_4) a través de la técnica *in vitro* de producción de gases. Para la incubación se utilizó heno de pasto Pangola (*Digitaria decumbens*) (HP) que se mezcló con 5, 15 y 25% de recursos forrajeros o agroindustriales (porcentaje de la materia seca incubada). A las 18 y 30 horas de incubación se determinó la degradación de la materia seca (DMS), de la fibra detergente neutra (DFDN), la producción de gas (P_{gas}) y de metano (P_{CH_4}). La concentración de proteína aumentó y la de carbohidratos estructurales disminuyó con la introducción de los recursos. Mayores niveles de inclusión (25 vs. 5%) de MAT y PC aumentaron la DMS. La DFDN aumentó con niveles crecientes de MAT y SA, pero disminuyó con la introducción de OU. La P_{gas} y la $P_{\text{CH}_4}/\text{g FDN degradada (FDN}_d)$ fue inferior para la mezcla incluyendo SA al 25%. La P_{CH_4} representó el 2.0-3.4% de la energía incubada. De los sustratos evaluados, los efectos más positivos en las variables analizadas en el presente estudio (DMS, DFDN, P_{CH_4}) se asociaron con la introducción de SA y MAT en los mayores niveles de inclusión (15 y 25%). El OU se muestra como el recurso con menor potencial antimetanogénico, consecuencia de su menor degradabilidad.

Palabras clave: *digestibilidad, Gliricidia sepium, metano, taninos, subproducto agroindustrial*

Anti-methanogenic potential of forage resources and agro-industrial by-products using in vitro gas production technique

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of increasing levels of matarratón (MAT, *Gliricidia sepium*), coffee pulp (CP, *Coffea arabica*), grape pomace (GP, *Vitis vinifera*) and cottonseed (CS, *Gossypium sp.*), mixed with forage, on dry matter degradation and methane (CH_4) production using the in vitro gas production technique. Pangola hay (*Digitaria decumbens*) (PH) was mixed with 5, 15 and 25% forage resources or agro-industrial by-products (percent of incubated dry matter). Dry matter

degradation (DMD), neutral detergent fiber degradation (NDFD), gas (P_{gas}) and methane production (P_{CH_4}) was determined at 18 and 30 hours of incubation. Protein concentration increased and structural carbohydrates decreased with the introduction of these resources. Higher levels (25 vs. 5%) of MAT and CP increased DMD. The NDFD increased with increasing levels of MAT and CS, but decreased with GP inclusion. The P_{gas} and P_{CH_4}/g degraded NDF (NDF_d) was lower for the 25% CS mixture. The P_{CH_4} accounted for 2.0-3.4% of the incubated energy. The most positive effects on the variables analyzed (DMD, NDFD, P_{CH_4}) were associated with the highets inclusion of CS and MAT (15 and 25%). The GP showed the lowest anti methanogenic potential, due to lower degradability.

Key words: agro-industrial by-product, digestibility, *Gliricidia sepium*, methane, tannins

Introducción

Actualmente existe gran interés por disminuir la emisión de gases de efecto invernadero, entre ellos el metano (CH_4), debido al impacto ambiental negativo y al desbalance energético que genera en los rumiantes (Ramírez et al 2014). De acuerdo con Johnson y Johnson (1995), la emisión de CH_4 , producto de la fermentación entérica, puede fluctuar entre 2 y 12% de la energía bruta consumida. Estrategias de alimentación tendientes a reducir la metanogénesis repercuten positivamente en la productividad animal y en la competitividad ambiental del sector ganadero.

Las condiciones tropicales en que se encuentra Colombia le permiten disponer de recursos forrajeros y agroindustriales que pueden participar en programas de suplementación estratégica en la alimentación de rumiantes. Entre los recursos evaluados en este trabajo se tiene el matarratón (*Gliricidia sepium*), leguminosa con alto potencial productivo y contenido de proteína (Cuervo et al 2013); la pulpa de café (*Coffea arabica*), principal subproducto fibroso resultante del beneficio húmedo del grano de café (Molina et al 1990; Noriega et al 2008); orujo de uva (*Vitis vinifera*), subproducto caracterizado por el aporte de grasa y azúcares (Rondeau et al 2013) derivado de la fabricación del vino y semilla de algodón (*Gossypium sp.*), fuente de energía y proteína (Grainger et al 2010) resultante del desmotado de la cosecha.

Los metabolitos secundarios de las plantas tienen potencial para reducir la metanogénesis (Ortiz et al 2014). El efecto de los taninos es atribuido a la reducción en la producción de iones hidrógeno (H_2), consecuencia de la menor digestibilidad de la fibra, y a la inhibición de bacterias metanogénicas y protozoos (Tavendale et al 2005; Cieslak et al 2012). En la literatura se reportan contenidos de taninos de 2.23% para el matarratón (Juma et al 2006), entre 1.8 y 8.56% para la pulpa de café (Noriega et al 2008) y de 5.23% para el orujo de uva (Besharati y Taghizadeh 2009). La adición de aceites a la dieta también representa un efectivo medio para reducir las emisiones de CH_4 en rumiantes, efecto explicado por la captación de iones H_2 (biohidrogenación de ácidos grasos insaturados), la disminución en el aporte de sustrato fermentable y, el incremento en la proporción de propionato a expensas de acetato o butirato (Ramírez et al 2014; Ramin y Huhtanen 2013). El orujo de uva, además de su contenido de taninos, tiene una alta cantidad de grasa insaturada (84.5% de la grasa total, que fluctúa entre 3-6%), características que pueden reducir las emisiones de CH_4 hasta en un 20% (Moate et al 2014). Finalmente, la semilla de algodón contiene alrededor de 12% de aceite y en trabajo conducido por Grainger et al (2008) redujo las emisiones de CH_4 un 12%.

Por otra parte, los taninos y las grasas pueden afectar negativamente la digestión de la dieta. Los taninos se unen a proteínas y polisacáridos estructurales retrasando su tasa de digestión e interfiriendo con la actividad de las enzimas microbianas (McSweeney et al 2001). Las grasas, en nivel superior al 5% de la materia seca consumida, interfieren con la fermentación ruminal, si bien este efecto es variable dependiendo del contenido de fibra de la dieta (Bateman y Jenkins 1998). Con base en estos conceptos, es patente la necesidad de evaluar el nivel óptimo de inclusión de recursos forrajeros y agroindustriales (conteniendo taninos y ácidos grasos insaturados) en la dieta de los rumiantes, que genere reducción de la metanogénesis sin causar efectos adversos sobre la digestibilidad de la materia seca. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de niveles crecientes de matarratón (*Gliricidia sepium*), pulpa de café (*Coffea arabica*), orujo de uva (*Vitis vinifera*) y semilla de algodón (*Gossypium sp.*), en mezcla con forraje, sobre la degradación de la materia seca y la producción de CH₄ a través de la técnica *in vitro* de producción de gases.

Materiales y Métodos

Localización

El experimento se desarrolló en el Laboratorio de Investigación en Nutrición y Alimentación Animal (NUTRILAB), localizado en la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Sustratos incubados y tratamientos experimentales

Se utilizó como sustrato base para la incubación, heno de pasto pangola (HP) (*Digitaria decumbens*), el cual se mezcló con niveles crecientes de matarratón (MAT) (*Gliricidia sepium*), pulpa de café (PC) (*Coffea arabica*), orujo de uva (OU) (*Vitis vinifera*) y semilla de algodón (SA) (*Gossypium sp.*). Estos alimentos representaron el 5, 15 y 25% del peso total incubado. En total se evaluaron 12 tratamientos experimentales, resultantes de la combinación de los factores sustrato (cuatro recursos forrajeros o agroindustriales) y nivel de inclusión (tres niveles previamente descritos).

Las muestras húmedas, correspondientes a MAT, PC y OU fueron presecadas en estufa de ventilación forzada (Dies, PJ Tech s.a.s., Colombia) a 65°C por 48 horas. Todos los sustratos secos se molieron a 1 mm en molino estacionario Thomas-Wiley modelo 4 (Arthur H. Thomas Company, Philadelphia) para su análisis químico e incorporación en la técnica *in vitro* de producción de gas. El análisis químico incluyó determinación de materia seca (MS), proteína bruta (PB), extracto etéreo (EE), cenizas (MI) (AOAC 2011), fibra detergente neutra (FDN) (Van Soest et al 1991), fibra detergente ácida (FDA) (Raffrenato y Van Amburgh 2011), lignina detergente ácida (LDA) (Van Soest 1963) y energía bruta (EB), cuantificada en bomba calorimétrica adiabática (IKA C5000, Rhys International, Ltd., United Kingdom). Los carbohidratos totales (CHO_t) fueron obtenidos por la ecuación $CHO_t = 100 - (\%PB + \%EE + \%MI)$, y los carbohidratos no estructurales (CNE) por la diferencia $CHO_t - FDN$. Los taninos (TN), expresados como porcentaje de ácido tánico, fueron cuantificados en el OU, la PC y el MAT de acuerdo con la metodología propuesta por Makkar (2003) (Tabla 1).

Tabla 1. Composición química de los sustratos evaluados.

Nutriente ¹	Heno de pangola	Orujo de uva	Pulpa de Café	Semilla de algodón	Matarratón
MS	89.1	95.3	93.6	90.6	90.6
PB	4.5	13.0	10.6	20.6	27.1
MI	7.3	5.8	8.3	4.6	9.8
EE	1.7	6.4	1.5	19.0	3.3
FDN	70.5	48.1	34.7	47.4	36.6
FDA	41.2	43.9	27.3	35.2	22.5
LDA	8.0	21.6	12.0	10.2	13.0
CHO _t	86.6	74.8	79.5	55.8	59.9
CNE	16.1	26.8	44.8	8.4	23.3
EB, Mcal/kg	4.19	4.90	4.26	6.02	4.76
TN, %	-	3.11	3.26	-	0.25

¹ Valores expresados en base seca; MS = Materia seca; PB = Proteína bruta; MI = Cenizas; EE = Extracto etéreo; FDN = Fibra detergente neutra; FDA = Fibra detergente ácida; LDA = Lignina detergente ácida; CHO_t = Carbohidratos totales; CNE = Carbohidratos no estructurales (%); EB = Energía bruta (Mcal/kg); TN = Taninos (% de ácido tánico).

Técnica in vitro de producción de gases

Sustratos incubados e inóculo ruminal.

Para la técnica de producción de gases se siguió la metodología descrita por Posada et al (2014), con la inclusión de bolsas conteniendo el sustrato como única variante. Para ello, en los frascos de vidrio con capacidad de 100 ml, se dispuso una bolsa elaborada en TNT (tejido no tejido: fibra de origen sintético) de 4x4 cm, que a su vez contenía 0.5 g de sustrato, de acuerdo con la participación porcentual de los alimentos en cada uno de los tratamientos. Las bolsas fueron herméticamente selladas al calor para evitar la salida del sustrato durante la incubación. Bolsas blanco que no contenían sustrato también se incubaron para corregir por la MS residual adherida a ellas, producto de su contacto con el inóculo.

El líquido ruminal bovino se obtuvo de tres vacas Holstein ubicadas en la Hacienda La Montaña, propiedad de la Universidad de Antioquia. Diez (10) días antes de la extracción del inóculo, los animales fueron alimentados con HP. El inóculo se colectó manualmente y se transportó hasta el laboratorio en garrafas térmicas previamente acondicionadas con agua a 40° C.

Producción de gas y de metano, degradación in vitro y perfil de fermentación.

La producción total de gas (P_{gas}) fue medida a través de un transductor de presión (Ashcroft 2089QG - Precision Digital Test Gauges, USA) a las 18 y 30 h de incubación. El valor obtenido en unidades de presión (psi) fue transformado a volumen (ml) mediante el empleo de la ecuación $Y = -0.1833 + 5.2098X + 0.0598X^2$ (Posada et al 2006). El gas generado en los intervalos 0-18 horas y 18-30 horas se almacenó en bolsas plásticas con sellado hermético para su posterior análisis de CH₄ por cromatografía gaseosa. Los procedimientos relacionados con la colecta de gas, el análisis cromatográfico y el procesamiento de los resultados fueron descritos por Posada et al (2014). La producción de CH₄ (P_{CH₄}, ml) fue calculada a partir del volumen total de gas (ml) y la concentración de CH₄ en cada uno de los intervalos evaluados.

Para determinar la degradación de la MS (DMS), los bolsos se substrajeron de los frascos de incubación en los mismos horarios en que se registró la producción de gas, se secaron a 65°C por 48 horas en estufa de ventilación forzada (DiEs, PJ Tech s.a.s., Colombia) y posteriormente se pesaron en balanza analítica (Precisa Gravimetrics AG, Switzerland). La MS degradada (MS_d) se calculó por diferencia entre la MS incubada (MS_i) y la MS residual, previa substracción del peso de la bolsa TNT seca y limpia y de la MS resultante del contacto con el inóculo en las bolsas blanco. Los resultados se expresaron en mg $MS_d/g MS_i$. En la MS residual se determinó el porcentaje de FDN y la degradación de este nutriente (DFDN) se obtuvo por diferencia entre la FDN incubada (FDN_i) y la FDN residual. Los resultados se expresaron en mg FDN degradada (FDN_d)/g FDN_i . La energía digestible incubada (ED_i) se obtuvo del producto entre la energía bruta incubada (EB_i) y la DMS. La producción de gas y de CH_4 fue expresada por gramo de MS_d y FDN_d . La producción de CH_4 también fue expresada como porcentaje de la EB_i y la ED_i , asignando al CH_4 un valor calórico de 9.45 kcal/L (Nkrumah et al 2006).

Para la determinación de ácidos grasos volátiles (AGV's), el líquido ruminal de cada frasco de incubación fue acidificado (con ácido sulfúrico 98% v/v hasta alcanzar un pH próximo a 2), centrifugado e inyectado en un cromatógrafo de gases (Thermo Trace GC Ultra, Thermo Scientific, USA). Las condiciones cromatográficas fueron descritas por Ramírez et al (2015). La concentración de AGV's (mmol/L) fue calculada a partir de la concentración (ppm) determinada por cromatografía y asumiendo una masa molar de 60.05, 74.08 y 88.11 g/mol para el ácido acético, propiónico y butírico, respectivamente. Este valor se extrapoló a un volumen de 50 ml (volumen incubado) y se relacionó con la MS_d , para obtener la producción de AGV/g MS_d .

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de medidas repetidas en el tiempo con arreglo factorial 4x3, empleando el procedimiento PROC MIXED de SAS (SAS 2015). Los efectos fijos correspondieron al sustrato (α_i), el nivel de inclusión (β_j) y el tiempo (τ_k); el inóculo fue considerado el efecto aleatorio (γ_{ijl}). El modelo general fue $Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \tau_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\tau)_{ik} + (\beta\tau)_{jk} + (\alpha\beta\tau)_{ijk} + \gamma_{ijl} + e_{ijkl}$. La prueba Tukey se empleó para realizar la comparación de medias, empleando un nivel de significancia del 5%.

Resultados

En la Tabla 2 se muestra la composición química de las diferentes mezclas HP (Digitaria decumbens)/recurso forrajero o agroindustrial. Al interior de cada recurso, mayores niveles de inclusión se asociaron con aumento del porcentaje de PB y de TN y, reducción del contenido de FDN y, en menor medida, de la FDA. El EE aumentó con niveles crecientes de OU y especialmente de SA. La composición química de la mezcla con diversos recursos a un mismo nivel de inclusión se hace más variable con reducción en la participación del HP.

Tabla 2. Composición química# de los tratamientos evaluados.

Sustrato	NI	PB	MI	EE	FDN	FDA	LDA	CHO _t	CNE	EB	TN
SA	5	5.3	7.1	2.5	69.3	40.9	8.1	85.1	15.8	4.28	-
	15	6.9	6.9	4.3	67.0	40.3	8.3	81.9	14.9	4.46	-
	25	8.5	6.6	6.0	64.7	39.7	8.6	78.9	14.2	4.65	-
MAT	5	5.6	7.4	1.7	68.8	40.3	8.3	85.3	16.5	4.22	0.01
	15	7.9	7.7	1.9	65.4	38.4	8.8	82.6	17.2	4.27	0.04
	25	10.1	7.9	2.1	61.9	36.5	9.3	79.9	17.9	4.33	0.06
OU	5	4.9	7.2	1.9	69.3	41.3	8.7	86.0	16.7	4.22	0.16
	15	5.8	7.1	2.4	67.1	41.6	10.0	84.8	17.7	4.29	0.47
	25	6.6	6.9	2.8	64.9	41.9	11.4	83.7	18.8	4.37	0.78
PC	5	4.8	7.3	1.6	68.7	40.5	8.2	86.3	17.6	4.19	0.16
	15	5.4	7.4	1.6	65.1	39.1	8.6	85.5	20.4	4.19	0.49
	25	6.0	7.5	1.6	61.5	37.7	9.0	84.8	23.3	4.20	0.82

SA= Semilla de algodón (*Gossypium sp.*); MAT= Matarratón (*Gliricidia sepium*); OU= Orujo de uva (*Vitis vinifera*); PC= Pulpa de café (*Coffea arabica*). NI = Nivel de inclusión, como porcentaje del peso incubado.

#Valores expresados en base seca

PB= Proteína bruta; MI= Cenizas; EE= Extracto etéreo; FDN= Fibra detergente neutra; FDA= Fibra detergente ácida; LDA= Lignina detergente ácida; CHO_t= Carbohidratos totales; CNE= Carbohidratos no estructurales (%); EB= Energía bruta (Mcal/kg); TN= Taninos (% de ácido tánico)

En la Tabla 3 se presenta la DMS y la DFDN de los tratamientos experimentales. A las 18 y 30 horas de incubación, la mezcla con 5% de inclusión de MAT y PC presentó menor DMS respecto a su introducción al 25% ($p < 0.05$). La comparación de los recursos al mismo nivel de inclusión también permitió evidenciar diferencias en la DMS, en todos los casos con el OU registrando los menores valores ($p < 0.05$). La variable DFDN sólo fue significativa ($p < 0.05$) entre diferentes niveles de OU, SA, y MAT. Para la SA y el MAT, la DFDN estuvo directamente relacionada con el nivel de inclusión, caso contrario con el OU, donde la mayor participación del recurso redujo la DFDN. Comparando los diversos recursos a un mismo nivel de inclusión, se observó mayor DFDN para la SA y menor para el OU y PC ($p < 0.05$).

Tabla 3. Degradación de la materia seca (DMS) y de la fibra detergente neutra (DFDN) de la mezcla forraje/recurso arbóreo o agroindustrial.

#	DMS (mg MS _d /g MS _i)					DFDN (mg FDN _d /g FDN _i)				
	18		30			18		30		
	Media±DE		Media±DE			Media±DE		Media±DE		
SA	5	151± 23.3		202± 6.3		115± 5.2	b	144± 9.1		c
	15	164± 4.4	AB	215± 3.7	A	147± 1.7	abA	190± 28.7		bA
	25	173± 12.6	AB	216± 10.7	BC	161± 6.2	aA	235± 18.8		aA
MAT	5	148± 15.0	b	191± 2.8	c	103± 5.0		130± 8.4		b
	15	199± 5.6	aA	243± 13.8	bA	104± 20.8	AB	178± 6.2		abA
	25	202± 13.4	aA	285± 19.0	aA	114± 10.0	B	217± 25.1		aA
OU	5	147± 18.2		169± 2.3		92.4 ± 11.4	a	108± 5.7		
	15	155± 22.1	B	175 ± 7.0	B	80.7 ± 7.5	abB	89.3 ± 21.2		B
	25	150± 20.6	B	181 ± 3.2	C	46.4 ± 9.9	bC	71.7 ± 3.6		B
PC	5	160± 9.4	b	194± 8.9	b	116± 12.3		140± 1.7		
	15	189± 27.2	abAB	218± 17.0	abA	91.3 ± 10.8	B	115± 11.6		B
	25	205± 28.6	aA	241± 8.1	aB	83.1 ± 14.3	BC	110± 16.0		B

a, b, c Medias sin letra común en la columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$) dentro del mismo sustrato a diferentes niveles de inclusión

A, B, C Medias sin letra común en la columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$) entre sustratos al mismo nivel de inclusión

SA= Semilla de algodón (*Gossypium sp.*); MAT= Matarratón (*Gliricidia sepium*); OU= Orujo de uva (*Vitis vinifera*); PC= Pulpa de café (*Coffea arabica*).

= Nivel de inclusión, como porcentaje del peso incubado.

En las Tablas 4 y 5 se muestra la P_{gas} y la P_{CH_4} expresadas con base en la MS_d y la FDN_d . A las 18 h de incubación, solamente se registró diferencia estadística ($p < 0.05$) en la P_{gas} , expresada con base en la FDN_d , para los mezclas incluyendo OU y PC. Los valores correspondientes al 25% de inclusión fueron superiores al 5%. En el mismo horario, la P_{CH_4} , expresada con base en la FDN_d , fue superior para la mezcla incluyendo OU al 25%. Comparando los diferentes recursos a un mismo nivel de inclusión, la P_{gas} y la P_{CH_4} por gramo de FDN_d fue superior para el OU, la PC y el MAT al 25% de inclusión respecto el valor obtenido para la SA ($p < 0.05$).

Tabla 4. Producción de gas (P_{gas}), con base en la degradación de la materia seca y la fibra detergente neutra, de la mezcla forraje/recurso arbóreo o agroindustrial.

	#	P_{gas} (ml/g MS_d)		P_{gas} (ml/g FDN_d)			
		18	30	18	30		
		Media±DE	Media±DE	Media±DE	Media±DE		
SA	5	217± 25.7	297± 19.9	409± 28.6		605± 70.2	
	15	225± 10.9	318± 29.2	407± 70.9		571± 170	
	25	192± 12.9	284± 23.6	318± 12.3	B	405± 44.9	B
MAT	5	234± 32.7	340± 1.2	490± 55.5		726± 58.5	
	15	219± 2.6	335± 10.7	639± 114		732± 106	
	25	245± 11.9	336± 5.8	700± 53.0	A	717± 44.0	A
OU	5	202± 25.4	325± 26.8	468± 88.7	b	721± 105	
	15	182± 20.5	311± 29.2	521± 49.6	b	820± 102	
	25	196± 18.5	318± 91.3	1021± 298	aA	1044± 272	A
PC	5	194± 11.2	316± 23.6	392± 38.9	b	638± 33.8	
	15	189± 38.9	297± 23.4	597± 97.6	ab	852± 70.2	
	25	197± 21.9	306± 7.5	805± 165	aA	952± 321	A

a, b Medias sin letra común en la columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$) dentro del mismo sustrato a diferentes niveles de inclusión

A, B Medias sin letra común en la columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$) entre sustratos al mismo nivel de inclusión

SA= Semilla de algodón (*Gossypium sp.*); MAT= Matarratón (*Gliricidia sepium*); OU= Orujo de uva (*Vitis vinifera*); PC= Pulpa de café (*Coffea arabica*).

Nivel de inclusión, como porcentaje del peso incubado

Tabla 5. Producción de metano (P_{CH_4}), con base en la degradación de la materia seca y la fibra detergente neutra, de la mezcla forraje/recurso arbóreo o agroindustrial.

	#	P_{CH_4} (ml/g MS _d)		P_{CH_4} (ml/g FDN _d)		
		18	30	18	30	
		Media±DE	Media±DE	Media±DE	Media±DE	
SA	5	35.8 ± 2.4	48.0 ± 5.2	67.8 ± .6	97.6 ± 11.7	
	15	37.2 ± 4.0	49.8 ± 9.2	66.3 ± 1.4	86.9 ± 10.5	
	25	29.1 ± 6.7	45.2 ± 5.9	47.9 ± 9.9	64.5 ± 9.2	B
MAT	5	46.2 ± 12.9	61.6 ± 14.7	96.3 ± 24.6	131 ± 25.5	
	15	39.6 ± 10.3	61.1 ± 17.7	105 ± 43.6	132 ± 35.7	
	25	50.4 ± 2.8	54.7 ± 7.9	124 ± 29.5	116 ± 16.3	A
OU	5	32.2 ± 4.5	55.8 ± 12.6	74.3 ± 13.9	110 ± 5.7	b
	15	31.0 ± 7.1	53.7 ± 1.9	87.5 ± 10.9	142 ± 15.4	b
	25	30.9 ± 3.7	55.6 ± 4.5	159 ± 42.8	178 ± 92.8	aA
PC	5	31.0 ± 3.7	48.3 ± 14.8	68.1 ± 13.8	110 ± 14.8	
	15	36.5 ± 10.6	50.9 ± 10.7	115 ± 26.9	135 ± 15.7	
	25	29.7 ± 7.6	52.7 ± 13.8	118 ± 4.4	154 ± 19.9	A

a, b Medias sin letra común en la columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$) dentro del mismo sustrato a diferentes niveles de inclusión

A, B Medias sin letra común en la columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$) entre sustratos al mismo nivel de inclusión

SA= Semilla de algodón (*Gossypium sp.*); MAT= Matarratón (*Gliricidia sepium*); OU= Orujo de uva (*Vitis vinifera*); PC= Pulpa de café (*Coffea arabica*).

Nivel de inclusión, como porcentaje del peso incubado.

Cuando la P_{CH_4} se expresó como porcentaje de la energía incubada (Tabla 6), sólo se obtuvo diferencias al comparar los diferentes recursos a un mismo nivel de inclusión. Al 15 y 25% de inclusión, la EB perdida en forma de CH_4 fue superior para MAT vs. OU ($p < 0.05$). La SA al 25% también registró un menor valor respecto MAT ($p < 0.05$).

Las diferencias en AGV's (Tabla 7) al interior de un mismo sustrato sólo se registraron para el acetato y el propionato ($p < 0.05$), con una tendencia a disminuir, aunque no muy bien definida. Al comparar los diferentes recursos a un mismo nivel de inclusión, la producción de acetato y propionato fue inferior al 5% de OU ($p < 0.05$). Diferencias en la relación acetato/propionato sólo se registraron entre OU y PC al 15% ($p < 0.05$) a las 18 h de incubación.

Tabla 6. Producción de metano (P_{CH_4}), con base en la energía bruta y digestible incubada (EB_i , ED_i), de la mezcla forraje/recurso arbóreo o agroindustrial.

	#	P_{CH_4} (% EB_i)			P_{CH_4} (% ED_i)		
		18		30	18		30
		Media±DE		Media±DE	Media±DE		Media±DE
SA	5	1.2 ± 0.11	2.1 ± 0.17		7.9 ± 0.52	10.6 ± 1.16	
	15	1.3 ± 0.13	2.3 ± 0.39	AB	7.9 ± 0.84	10.5 ± 1.95	
	25	1.0 ± 0.21	2.0 ± 0.27	B	5.9 ± 1.37	9.2 ± 1.20	
MAT	5	1.5 ± 0.32	2.6 ± 0.59		10.4 ± 2.91	13.8 ± 3.28	
	15	1.7 ± 0.47	3.3 ± 0.85	A	8.7 ± 2.28	13.5 ± 3.91	
	25	1.9 ± 0.59	3.4 ± 0.56	A	11.0 ± 0.61	11.9 ± 1.72	
OU	5	1.0 ± 0.06	2.1 ± 0.50		7.2 ± 1.01	12.5 ± 2.82	
	15	1.0 ± 0.12	2.1 ± 0.15	B	6.8 ± 1.57	11.6 ± 0.14	
	25	1.0 ± 0.09	2.2 ± 0.18	B	6.7 ± 0.80	12.8 ± 0.64	
PC	5	1.1 ± 0.12	2.4 ± 0.33		7.0 ± 0.84	10.9 ± 3.34	
	15	1.5 ± 0.38	2.5 ± 0.63	AB	8.2 ± 2.39	11.5 ± 2.41	
	25	1.3 ± 0.25	2.8 ± 0.71	AB	6.7 ± 1.70	11.8 ± 3.11	

a, b Medias sin letra común en la columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$) dentro del mismo sustrato a diferentes niveles de inclusión

A, B Medias sin letra común en la columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$) entre sustratos al mismo nivel de inclusión

SA= Semilla de algodón (*Gossypium sp.*); MAT= Matarratón (*Gliricidia sepium*); OU= Orujo de uva (*Vitis vinifera*); PC= Pulpa de café (*Coffea arabica*).

Nivel de inclusión, como porcentaje del peso incubado.

Tabla 7. Producción de ácidos grasos volátiles de la mezcla forraje/recurso arbóreo o agroindustrial.

	#	Acético		Propiónico		Butírico		Acético/Propiónico						
		18	30	18	30	18	30	18	30					
		Media ± DE		Media ± DE		Media ± DE		Media ± DE		Media ± DE				
SA	5	83.2±15.4	a	59.2±14.3	AB	19.3±2.8	aA	9.4±2.1	AB	9.1±2.3	6.5±1.7	5.4±1.4	5.5±0.6	
	15	42.6±1.5	b	54.8±8.0		5.7±0.6	b	11.6±2.4		5.9±1.0	5.8±0.5	6.9±1.1	4.8±0.3	
	25	57.3±6.2	ab	54.0±12.7		10.5±2.6	b	9.0±2.1		6.5±1.2	5.7±1.1	5.6±0.9	5.3±0.1	
MAT	5	78.6±16.7		78.4±11.8	aA	14.4±3.9	AB	16.3±2.4	A	8.3±1.2	6.4±1.9	5.5±0.3	4.9±0.0	
	15	52.2±12.8		46.4±10.0	ab	6.8±2.1		8.9±3.2		5.6±1.1	5.5±1.3	6.5±0.7	AB	5.3±0.8
	25	52.6±7.6		43.2±9.2	b	8.7±2.2		7.9±1.6		5.5±0.5	4.7±1.2	6.2±0.8	4.9±0.6	
OU	5	59.5±9.3		40.2±7.2	B	10.1±3.0	B	5.6±1.0	B	7.3±1.1	5.5±0.3	6.0±0.8	7.2±0.0	
	15	48.5±7.8		41.5±5.8		6.5±0.9		6.5±0.3		5.5±0.3	6.0±1.5	9.2±1.9	A	6.3±0.6
	25	49.7±14.8		63.1±4.9		6.5±3.1		11.7±1.0		9.2±2.3	7.7±0.5	7.0±1.8	5.4±0.1	
PC	5	84.0±14.8		61.4±0.8	AB	17.5±1.3	aAB	13.5±0.3	AB	9.3±0.8	7.1±0.1	4.8±0.5	4.6±0.1	
	15	57.7±5.1		51.0±8.0		9.6±1.6	b	9.9±2.1		6.1±0.7	5.8±0.4	6.1±1.0	B	5.2±0.4
	25	61.9±3.9		46.1±4.4		12.2±2.8	ab	9.2±1.0		6.3±0.6	5.2±0.3	5.2±0.8	5.1±0.2	

a, b Medias sin letra común en la columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$) dentro del mismo sustrato a diferentes niveles de inclusión

A, B Medias sin letra común en la columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$) entre sustratos al mismo nivel de inclusión

*SA= Semilla de algodón (*Gossypium sp.*); MAT= Matarratón (*Gliricidia sepium*); OU= Orujo de uva (*Vitis vinifera*); PC= Pulpa de café (*Coffea arabica*).*

Nivel de inclusión, como porcentaje del peso incubado.

Discusión

Degradación de la materia seca y la fibra detergente neutra

La composición química del HP utilizado en el presente estudio (Tabla 1) fluctuó dentro de los valores reportados en otros estudios (Suksathit et al 2011; Tikam et al 2013). Sin embargo, el contenido de PB se encontró dentro de los valores más bajos, lo que puede deberse a la madurez de dicho sustrato (Archimède et al 2000). En la Tabla 2 se evidencia cambio en la concentración de nutrientes a medida que se incrementa el nivel de inclusión de recursos como MAT, SA, PC y OU, características que influyeron sobre la DMS y la DFDN por el efecto asociativo de las mezclas. En términos generales, aumentos en el nivel de inclusión de recursos forrajeros o agroindustriales incrementaron la concentración de PB, en especial para la mezclas con MAT y SA y, redujeron el contenido de FDN y FDA, principalmente en las mezclas con MAT y PC. Esta modificación en la densidad nutricional explica los mayores valores de DMS y DFDN con aumentos en el nivel de inclusión (Tabla 3). El incremento en la concentración de PB promueve el crecimiento de las bacterias celulolíticas y la tasa de digestión de la fracción fibrosa (Knorr et al 2005; Oliveira et al 2004). Los rumiantes tienen una exigencia mínima de 7% de PB en la dieta para promover una adecuada actividad fermentativa de los microorganismos ruminales (Minson 1990). La reducción en los constituyentes estructurales se suma a este efecto, toda vez que la FDN y la FDA se correlacionan negativamente con la digestibilidad (Barahona y Sánchez 2005).

El efecto asociativo positivo de las mezclas no fue observado con el OU, toda vez que la inclusión de este material afectó negativamente la DFDN (Tabla 3). A diferencia de las restantes mezclas, niveles crecientes de OU no se acompañaron de reducción en el contenido de FDA (Tabla 2). La concentración de FDA se relaciona negativamente con la digestibilidad y su efecto es más marcado respecto la FDN. Esto fue evidenciado en el trabajo de Jančík et al (2008), donde la DFDN se correlacionó más negativamente con la concentración de FDA que de FDN, -0.77 y -0.68, respectivamente. Otra plausible explicación hace referencia al contenido de TN en el OU (Tabla 1). Este metabolito secundario es capaz de ejercer un efecto inhibitorio sobre las poblaciones de bacterias, protozoos y hongos responsables de la actividad fibrolítica (Bodas et al 2012; Wang et al 2012). Los TN se unen a las proteínas y polisacáridos estructurales, interfiriendo con la actividad de las enzimas microbianas y, con ello, retrasando la tasa de digestión (McSweeney et al 2001). La inclusión de PC, a diferencia del OU, no generó diferencias estadísticamente significativas en la DFDN, pero sí una tendencia numérica a la disminución (Tabla 3). Este efecto también se explica por su contenido de TN (Tabla 1).

En general, se observa una DMS muy baja para todas las mezclas evaluadas (Tabla 3). Esto puede ser explicado por la incubación de los sustratos en las bolsas sintéticas. En este mismo trabajo, para probar el efecto de la bolsa, se evaluó la DMS del HP, incubado dentro de ella o directamente en el frasco de vidrio. A las 30 horas de incubación, la DMS promedio del HP incubado en la bolsa fue 18.9%, en tanto que el sustrato en contacto directo con el inóculo ruminal registró un valor medio de

26.3%. Si bien, la DMS aumenta, evidenciando un efecto de la bolsa, su valor continúa siendo bajo. Por esta razón, la baja DMS del presente trabajo es mejor explicada por la incubación de mezclas con alto contenido de FDN (entre 61.5 y 69.3%) y FDA (entre 37.7 y 41.9%) (Tabla 2), más que por el efecto de interferencia de la bolsa.

Las diferencias en la DMS y DFDN entre recursos forrajeros o agroindustriales a un mismo nivel de inclusión (Tabla 3) también se basan en su composición química. A las 18 y 30 horas, los mayores niveles de inclusión de OU registraron menor DMS en relación con las mezclas con MAT, que fueron las que más modificaron el perfil nutricional, en términos de aumento de PB y reducción de FDN (Tabla 2). La *Gliricidia sepium* es catalogada como una planta con bajo contenido de taninos y alto contenido de proteína (Apori et al 1998), características que favorecieron la DMS en este estudio. Con respecto a la DFDN, se destaca la superioridad para las mezclas con SA y en menor medida con MAT, en tanto que la participación de OU y PC al 15 y 25% originaron un efecto deletéreo (Tabla 3). Considerando que la participación porcentual del HP es la misma en todas las mezclas, las diferencias en la DFDN obedecen a diferencias en la cantidad y calidad de la FDN de los otros recursos incubados. La SA se caracteriza por presentar un alto contenido de FDN, entre 39.0 y 52.0% (Bertrand et al 2005), rango dentro del cual se encuentra el valor del ingrediente para el presente estudio (Tabla 1). Toda vez que el contenido de FDN de los restantes recursos es próximo (OU) o inferior (PC, MAT) al registrado por la SA, la superioridad en la DFDN para la mezcla incluyendo SA puede estar explicada por la presencia de línter (fibras cortas de algodón que permanecen adheridas a la semilla después de retirar las fibras largas) en este ingrediente, el cual corresponde a celulosa altamente degradable en rumen. En el caso del MAT, PC y OU, la mayor presencia de lignina en la pared celular puede explicar la menor DFDN. La literatura reporta contenidos de lignina del 10% para la SA (Bertrand et al 2005), entre 11.8 y 15.4% para MAT (Castillo y Villarreal 2002), 12.3% para la PC (Salinas et al 2014) y entre 20.2 y 26.7% para el OU (Baumgartel et al 2007), próximos a los registrados en este trabajo. Al superior contenido de lignina se suma la presencia de TN en la PC y el OU, con los efectos negativos sobre la digestibilidad, previamente discutidos. La PC adicionalmente contiene cafeína, compuesto que ejerce un efecto tóxico sobre las bacterias. Mazzafera (2002) afirma que una concentración del 0.1% inhibe de manera reversible la síntesis de proteínas en bacterias, lo cual podría afectar la degradabilidad.

Los datos de degradabilidad aquí reportados deben ser interpretados con precaución, toda vez que una característica de los estudios in vitro es que los materiales en evaluación se encuentran molidos, lo cual aumenta la digestibilidad respecto a las condiciones en que son consumidos por el animal. Los resultados de Bertrand et al (2005) reflejan esta situación. Trabajando en condiciones in vitro, los autores reportaron para la SA molida una DMS entre 56.1 y 60.8%, en tanto para las semillas enteras esta variable fluctuó entre 9.4 y 15.9%.

Producción de gas y de metano

En los experimentos in vitro la P_{gas} y la P_{CH_4} está directamente relacionada con la digestibilidad del sustrato y ésta a su vez con el perfil nutricional del sustrato incubado. En el presente estudio a las 18 horas, las mezclas con el mayor nivel de inclusión de OU registraron mayor P_{gas} y P_{CH_4} (por g FDN_d) (Tablas 4 y 5), lo cual obedece a la menor DFDN (Tabla 3), consecuencia del mayor contenido de TN y lignina. Ahora, la PC y el OU tienen una concentración de TN similar (Tabla 1), si bien, la PC no alcanzó a generar un efecto deletéreo sobre la DFDN como el OU. Esto puede explicarse por la menor

concentración de lignina en el recurso y porque las mezclas con el mayor nivel de inclusión de PC vs. OU presentaron una menor relación FDN/CNE (2.6/1 vs. 3.5/1).

Cuando se compararon las diferentes mezclas al mismo nivel de inclusión de recurso arbóreo o agroindustrial (25%), nuevamente la P_{gas} y la P_{CH_4} (por g FDN_d) (Tablas 4 y 5) fue superior para los recursos MAT, OU y PC, que mostraron menor DFDN respecto la SA (Tabla 3). De acuerdo con McGinn et al (2004), la P_{CH_4} obedece principalmente a la degradación de los carbohidratos presentes en los alimentos. Esto fue confirmado experimentalmente por Santos et al (2007), quienes encontraron una relación positiva entre la producción de CH₄ y la FDN digerida ($R^2=88.4\%$, $p<0.001$). Partiendo del concepto que la P_{CH_4} es, principalmente, una función de la cantidad de pared celular digerida, y que las mezclas que registraron mayor producción del gas por g de FDN_d (Tabla 4) fueron las que registraron menor DFDN (Tabla 3), es posible proponer que la mayor concentración de grasa en el tratamiento de 25% de inclusión de SA (6.0% vs. 2.2% en promedio para los restantes tratamientos) (Tabla 2) hubiese ayudado a reducir la P_{CH_4} , bien por la captación de iones H₂ (biohidrogenación de ácidos grasos insaturados) o por incrementar la proporción de propionato a expensas de acetato o butirato. Este último mecanismo no fue evidenciado a partir de los datos experimentales (Tabla 7).

El hecho de encontrar diferencias estadísticas en P_{gas} y P_{CH_4} por g FDN_d y no por g de MS_d (Tablas 4 y 5) resalta la importancia de analizar la DFDN en los estudios in vitro. Teniendo en cuenta consideraciones ambientales y de eficiencia microbiana, se espera una menor P_{gas} y P_{CH_4} por g de sustrato degradado. La eficiencia microbiana aumenta cuando una mayor proporción de la energía contenida en el sustrato degradado es fijada en las células y, por lo tanto, no se refleja en la producción de AGV y de CH₄ (Van Soest et al 1992). Desde este punto de vista, el tratamiento con inclusión de SA al 25% registró mayor eficiencia microbiana en la utilización del sustrato, respecto los tratamientos con MAT, OU y PC.

La P_{CH_4} expresada como porcentaje de la EB_i se encuentra próxima al límite inferior del rango descrito por Johnson y Johnson (1995), entre 2 a 12% (Tabla 6). Las únicas diferencias estadísticas encontradas (al 15 y 25% de inclusión, 30 horas de incubación) es consistente con la mayor DMS del MAT vs. el OU y SA en el mismo horario y niveles de inclusión (Tabla 3). La expresión como porcentaje de la ED_i (Tabla 6) estuvo dentro del rango sugerido por Van Soest (1994), entre 5 y 12%.

Desde el punto de vista fermentativo, la reducción en la emisión de CH₄ se asocia con aumento de la producción de ácido propiónico y disminución en la relación acetato:propionato (Williams et al 2011). La fermentación propiónica utiliza H₂ libres impidiendo la formación de CH₄, a diferencia de la fermentación acética y butírica que producen más H₂. Como se muestra en la Tabla 7, el perfil de fermentación no correspondió con los datos de P_{CH_4} , ya que la mezcla con SA al 25%, que fue la que generó menor CH₄/g FDN_d (Tabla 5), no registró los cambios mencionados. Igualmente, las diferencias estadísticas en el perfil de fermentación entre algunas mezclas incluyendo 5% de recurso forrajero o agroindustrial (Tabla 7) no se asociaron con la variable P_{CH_4} (Tabla 5), que fue estadísticamente igual ($p>0.05$) entre todos los tratamientos al mismo nivel de inclusión. La falta de diferencia estadística puede explicarse por la variabilidad asociada con la respuesta y, desde el punto de vista biológico, por la ausencia de diferencias contrastantes en la composición química del sustrato incubado (Tabla 1).

Conclusión

Los resultados encontrados permiten concluir que la inclusión de SA y en menor medida, de MAT (al 15 y 25%) mejora la DMS y la DFDN. Este efecto es explicado por el aumento en la concentración de PB, que genera un efecto asociativo positivo para la degradación de los carbohidratos fibrosos. La mezcla con SA adicionalmente aumenta la concentración de grasa, lo que finalmente se traduce en menor $P_{CH_4}/g\text{ FDN}_d$. El OU y, en menor extensión la PC, son los recursos con menor potencial antimetanogénico, consecuencia de su menor degradabilidad, bien por su mayor contenido de taninos y, en el caso del OU, por el superior contenido de lignina.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación-Colciencias- por el apoyo para el desarrollo de la propuesta de investigación “Efecto de la suplementación con arbóreas y subproductos agroindustriales sobre la eficiencia energética y la emisión de gases de efecto invernadero en ganado cebú” (código 1115-569-33853).

Bibliografía

Apori S O, Castro F B, Shand W J and Orskov E R 1998 Chemical composition in sacco degradation and in vitro gas production of some Ghanaian browse plants. *Animal Feed Science and Technology* 76: 129-137. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840198002053?np=y>

Archimède H, Boval M, Alexandre G, Xandé A, Aumont G and Poncet C 2000 Effect of regrowth age on intake and digestion of *Digitaria decumbens* consumed by Black-belly sheep. *Animal Feed Science and Technology* 87:153–162. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840100002078>

Arieli A 1998 Whole cottonseed in dairy cattle feeding: a review. *Animal Feed Science and Technology* 72: 97–110. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840197001697>

AOAC 2005 Official methods of analysis. 18th edition. Association of Analytical Chemist International. Arlington, VA.

Barahona R y Sánchez M 2005 Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. *Revista Corpoica* 6: 69-82. https://www.researchgate.net/publication/262166328_Limitaciones_fisicas_y_quimicas_de_la_digestibilidad_de_pastos_tropicales_y_estrategias_para_aumentarla

Bateman H G and Jenkins T C 1998 Influence of Soybean Oil in High Fiber Diets Fed to Non-lactating Cows on Ruminal Unsaturated Fatty Acids and Nutrient Digestibility. *Journal of Dairy Science* 81:2451–2458. [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(98\)70136-5/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(98)70136-5/pdf)

Baumgartel T, Kluth H, Epperlein K and Rodehutschord M 2007 A note on digestibility and energy value for sheep of different grape pomace. *Small Ruminant Research* 67: 302–306. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448805004694>

Bertrand J A, Sudduth T Q, Condon A, Jenkins T C and Calhoun M C 2005 Nutrient Content of Whole Cottonseed. *Journal of Dairy Science* 88:1470–1477. [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(05\)72815-0/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(05)72815-0/pdf)

Besharati M and Taghizadeh A 2009 Evaluation of dried grape by-product as a tanniferous tropical feedstuff. *Animal Feed Science and Technology* 152: 198–203. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840109001357>

Bodas R, Prieto N, García González R, Andrés S, Giráldez F J and López S 2012 Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology* 176: 78–93. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037784011200243X>

Castillo J L y Villarreal C A 2002 Evaluación de recursos alimenticios y simulación para la implementación del CNCPS en el trópico. Proyecto especial del Programa Ingeniero Agrónomo, El Zamorano, Honduras. <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2181/1/T1396.pdf>

Cieslak A, Zmora P, Pers-Kamczyc E and Szumacher-Strabel M 2012 Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation *in vivo*. *Animal Feed Science and Technology* 176: 102–106. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840112002453>

Cuervo Jiménez A, Narváez Solarte W y Hahn von-Hessberg C 2013 Características forrajeras de la especie *Gliricidia sepium* (Jacq.) Stend, Fabaceae. *Boletín Científico, Museo de historia natural* 17: 33–45. <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v17n1/v17n1a03.pdf>

Grainger C, Clarke T, Beauchemin K A, McGinn S M and Eckard R J 2008 Supplementation with whole cottonseed reduces methane emissions and increases milk production of dairy cows offered a forage and cereal grain diet. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48:73–76. https://www.researchgate.net/publication/248892081_Supplementation_with_whole_cottonseed_reduces_methane_emissions_and_can_profitably_increase_milk_production_of_dairy_cows_offered_a_forage_and_cereal_grain_diet

Grainger C, Williams R, Clarke T, Wright A D G and Eckard R J 2010 Supplementation with whole cottonseed causes long-term reduction of methane emissions from lactating dairy cows offered a forage and cereal grain diet. *Journal of Dairy Science* 93: 2612–2619. [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(10\)00265-1/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(10)00265-1/pdf)

Jančík F, Homolka P, Čermák B and Lád F 2008 Determination of indigestible neutral detergent fibre contents of grasses and its prediction from chemical composition. *Czech Journal of Animal Science* 53: 128–135. <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/00901.pdf>

Johnson K A and Johnson D E 1995 Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* 73:2483–2492. <https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/pdfs/73/8/2483>

Juma H K, Abdulrazak S A, Muinga R W and Ambula M K 2006 Evaluation of Clitoria, Gliricidia and Mucuna as nitrogen supplements to Napier grass basal diet in relation to the performance of lactating Jersey cows. *Livestock Science* 103: 23– 29. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141306000448>

Knorr M, Ospina H, Finkler A L, Frenzel P R, Mallmann G M e Medeiros F S 2005 Desempenho de novilhos suplementados com sais proteinados em pastagem nativa. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40: 783-788. <http://www.scielo.br/pdf/pab/v40n8/a08v40n8.pdf>

Makkar H P S 2003 Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage – A Laboratory Manual. Joint FAO/IAEA. Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. <http://www-naweb.iaea.org/nafa/aph/public/pubd31022manual-tannin.pdf>

Mazzafera P 2002 Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding: Review. Scientia Agricola 59: 815-821. <http://www.scielo.br/pdf/sa/v59n4/a30v59n4.pdf>

McGinn S M, Beauchemin K A, Coates T and Colombatto D 2004 Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. Journal of Animal Science 82:3346–3356. <https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/pdfs/82/11/0823346>

McSweeney C S, Palmer B, McNeill D M and Krause DO 2001 Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. Animal Feed Science and Technology 91:83-93. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840101002322>

Minson D J 1990 Forage in Ruminant Nutrition. Academic Press. New York.

Moate P J, Williams S R O, Torok V A, Hannah M C, Ribaux B E, Tavendale M H, Eckard R J, Jacobs J L, Auldish M J and Wales W J 2014 Grape marc reduces methane emissions when fed to dairy cows. Journal of Dairy Science 97: 5073–5087. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030214004305>

Molina M, Lechuga O R y Bressani R 1990 Valor nutritivo de la pulpa de café sometida a fermentación sólida usando *Aspergillus niger* en pollos y cerdos. Agronomía Mesoamericana 1: 79-82. http://www.mag.go.cr/rev_meso/v01n01_079.pdf

Nkrumah J D, Okine E K, Mathison G W, Schmid K, Li C, Basarab J A, Price M A, Wang Z and Moore S S 2006 Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. Journal of Animal Science 84:145-153. <https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/pdfs/84/1/145>

Noriega A, Silva R y García M 2008 Revisión Utilización de la pulpa de café en la alimentación animal. Zootecnia Tropical 26:411-419. <http://www.scielo.org.ve/pdf/zt/v26n4/art01.pdf>

Oliveira L O F, Saliba E O S, Rodríguez N M, Gonçalves L C, Borges I e Amaral T B 2004 Consumo e digestibilidad de de novillos Nelore sob pastagem suplementados com misturas múltiples. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 56: 61-68. <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v56n1/a10v56n1.pdf>

Ortiz D M, Posada S L y Noguera R R 2014 Efecto de metabolitos secundarios de las plantas sobre la emisión entérica de metano en rumiantes. Livestock Research for Rural Development 26(11) <http://www.lrrd.org/lrrd26/11/orti26211.html>

Posada S L, Noguera R R y Bolívar D M 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 19: 407-414. <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v19n4/v19n4a06.pdf>

Posada S L, Ramírez J J y Noguera R R 2014 Producción de metano y digestibilidad de mezclas kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) - papa (*Solanum tuberosum*). Agronomía Mesoamericana 25: 141-150. <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/14214/13513>

Raffrenato E and Van Amburgh M E 2011 Technical note: Improved methodology for analyses of acid detergent fiber and acid detergent lignin. Journal of Dairy Science 94:3613–3617. [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(11\)00358-4/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(11)00358-4/pdf)

Ramin M and Huhtanen P 2013 Development of equations for predicting methane emissions from ruminants. Journal of Dairy Science 96:2476–2493. [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(13\)00094-5/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(13)00094-5/pdf)

Ramírez J F, Posada S and Noguera R 2015 Effects of Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) age and different forage: concentrate ratios on methanogenesis. Revista MVZ Córdoba 20:4726-4738.<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69341382007>

Ramírez J F, Posada S y Noguera R 2014 Metanogénesis ruminal y estrategias para su mitigación. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia 9: 307-323.<http://www.scielo.org.co/pdf/cmvez/v9n2/v9n2a14.pdf>

Rondeau P, Gambier F, Jolibert F and Brosse N 2013 Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard. Industrial Crops and Products 43: 251–254.<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669012003998>

Salinas T, Sánchez T, Ortega M E, Soto M, Díaz A, Hernández J, Nava C and Vaquera H 2014 Changes in composition, antioxidant content, and antioxidant capacity of coffee pulp during the ensiling process. Revista Brasileira de Zootecnia 43: 492-498.<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v43n9/1516-3598-rbz-43-09-00492.pdf>

Santoso B, Mwenya B, Sar C and Takahashi J 2007 Methane Production and Energy Partition in Sheep Fed Timothy Silage-or Hay-based Diets. Indonesian Journal of Animal and Veterinary Science12: 27-33.<http://medpub.litbang.pertanian.go.id/index.php/jitv/article/view/561/570>

Statistical Analysis System – SAS 2015 SAS® University Edition. USA: SAS Institute Inc [acceso: 16 de octubre de 2015]. URL: http://www.sas.com/en_us/software/university-edition.html

Suksathit S, Wachirapakorn C and Opatpatanakit Y 2011 Effects of levels of ensiled pineapple waste and pangola hay fed as roughage sources on feed intake, nutrient digestibility and ruminal fermentation of Southern Thai native cattle. Songklanakarin Journal of Science and Technology 33: 281-289.<http://rdo.psu.ac.th/sjstweb/journal/33-3/0125-3395-33-3-281-289.pdf>

Tavendale M H, Meagher L P, Pacheco D, Walker N, Attwood G T and Sivakumaran S 2005 Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. Animal Feed Science and Technology 123-124: 403–419. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037784010500180X>

Tikam K, Phatsara C, Mikled C, Vearasilp T, Phunphiphat W, Chobtang J, Cherdthong A and Südekum K H 2013 Pangola grass as forage for ruminant animals: A review. Springer Plus 2:604-609.<http://link.springer.com/article/10.1186/2193-1801-2-604/fulltext.html>

Van Soest P J 1963 Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin. [Journal of the Association of Official Agricultural Chemists](http://www.cafcd.umn.edu/journal-of-the-association-of-official-agricultural-chemists) 46: 829-835.http://catalogo.latu.org.uy/doc_num.php?explnum_id=1479

Van Soest P J 1994 Nutritional ecology of the ruminant. 3rd ed. Cornell University Press Ithaca.

Van Soest P J, France J and Siddons R C 1992 On the steady-state turnover of compartments in the ruminant gastrointestinal tract. Journal of Theoretical Biology 159:135-145.

Van Soest P J, Robertson J B and 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.

Wang J K, Ye J and Liu J 2012 Effects of tea saponins on rumen microbiota, rumen fermentation, methane production and growth performance: A review. Tropical Animal Health and Production 44: 697-706.

Williams C M, Euna J S, MacAdamb J W, Younga A J, Fellnerc V and Min B R 2011 Effects of forage legumes containing condensed tannins on methane and ammonia production in continuous cultures of mixed ruminal microorganisms. *Animal Feed Science and Technology* 166–167: 364–372. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840111001441>

Received 12 February 2016; Accepted 16 March 2016; Published 1 May 2016