

Identificación del potencial antimetanogénico *in vitro* de plantas nativas de la sabana inundable adaptadas a condiciones de sequía en la Orinoquía Colombiana

O M Vélez, R R Noguera¹, S L Posada¹, R C Gaona y H S Guerrero

Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Facultad de Ciencias Agropecuarias
omvelezt@unal.edu.co

¹ Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias-GRICA

Resumen

La identificación y uso de los metabolitos secundarios de las plantas es un área de investigación con gran proyección para reducir la metanogénesis ruminal. Las plantas con propiedades antimetanogénicas se convierten en una alternativa de mitigación de metano entérico viable para países y regiones donde la actividad ganadera sea a base de pastoreo como es el caso de las sabanas inundables de la Orinoquía Colombiana. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue caracterizar el potencial antimetanogénico *in vitro* y la composición fitoquímica de plantas de la sabana inundable adaptadas a condiciones de sequía. A través de la técnica de producción de gases se evaluó la adición de cinco plantas (*A. peruviana*, *B. nemorosa*, *B. virgilioides*, *C. americana* y *S. multijuga*) a una dieta base (*Axonopus purpussi* 60% + *Paratheria prostrata* 40%) y su efecto sobre la producción de gas, metano y degradación de la materia seca a las 12, 24 y 48h.

Las plantas evaluadas no generaron cambios en la producción de metano a través del tiempo, pero incrementaron el volumen de producción de gas de la dieta. La especie *A. peruviana* aumentó la digestibilidad mientras que *B. virgilioides* promovió una mayor síntesis de proteína microbiana. Se encontró la presencia de alcaloides, esteroides y triterpenoides, flavonoides, saponinas y taninos en todas las plantas evaluadas, a excepción de *B. nemorosa* que no presentó saponinas. Se recomienda la realización de otros estudios para caracterizar el potencial antimetanogénico de las plantas evaluadas de manera individual, y cuantificar los metabolitos secundarios encontrados.

Palabras clave: época seca, forrajes nativos, metabolitos secundarios, metano

Identification of *in vitro* antimethanogenic potential of native plants from the floodable savanna adapted to dry conditions in the Colombian Orinoco

Summary

The identification and use of plants secondary metabolites is a research area with great projection for reducing ruminal methanogenesis. Plants with antimethanogenic properties becomes a feasible

mitigation alternative of enteric methane for countries and regions where livestock activity is based on grazing like the case of the floodable savannas in the Colombian Orinoco. Therefore, the aim of this study was to characterize the *in vitro* antimethanogenic potential and phytochemical composition of floodable savanna plants adapted to drought conditions. Using the gas production technique it was evaluated the addition of five plants (*A. peruviana*, *B. nemorosa*, *B. virgilioides*, *C. americana* y *S. multijuga*) to a basal diet (*Axonopus purpussi* 60% + *Paratheria prostrata* 40%) and their effects on gas production, methane and dry matter degradation at 12, 24 and 48h were recorded.

The evaluated plants did not produce changes in methane production across the time; however they increased the volume of gas production from the diet. The specie *A. peruviana* increased digestibility while *B. virgilioides* promoted greater microbial protein synthesis. It was found the presence of alkaloids, steroids and triterpenoids, flavonoids, saponins and tannins, in all the evaluated plants, except *B. Nemorosa* that not presented saponins. Further studies are required to characterize the antimethanogenic potential of the evaluated plants individually, and to quantify the secondary metabolites found.

Key words: *dry season, methane, native forages, secondary metabolites*

Introducción

La región de la Orinoquía representa el 22% del territorio colombiano con 25.4 millones de hectáreas de las cuales el 58% está dedicada al uso pecuario. En la región existen alrededor de 4.2 millones de cabezas de ganado lo cual representa aproximadamente el 19% del inventario ganadero nacional (Lafaurie 2011). Parte de la actividad ganadera se desarrolla en condiciones de sabanas inundables, las cuales alcanzan algo más de 5 millones de hectáreas ubicadas entre los departamentos de Casanare y Arauca. Estos departamentos poseen el 39% de la población bovina de la Orinoquía, y además producen el 68% de la carne consumida en la capital del país, lo que equivale al 16.5% de la producción nacional de carne bovina (Fernández 2009). La actividad ganadera principal es la cría, la cual se desarrolla en pastoreo extensivo con plantas nativas (gramíneas y leguminosas) adaptadas a la dinámica de sequía e inundación, y que garantizan la alimentación para el ganado durante el año (Peñuela et al 2011).

Una desventaja que tienen los bovinos que consumen dietas altas en fibra es que emiten altas concentraciones de metano (CH₄) a la atmósfera, un gas de efecto invernadero que tiene un potencial de calentamiento 21 veces superior que el CO₂ (Peters et al 2012), y cuyo efecto ambiental ha provocado que la actividad ganadera sea cuestionada fuertemente (Santana et al 2009; Makkar y Vercoe 2007).

El metano es producido principalmente por la descomposición bacteriana anaerobia de los compuestos orgánicos de los alimentos en el tracto digestivo de los bovinos (Merino et al 2011). Los productos de la fermentación son principalmente ácidos grasos volátiles (AGV's-acetato, propionato y butirato), formato, etanol, lactato, succinato y ácidos grasos ramificados. De estos, los AGV's son la principal fuente de energía para el animal. También

se produce amonio, hidrógenos y dióxido de carbono, estos dos últimos subproductos son reducidos y convertidos en metano por poblaciones microbiales especializadas (Jansen 2010; Banik et al 2013b). Los sistemas ganaderos se estiman contribuyen con cerca del 80% de las emisiones de CH₄ y N₂O de todo el sector agrícola (Havlik et al 2014), generando hasta un 9% de todas las emisiones antropogénicas de CO₂, 37-52% de CH₄ y 65–84% de N₂O (Peters et al 2012). En Colombia, los inventarios de gases publicados por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia (IDEAM) indican que la fermentación entérica del ganado genera anualmente el 61% de las emisiones totales de CH₄ en el país (Santana et al 2009).

La producción de metano representa una pérdida energética del 2 – 12 % de la energía consumida (Johnson y Johnson 1995) que puede ser potencialmente utilizable por el animal. Una forma de reducir estas pérdidas es a través de la manipulación de la dieta en busca de mejorar la eficiencia de fermentación ruminal para mejorar la utilización de los alimentos (Makkar y Vercoe 2007).

Un mecanismo natural para modificar la fermentación ruminal y reducir la metanogénesis son los metabolitos secundarios de las plantas (Santra et al 2012). Compuestos como las saponinas, taninos, aceites esenciales, flavonoides, compuestos organosulfurados, etc han demostrado reducir la metanogénesis ruminal (Patra y Saxena 2010; Bodas et al 2012) *in vitro* (Bodas et al 2008; García-González et al 2008; Durmic et al 2010; Banik et al 2013a) e *in vivo* (Grainger et al 2009; Hess et al 2004; Jensen 2012). Las plantas producen metabolitos secundarios como medio de defensa y de adaptación a ambientes adversos. Actualmente se han identificado más de 200.000 estructuras definidas de estos compuestos, en donde la actividad y concentración de cada uno, varía dependiendo de la localización geográfica y condiciones ambientales (Patra y Saxena 2010). Generalmente se ha observado que en algunas plantas, el estrés por sequía, las altas temperaturas e intensidad luminosa tienden a incrementar la presencia de metabolitos secundarios, en especial flavonoides, fenoles y saponinas (Ramakrishna y Aswathanarayana 2011).

Las sabanas inundables de la Orinoquía presentan un régimen monomodal, con una época de lluvias que va desde abril hasta noviembre, y un época seca que se da desde diciembre hasta marzo (Lasso et al 2010). Estas condiciones han determinado una diversidad de plantas nativas adaptadas a condiciones de altas temperaturas y extrema sequía (Peñuela et al 2011), que podrían estar determinando una diversidad de metabolitos secundarios, útiles para reducir la metanogénesis ruminal. Por esta razón, el objetivo de este estudio es caracterizar la composición fitoquímica y potencial antimetanogénico *in vitro*, de plantas nativas de la sabana inundable adaptadas a condiciones de sequía, que puedan ser usadas en asociación con otras especies de plantas como fuente de alimentación para los sistemas ganaderos de la región.

Materiales y métodos

Selección de las plantas a evaluar

Con la ayuda de un botánico y personal de la región, se recorrió un transecto de aproximadamente 72 Km a través de las sabanas inundables de Arauca. El recorrido se realizó durante la fase final de la época seca (Abril), en donde se realizaron 17 paradas o puntos de observación (Figura 1) en lugares donde se observaron cambios en la vegetación, topografía y suelo de acuerdo a lo propuesto por Shultze-Kraft (1979). En cada punto de observación se estableció un radio de 50 m, y se tomaron muestras de las plantas más abundantes. También se tomaron muestras de plantas de una misma especie en diferentes puntos de observación para generar un muestreo representativo de la zona de estudio. 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.

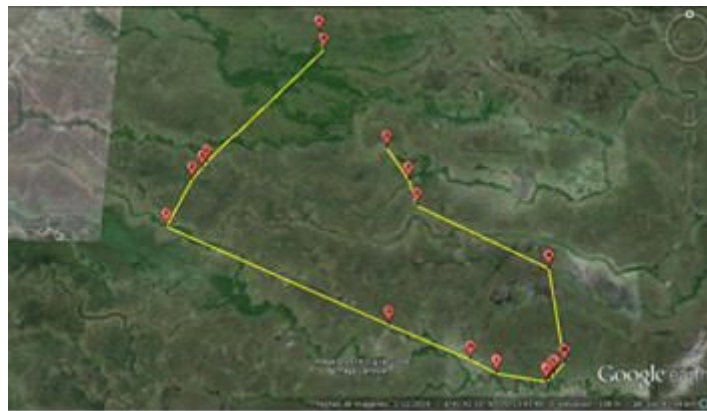


Figura 1. Ubicación del transecto recorrido y los 17 puntos de observación realizados en condiciones de sabanas inundables del Departamento de Arauca.

En el laboratorio, las plantas se secaron en un horno de ventilación forzada a 40°C por 48 h y fueron molidas en un molino Wiley (Arthur H. ThomásCompany, Philadelphia) a través de un tamiz de 1 mm, luego fueron almacenadas en recipientes plásticos oscuros.

El proceso de fermentación se realizó en la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia. Se utilizó la técnica de producción de gas siguiendo la metodología propuesta por Bodas et al (2008), ya que el propósito era identificar plantas que reduzcan la emisión de metano, cuando son usadas como complemento en la dieta de bovinos en pastoreo. El sustrato usado en las pruebas de fermentación, fue una combinación de forrajes los cuáles se consideran son la dieta base de los bovinos durante la época seca en condiciones de sabana inundable (*Axonopus purpussi* 60% +*Paratheria prostrata* 40%) (Vélez et al 2013). El inóculo se obtuvo de tres bovinos mestizos canulados los cuáles eran alimentados con heno de *Digitaria decumbens*, una pastura tropical que presentaba un contenido de MS (91.5%), proteína (8.3%), FDN (69.2%) y FDA (36.7%). El inóculo de cada animal se utilizó por separado y cada uno sirvió como repetición para el análisis estadístico. El fluido ruminal fue colectado a primera hora en la mañana (8:00 am) y transportado en termos previamente calentados a 39 °C al laboratorio, donde se filtró a través de dos paños de gasa y se saturó con CO₂. La parte sólida fue licuada con un poco de líquido ruminal y nuevamente filtrada,

para asegurar la presencia de microorganismos tanto de la fase líquida como de la sólida en el inóculo final.

Los tratamientos fueron incubados en frascos de vidrio de 100 ml, en los cuáles se pesaron y adicionaron 500 mg de materia seca de sustrato + 50 mg de materia seca de cada planta a evaluar + 10 ml de fluido ruminal filtrado (inóculo) + 40 ml de medio de cultivo según McDougall (1948). También se incluyeron tratamientos control (eg, inóculo + sustrato) y blancos (eg, inóculo) para corregir por los gases generados por los microorganismos presentes en el líquido ruminal (López et al 2007). Para cada tratamiento se incubaron 18 frascos (2 réplicas X 3 repeticiones (inóculos) X 3 horarios (12, 24 y 48 h)), y en total se evaluaron 7 tratamientos (Control + 5 plantas + blancos), para un total de 126 unidades de fermentación. Los frascos fueron sellados con tapas de caucho y llevados a una estufa de ventilación forzada a 39°C por 48 h, tratando de simular el tiempo de retención ruminal de la fase sólida reportado para bovinos con dietas a base de forrajes tropicales (Campos et al 2007; Lopes et al 2003)

Parámetros evaluados

En este experimento se realizaron lecturas de producción de gas, metano y degradación de MS a las 12, 24 y 48h, por lo tanto para evaluar cada parámetro, fue necesario retirar del proceso de fermentación 42 frascos en cada horario.

Para medir la presión originada por los gases producto de la fermentación se utilizó un transductor digital de presión (ASHCROFT – modelo 2089), al cual se le acopló una aguja que fue insertada a través de la tapa de caucho de los frascos, indicando la presión en libras por pulgada cuadrada (PSI). Para transformar los datos de presión a volumen, corregidos por la presión atmosférica del laboratorio, se usó la ecuación $Y = -0.1375 + 5.1385 X + 0.0777 X^2$ donde Y representa el volumen de gas producido por cada unidad de presión (X) (Posada y Noguera 2006).

Para estimar la producción de metano, se tomaron muestras de los gases generados y se almacenaron en bolsas de etil vinil acetato de 100 ml, posteriormente se inyectaron manualmente a un cromatógrafo de gases (TRACE GC Ultra) con una jeringa de 100 µl (SGE 50R-V-GT).

Para la determinación de la degradación de la MS, los frascos se filtraron inmediatamente a través de crisoles filtrantes Pyrex® (poro número 1). Los residuos se secaron a 110 °C por 4h, y la MS degradada se estimó por diferencia de peso antes y después del proceso de fermentación.

Con la información obtenida, se estimó el factor de partición (FP), el cuál es la relación entre la cantidad de sustrato degradado (mg) y el volumen de total gas producido (ml) durante el proceso de incubación. Este parámetro indica la eficiencia de fermentación microbiana sobre los tratamientos (Arenas et al 2010).

Para observar el efecto general de los tratamientos, también se estimó el volumen total de gas y metano después de las 48 h de incubación. Estos parámetros fueron estimados a través de la sumatorias de cada una de las producciones en los tres horarios de medición.

Análisis fitoquímico

Se pesaron 20 g del material seco de cada una de las especies a evaluar, y se realizó el método cualitativo denominado marcha fitoquímica, que permite conocer la composición de metabolitos secundarios presentes en cada planta a través del cambio de color de las muestras cuando se mezclan con diferentes compuestos químicos específicos para cada metabolitos. El material se mezcló con etanol y cloroformo para generar los respectivos extractos y se identificó la presencia (+) o ausencia (-) de alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides, esteroides y triterpenoides siguiendo la metodología adaptada de Carvajal et al (2009) y Sanabria (1983), los cuáles han sido reportados por reducir las emisiones de metano (Patra y Saxena 2010; Bodas et al 2012).

Para la identificación de los metabolitos, en cada extracto se realizaron los ensayos Dragendorff y wagner (alcaloides), índice de espuma (saponinas), cloruro férrico (taninos), Shinoda (flavonoides) y Liebermann-Burchard (esteroides y triterpenos).

Análisis estadístico

Para analizar el comportamiento en el tiempo de cada uno de los parámetros estimados en los tratamientos, se realizó un análisis de medidas repetidas bajo un diseño completamente al azar, de acuerdo al siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + H_j + (T \times H)_{ij} + e_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Observacion ijk

μ = Media general

T_i = Efecto del tratamiento i

H_j = Efecto del horario j

$(T \times H)_{ij}$ = Interacción entre el tratamiento i y el horario j

e_{ijk} = Error experimental

En cada parámetro estimado, se evaluó diferentes estructuras de covarianza y se estimó el mejor modelo de análisis teniendo como criterio de selección los coeficientes de información Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC), utilizando la opción “Modelos lineales generales y mixtos” del software estadístico InfoStat (2013). La comparación de medias se hizo utilizando la opción “Contrastes”, en donde se comparó cada tratamiento contra el control.

Para el análisis de los parámetros volumen total de gas y metano después de las 48 h de incubación se realizó un análisis de varianza de una vía con el software estadístico InfoStat (2013). La comparación de medias fue igual que en el análisis anterior.

Resultados y discusión

Durante el recorrido realizado en la época seca de las sabanas inundables de Arauca, se seleccionaron 5 especies vegetales que mostraron un alto nivel de presencia y adaptación a las condiciones adversas de la época. En la tabla 1 se muestran las características de las especies seleccionadas.

Tabla 1. Descripción de las plantas muestreadas durante el transecto recorrido

Nombre común	Nombre científico	Familia	Habito
Altamisa	<i>Ambrosia peruviana</i>	Asteraceae	Arbusto
Marinito	<i>Belencita nemorosa</i>	Capparaceae	Arbusto
Alcornoco	<i>Bowdichia virgilioides</i>	Fabaceae	Árbol
Chaparro	<i>Curatella americana</i>	Dilleniaceae	Árbol
Casabe	<i>Senna multijuga</i>	Fabaceae	Árbol

Parámetros de fermentación

La tabla 2 muestra el efecto de la inclusión de las plantas a la dieta base sobre los parámetros de fermentación en cada uno de los horarios de medición. Los resultados del presente estudio se expresan por unidad de materia seca degradada, esta es la fracción disponible para el metabolismo corporal de los animales, y por tanto es la que más interesa (Dijkstra et al 2011).

Tabla 2. Parámetros de fermentación *in vitro* de las plantas evaluadas, en 3 horarios de medición (12, 24 y 48 h).

	Gas, ml/g MS deg.	EE ²	Metano, ml/g MS deg.	EE	MS deg., %	EE	FP ³ , mg MS deg/ml gas	EE
12 h								
Control ¹	74	2,380	12	0,204	24	0,204	4,77	0,118
<i>A. peruviana</i>	88*	3,335	16	1,428	26	1,020	4,71	0,117
<i>B. nemorosa</i>	95*	6,193	13	0,204	23	0,204	4,37*	0,109
<i>B. virgilioides</i>	70*	4,013	10	1,020	21	1,020	5,33*	0,134
<i>C. americana</i>	75*	1,971	12	0,204	23	0,204	5,19*	0,130
<i>S. multijuga</i>	77*	1,155	12	0,204	24	0,204	4,90*	0,122
24 h								
Control	203	1,359	36	0,530	35	0,681	2,30	0,065
<i>A. peruviana</i>	217*	4,356	39	0,694	37	1,498	2,34	0,066
<i>B. nemorosa</i>	226*	8,030	42	1,918	32	0,542	2,22*	0,064
<i>B. virgilioides</i>	191*	6,258	33	1,755	31*	0,951	2,55*	0,069
<i>C. americana</i>	201*	2,175	37	0,122	31*	0,951	2,34	0,065
<i>S. multijuga</i>	200*	2,584	37	0,122	34	0,273	2,35	0,066
48 h								
Control	316	4,351	58	2,857	41	0,204	1,58	0,053
<i>A. peruviana</i>	332*	2,180	66	0,408	45*	1,837	1,73	0,056
<i>B. nemorosa</i>	341*	5,854	62	1,224	38	1,020	1,71	0,055
<i>B. virgilioides</i>	320*	2,718	63	0,816	39	0,612	1,76*	0,056
<i>C. americana</i>	331*	1,771	63	0,816	40	0,204	1,72	0,055
<i>S. multijuga</i>	320*	2,718	65	0,040	40	0,204	1,72	0,055

Medias en una misma columna con (*) difieren con respecto al control ($p < 0.05$)

¹ *Axonopus purpussi* 60% + *Paratheria prostrata* 40% ² Error estándar

³ Factor de partición

Los volúmenes de gas por unidad de MS degradada generados por la adición de cada planta, en general fueron diferentes con respecto al control en los 3 horarios de medición ($p > 0.05$). A las 12h de incubación, la mayoría de las plantas mostraron volúmenes de gas más altos que el tratamiento control, a excepción de *B. virgilioides* (70 Vs 74 ml/g MS degradada). A las 24 h el tratamiento

control presentó un volumen más alto que *B. virgilioides*, *C. americana* y *S. multijuga* ($p>0.05$). En las 48h las diferencias persistieron, sin embargo en este caso todas las plantas mostraron mayores volúmenes de gas en comparación con el control ($p>0.05$). Los tratamientos con las especies *A. peruviana* y *B. nemorosa* mostraron ser superiores en los 3 horarios de medición ($p>0.05$).

La producción de metano por unidad de MS degradada no mostró diferencia a través del tiempo entre los tratamientos con las plantas y el tratamiento control ($p>0.05$). La figura 2 muestra como la producción de metano presenta una tendencia creciente en el tiempo, similar en todos los tratamientos evaluados.

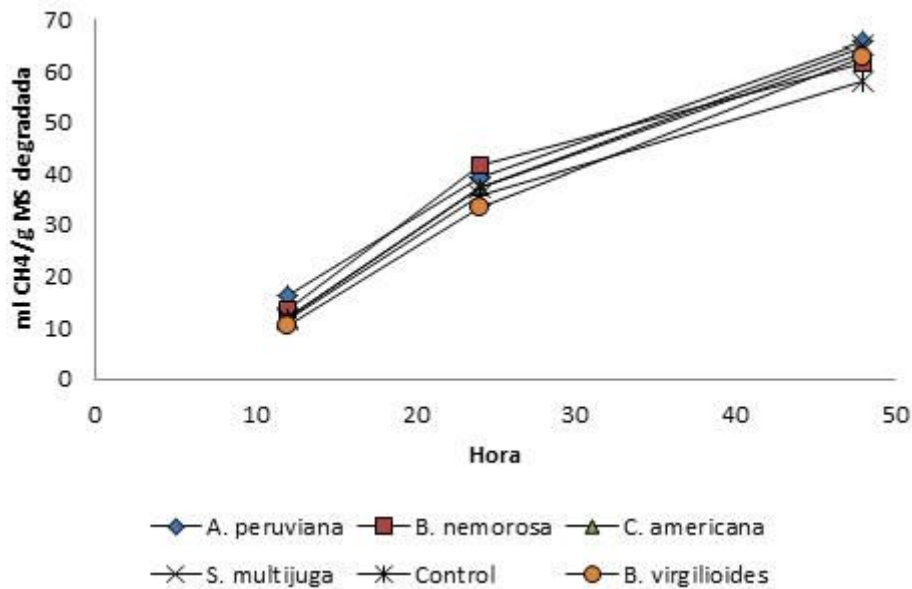


Figura 2. Efecto de la inclusión de las plantas a la dieta base sobre la emisión de metano.

Cuando comparamos la degradación de la MS de los tratamientos estudiados, podemos observar que a las 12h de incubación no se encontraron diferencias entre las plantas y el control ($p>0.05$), sin embargo a las 24h los tratamientos con *B. virgilioides* y *C. americana* mostraron reducir la digestibilidad con respecto al control en 3,78 y 4% respectivamente ($p>0.05$). A las 48h sólo el tratamiento con la planta *A. peruviana* mejoró la digestibilidad de la MS mostrando diferencias estadísticas ($p>0.05$).

Como se puede observar en la tabla 2, no todos los tratamientos que mostraron las mayores degradaciones de la MS, presentaron los más altos volúmenes de producción de gas. Esto es, porque una mayor producción de gas no siempre está relacionada con una mayor degradación de la MS (Arenas et al 2010). Para entender mejor esta situación se estimó el factor de partición (FP) el cual refleja cuanto de la MS degradada se destinó para la formación de proteína microbiana. (Getachew et al 1998; Noguera et al 2011).

Los FP estimados de los tratamientos con la adición de las plantas, mostraron ser diferentes al tratamiento control en los tres horarios evaluados ($p>0.05$). A las 12h los tratamientos con las plantas *B. virgilioides*, *C. americana* y *S. multijuga* presentaron un FP mayor que el control ($p>0.05$), mientras que *A. peruviana* y *B. nemorosa* estuvieron por debajo, siendo sólo esta última la que mostró diferencias estadísticas ($p>0.05$). En las 24 h sólo dos plantas mostraron diferencias *B. nemorosa* y *B. virgilioides* ($p>0.05$). En el primer caso, se encontró un FP inferior al encontrado con el tratamiento

control (2,22 Vs 2,30), mientras que en el segundo el FP fue mayor (2,55 Vs 2,30). A las 48h la única planta que mostró diferencias ($p>0.05$) con respecto al control fue *B. virgilioides*, la cuál continuó con la superioridad mostrada en los horarios anteriores (1,76 Vs 1,58), lo que indica que la adición de esta planta promovió una mayor síntesis de proteína microbiana por unidad de materia seca degradada.

La tabla 3 muestra el comportamiento general de los tratamientos después de las 48h de incubación en relación a volumen total de gas y metano. Los resultados muestran que a pesar de que el volumen de gas fue variable en los tiempos de medición evaluados, al final del proceso de incubación el volumen total de gas generado por los tratamientos con las plantas evaluadas no mostraron diferencia estadística con respecto al tratamiento control ($p>0.05$). Este mismo comportamiento se observó en la producción total de metano, a excepción de *A. peruviana* que mostró un mayor volumen comparado con el tratamiento control ($p>0.05$).

Tabla 3. Producción total de gas y metano después de 48h de incubación

Especie	Producción Gas total (ml/g MS deg.)	Metano total (ml/g MS deg.)
Control ¹	627	105
<i>A. peruviana</i>	651	121*
<i>B. nemorosa</i>	667	118
<i>B. virgilioides</i>	600	107
<i>C. americana</i>	639	113
<i>S. multijuga</i>	632	114
EE ²	33,43	6,56

Medias en una misma columna con (*) difieren estadísticamente con respecto al control ($p<0.05$)

¹ *Axonopus purpussi* 60% + *Paratheria prostrata* 40% ; ² Error estándar

Composición Fitoquímica

En la tabla 4 se puede observar los resultados de la identificación presuntiva de algunos metabolitos secundarios en las plantas que fueron usadas como complemento a la dieta base de bovinos durante la época seca en condiciones de sabana inundable.

Tabla 4. Análisis fitoquímico cualitativo de las plantas seleccionadas

Compuesto	Especie				
	<i>B. nemorosa</i>	<i>A. peruviana</i>	<i>C. americana</i>	<i>B. virgilioides</i>	<i>S. multijuga</i>
Alcaloides	+	+	+	+	+
Esteroides y triterpenoides	+	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+
Saponinas	-	+	+	+	+
Taninos	+	+	+	+	+

(+) Presencia o ausencia (-) del compuesto

En general se encontró diversidad de metabolitos en las plantas estudiadas. En las especies *Ambrosia peruviana*, *Curatella americana*, *Bowdichia virgilioides* y *Senna multijuga* se identificó la presencia de todos los compuestos propuestos en este estudio, sólo en la especie *Belencita nemorosa* no se encontró la presencia de saponinas. Similares resultados se han reportado para la especie *Ambrosia peruviana* donde se han encontrado alcaloides, flavonoides, taninos y saponinas (Guauque et al 2010).

En las hojas de la especie *Curatella americana* se ha reportado la presencia de flavonoides, fenoles, terpenos, saponinas, esteroides (El-Azizi et al 1980) y en menor proporción taninos (Gomes 2009). Vieira et al 2013 reporta para la especie *Bowdichia virgilioides* alcaloides, triterpenoides, flavonoides y aceites esenciales. En la especie *Senna multijuga* se han encontrado triterpenos, esteroides, esteroides, flavonoides, alcaloides y taninos (Tapia 2012; Rinnert 2010). En cuanto a la especie *Belencita nemorosa* son escasos los reportes acerca de los constituyentes químicos de esta planta, por tanto los resultados del presente estudio brindan las primeras bases acerca de la composición fitoquímica de esta especie.

Diversos estudios reportan el potencial antimetanogénico *in vitro* de plantas (Banik et al 2013a; Durmic et al 2010; Bodas et al 2008; Garcia-González et al 2008; Soliva et al 2008) útiles para ser usadas como alternativas nutricionales de mitigación de metano entérico en rumiantes en pastoreo. La reducción en la producción de metano se debe principalmente a la presencia de metabolitos secundarios (taninos, saponinas, flavonoides, etc.) cuyas formas de acción varían dependiendo el compuesto, y que de manera general se asocian con una inhibición directa sobre las bacterias metanogénicas o protozoarios, mejorando las reacciones metabólicas que promueven mayor formación de propionato o reduciendo la degradación de la MS, siendo este último mecanismo de poco interés ya que resulta en una menor eficiencia de utilización de los alimentos (Bodas et al 2012). Por lo tanto la identificación de estas plantas debe realizarse cuidadosamente, garantizando que no se afecte la producción de AGV's y degradación de la MS (Bodas et al 2008; García-González et al 2008).

Los resultados del presente estudio, indican que en general la adición de las plantas al sustrato no afecto la degradación de la MS a través del tiempo (Tabla 2), siendo estos resultados similares a los reportados para otras especies tropicales como *Megathyrus maximus* y *Dichanthium aristatum* (Molina et al 2013). En algunos casos la degradación de la MS se incrementó (*A. peruviana*) lo que se pudo reflejar en un mayor volumen de gas y FP indicando que se mejoró la eficiencia de fermentación a través de una mayor síntesis de proteína microbiana (FP) y digestibilidad de la dieta. Resultados similares reporta Bodas et al (2008), donde la adición de plantas como *Carduus pycnocephalus* L., *Rheum nobile* Hook. f. & Thoms y *Prunus avium* (L.) a una dieta a base de forraje no afecto la producción de gas, y si mejoro la producción de AGV's y proteína microbiana. Diferentes estudios reportan el efecto benéfico de la suplementación con especies arbóreas y arbustivas sobre la digestibilidad de dietas altamente fibrosas en cabras (Ondiek et al 2013) y bovinos (Abdulrazak et al 1997).

En la Tabla 3 se pueden observar los volúmenes totales de gases encontrados después de 48h de fermentación. Estos resultados son superiores a los reportados para otras especies de gramíneas y leguminosas (600.48-666.63 Vs 418.1-601.7 ml/g MS degradada respectivamente), además, la producción de metano fue notoriamente superior en las especies evaluadas en el presente estudio (105.2-120.9 Vs 25.5-74.8 ml/g MS degradada) (Vargas 2013). Los altos volúmenes de gas y metano observados con la adición de las plantas, están determinados por el alto contenido fibroso del sustrato utilizado (77,3 % FDN) el cuál representaba la dieta basal de los bovinos durante la época seca. La fermentación de sustratos altamente fibrosos favorece la síntesis de acetato y butirato (Klevenhusena et al 2012), durante la formación de estos compuestos se libera CO₂ el cuál es parcialmente reducido a metano por acción de las bacterias metanógenas (Moss et al 2000; Noguera et al 2011). De esta

manera, es común observar en dietas de baja calidad nutricional mayores volúmenes de gas determinados en gran parte por CO₂ y CH₄.

A pesar de encontrar diversidad de metabolitos secundarios en las plantas evaluadas (Tabla 4), no se redujo la producción de metano durante el proceso de fermentación. Estos resultados pueden ser explicados por los tipos de compuestos encontrados, su concentración (g/Kg de material vegetal) y dosis utilizada (Bodas et al 2012). En bajas concentraciones, estos compuestos tienen poco efecto sobre la fermentación ruminal, sin embargo en dosis más altas se puede observar una reducción en la producción de metano hasta alcanzar un límite, donde se estabiliza (Bodas et al 2012). La dosis usada en el presente estudio fue de 50 mg (100 mg/g MS incubada, 1g/L o 1000 mg/L de líquido incubado) la cuál es considerada baja (Klevenhusena et al 2012), lo que podría explicar el hecho de que la adición de las plantas evaluadas no generaran cambios significativos en la producción de metano y otros parámetros de fermentación. Zmora et al (2012) evaluaron el efecto de la adición de una planta con diversidad de compuesto secundarios (*Salvia officinalis* L.) sobre la producción de metano, y observaron que los mejores resultados se obtuvieron con dosis entre 100 y 200 mg. García-González et al (2008) lograron reducir la metanogénesis hasta un 20% con la adición de plantas en dosis de 1.4 g/L. Goel et al (2008) demostraron que la adición de plantas con bajos y altos contenidos de saponinas (*Carduus pycnocephalus* – 12.7 g/Kg y *Sesbania sesban* – 105 g/Kg de material vegetal) permitieron reducir la metanogénesis cuando se suministraron en dosis de 150 y 66 mg respectivamente. Por otra parte, Busquet et al (2006) reportan que en aceites esenciales el efecto es más notorio con dosis entre los 300-3000 mg/L. La literatura indica que la efectividad de los metabolitos secundarios para modificar la fermentación ruminal y reducir la producción de metano es variable entre las especies de plantas y dosis usadas (Klevenhusena et al 2012; Busquet et al 2006). Por esta razón se recomienda que al evaluar el potencial antimetanogénico en plantas que presenten diversidad de metabolitos secundarios se haga de manera individual, similar a lo propuesto por Durmic et al (2010) y Banik et al (2013^a), o realizar una caracterización y cuantificación fitoquímica de las plantas antes de los experimentos de fermentación *in vitro* (Flachowsky y Lebzien 2012; Vélez et al 2014).

Conclusiones

- La inclusión de las plantas evaluadas a la dieta base, a través del tiempo no generaron cambios significativos en la producción de metano *in vitro* con respecto a la dieta control.
- El análisis fitoquímico determinó la presencia de alcaloides, esteroides y triterpenoides, flavonoides, saponinas y taninos en *A. peruviana*, *B. virgilioides*, *C. americana* y *S. multijuga*. Sólo en la especie *B. nemorosa* no se encontró la presencia de saponinas.
- Las plantas estudiadas incrementaron el volumen de producción de gas de la dieta, y entre ellas se destaca *A. peruviana* por mejorar la digestibilidad, y *B. virgilioides* por promover una mayor formación de proteína microbiana por unidad de materia seca degradada.

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), la Universidad Nacional de Colombia Sede Orinoquía (Convocatoria de investigación para financiar trabajos de grado en posgrado en temáticas relacionadas con la Orinoquía 2014-I) por su aporte financiero, y al laboratorio NUTRILAB - GRICA de la Universidad de Antioquia por su apoyo logístico para la realización de la presente investigación.

Referencias

Abdulrazak S A, Muinga R W, Thorpe W and Ørskov E R 1997 Supplementation with *Gliricidia sepium* and *Leucaena leucocephala* on voluntary food intake, digestibility, rumen fermentation and liveweight gain of crossbred steers offered *Zea mays* stover. *Livestock Production Science* 49:53-62

Arenas F A, Noguera R R y Restrepo L F 2010 Efecto de diferentes tipos de grasa en dietas para rumiantes sobre la cinética de degradación y fermentación de la materia seca in vitro. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 23:55-64. <http://www.scielo.org.co/pdf/rcpp/v23n1/v23n1a07.pdf>

Banik B K, Durmic Z, Erskine W, Ghamkhar K and Revell C 2013a In vitro ruminal fermentation characteristics and methane production differ in selected key pasture species in Australia. *Crop & Pasture Science* 64: 935–942. <http://dx.doi.org/10.1071/CP13149>

Banik B K, Durmic Z, Erskine W, Nichols P, Ghamkhar K and Vercoe P 2013b Variability of in vitro ruminal fermentation and methanogenic potential in the pasture legume biserrula (*Biserrula pelecinus* L.). *Crop & Pasture Science* 64: 409–416. <http://dx.doi.org/10.1071/CP13073>

Bodas R, López S, Fernandez M, Garcia-Gonzalez R, Rodriguez A B, Wallace R J and Gonzalez J S 2008 In vitro screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 145: 245–258.

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.

Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A and Kamel C 2006 Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science* 89: 761–771. [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(06\)72137-3/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(06)72137-3/pdf)

Campos W E, Benedetti E, Rodríguez N M, Saliba E S, Borges A L C C e Lachica Lopes M 2007 Cinética ruminal de vacas leiteiras a pasto consumindo diferentes gramíneas tropicais. *Archivos de Zootecnia* 56 (216): 829-837. http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/06_17_35_03CineticaCampos.pdf

Carvajal L, Hata Y, Sierra N y Rueda D 2009 Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*strychnos schultesiana* krukoff). *Revista Colombia Forestal* 12: 161-170.

Dijkstra J, Oenema O and Bannink A 2011 Dietary strategies to reducing N excretion from cattle: implications for methane emissions. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 3:414–422.

Durmic Z, Hutton P, Revell D K, Emms J, Hughes S and 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.

El-Azizi M M, Ateya A M, Svolvoda G H, Schiff Jr. P L, Slatkin D J and Knapp J E 1980 Chemical Constituents of *Curatella americana* (Dilleniaceae). *Journal of Pharmaceutical Sciences* 69: 360-361.

Fernández A P 2009 Evaluación de la oferta de especies silvestres asociadas a la ganadería de cría en la sabana inundable, como aporte a la seguridad alimentaria de los habitantes del municipio de Paz de Ariporo, Departamento de Casanare, Colombia. Tesis para optar al título de Especialista en producción Agrícola Tropical Sostenible. Universidad de los Llanos, pag 12-15. <http://www.horizonteverde.org.co/attachments/article/23/Tesis%20Especializaci%C3%B3n%20Paola%20Fernandez.pdf>

Flachowsky G and Lebzien P 2012 Effects of phytogenic substances on rumen fermentation and methane emissions: A proposal for a research process. *Animal Feed Science and Technology* 176: 70–77.

García-González R, López S, Fernández M, Bodas R and 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.

Goel G, Makkar H P S and Becker K 2008 Effect of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrient from roughage and concentrate based feeds to methane. *Animal Feed Science and Technology* 147, 72–89.

Gomes L G 2009 Herbivoria em folhas de *Curatella americana* L. (dilleniaceae) em dois diferentes estágios de desenvolvimento. análise sob enfoque histoquímico foliar. Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil, pp 1-3. http://www.seb-ecologia.org.br/2009/resumos_ixceb/559.pdf

Guaque M y Castaño J C, Gómez M 2010 Detección de metabolitos secundarios en *Ambrosia peruviana* Willd y determinación de la actividad antibacteriana y antihelmíntica. *Infectio* 14(3): 186-194. <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14n3/v14n3a05.pdf>

Getachew G, Blümmel M, Makkar H P and Becker K 1998 In vitro measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology* 72: 261-281.

Grainger C, Clarke T, Auldish M J, Beauchemin K A, McGinn S M, Waghorn G C and 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. <http://pubs.aic.ca/doi/pdf/10.4141/CJAS08110>

Havlík P, Valina H, Herrero M, Obersteiner M, Schmid E, Rufino M C, Mosnier A, Thornton P K, Böttcher H, Conant R T, Frank S, Fritz S, Fuss S, Kraxner F and Notenbaert A 2014 Climate change mitigation through livestock system transitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Volume 111-no 10: 3709–3714. <http://www.pnas.org/content/111/10/3709.full.pdf+html>

Hess H D, Beuret R, Loetscher M, Hindrichsen I K, Machmüller A, Carulla J E, Lascano C E and Kreuzer M 2004 Ruminant fermentation, methanogenesis and nitrogen utilisation of sheep receiving tropical grass hay-concentrate diets offered with *Sapindus saponaria* fruits and *Cratylia argentea* foliage. *Animal Science* 79: 177–189. http://www.veterinaria.unal.edu.co/inv/nutricion/Hess_2004_AS.pdf

InfoStat 2013 software estadístico versión 1613-2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Jansen 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, pp 1-43.

Johnson K A and Johnson D E 1995 Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73:2483-2492. <http://www.journalofanimalscience.org/content/73/8/2483.full.pdf>

Klevenhusena F, Muro-Reyes A, Khiaosa-ard R Metzler-Zebeli B U and Zebelia Q 2012 A meta-analysis of effects of chemical composition of incubated diet and bioactive compounds on in vitro ruminal fermentation. *Animal Feed Science and Technology* 176: 61– 69.

Lafaurie J F 2011 Los ojos en la Orinoquía. *Ciencia y Tecnología Ganadera. Carta Fedegán N.º 123*. pp 38-43.

Lasso C A, Usma J S, Trujillo F y Rial A 2010 Biodiversidad de la cuenca del Orinoco: bases científicas para la identificación de áreas prioritarias para la conservación y uso sostenible de la biodiversidad. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, WWF Colombia, Fundación Omacha, Fundación La Salle e Instituto de Estudios de la Orinoquía (Universidad Nacional de Colombia). Bogotá – Colombia, pp 220.

Lopes F C F, Rodriguez N M, Aroeira L J M, Deresz F, Sampaio I B M, Maldonado-Vasquez H e Vittori A 2003 Modelagem comparativa da cinética de fluxo da fase sólida do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schumack) consumido sob pastejo por vacas mestiças Holandês × Zebu em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 55: 702-709.

López S, Dhanoa M S, Dijkstra J, Bannink A, Kebreab E and 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 and Vercoe P 2007 Measuring methane production from ruminants. Joint FAO/IEA Division of Nuclear Techniques in food and Agriculture, International Atomic Energy, Vienna-Austria, pp 1-137.

McDougall E I 1948 Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep`s saliva. *Biochemistry Journal* 43:99-109. <http://www.biochemj.org/bj/043/0099/0430099.pdf>

Merino P, Ramirez-Fanlo E, Arriaga H, Del Hierro O, Artetxe A and Viguria M 2011 Regional inventory of methane and nitrous oxide emission from ruminant livestock in the Basque Country. *Animal Feed Science and Technology* 166– 167: 628– 640.

Molina I C, Cantet J M, Montoya S, Correa Londoño G A y 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. <http://www.scielo.org.co/pdf/cmvez/v8n2/v8n2a02.pdf>

Moss A, Jouany J P and Newbold J 2000 Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales De Zootechnie* 49: 231–253. <http://animres.edpsciences.org/articles/animres/pdf/2000/03/z0305.pdf>

Noguera R R, Ortiz, D M y Gallego N 2011 Comparación de líquido ruminal vacuno y caprino como fuente de inóculo en la técnica in vitro de producción de gases. *Livestock Research for Rural Development* 23 (11). <http://www.lrrd.org/lrrd23/11/nogu23225.htm>

Ondiek J O, Ogore P B, Shakala E K and Kaburu G M 2013 Feed intake, digestibility and performance of growing small East African goats offered maize (*Zea mays*) stover supplemented with *Balanites aegyptiaca* and *Acacia tortilis* leaf forages. *Basic Research Journal of Agricultural Science and Review*, 2(1): 21-26. <http://isindexing.com/isi/papers/1391260218.pdf>

Patra A and 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 y 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.

Peters M, Rao I, Fisher M, Subbarao G, Martens S, Herrero M, Van der Hoek R, Schultze-Kraft R, Miles J, Castro A, Graefe S, Tiemann T, Ayarza M and Hyman G 2012 Tropical Forage-based Systems to Mitigate Greenhouse Gas Emissions. Chapter 11, *Eco-Efficiency: From Vision to Reality* pp 172-190. http://ciat.cgiar.org/wp-content/uploads/2012/12/chapter_11_eco_efficiency.pdf

Posada S L, Noguera R y 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* 19(4): 407-414. <http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/viewFile/246/244>

Ramakrishna A and Aswathanarayana G 2011 Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plants Signaling & Behavior* 6:11, 1720-1731. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3329344/pdf/psb-6-1720.pdf>

Rinnert C H 2010 Análise estrutural de folhas de *Senna multijuga* Subs. Lindleyana (Gardner) H.S, Irwin Barneby(Leguminosae, Cesalpinoideae) e localização *In situ* de compostos coma ação biológica de interesse Farmacológico. Tesis para optar al título de Doutor em Biodiversidade Vegetale Meio Ambiente. Instituto de Botanica da Secretaria do Meio Ambiente, pp 27.

Sanabria A 1983 Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Santana A, Camacho C, Estévez L, García G, Gómez M, Gutiérrez J, Rozo M y Ballesteros H 2009 Agenda desarrollo tecnológico para la cadena prospectiva de investigación y cárnica bovina de Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Federación Colombiana de Ganaderos (Fedegan), Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), Universidad Nacional de Colombia, pp 10 –198.

Santra A, Saikia A and 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.

Soliva C R, Zeleke A B, Clément C, Hess H D, Fievez V and Kreuzer M 2008 In vitro screening of various tropical foliage, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in

the In vitro fermentation and methane production of pastures in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 147, 53–71

Tapia J A 2012 Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y subextractos clorofórmico y etéreo de *senna multijuga*, *tagetes zipaquirensis*, y *coursetia dubia*. Tesis para optar al título de Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, pag 84-88. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2449/1/56T00318.pdf>

Vargas J J 2013 Producción de metano in vitro e in vivo de gramíneas y leguminosas presentes en sistemas de producción bovina en trópico alto colombiano. Tesis para optar al título de Magister en Producción Animal. Universidad Nacional de Colombia, pag 39-60 <http://www.bdigital.unal.edu.co/11743/1/780255.2013.pdf>

Vélez M, Escobar E y Salamanca A 2013 Caracterización de la vegetación nativa de la sabana inundable en época de sequía en el Departamento de Arauca, Colombia con énfasis en la productividad ganadera. Memorias Segundo Congreso Internacional Rural Sustentable “Estrategias para la Competitividad Rural”, Universidad Nacional sede Orinoquía, Colombia, 16 a 18 de Octubre de 2013 pp 15-17.

Vélez O M, Campos R y Sánchez H 2014 Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 17: 489 – 499

Vieira L F, Reis M D, Brandão A R, Viana I M, Da Silva J P, Barreto E and Smaniotto, S 2013 Anxiolytic-like effect of the extract from *Bowdichia virgilioides* in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(4): 680-686. <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v23n4/aop04113.pdf>

Zmora P, Cieślak A, Pers-Kamczyc E, Szyszka P and Szumacher-Strabel, M 2012 An in vitro study on the effect of sage, *Salvia officinalis* L., on rumen fermentation. *Journal of Animal and Feed Sciences* 21:613–623

Received 5 February 2015; Accepted 10 April 2015; Published 1 May 2015