

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Efecto del guineo cuadrado sobre la proteína cruda, almidón, fibra y fermentación ruminal de ensilados de leguminosas¹

Ricardo Alvarez-Brito², Augusto Rojas-Bourrillon^{3A}, Michael López-Herrera^{4A✉}

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de sustituir, proporciones de forraje de 2 leguminosas arbustivas por fruto de guineo cuadrado (*Musa* ABB) sobre el contenido de nutrimentos y producción de metano. El experimento se desarrolló entre enero y noviembre de 2017 y se utilizó un diseño factorial con ocho tratamientos. Las mezclas se almacenaron durante 50 días en bolsas de 5,0 kg. El aumento de fruto de guineo cuadrado reduce la concentración de PC y dFDN, mientras que aumenta la cantidad de almidón total y pectinas. En cuanto a los parámetros ruminales, la concentración de NH₄ se reduce, por una reducción en la concentración de PC, aunque se debe analizar cuanto se pudo haber transformado en proteína microbiana. El tiempo de incubación de la muestra pudo haber generado que la fibra no haya sido degradada y esto alteró la proporción de los AGV. Finalmente, conforme se aumentó la cantidad de fruto, se redujo la cantidad de metano producido, también el Poró mostró mayor capacidad de reducción comparado con la *Cratylia*. Los ensilados de guineo cuadrado con leguminosas pueden aportar nutrimentos de calidad y tienen la capacidad de reducir la producción de metano, lo que resulta en un aumento de la productividad y menor impacto ambiental.

Palabras clave: Leguminosas tropicales, Ensilaje, Musa, Forrajes, Rumen

¹ Este trabajo formó parte del proyecto de investigación 739-B4-115 inscrito en Vicerrectoría de Investigación, denominado "Evaluación de ensilajes de pastos y forrajeras con diferentes niveles de guineo cuadrado (*Musa* sp.) para la alimentación de rumiantes bajo normativa orgánica". Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica y de la tesis de licenciatura del primer autor

² Finca Lechería Bijagua. Alajuela, Costa Rica. rxab2ster@gmail.com

^A Universidad de Costa Rica, Escuela de Zootecnia, Centro de Investigación en Nutrición Animal. San José, Costa Rica.

³ augusto.rojas@ucr.ac.cr <https://orcid.org/0000-0002-9834-2361>

^{4✉} Autor para correspondencia: michael.lopez@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0003-4301-9900>)

Recibido: 31 agosto 2020 Aceptado: 15 octubre 2020

Esta obra está bajo licencia internacional Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas 4.0.



ABSTRACT

Effect of square banana on crude protein, starch, fiber and ruminal fermentation of legume silage. The objective of this study was to evaluate the effect of replacing, forage proportions of 2 shrub legumes by Square banana fruit (*Musa ABB*) on nutrient content and methane production. The experiment was carried out between January and November 2017 and a factorial design with eight treatments was used. The mixtures were stored for 50 days in bags of 5.0 kg. The increase of square banana fruit reduces the concentration of CP and dNDF, while the amount of total starch and pectins increases. Regarding the ruminal parameters, the concentration of NH_4 is reduced, by a reduction in the CP concentration, although it must be analyzed how much it could have been transformed into a microbial protein. The incubation time of the sample could have generated that the fiber was not degraded and this altered the proportion of the VFA. Finally, as the amount of fruit was increased, the amount of methane produced was reduced, also Poró showed a greater reduction capacity compared to Cratylia. Silage of Square bananas and legumes can provide quality nutrients and have the ability to reduce methane production, resulting in increased productivity and lower environmental impact.

Keywords: Tropical legumes, Silage, Musa, Forage, Rumen

INTRODUCCIÓN

El calentamiento global ha obligado a toda la industria agropecuaria a buscar opciones para mantener la productividad con una menor emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera (Morgavi et al., 2008). Los principales gases de efecto invernadero producidos en la ganadería son: el dióxido de carbono (CO_2), el metano (CH_4) y el óxido nitroso (N_2O) (Knapp et al., 2014). El metano es un gas que se produce en el retículo-rumen como parte de los procesos de degradación de los carbohidratos a partículas menos complejas, compuestos que son transformados y aprovechados por el rumiante en forma de ácidos grasos volátiles (Beauchemin et al., 2008; Dijkstra et al., 2011; Duncan 2014).

La producción de metano en los rumiantes no es sólo una preocupación ambiental sino que, también representa una pérdida de la energía consumida por el animal (Haque et al., 2014). De acuerdo a lo descrito por Meale et al., (2012), la pérdida de energía puede ser 2-12% del total consumido por día; de manera que cualquier acción que permita aprovechar esta energía será beneficiosa para el animal y para el productor (Hook et al., 2010). Además, se ha determinado que durante la degradación de los carbohidratos fibrosos se produce mayor

cantidad de metano, en comparación con los carbohidratos no fibrosos, sobre todo el almidón (Jiao et al., 2013).

Los sistemas ganaderos de producción en condiciones tropicales utilizan los pastos como base para la alimentación de los rumiantes, además estos pastos tienden a poseer mayor cantidad de carbohidratos fibrosos y lignina lo que reduce su digestibilidad (Boval y Dixon, 2012), situación que obliga al uso de alternativas como: reducir la edad del pasto, utilizar fuentes de almidón y el uso de arbustivas leguminosas o no leguminosas en las dietas de los rumiantes como estrategia para reducir la metanogénesis (Meale et al., 2012).

De acuerdo con lo publicado por Archimède et al., (2011), las leguminosas tropicales tienen un potencial de producción de metano menor comparadas con los pastos tropicales, esto se ha relacionado con la presencia de metabolitos secundarios en las leguminosas, principalmente taninos y saponinas (Wang, 2012; Pinski, 2013). No obstante, poseen mayor contenido de lignina en comparación con los pastos, esto reduce la digestibilidad de la fibra (Krizsan y Huhtanen, 2013); que se considera uno de los factores que más aumentan la metanogénesis (Moss et al., 2000).

Por otra, parte, el uso de fuentes de almidón he demostrado ser eficiente para reducir la metanogénesis, ya que favorece la síntesis de propionato en el rumen y reduce el pH lo que inhibe la actividad de los organismos metanogénicos (Boadi et al., 2004). En condiciones tropicales el almidón proviene principalmente del uso de alimentos balanceados, lo que representa una limitación económica para algunos productores (Lascano y Cárdenas, 2010), además deben ser utilizados sin comprometer el adecuado desempeño y salud del animal (Mc Geough et al., 2010).

Las arbustivas *Cratylia* (*Cratylia argentea* Desv. O. Kuntze) y *Poró* (*Erythrina poeppigiana*) son recursos forrajeros bien documentados en sistemas tropicales de producción, donde han mostrado adecuadas producciones de biomasa y buen contenido nutricional del forraje (Zhou et al., 2011; Kongmanila et al., 2012; González-Arcía et al., 2012; López-Herrera y Briceño-Arguedas, 2016; Vivasane y Preston 2016). Además, los frutos de musáceas son considerados una fuente de energía interesante, disponible en condiciones tropicales debido a su alta concentración de carbohidratos no fibrosos en el fruto (Archimède et al., 2010; López-Herrera et al., 2017) sobre todo cuando se utiliza en estado inmaduro (HappiEmaga et al., 2008) ya que poseen más de 80% de almidón total (López-Herrera et al., 2019), que puede ser complementario al bajo contenido energético de los forrajes leguminosos (Jiménez-Ferrer et al., 2015).

Por todo lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto que genera la sustitución parcial de follaje de las leguminosas *Cratylia argentea* y *Erythrina poeppigiana* por

fruto inmaduro de guineo cuadrado (*M. acuminata* x *M. balbisiana*, Grupo ABB); sobre el contenido de almidón, pectinas, fibra en detergente neutro digestible y parámetros ruminales in vitro de mezclas ensiladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los forrajes utilizados en el ensayo fueron obtenidos en la finca Agroecológica Vocaré, ubicada en el cantón de Upala, a 120 - 180 msnm, con una precipitación promedio de 2400 mm anuales y una temperatura promedio de 26°C (Solano y Villalobos 2001). Mientras que la etapa experimental se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA) de la Universidad de Costa Rica, Montes de Oca, Costa Rica, ahí se realizaron los análisis de los tratamientos.

Las especies forrajeras de Poró (*Erythrina poeppigiana*) y Cratylia (*Cratylia argentea*) fueron cosechadas a 90 días de rebrote y el guineo cuadrado fue cosechado cuando el fruto se encontraba desarrollado, engrosado y no madurado; el fruto se utilizó con todo y su cáscara, sin incluir el pinzote del racimo. Todas las especies se produjeron bajo normativa orgánica y presentaban la composición bromatológica que se muestra en el Cuadro 1. Los materiales fueron picados con picadora eléctrica de cuchillos hasta obtener un tamaño promedio de partícula aproximado de 2,5 cm.

Cuadro 1. Valor nutricional de los alimentos utilizados para la preparación de los tratamientos ensilados. Centro de Investigación en Nutrición Animal, San José, Costa Rica. 2018

	Guineo cuadrado	Cratylia	Poró
MS (%)	25,01	27,40	25,15
PC (% MS)	4,10	15,33	16,80
FDN (%MS)	8,30	57,51	47,73
Lignina (%MS)	5,30	13,21	11,50
Almidón total (% MS)	81,72	N.D.	0,10
TND (%)	88,60	54,40	62,70

Materia Seca (MS), Proteína cruda (PC), Fibra en detergente neutro (FDN), Fibra en detergente ácido (FDA), Carbohidratos no fibrosos (CNF) y Total de nutrientes digestibles (TND)

Los materiales se mezclaron de manera manual en bolsas de polietileno para empaque al vacío con capacidad para 5,0 kg y con un grosor de 0,0063 mm (microsilos); de acuerdo a un diseño experimental factorial completamente aleatorizado, con cuatro niveles crecientes de fruto inmaduro de guineo cuadrado (0%, 15%, 30% y 45% p/p) y las 2 especies de leguminosas (Cratylia y Poró), para un total de 8 tratamientos. Cada bolsa fue considerada como una unidad experimental, además cada tratamiento tuvo 4 repeticiones, para un total de 32 silos. A todos los tratamientos se les agregó un único nivel de melaza (5% p/p) y de inóculo bacteriano (1 L/ton de material) preparado fermentando durante 30 días melaza, suero de leche y microorganismos.

La compactación del forraje se hizo manualmente, mientras que la extracción del aire de los silos se realizó por medio de una aspiradora doméstica, para ser selladas con cinta plástica adhesiva. Posterior al sellado, los silos fueron transportados y almacenados en un laboratorio en San José, donde se mantuvieron aislados de las condiciones ambientales controladas (temperatura de 25 °C y humedad relativa > 80%) durante 50 días.

Posterior a este tiempo se tomaron muestras de cada tratamiento y se enviaron al Laboratorio de Bromatología de Forrajes del CINA, donde se realizaron los análisis de proteína cruda (AOAC, 1998), fibra en detergente neutro y lignina según Van Soest et al., (1991), Pectinas (Loyola et al. 2013) y almidón total tal y como se describe en Karkalas, (1985), utilizando un sistema de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) modelo 1260 de Agilent Technologies con una columna Agilent Hi-Plex H. Los datos obtenidos en los análisis de fibra detergente neutra y lignina, se utilizaron para estimar la concentración de fibra en detergente neutro digestible según se describe en Detmann et al., (2008), además el Total de nutrientes digestibles (TND) se estimó por medio de las ecuaciones descritas en Sampaio et al., (2012)

Para la determinación de la producción de metano se utilizó una adaptación de la metodología descrita en el trabajo de Meale et al. (2012). Para este fin se pesó 1g de forraje seco combinado con licor ruminal de una vaca fistulada con una dieta conocida (0,5 kg de cítricos; 0,5 kg de alimento balanceado; 0,3 kg de melaza; 0,5 kg de soya; 38 kg ensilaje). Las mezclas forrajeras fueron incubadas durante 24 horas a 39 ± 0.5 °C, en botellas de vidrio con capacidad para 250 mL en un equipo ANKOM Gas ProductionSystem. Los valores obtenidos fueron corregidos con un blanco que contiene solamente licor ruminal. A 24 horas de incubación se procedió a la colecta del gas, la muestra de gas se tomó directamente en el septo del recipiente y para la cuantificación de la producción de metano se utilizó un Cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 7820A con una columna 19091P-MS4 y un detector de masas de simple cuadrupolo modelo 5977E Agilent Technologies. La producción de CH₄ se expresó como g CH₄/kg MS) y g CH₄/kg MSD).

Después de tomar la muestra de gases, los recipientes fueron retirados de la incubadora y el licor ruminal remanente fue transvasado a tubos de ensayo, a los que se les agregó 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado, para eliminar las bacterias presentes. A continuación, se procedió a centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos para lograr la precipitación de los materiales sólidos sin digerir. El líquido supernatante fue almacenado a 4-5 °C, mientras se realizó el centrifugado a todos los tratamientos. Para cuantificar la concentración de los ácidos grasos volátiles en el licor ruminal (% del total de ácidos grasos volátiles), se analizó el líquido supernatante en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) Agilent Technologies modelo 1260 Infinity con una columna Agilent Hi-Plex H.

Para la determinación del nitrógeno amoniacal se tomó una muestra de 3 ml de los tubos de ensayo almacenados con ácido y en refrigeración, se les agregó 150µl de ácido tricloracético y se cuantificó el contenido de nitrógeno amoniacal por medio de la técnica de Kjeldahl (AOAC, 1998).

Se realizó una simulación para estimar el efecto de utilizar la mezcla ensilada que demostró la menor producción de metano y se comparó contra el tratamiento que mostró la mayor producción de metano. Para este fin se utilizaron los datos publicados por Montenegro y Barrantes (2016), quienes midieron la emisión de metano (141 gCH₄/día) que proviene de novillas Jersey de peso promedio 290±16 kg, que consumen de materia seca (CMS) 8,1 kg por día de pasto *Brachiaria decumbens* cvBasilisk sin fertilizar y con edad de cosecha 35 días; y se analizó el impacto de reemplazar el pasto por niveles crecientes (20, 30 y 40% del CMS) de los ensilados obtenidos en esta investigación. También se simuló el efecto de utilizar los ensilados en niveles crecientes (20 y 40% del CMS) sobre la concentración de nitrógeno amoniacal en licor ruminal, contra una dieta 100% de pasto *Megathyrus maximus* cvGatton obtenido en la investigación de Relling et al., (2001).

Los datos recopilados se analizaron por medio de ANOVA, utilizando el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2019). Se consideraron como efectos principales: la especie de leguminosa y el nivel de sustitución por guineo cuadrado, así como la interacción entre ambos efectos. Tal y como se muestra en la siguiente ecuación:

$$y_{ijk} = \mu + L_i + G_j + (LxG)_{ij} + E_{ijk}$$

Dónde:

μ= media general

F= Efecto i-esimo del tipo de forraje leguminoso

G= Efecto j-esimo de nivel de inclusión de Guineo cuadrado

LxG= Efecto de la interacción del tipo de leguminosa y el nivel de inclusión de Guineo cuadrado

E= Error experimental $E \sim (0, \sigma^2)$

Las diferencias entre medias se determinaron por medio de la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proteína cruda

Se detectaron diferencias significativas ($p < 0,001$) debidas al nivel de sustitución por guineo cuadrado (Cuadro 2) ya que conforme aumentó la cantidad de fruto, se redujo el contenido de proteína cruda en la mezcla ensilada. Así, el promedio de los tratamientos con nivel de sustitución 45% fue el más bajo con 10,11%, mientras que el promedio de los tratamientos sin fruto de guineo cuadrado fue de 16,12% de proteína cruda.

Cuadro 2. Medias de concentración de almidón total, pectinas y digestibilidad de la fibra de los ensilados de leguminosas con frutos de guineo cuadrado después de 50 días de fermentación. Centro de Investigación en Nutrición Animal, San José, Costa Rica, 2018

Variable	Poró				Cratyia				E.E
	0	15	30	45	0	15	30	45	
Proteína cruda (% MS)	16,7 ^d	14,9 ^c	13,2 ^b	9,4 ^a	15,5 ^c	14,3 ^c	12,3 ^b	10,8 ^a	0,51
Almidón total (%MS)	2,2 ^a	11,4 ^b	17,3 ^c	24,8 ^d	0,1 ^a	9,3 ^b	14,0 ^c	26,6 ^d	0,50
Pectinas (%MS)	5,9 ^a	11,2 ^b	14,2 ^b	13,9 ^b	4,9 ^a	4,4 ^a	5,6 ^a	7,9 ^a	1,64
dFDN (% MS)*	25,7 ^d	19,2 ^c	17,1 ^b	11,9 ^a	27,3 ^d	21,0 ^c	15,0 ^b	13,1 ^a	1,08

*dFDN= Fibra detergente neutro digestible E.E.= error estándar

Letras distintas en la misma fila son diferentes ($p < 0,05$)

Todos los tratamientos, con excepción de los que poseían 45% de guineo cuadrado, presentaron concentraciones de proteína cruda mayores a las reportadas por Castillo et al.,

(2009) con ensilados Maiz-Vigna, sin embargo se ha demostrado que el uso de frutos similares al guineo cuadrado incrementa la cantidad de proteínas ligadas a la fibra (López-Herrera et al., 2017), de manera que al hacer uso de estos ensilados se debe reforzar el aporte de proteína, no sólo por la disminución en la concentración, sino por el cambio en valor biológico de la misma, situación que podría repercutir en la productividad de los animales (Calsamiglia et al., 2010).

Almidón total

Se determinaron diferencias significativas ($p < 0,001$) en la concentración de almidón total, debidas al nivel de sustitución por fruto de guineo cuadrado. Se determinó que conforme se acrecenta la cantidad de fruto de guineo cuadrado así también se incrementa la concentración de almidón total en las mezclas ensiladas.

El incremento promedio fue de 8,3% de almidón total por cada 15% de aumento en la cantidad de fruto utilizado para el ensilaje. Así, el promedio de los tratamientos sin uso de fruto presentó la media menor (1,2% MS), mientras que el promedio mayor lo expusieron los tratamientos con 45% de sustitución (25,7% MS). No se determinaron diferencias entre la especie de leguminosa, aunque hubo una tendencia de los tratamientos elaborados con Poró a mostrar mayor (13,9% MS) contenido de almidón comparado a los tratamientos con Cratylia (12,5% MS). Los promedios de cada tratamiento se muestran en el Cuadro 2.

El almidón es el nutrimento principal en el fruto de guineo cuadrado, ya que representa 81,72% de este material (Cuadro 1), esta afirmación tiene soporte en la investigación de Barrera et al., (2010), aunque otros estudios afirman que pueden haber variaciones en la cantidad de almidón entre especies de musáceas y entre zonas geográficas (Mohapatra et al., 2010; Pelissari et al., 2012; Ravi y Mustaffa, 2013). Por esta razón se deben analizar y conocer su composición nutricional de manera que se pueda balancear dentro de una dieta que evite el desarrollo de acidosis ruminal (Zebeli et al., 2010).

Los ensilados con 45% de sustitución del forraje por fruto de guineo cuadrado poseen un contenido de almidón total comparable con los ensilados de maíz con 32% MS del trabajo de Der Bedrosian et al., (2012). El incremento en el contenido de almidón total por efecto de incorporar fuentes altas en almidón, como maíz o guineo cuadrado; ha sido documentado por otros autores (Benchaar et al., 2014; Lazo-Salas et al., 2018; Rojas-Cordero, 2018).

También ocurre un incremento en la cantidad de almidón en los tratamientos sin fruto, este aumento puede ser debido a que durante el ensilaje se reduce la cantidad de fibra (López-

Herrera et al., 2017), lo que concentra otros nutrimentos el final del ensilaje. El aumento en el contenido de almidón favorece la producción ya que aumenta la digestibilidad del ensilado, ya que es un carbohidrato muy aprovechable, en comparación con la fibra (McDonald et al., 2010).

Pectinas

El contenido de pectinas presentó diferencias significativas por el efecto de la especie de leguminosa utilizada ($p=0,001$) y por el nivel de sustitución del forraje por fruto de guineo cuadrado ($p=0,01$). Los valores promedio de esta fracción en los tratamientos se muestran en el Cuadro 2. Tal y como se indicó, conforme se incrementa la cantidad de fruto en la mezcla así, aumenta la concentración de pectinas en la mezcla ensilada, así, los promedios de los tratamientos 0 y 15% mostraron menor concentración de esta fracción, sin ser diferentes entre ellos (5,4 y 7,8% MS, respectivamente), por el contrario, el promedio de los tratamientos con 30 y 45% fueron los que mostraron la mayor concentración de pectinas (9,9 y 10,9% MS, respectivamente) Por otra parte, se determinó que el promedio de los tratamientos donde se utilizó el Poró fue mayor (11,3% MS), comparado con el promedio de los ensilados en los que se utilizó *Cratylia* (5,67% MS). Además, se determinaron correlaciones entre el contenido de pectinas en el ensilado y la concentración de ácido propiónico ($p=0,53$; $p<0,001$) y entre el contenido de pectinas y la concentración del ácido acético ($p= -0,51$; $p<0,001$).

Las diferencias detectadas por la leguminosa utilizada al elaborar los ensilados, son provocadas por las diferencias propias de cada especie. De acuerdo a Jung, (2012) las pectinas están conformadas por un diverso grupo de polisacáridos, que determinan que sean además más o menos solubles en el rumen. Además, Cassida et al., (2007) señalan que la concentración de pectinas es mayor en las leguminosas (7,5-11,2% MS) en comparación con los pastos (2,7-6,0% MS), sin embargo, la concentración de pectinas pueden ser reducida hasta la mitad de la concentración original del forraje durante el ensilaje (Yahaya et al., 2001), tal y como se determinó en esta investigación.

Por otra parte, las pectinas son abundantes en tejidos blandos como las cáscaras de frutas (HappiEmaga et al., 2008; McDonald et al., 2010). En el proceso de degradación de las pectinas se libera ácidos urónicos, que al ser hidrolizados liberan ácido péctico y metanol, el primero da origen a los ácidos galacturónicos, que se convierten en xilosa; mientras que el segundo es reducido en condiciones ruminales a metano (McDonald et al., 2010).

En esta investigación se determinó que el contenido de pectinas está correlacionado con la concentración de los ácidos grasos volátiles en el licor ruminal. Sin embargo, la relación con los ácidos es inversa a la esperada, ya que las pectinas son compuestos que forman parte de la pared celular (Harholt et al., 2010). La fibra está relacionada directamente con la producción de ácido acético en rumen, mientras que se correlaciona de manera negativa con la producción de ácido propiónico; cuya síntesis es estimulada por medio del almidón (Owens y Basalan, 2016). Este efecto puede ser debido a la alta concentración de almidón del guineo cuadrado (Cuadro 1) que disfracen el efecto de la pectina o a condiciones de pH, temperatura y el tiempo de exposición a ambos durante el ensilaje; que podrían afectar la extracción de la pectina (Oliveira et al., 2016) o generar precipitados de detergentes cuaternarios debido a las condiciones ácidas de pH en el ensilaje (Cassida et al., 2007); efectos que deben ser analizados a mayor profundidad en otras investigaciones.

Fibra en Detergente Neutro Digestible (dFDN)

La concentración de fibra digestible fue influenciada y generó diferencias por el efecto de el nivel de sustitución por fruto de guineo cuadrado ($p < 0,001$) cuando se expresó como parte de la materia seca. Al ser expresada como parte de la materia seca, la concentración de fibra en detergente neutro digestible sufre una reducción, conforme se incrementa la cantidad de fruto de guineo cuadrado en la mezcla ensilada. El promedio de fibra digestible en los tratamientos sin fruto fue mayor (26,5% MS) que el promedio de los tratamientos con 45% de fruto en la mezcla (12,4% MS), además, la disminución en la cantidad de fibra digestible se reduce a una tasa de 4,7% por cada incremento de 15% de fruto en la mezcla ensilada.

El comportamiento de la dFDN es el esperado ya que conforme se aumenta la cantidad de fruto de guineo cuadrado, así disminuye la dFDN. Esta situación se asocia a que el fruto es una materia prima con menor contenido de lignina y fibra en detergente neutro, comparada con los forrajes de Poró y *Cratylia* (Cuadro 1) y a que la ecuación de estimación de la dFDN considera la concentración de fibra total, la concentración de lignina y la relación de ambas en el material (Detmann et al., 2008; Sampaio et al., 2012). Los valores obtenidos son comparables a los resultados obtenidos por Rojas-Cordero, (2018) con ensilados de Morera (*Morus alba*) y Nacedero (*Trichantera gigantea*) con guineo cuadrado, quien también encontró este mismo efecto

La digestibilidad de la fibra es un factor de la dieta que puede afectar el consumo de materia seca y la productividad de los animales, ya que la digestibilidad de la fibra tiene mayor impacto en la producción comparada con la digestibilidad de cualquier otro nutrimento

(Combs, 2014). Por otra parte, Krizsan y Huhtanen, (2013) indican que aunque el contenido de lignina está relacionado con la digestibilidad de la fibra, es importante el considerar otros factores como: la composición de la dieta y el ambiente ruminal.

Parámetros de fermentación ruminal

No se determinaron diferencias significativas en la producción de nitrógeno amoniacal entre especies de leguminosas, con promedio 93,4 mgNH₄/L de licor ruminal en los tratamientos elaborados con Cratylia y 95,2 mgNH₄/L de licor ruminal en los tratamientos con Poró. Sin embargo, si fue posible detectar diferencias significativas ($p=0,036$) por efecto del nivel de sustitución del forraje por fruto de guineo cuadrado (Cuadro 3). De esta manera, el promedio de concentración NH₄ en licor ruminal mayor se detectó en el tratamiento con 0% de inclusión de guineo cuadrado (112,1 mgNH₄/L de licor ruminal), mientras que la menor concentración fue detectada en el tratamiento con 45% de inclusión de guineo cuadrado (81,1 mgNH₄/L de licor ruminal), esta disminución fue progresiva conforme se aumentó la cantidad de fruto en la mezcla ensilada.

Cuadro 3. Medias de concentración parámetros fermentativos a 24 horas de los ensilados de leguminosas con frutos de guineo cuadrado después de 50 días de fermentación. Centro de Investigación en Nutrición Animal, San José, Costa Rica, 2018

	Poró				Cratylia				E.E.
	0	15	30	45	0	15	30	45	
Nitrógeno amoniacal ¹	112 ^b	99 ^a	85 ^a	84 ^a	112 ^b	96 ^a	88 ^a	78 ^a	1,06
Estimación proteína microbiana (PM) ²	81,3 ^a	93,9 ^b	98,2 ^c	108,2 ^d	84,2 ^a	94,6 ^b	104,6 ^c	107,9 ^d	1,90
Á. Propiónico ³	48,7 ^a	72,8 ^b	65,0 ^b	57,5 ^b	43,9 ^a	42,9 ^a	45,3 ^a	46,2 ^a	4,42
Á. Acético ³	36,0 ^b	18,3 ^a	27,4 ^b	31,4 ^b	43,6 ^c	43,9 ^c	43,6 ^c	42,1 ^c	2,94
Á. Butírico ³	14,3	8,2	7,3	10,1	12,1	12,6	11,8	11,2	1,86
g CH ₄ /kg MS	3,2 ^a	2,0 ^a	2,0 ^a	3,0 ^a	11,9 ^b	10,5 ^b	8,3 ^b	6,4 ^b	2,04
g CH ₄ /kg MSD	5,1 ^a	2,2 ^a	2,5 ^a	3,6 ^a	18,2 ^b	14,6 ^b	10,2 ^b	7,7 ^b	2,80

¹mg NH₄/L fluido ruminal.²g PM/kg MS.³moles ácido/100moles. MS=materia seca.MSD=materia seca digestible.Letras distintas en la misma fila son diferentes (p<0,05)

Además, se pudo determinar que existe correlación negativa significativa ($\rho = -0,46$; $p = 0,012$) entre la concentración de nitrógeno amoniacal y de almidón y entre la concentración de nitrógeno amoniacal y el total de nutrimentos digestibles ($\rho = -0,46$; $p = 0,012$), sin embargo, fue posible calcular una correlación entre el contenido de nitrógeno amoniacal y la cantidad de proteína cruda en los ensilados ($\rho = 0,51$; $p < 0,001$).

En la Figura 1 se muestra la simulación de comportamiento esperado en la concentración de nitrógeno amoniacal a partir del uso de los ensilados generados en esta investigación. De esta manera, se determinó que se genera una reducción en la concentración de nitrógeno amoniacal al pasar de una dieta 100% pasto (146,1 mgNH₄/L de licor ruminal), a una dieta con 60:40 pasto:ensilado que además tiene 45% de guineo cuadrado (118,9 y 121,3 mgNH₄/L de licor ruminal).

Al realizar una estimación de la producción de proteína microbial que podrían estimular estos ensilados se detectó que conforme aumenta la cantidad de guineo cuadrado, así se incrementa la cantidad de proteína microbial que, de manera potencial podría estimular cada kg de materia seca de ensilado (Cuadro 3). En promedio los tratamientos sin fruto mostraron un menor potencial de producción de proteína microbial (82,8 gPM/kg MS), en comparación con el promedio de los tratamientos con mayor inclusión de guineo cuadrado (108,1 gPM/kg MS).La producción de proteína microbial potencial se incrementa debido a la cantidad de energía presente en el guineo cuadrado (Cuadro 1), que incrementa el valor energético de los ensilados y que funciona como fuente de energía para ser aprovechados por los microorganismos del rumen, siempre y cuando haya un adecuado aporte de nitrógeno en la dieta (Uddin et al., 2015).

Se determinó que tanto el ácido propiónico como el ácido acético, muestran diferencias significativas (ambas $p < 0,05$) por el efecto de la interacción entre el nivel de sustitución por fruto de guineo cuadrado y la especie de leguminosa arbustiva utilizada para elaborar los ensilados. Mientras que no fue posible detectar diferencias en la producción de ácido butírico, a pesar de esto los valores encontrados fluctuaron entre 7,3 – 14,3 mol/100mol AGV (Cuadro 3).

En cuanto al ácido acético, se determinó que los tratamientos elaborados con Cratylia presentaron promedio mayor (43,1 mol/100 mol AGV) que los tratamientos con Poró de (28,3 mol/100 mol AGV). Además, se detectó que los tratamientos con 15% de sustitución por fruto de guineo cuadrado presentaron una media inferior (31,2 mol/100 mol AGV) a los promedios

de los demás niveles de sustitución, siendo la media de los tratamientos con 45% de sustitución la de mayor concentración (39,8 mol/100 mol AGV).

Por su parte, el ácido propiónico presenta mayor media de concentración en los tratamientos elaborados con Poró (61,0 mol/100 mol AGV) en comparación con los tratamientos en que se utilizó Cratylia (44,6 mol/100 mol AGV). También fue posible determinar coeficientes de correlación entre las concentraciones de ácido acético y de ácido propiónico ($\rho = -0,97$; $p < 0,001$); también entre las concentraciones de ácido propiónico y de ácido butírico ($\rho = -0,79$; $p < 0,001$) y entre las concentraciones de ácido acético y de ácido butírico ($\rho = 0,62$; $p < 0,001$).

La producción de metano de los materiales ensilados fue influenciada por el efecto de la especie de leguminosa ($p < 0,001$), donde el promedio de los tratamientos elaborados con Poró fue menor (2,6 gCH₄/kg MS y 3,4 gCH₄/kg MSD) que la media de los tratamientos en los que se utilizó Cratylia (10,1 gCH₄/kg MS y 12,7 gCH₄/kg MSD). También, fue posible determinar diferencias significativas provocadas por el nivel de sustitución del forraje por fruto de guineo cuadrado ($p = 0,015$) de manera que, al aumentar la cantidad de fruto de guineo cuadrado en la mezcla ensilada, se reduce la producción de metano, siendo el tratamiento con 45% de sustitución el que mostró la menor producción del gas (5,1 gCH₄/kg MS y 5,6 gCH₄/kg MSD) en comparación con el tratamiento sin fruto que presentó la media más alta de producción de metano (8,2 gCH₄/kg MS y 11,7 gCH₄/kg MSD).

En los resultados de la simulación de dieta donde se utilizaron niveles crecientes de los ensilados, se detectó que tanto el tratamiento que demostró menor producción de metano (gCH₄/kg MS; metano bajo), como el tratamiento que presentó la media mayor de producción de metano (metano alto), tienen el potencial para reducir la emisión de metano de una novilla Jersey 290±16 kg, que consume 8,1 kg de materia seca por día de pasto *BrachiariadecumbenscvBasilisk* sin fertilizar y con edad de cosecha 35 días y que emiten diariamente 141 gCH₄/día. Además, esta reducción es proporcional a la cantidad de ensilado utilizado en sustitución del pasto (Figura 1).

Asimismo, se detectaron las correlaciones entre la producción de metano y la concentración de ácido acético ($\rho = 0,65$; $p < 0,001$) y entre la concentración de ácido propiónico con la producción de metano ($\rho = -0,58$; $p < 0,001$). Además, se determinó que el contenido de almidón y la concentración de pectinas en los ensilados se correlacionaron negativamente con la producción de metano (-0,53 y -0,54, respectivamente; ambas $p < 0,001$).

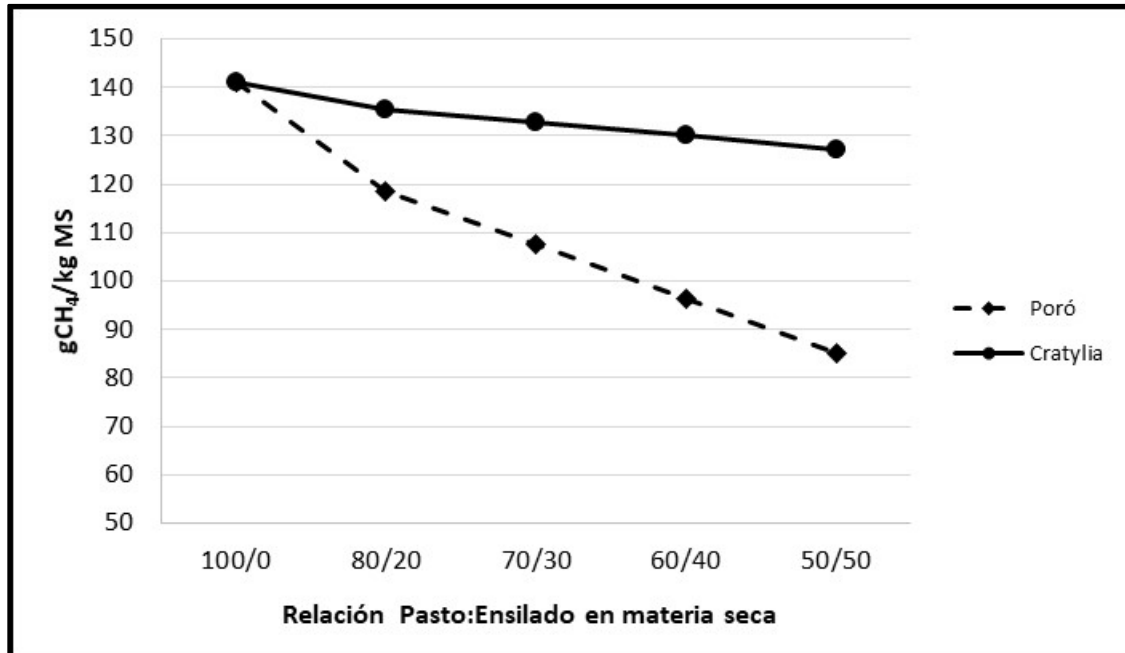


Figura 1. Estimación del efecto de utilizar niveles crecientes de los tratamientos con la mayor y menor producción de metano, sobre la emisión de una novilla Jersey 290 ± 16 kg, que consume 8,1 kg MS/d de pasto *Brachiariadecumbens* y 141 gCH₄/día.

La concentración de NH₄ disminuye conforme se reduce el contenido de proteína cruda en los ensilados (Cuadros 2 y 3), esto se debe a que hay menor contenido de compuestos nitrogenados, que pueden ser aprovechados por los microorganismos del rumen y estimular la producción de proteína microbiana, en sincronía con las fuentes de energía de rápida y media degradación como: los azúcares y el almidón (Azizi-Shotorkhoft et al., 2012; Dewhurst, 2013). Este parámetro de fermentación ha sido utilizado como indicador de calidad de las condiciones del rumen para la actividad microbiana, principalmente de las bacterias fibrolíticas, que utilizan el amonio como fuente de nitrógeno para su crecimiento (Lazzarini et al., 2009).

Todos los tratamientos mostraron de manera individual, valores de concentración de nitrógeno amoniacal que superan el valor de 50,0 mgNH₄/L de licor ruminal, que es el mínimo requerido para que los microorganismos del rumen crezcan de manera adecuada, además se ubican entre el ámbito 85,0-300 mgNH₄/L de licor ruminal (Gumilar et al., 2018), esto permite afirmar que estos materiales permiten mantener un ambiente propicio para la producción de proteína microbiana y la degradación de la fibra (Detmann et al., 2009).

Sin embargo, Leng (1990) indica que los niveles óptimos de nitrógeno amoniacal en dietas tropicales deben tener un límite mayor ubicarse entre 100-200 mgNH₄/L de licor ruminal, debido a que las dietas utilizadas en el trópico son predominantes en el uso de forrajes y estos carbohidratos demoran en estar disponibles y ser aprovechados por las bacterias. Por otra parte Chamberlain et al., (1993) indican que parte del nitrógeno amoniacal producido en el rumen puede haber sido transformado en proteína microbiana, de manera que se obtienen concentraciones bajas cuando se analiza este parámetro.

Al ser utilizados en complemento con un pasto con contenidos de proteína cruda propios de condiciones tropicales, se observa que la concentración nitrógeno amoniacal se mantiene por arriba del límite crítico propuesto por Leng (1990) y mencionado por Paulino et al., (2006), de manera que no se compromete la síntesis de proteína microbiana, ni la degradación de la fibra en el rumen, de forma contraria, sucede un adecuado aprovechamiento del nitrógeno y se aprovecha el almidón de los frutos como fuente de energía, aunque se debe analizar la resistencia de este almidón a ser degradado en el rumen (Lehmann et al., 2002; Bello-Lara et al., 2014), ya que la amilosa confiere esta resistencia y su concentración varía entre variedades, se debe realizar más investigación en este sentido (Dufour et al., 2009).

Otro factor relacionado con una disminución en la concentración de nitrógeno amoniacal ruminal, es el contenido de taninos en los forrajes y alimentos consumidos (Monsalve et al., 2006), ya que los taninos tienen la facilidad de enlazarse con las proteínas y evitar que sean degradadas por los microorganismos del rumen, lo que reduce la cantidad de proteína degradable, en aumento de la proteína de sobrepaso (Huyen et al., 2016).

La concentración de ácido butírico obtenida en los tratamientos se encuentra dentro de los valores reportados como esperados por Owens y Basalan, (2016). Sin embargo, la concentración de los ácidos propiónico y acético, fueron distintas a las obtenidas en otras investigaciones, donde el ácido acético tiene mayor concentración que el propiónico (Ahvenjärvi et al., 2002; Hess et al., 2004; Morgavi et al., 2008). Las relaciones entre ácidos obtenidas en los tratamientos elaborados con *Cratylia*, son similares a la descrita en McDonald et al., (2010) en dietas de ovinos donde se utiliza 80% de concentrado y 20% de heno. Mientras que en los tratamientos en que se utilizó Poró, las relaciones son de 1,4-4,0 veces la cantidad de ácido propiónico en comparación con el ácido acético.

De acuerdo a Owens y Basalan, (2016), la mayor parte de la energía disponible para los microorganismos del rumen proviene de la conversión de los carbohidratos del alimento a glucosa, pentosas y triosas, que a su vez son transformadas a ácidos grasos volátiles, además McDonald et al., (2010) señalan que la relación entre los ácidos grasos volátiles depende del tipo de alimento, la cantidad de alimento utilizada y las condiciones de fermentación,

principalmente el pH del licor ruminal. Asimismo, Rotger et al., (2006), mencionan que los carbohidratos no estructurales y las proteínas poseen diferentes velocidades de degradación en el rumen, situación que puede impactar en el crecimiento de las poblaciones de microorganismos en el licor ruminal.

Por todo lo anterior y con base en los valores obtenidos por medio de los coeficientes de Pearson, se puede inferir que, las diferencias obtenidas en las concentraciones de los ácidos acético y propiónico provienen de un efecto de tiempo de incubación de las muestras, ya que 24 horas no parece ser tiempo suficiente para que ocurra plena formación y se maximice la concentración de acetato. Rojas-Bourrillon, (1995) indica que a las 24 horas apenas se ha degradado el 35% de la fibra, que es responsable de la formación del ácido acético, mientras que el almidón (precursor de propionato) es degradado totalmente después de 18 horas.

Las diferencias por especie de leguminosa pueden ser debidas al contenido de taninos presentes en las leguminosas. López-Herrera, (2017) indicó que la *Cratylia* es una arbustiva que posee menor (1,09% MS) contenido de taninos con respecto al Poró (3,35% MS). Los taninos tienen la capacidad de reducir la digestión de la fibra en el rumen, además de disminuir la actividad de los microorganismos metanogénicos (Hook et al., 2010). Estos compuestos están presentes en las plantas forrajeras y en gran medida en leguminosas tropicales (Archimède et al., 2011), lo que les confiere a estas plantas la capacidad de reducir la producción de metano entérico, en comparación con otros forrajes o leguminosas de clima templado (Puchala et al., 2005; Archimède et al., 2011; Archimède et al., 2015).

La producción de metano también se ve disminuida por la baja producción de ácido acético, ya que en el proceso de formación de este ácido se libera el dióxido de carbono y los iones de hidrógeno que se utilizan durante la metanogénesis (Duncan, 2014). La baja producción de acetato es debida a una menor actividad de los organismos celulolíticos, no sólo porque la colonización de la fibra toma más tiempo, sino que al producirse más propionato, se genera una reducción en el pH del licor ruminal lo que acrecienta el impacto sobre la actividad de las bacterias celulolíticas y así sobre la producción de ácido acético (Rojas-Bourrillon, 1995). A pesar de esto se determinaron correlaciones importantes entre los ácidos grasos volátiles y la producción de metano, que permiten justificar estos resultados.

Los valores de producción de metano obtenidos en esta investigación son congruentes con los publicados por Meale et al., (2012), en leguminosas tropicales, además se considera que existe un efecto adicional en la reducción de la producción de metano, al tratarse de materiales ensilados, esto concuerda con lo reportado en Navarro-Villa et al., (2013). Por otra parte, se observa que, el uso de estos materiales en complemento con una dieta de pasto de piso permiten disminuir la producción de metano por animal/ día, lo que puede impactar

positivamente en la productividad de los animales, ya que hay menos energía que se pierde como metano.

CONSIDERACIONES FINALES

La inclusión de guineo cuadrado redujo el contenido de proteína cruda y la cantidad de fibra digestible, al mismo tiempo que aumentó el contenido de pectinas y almidón total en los materiales ensilados, estos cambios provocados por el fruto de guineo cuadrado provocan que estos materiales deban ser balanceado dentro de una dieta que permita cubrir las carencias de cada mezcla. Además, permite reducir la cantidad de gas metano que emiten los bovinos en sistemas de pastoreo con pastos tropicales, lo que aumenta la energía disponible para la producción de leche o carne. Sin embargo, debe realizar más investigación en cuanto al impacto sobre la producción de ácidos grasos volátiles, el impacto del almidón del guineo cuadrado y los tiempos de incubación de la muestra.

LITERATURA CITADA

- Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., & Huhtanen, P. (2002). Supplementing barley or rapeseed meal to dairy cows fed grass-red clover silage: I. Rumen degradability and microbial flow. *Journal of Animal Science*, 80(8), 2176-2187.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 1998. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th ed, 4th rev. Gaithersburg, MD
- Archimède H., Eugène M., Marie Magdeleine C., Boval M., Martin C., Morgavi D.P., Lecomte P., & Doreau M. (2011). Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 59-64.
- Archimède, H., González-García, E., Despois, P., Etienne, T., & Alexandre, G. (2010). Substitution of corn and soybean with green banana fruits and *Gliricidia sepium* forage in sheep fed hay-based diets: effects on intake, digestion and growth. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94(1), 118-128.
- Archimède, H., Rira, M., Barde, D.J., Labirin, F., Marie-Magdeleine, C., Calif, B., Periacarpin, F., Fleury, J., Rochette, Y., Morgavi, P., & Doreau, M. 2015. Potential of tannin-rich plants, *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium* and *Manihot esculenta*, to reduce enteric

methane emissions in sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 414–422

Azizi-Shotorkhoft, A., Rouzbehan, Y., &Fazaeli, H. (2012). The influence of the different carbohydrate sources on utilization efficiency of processed broiler litter in sheep. *Livestockscience*, 148(3), 249-254.

Barrera, J. L., Arrazola, G. S., & Cayón, D. G. (2010). Caracterización fisicoquímica y fisiológica del proceso de maduración de plátano Hartón (*Musa* AAB Simmonds) en dos sistemas de producción. *Acta Agronómica*, 59(1), 20-29.

Beauchemin, K. A., Kreuzer, M., O'mara, F., &McAllister, T. A. (2008). Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(2), 21-27.

Bello-Lara, J.E., Balois-Morales, R., Sumaya-Martínez, M.T., Juárez-López, P., Rodríguez-Hernández, A.I., Sánchez-Herrera, L.M.,& Jiménez-Ruíz, E.I. 2014. Extracción y caracterización reológica de almidón y pectina en frutos de plátano 'Pera' (*Musa* ABB). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8: 1501 – 1507.

Benchaar, C., Hassanat, F., Gervais, R., Chouinard, P. Y., Petit, H. V., & Massé, D. I. 2014. Methane production, digestion, ruminal fermentation, nitrogen balance, and milk production of cows fed corn silage-or barley silage-based diets. *Journal of Dairy Science*, 97(2), 961-974 pp

Boadi, D., Benchaar, C., Chiquette, J. &Massé, D. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*. 84: 319–335.

Boval, M., & Dixon, R. M. (2012). The importance of grasslands for animal production and other functions: a review on management and methodological progress in the tropics. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 6(5), 748.

Calsamiglia, S., Ferret, A., Reynolds, C. K., Kristensen, N. B., & Van Vuuren, A. M. (2010). Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 4(7), 1184.

Cassida, K. A., Turner, K. E., Foster, J. G., & Hesterman, O. B. (2007). Comparison of detergent fiber analysis methods for forages high in pectin. *Animal feed science and technology*, 135(3-4), 283-295.

- Castillo M., A., R., Rojas-Bourrillon, & R., WingChing-Jones. 2009. (2009). Valor nutricional del ensilaje de maíz cultivado en asocio con vigna ("Vigna radiata"). *Agronomía costarricense: Revista de ciencias agrícolas*, 33(1), 133-146.
- Chamberlain, D. G., Robertson, S., & Choung, J. J. (1993). Sugars versus starch as supplements to grass silage: effects on ruminal fermentation and the supply of microbial protein to the small intestine, estimated from the urinary excretion of purine derivatives, in sheep. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63(2), 189-194.
- Combs, D. 2014. Using In Vitro Total-Tract NDF Digestibility in Forage Evaluation. *Focus on Forage* 15(2):1-3.
- Der Bedrosian, M. C., Nestor Jr, K. E., & Kung Jr, L. 2012. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 5115-5126
- Detmann, E., Paulino, M. F., Mantovani, H. C., Valadares Filho, S. D. C., Sampaio, C. B., de Souza, M.A., Lazzarini I., & Detmann, K. S. (2009). Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis–Menten kinetics. *Livestock Science*, 126(1-3), 136-146.
- Detmann, E., S.C. Valadares Filho, D.S. Pina, L.T. Henriques, M.F. Paulino, K.A. Magalhães, P.A. Silva, & Chizzotti M.L. (2008). Prediction of the energy value of cattle diets based on the chemical composition of the feeds under tropical conditions. *Animal Feed Science and Technology*, 143(1-4), 127-147.
- Dewhurst, R. (2013). Milk production from silage: comparison of grass, legume and maize silages and their mixtures. *Agricultural and food science*, 22(1), 57-69.
- Dijkstra, J., Oenema, O., & Bannink, A. 2011. Dietary strategies to reducing N excretion from cattle: implications for methane emissions. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 3: 414–422
- Di-Rienzo, J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez., M. Tablada, Y.C. Robledo. (2019). InfoStat versión 2019. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, ARG (2019)
- Dufour, D., Gibert, O., Giraldo, A., Sánchez, T., Reynes, M., Pain, J.P., González, A., Fernández, A., & Díaz, A. 2009. Differentiation between cooking bananas and dessert bananas. 2. Thermal and functional characterization of cultivated colombian Musaceae (*Musa* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(17): 7870 – 7876.

- Duncan, A.V.M. 2014. Reduction of Enteric Methane Production: A Nutritional Approach. Tesis doctoral. Universidad de Carolina del Norte A&T en Greensboro. Estados Unidos. 123p
- González Arcia, M., Valles de la Mora, B., Alonso Díaz, M. Á., Castillo Gallegos, E., Ocaña Zavaleta, E., & Jarillo Rodríguez, J. (2012). Effect of grazing *Cratylia argentea* associated with *Brachiaria brizantha*-Toledo on quality pasture and weight gain in Holstein × Zebu heifers. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(Suppl. 2).15(2):1-11
- Gumilar, D. A. K. W., Rianto, E., & Arifin, M. (2018, February). The Concentrations of Rumen Fluid Volatile Fatty Acids and Ammonia, and Rumen Microbial Protein Production in Sheep Given Feed During the Day and Night Time. In: IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science* (Vol. 119, No. 1, p. 012045). IOP Publishing.
- Happi-Emaga, T., C. Robert, S.N. Ronkart, B. Wathélet, & Paquot M. (2008). Dietary fibre components and pectin chemical features of peels during ripening in banana and plantain varieties. *Bioresource Technology*, 99(10), 4346-4354.
- Haque, M. N., Cornou, C., & Madsen, J. (2014). Estimation of methane emission using the CO₂ method from dairy cows fed concentrate with different carbohydrate compositions in automatic milking system. *Livestock Science*, 164, 57-66.
- Harholt, J., Suttangkakul, A., & Scheller, H. V. (2010). Biosynthesis of pectin. *Plant physiology*, 153(2), 384-395.
- Hess, H. D., Beuret, R. A., Lötscher, M., Hindrichsen, I. K., Machmüller, A., Carulla, J. E., Lascano C.E., & Kreuzer, M. (2004). Ruminal fermentation, methanogenesis and nitrogen utilization of sheep receiving tropical grass hay-concentrate diets offered with *Sapindus saponaria* fruits and *Cratylia argentea* foliage. *Animal Science*, 79(1), 177-189.
- Hook, S.E., Wright, A.D.G., & McBride, B.W. 2010. Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. *Archaea* 2010. 11 p
- Huyen, N. T., Desrues, O., Alferink, S. J. J., Zandstra, T., Verstegen, M. W. A., Hendriks, W. H., & Pellikaan, W. F. (2016). Inclusion of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage in dairy cow rations affects nutrient digestibility, nitrogen utilization, energy balance, and methane emissions. *Journal of dairy science*, 99(5), 3566-3577.

- Jiao, H. P., Yan, T., McDowell, D. A., Carson, A. F., Ferris, C. P., Easson, D. L., & Wills, D. (2013). Enteric methane emissions and efficiency of use of energy in Holstein heifers and steers at age of six months. *Journal of Animal Science*, 91(1), 356-362.
- Jiménez-Ferrer, G., Mendoza-Martínez, G., Soto-Pinto, L., & Alayón-Gamboa, A. (2015). Evaluation of local energy sources in milk production in a tropical silvopastoral system with *Erythrina poeppigiana*. *Tropical animal health and production*, 47(5), 903-908.
- Jung, H. G. (2012). Forage digestibility: the intersection of cell wall lignification and plant tissue anatomy. In Proceedings of the 23rd annual Florida ruminant nutrition symposium (pp. 162-174).
- Karkalas, J. 1985. An improved enzymic method for the determination of native and modified starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36: 1016.
- Knapp, J. R., Laur, G. L., Vadas, P. A., Weiss, W. P., & Tricarico, J. M. (2014). Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of dairy science*, 97(6), 3231-3261.
- Kongmanila, D., Bertilsson, J., Ledin, I., & Wredle, E. (2012). Utilisation of some *Erythrina* species and biomass production of *Erythrina variegata*. *Livestock Research for Rural Development*, 24(8). Consultado el 8 de febrero del 2019 a las 3:30pm en la dirección <http://www.lrrd.org/lrrd24/8/daov24137.htm>
- Krizsan, S.J., & Huhtanen, P. 2013. Effect of diet composition and incubation time on feed indigestible neutral detergent fiber concentration in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 96(3): 1715-1726.
- Lascano, C. E., & Cárdenas, E. (2010). Alternatives formethaneemissionmitigation in livestock systems. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 175-182.
- Lazo-Salas, G.J., Rojas-Bourrillón, A., Campos-Granados, C.M., Zumbado-Ramírez, C., & López-Herrera, M. (2018). Caracterización fermentativa y nutricional de mezclas ensiladas de corona de piña con guineo cuadrado Musa (ABB) I. Parámetros fermentativos, análisis bromatológico y digestibilidad in vitro. *Nutrición animal tropical*, 12(1), 59-79.
- Lazzarini, I., Detmann, E., Sampaio, C. B., Paulino, M. F., Valadares Filho, S. D. C., Souza, M. A. D., & Oliveira, F. A. (2009). Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(10), 2021-2030.

- Lehmann, U., Jacobasch, G., & Schmiedl, D. 2002. Characterization of resistant starch type III from banana (*Musa acuminata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(18): 5236 – 5240.
- Leng, R. A. (1990). Factors affecting the utilization of 'poor-quality' forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutrition research reviews*, 3(1), 277-303.
- López-Herrera, M. 2017. Efecto del ensilado de cuatro leguminosas en mezcla con diferentes fuentes de carbohidratos sobre la fermentación, calidad nutritiva y producción de metano. Tesis de maestría. 139p
- López-Herrera, M., Rojas-Bourrillon, A., & Zumbado Ramírez, C. (2017). Características nutricionales y fermentativas de ensilados de pasto Camerún con plátano Pelipita. *Agronomía Mesoamericana*, 28(3), 629-642.
- López-Herrera, M., & Briceño-Arguedas, E. (2016). Efecto de la frecuencia de corte y la precipitación en el rendimiento de *Cratylia argentea* orgánica. *Nutrición animal tropical*, 10(1), 24-44.
- López-Herrera, M., Rojas-Bourrillon, A., & Briceño-Arguedas, E. (2019). Sustitución del pasto *Megathyrsus maximus* por guineo cuadrado y urea en mezclas ensiladas. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 179-194.
- Loyola, N., Nuñez, P., & Acuña, C. 2013. Extracción y análisis de pectinas a partir de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. O'Neill. *Revista FCA UNCUYO*, 45(1): 79-89 pp.
- Mc Geough, E. J., O'kiely, P., Hart, K. J., Moloney, A. P., Boland, T. M., & Kenny, D. A. (2010). Methane emissions, feed intake, performance, digestibility, and rumen fermentation of finishing beef cattle offered whole-crop wheat silages differing in grain content. *Journal of Animal Science*, 88(8), 2703-2716.
- McDonald P., R.A. Edwards, J.F.D. Greenhalgh, C.A. Morgan, L.A. Sinclair, R.G. Wilkinson. 2010. *Animal Nutrition*. United Kingdom. Editorial Pearson United Kingdom.
- Meale, S., Chaves, A., Baah, J., & McAllister, T. 2012. Methane production of different forages in In Vitro ruminal fermentation. *Asian- Australian Journal of Animal Science*. 25(1): 86-91 pp.
- Mohapatra D., Mishra, S., & Sutar, N. (2010). Banana and its by-product utilization: an overview. *Journal of scientific & industrial research*, 69(5): 323 – 329.

- Monsalve, L., Ávila, P., & Lascano, C. 2006. Fermentación ruminal, flujo de proteína al duodeno y absorción de N en ovinos alimentados con mezclas de leguminosas. Segundo taller de taninos en la nutrición de rumiantes. Colombia. 46 p.
- Montenegro, J., &Barrantes, E. 2016. Implementación de la técnica de hexafluoruro de azufre para cuantificar metano entérico en bovinos en Costa Rica. *Revista de Ciencias Ambientales*. 50(2): 62-74
- Morgavi, D. P., Jouany, J. P., & Martin, C. (2008). Changes in methane emission and rumen fermentation parameters induced by refaunation in sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(2), 69-72.
- Moss, A. R., Jouany, J. P., &Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de zootechnie*, 49(3), 231-253
- Navarro-Villa, A., O'Brien, M., López, S., Boland, T.M., &O'Kiely, P. 2013. In vitro rumen methane output of grasses and grass silages differing in fermentation characteristics using the gas production technique (GPT). *Grass and Forage Science* 68(2): 228 – 244.
- Oliveira, T. Í. S., Rosa, M. F., Cavalcante, F. L., Pereira, P. H. F., Moates, G. K., Wellner, N., Mazzetto, S.E., Waldron, K.W., &Azeredo, H. M. (2016). Optimization of pectin extraction from banana peels with citric acid by using response surface methodology. *Food Chemistry*, 198, 113-118.
- Owens F.N., and M. Basalan. 2016. Ruminal Fermentation. Rumenology. Switzerland.Springer International Publishing.
- Paulino, M. F., Detmann, E., & Valadares Filho, S. C. (2006). Suplementação animal em pasto: energética ouprotéica. Simpósio sobre manejo estratégico da pastagem, 3(2006), 359-392.
- Pelissari, F. M., Andrade-Mahecha, M. M., Sobral, P. J. D. A., & Menegalli, F. C. (2012). Isolation and characterization of the flour and starch of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *Starch-Stärke*, 64(5), 382-391.
- Pinski, B.N. 2013. Evaluating the effects of essential oils and condensed tannin on fermentation and methane production under in vitro conditions Tesis de Maestría. Universidad del Sur de Illinois, Carbondale. Estados Unidos. 82p.

- Puchala, R., Min, B.R., Goetsch, A.L., Sahlu, T. 2005. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. *Journal of Animal Science*. 83(1): 182-186.
- Ravi, I., & Mustaffa, M.M. 2013. Starch and amylose variability in banana cultivars. *Indian Journal of Plant Physiology* 18(1): 83 – 87.
- Relling, E. A., Van Niekerk, W. A., Coertze, R. J., & Rethman, N. F. G. (2001). An evaluation of *Panicum maximum* cv. Gatton: 2. The influence of stage of maturity on diet selection, intake and rumen fermentation in sheep. *South African Journal of Animal Science*, 31(2), 85-92.
- Rojas-Bourrillon, A. 1995. Conceptos básicos de nutrición de rumiantes. Escuela de Zootecnia. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 178p.
- Rojas-Cordero, D. 2018. Efecto del guineo cuadrado (*Musa* sp.), sobre la calidad nutricional y fermentativa de ensilajes de Morera (*Morus alba*) y Nacedero (*Trichanthera gigantea*). Tesis Lic. Universidad Nacional de Costa Rica. Heredia, Costa Rica
- Rotger, A., Ferret, A., Calsamiglia, S., & Manteca, X. (2006). Effects of nonstructural carbohydrates and protein sources on intake, apparent total tract digestibility, and ruminal metabolism in vivo and in vitro with high-concentrate beef cattle diets. *Journal of animal science*, 84(5), 1188-1196.
- Sampaio, C. B., Detmann, E., Valadares Filho, S. D. C., Queiroz, A. C. D., Valente, T. N. P., Silva, R. R., Souza.M.A., & Costa, V. A. C. (2012). Evaluation of models for prediction of the energy value of diets for growing cattle from the chemical composition of feeds. *Revista brasileira de zootecnia*, 41(9), 2110-2123.
- Solano, J., & Villalobos, R. (2001). Aspectos fisiográficos aplicados a un bosquejo de regionalización geográfico climático de Costa Rica. *Tópicos meteorológicos y oceanográficos*, 8(1):26-39,
- Uddin, M.J., Khandaker, Z.H., Khan, M., & Khan, M.M.H. 2015. Dynamics of microbial protein synthesis in the rumen-A review. *Annals of Veterinary and Animal Science* 2(5): 2312-9123.
- Van Soest, P. V., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*, 74(10), 3583-3597.

- Vivasane, S., & Preston, T. R. (2016). Effect of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and Erythrina (*E. subumbrans*) foliage on growth of goats fed basal diets of banana (*Musa* spp) leaves or Elephant grass (*Pennisetum purpureum*). *Livestock Research for Rural Development*, 2(8). Consultado el 8 de febrero del 2019 a las 3:30pm en la dirección <http://www.lrrd.org/lrrd28/12/khao28215.html>
- Wang, Q. 2012. Nutritional strategies to mitigate greenhouse gas emissions from cattle production. Tesis doctoral. Universidad de California en Davis. Estados Unidos. 123p.
- Yahaya, M. S., Kimura, A., Harai, J., Nguyen, H. V., Kawai, M., Takahashi, J., & Matsuoka, S. (2001). Evaluation of structural carbohydrates losses and digestibility in alfalfa and orchard grass during ensiling. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 14(12), 1701-1704.
- Zebeli, Q., Mansmann, D., Steingass, H., & Ametaj, B. N. (2010). Balancing diets for physically effective fibre and ruminally degradable starch: A key to lower the risk of sub-acute rumen acidosis and improve productivity of dairy cattle. *Livestock Science*, 127(1), 1-10.
- Zhou, H., Li, M., Zi, X., Xu, T., & Hou, G. (2011). Nutritive value of several tropical legume shrubs in Hainan province of China. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(13), 1640-1648.