

**Efecto de la mezcla ensilada de *Pennisetum purpureum* y *Tithonia diversifolia* sobre la fermentación ruminal *in vitro* y su emisión de metano en el sistema RUSITEC**

Vilma A. Holguín <sup>a,b\*</sup>

Mario Cuchillo-Hilario <sup>c,d</sup>

Johanna Mazabel <sup>c</sup>

Stiven Quintero <sup>c</sup>

Jairo Mora-Delgado <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidad Nacional de Colombia - Palmira. A.A 237, Palmira, Colombia.

<sup>b</sup> Grupo de Investigación Sistemas Agroforestales Pecuarios, Universidad del Tolima, A.A. 546, Ibagué, Colombia.

<sup>c</sup> International Center for Tropical Agriculture (CIAT), A.A. 6713, Cali, Colombia.

<sup>d</sup> Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Departamento de Nutrición Animal, Ciudad de México, México.

\*Autor de correspondencia: vholguin@ut.edu.co

**Resumen:**

Los ganaderos del trópico tradicionalmente han usado dietas con base en gramíneas con limitaciones nutricionales. Tal deficiencia, exige la suplementación con otras especies forrajeras de alta calidad proteica. El objetivo de este estudio fue evaluar la asociación de *Pennisetum purpureum* (PP) y *Tithonia diversifolia* (TD), así como el efecto de la adición de bacterias ácido lácticas (BAL) sobre las variables de la cinética ruminal y la producción de metano en un sistema

de Simulación del Rumen (RUSITEC). Se emplearon cuatro tratamientos: T1) ensilaje de PP al 100% sin inóculo como grupo testigo; T2) mezcla de PP y TD (67:33%) sin inóculo; T3) mezcla de PP y TD (67:33%) adicionada con inóculo de BAL (*Lactobacillus paracasei* - T735); y T4) mezcla de PP y TD (67:33%) adicionada con inóculo comercial (Sil-all<sup>®4x4</sup>). Los datos se analizaron mediante un diseño completamente al azar. No hubo efecto de los tratamientos (T2, T3 y T4) *versus* testigo (T1) en la concentración de NH<sub>4</sub>-N ( $P<0.05$ ). En comparación con el control, T4 redujo a los ácidos grasos volátiles un 57 % ( $P<0.0001$ ). T4 redujo el CH<sub>4</sub> liberado, frente al testigo (T1) 1.36 y 2.43 (mmol/g), respectivamente ( $P<0.05$ ). La reducción de la población de protozoos ciliados no mostró diferencias ( $P>0.05$ ). La disminución en la emisión de CH<sub>4</sub> por gramo de MS en ensilajes (PP/TD), posiblemente se explica por una menor degradación de la fibra y sugiere que habrá menos emisiones de CH<sub>4</sub> por unidad de proteína comestible producida. Sin embargo, la cantidad total de metano que se libera no fue diferente estadísticamente.

**Palabras clave:** Defaunación, Fibra, Protozoos, Digestión, Ensilaje.

Recibido: 05/01/2018

Aceptado: 23/11/2018

## Introducción

En la zona tropical existe la mayor biodiversidad genética de plantas vasculares por unidad de área del mundo, no obstante esta riqueza, los sistemas de alimentación animal se han basado principalmente en el uso de muy pocas especies vegetales, siendo más reducida la gama de árboles y arbustos forrajeros<sup>(1)</sup>. Por ello, ante la enorme demanda de carne y leche proyectada para alimentar a una población humana y ante los altos costos de producción de las materias primas para la alimentación animal, es importante recurrir a esta biodiversidad para buscar otras fuentes alimentarias y aprovechar así la oferta natural local de manera racional<sup>(2)</sup>.

Los productores del trópico tradicionalmente han utilizado dietas basadas en la asociación de gramíneas, nativas o introducidas, con significativas limitaciones nutricionales, derivadas de los altos contenidos de pared celular, que se traducen en una baja ingestión y por tanto limitado consumo de nutrientes digeribles. Generalmente, esto se debe a una fermentación microbiana deficiente que se refleja en un flujo y una absorción de nutrientes inferior a la que requieren los rumiantes<sup>(3)</sup>. Tal deficiencia demanda el uso de alimentos suplementarios, así como la introducción

de leguminosas en pasturas de gramíneas, la suplementación con forraje de leguminosas arbustivas o la suplementación con otras especies leñosas no leguminosas de alta calidad proteica<sup>(4)</sup>.

La mezcla de la diversidad de especies en la dieta de los rumiantes ha sido concebida como una alternativa eficiente para mejorar la oferta proteica y energética en el trópico<sup>(5)</sup>. Tal alternativa puede concebirse como la oferta de mezclas de forrajes ofrecidos mediante ramoneo, corte, acarreo o prácticas de conservación de forrajes por procesos de ensilaje<sup>(6)</sup>. Una mezcla apropiada para mantener un balance adecuado de proteína energía lo constituye una proporción de 70:30, entre la fuente de energía y la fuente proteica, así, generalmente la mezcla comúnmente usada se ha conformado entre gramíneas y leguminosas en la proporción señalada<sup>(7)</sup>. No obstante, la fuente proteica puede ser otra planta no leguminosa, entre la gran diversidad de leñosas forrajeras que existen en el trópico<sup>(8)</sup>. *Tithonia diversifolia*(TD) ha constituido una de las especies predilectas usadas en alimentación animal, por su alto contenido proteico, alta digestibilidad y versatilidad en el manejo. Un estudio de Lezcano *et al*<sup>(9)</sup> reporta datos de MS para TD que varían desde 13.5 % hasta 25.0 %, en función de la edad y la frecuencia de corte y los valores de proteína bruta las cuales variaron entre 11.0 y 29.8 %, con diferencias significativas entre las hojas para los 30 y 60 días. Por su parte, Fasuyi y Ibitayo<sup>(10)</sup> reportan que las hojas de TD poseen un alto contenido de proteína bruta (20.6 %).

Por otra parte, el ensilaje constituye una estrategia de conservación de los nutrientes basada en la fermentación anaeróbica gobernada por bacterias del genero *Lactobacillus*<sup>(11)</sup>. Sin embargo, el conocimiento del proceso de acidificación del medio y la ensilabilidad de TD es limitado; esto obliga a evaluar el potencial acidificador de las cepas nativas de *Lactobacillus*<sup>(6)</sup> y la estabilidad del ensilaje y la reducción de las pérdidas de nutrientes bajo condiciones aerobias, una vez que el ensilaje es expuesto a condiciones aerobias<sup>(12)</sup>. Al respecto, existen reportes que indican una optimización del proceso de fermentación anaeróbica inducido por mezclas que pueden mejorar las características del alimento, especialmente con TD<sup>(6,10)</sup>.

Las técnicas de simulación de la fermentación ruminal (mediante cultivos continuos como el artificial rumen simulation system - RUSITEC) y de producción de gas, constituyen dos de los procedimientos experimentales *in vitro* más utilizados en la actualidad para el estudio de los procesos de fermentación ruminal, pues permiten el control de las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la fermentación y de los factores de variación que la afectan<sup>(13)</sup>. Los métodos de simulación se basan en el mantenimiento de pequeñas cantidades de fluido ruminal bajo condiciones ambientales (anaerobias, de temperatura y cinética) controladas, de modo que la biota microbial pueda actuar a discreción sobre la materia prima en prueba<sup>(14,15)</sup>. En este sistema, un equipo debidamente acondicionado permite el mantenimiento de una población normal del fluido ruminal, bajo condiciones estrictamente controladas durante largos períodos de tiempo<sup>(16)</sup>. Este sistema fue desarrollado por Czerkowsky y Breckeridge<sup>(17)</sup> y modificado por Machmuller *et al*<sup>(18)</sup>

y se usa específicamente, para determinar la fermentación, mediante la simulación de actividades fisiológicas de la digestión ruminal, durante periodos de tiempo relativamente largos. Esta técnica de simulación de rumen permite analizar la fermentación *in vitro* durante una escala de tiempo suficiente que evidencie la posible adaptación de los microbios en el rumen. El objetivo de este estudio fue evaluar la asociación de *Pennisetum purpureum* (PP) y *Tithonia diversifolia* (TD), así como el efecto de la adición de bacterias ácido lácticas (BAL) sobre las variables de la cinética ruminal y la producción de metano en un sistema de simulación del rumen (RUSITEC).

## Material y métodos

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Calidad de Forrajes del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), coordenadas geográficas 3°30'09'' N y 76°21'18'' O, localizado en el Municipio de Palmira (Valle del Cauca), Colombia.

### Forrajes utilizados

La biomasa de TD fue obtenida en etapa de prefloración (60 días) a un corte de 40 cm sobre el nivel del suelo incluyendo hojas y tallos en febrero del 2013 en la granja experimental de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira (1,000 msnm, 24°C, precipitación anual de 1,020 mm y humedad relativa de 72 %). PP fue recolectado a los 75 días de edad (10 cm sobre el nivel del suelo). Ambos forrajes fueron cortados a un tamaño de partícula de 2-3 cm usando un molino de tres cuchillas, 7.5 HP, 1400 rpm y 4.5 Amperios Marca Gaitán.

### Preparación de ensilajes

Los forrajes TD y PP se ensilaron con una humedad de 30 y 35 % de materia seca respectivamente. Se emplearon cuatro tratamientos: T1) ensilaje de PP al 100% sin inóculo como grupo testigo; T2) mezcla de PP y TD (67:33%) sin inóculo; T3) mezcla de PP y TD (67:33%) adicionada con inóculo de BAL (*Lactobacillus paracasei* - T735 previamente aislado de TD); y T4) mezcla de PP y TD (67:33%) adicionada con inóculo comercial Sil-all@4x4 [mezcla de BAL: *Streptococcus faecium* (CNCM (National Collection of Microorganisms Cultures) I-3236), *L. plantarum* (CNCM I-3235), *Pediococcus acidilactici* (CNCM I-3237) y *L. salivarius* (CNCM I-3238)] como se muestra en el Cuadro 1. Los microsilos fueron hechos en triplicado. Ambos inóculos se aplicaron a una concentración de 10<sup>4</sup> UFC/g. Las mezclas de los forrajes (1,000 g cada uno) fueron empacadas en

vacío siguiendo las recomendaciones del modelo Rostock para ensilajes<sup>(19)</sup> y fueron almacenadas durante 90 días en oscuridad a temperatura ambiente (25 °C). Al día 90, los ensilajes fueron abiertos, liofilizados y molidos (Thomas Wiley Mill 4, con una criba de 1.0 mm).

**Cuadro 1:** Tratamientos analizados en el proceso de digestión en microsilos elaborados a partir de *Pennisetum purpureum* (PP) y *Tithonia diversifolia* (TD)

	Mezcla (%)	Inóculo
T1	PP (100)	Sin inóculo
T2	TD /PP (33/67)	Sin inóculo
T3	TD /PP (33/67)	T735
T4	TD /PP (33/67)	SIL-ALL <sup>®4x4</sup>

T1= ensilaje de PP al 100% sin inóculo como grupo control; T2= mezcla de PP y TD (67:33%) sin inóculo; T3= mezcla de PP y TD (67:33%) adicionada con inóculo de bacterias ácido lácticas - BAL(*Lactobacillus paracasei* - T735); y T4= mezcla de PP y TD (67:33%) adicionada con inóculo comercial (Sil-all<sup>®4x4</sup>).

### Fermentación ruminal *in vitro* en el sistema RUSITEC

El sistema RUSITEC consta de ocho tubos fermentadores que permiten la evaluación simultánea de máximo ocho tratamientos. En este estudio, se analizaron cuatro tratamientos con dos repeticiones, el efecto de corrida se usó como repetición. El periodo experimental fue de 10 días, de los cuales los primeros cuatro días corresponderán al período de adaptación de los microorganismos a las dietas experimentales y los siguientes seis días para la recolección de datos y toma de muestras.

Se tomaron los ocho tubos fermentadores y se les adicionaron 890 ml de líquido ruminal y 110 ml de solución buffer o saliva artificial<sup>(20)</sup>. El líquido ruminal, previo a su adición se filtró a través de cuatro capas de gasas. El flujo de saliva artificial se dosificó en una bomba que garantizó el suministro continuo de 500 ml por día cada fermentador, equivalente a una tasa de dilución de 0.5 por día.

Al inicio de cada período experimental se pusieron a incubar 60 g de contenido ruminal y 16 g de MS de los ensilajes experimentales empacadas por separado para cada tubo fermentador. Las dietas se empacaron en bolsas de nylon con medidas de 13.5 x 6.5 cm (NItex 03-100/32, SEFAR, Heiden, Suiza) y poros de 100 µm. Posteriormente, cada 24 h se reemplazó una de las bolsas por una nueva, empezando con la bolsa que tenían contenido ruminal, para tener cada bolsa incubada por 48 h. Posterior al cambio de las bolsas, el aire de los fermentadores se desplazó con N<sub>2</sub> para restablecer las condiciones anaeróbicas. Las bolsas se retiraron de los fermentadores y se lavaron con agua fría hasta que el agua fuese clara para ser almacenadas a -20 °C.

La alimentación de los fermentadores fue diaria; 4 h antes de hacer esta alimentación se tomaron muestras de líquido ruminal para determinar el potencial redox, el pH, concentración de amonio y el recuento de microorganismos. El gas colectado se almacenó en bolsas Supel™ Inert Foil Gas Sampling Bags, Screw Cap Valve 10 Liter y se cuantificó mediante desplazamiento de agua.

### **Análisis bromatológico**

Previo al proceso de digestión en RUSITEC a las muestras de cada tratamiento se les determinó la composición química al igual que después del proceso a los residuos de la incubación. Los análisis bromatológicos de calidad nutricional fueron efectuados siguiendo las normas AOAC<sup>(21)</sup> 930.15, NFTA Method 2.1.4 para determinación de en horno a 105°C, AOAC<sup>(22)</sup> 973.18, NFTA Method 4.1 para Fibra detergente Ácida(FDA), Van Soest<sup>(23)</sup> para fibra detergente Neutra(FDN), Tilley y Terry<sup>(24)</sup> modificado por Moore<sup>(25)</sup>; para la determinación de Proteína cruda (PC) por Kjeldahl se aplica la norma AOAC 984.13. La digestibilidad estimada de la materia seca (DEMS) fue determinada mediante la ecuación:  $DEMS = 88.9 - (0.779 \times FDA)$ .

Para hacer la determinación de la concentración de amonio se hizo siguiendo el “Intruccion Manual for Ammonia Electrode (NH<sub>3</sub>)”. Para esto se calibraron 3 puntos 1.10 y 100 mmolar tomando en cada calibración 20 ml de la solución molar se agitó y se le agregó 1 ml de hidróxido de sodio y así sucesivamente con los otros dos puntos (10 y 100 mmolar); una vez calibrado se tomó la muestra la cual a 1 ml de inóculo se le adicionó 18 ml de agua destilada y 1 ml de hidróxido de sodio y se hizo la lectura.

### **Determinación de pH y potencial redox**

La determinación de potencial redox y del pH se hizo con un equipo acondicionado para tomar ambas lecturas, modelo SG8, marca Mettler-Toledo serie: B 337764747. Para esto se tomaron 6 ml del líquido ruminal de cada fermentador y se hizo la medición con el electrodo respectivo. Los equipos fueron calibrados antes de iniciar la toma de los datos.

### **Recuento de protozoarios**

Para el recuento de protozoarios se tomaron 2,000 µL de solución Hayem (HgCl<sub>2</sub>, 2.5 g/L; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 g/L; NaCl, 5.0 g/L) y 500 µl de líquido ruminal (días 0 y 1) o 100 µl de solución Hayem y 1,000 µl del líquido ruminal (días 2 a 8) en tubos plásticos. Para el recuento se utilizó la Cámara

NEUBAUER, 0.1 mm Deep HAUSSER SCIENTIFIC. Posteriormente se contaron los protozoarios presentes en el total del área de la cámara siguiendo la metodología de Rojas<sup>(26)</sup>.

### **Determinación de metano**

Para la determinación del CH<sub>4</sub> se utilizó un cromatógrafo: Shimadzu GC-2014. Columna: Shimadzu; el cual posee una serie de columnas empaquetadas para metano: 4m H-D 80/100, 0.7m S-Q y 1.5 P-N. Temperatura columna: 80 °C. temperatura del detector: FID 25 °C. temperatura del inyector: la inyección en este equipo se maneja directo a un cable, el cual está a temperatura ambiente, pues no se hace por puerto de inyección tradicional como lo manejan otros equipos. Gas de arrastre: Nitrógeno Column Flow: 30.83 ml/min.

### **Análisis estadístico**

Los datos se analizaron mediante un diseño completamente al azar ( $P < 0.05$ ). Para el análisis de las variables evaluadas se usó un procedimiento de modelos lineales generales y mixtos de medidas repetidas usando el software Infostat Versión 2010. En el modelo se incluyeron los efectos fijos de tratamiento, tiempo de medición y su interacción. El tiempo de incubación se consideró un efecto aleatorio. En cada variable evaluada se analizaron diferentes estructuras de covarianza y se estimó el mejor modelo de análisis teniendo como criterio de selección los estadísticos de información Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC).

### **Resultados y discusión**

En el Cuadro 2 se presenta la composición química de los ensilajes que se sometieron a un proceso de digestión en el sistema RUSITEC. Se observa que en el nivel de PC de los ensilajes no hubo diferencias significativas ( $P=0.5182$ ). Este resultado es posiblemente debido a que la inclusión de TD no fue lo suficientemente importante para modificar este parámetro; una mayor proporción de TD en los ensilajes podría haber generado diferencia significativa entre los tratamientos. Principalmente, el ensilado preparado con PP/TD y enriquecido con T735 es el que tiene la PC más alta (7.8 %), que es parecida a la proteína de ensilaje obtenido por Roa *et al*<sup>(27)</sup>, que alcanzó el 8 % y 6 %, a los 30 y 90 días de fermentación, respectivamente.

**Cuadro 2:** Composición bromatológica de los ensilajes analizados antes de RUSITEC (valores expresados como porcentaje de la materia seca)

Variable		T1		T2		T3		T4	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
MS	%	92.46	0.01b	92.52	0.04bc	91.77	0.08a	92.74	0.1c
PC	%	5.55	0.64a	7.20	1.70a	7.80	1.13a	7.50	2.12a
FDN	%	74.05	0.11a	69.1	0.63b	65.09	0.07c	68.56	0.3b
FDA	%	51.02	0.00a	52.15	1.31a	49.92	0.18a	51.21	0.4a
Cenizas	%	12.51	0.01b	11.96	0.29b	10.91	0.07a	11.71	0.4ab
MO	%	87.49	0.01a	88.04	0.29a	89.09	0.07ab	88.29	0.4b
DEMS	%	49,15	0,00 a	48,28	1,02 a	50,01	0,14 a	49,01	0,34 a

MS= materia seca; PC= proteína cruda; FDN= fibra detergente neutra; FDA= fibra detergente ácida; MO= materia orgánica; DEMS=digestibilidad de la materia seca.  
ab Valores con distinta literal son diferentes  $P<0.05$ .

Por otra parte, también es evidente que el nivel de fibra (FDN) fue mayor en T1 ( $P<0.0001$ ) con diferencias significativas respecto a los otros tratamientos, siendo T3 el ensilaje en el cual este parámetro fue significativamente menor. A diferencia de proteína cruda, el contenido de fibra en PP en relación a TD en la mezcla, modificó significativamente esta variable y pudo ser la razón de obtener menores valores de FDN. La FDN en los microsilos, tiene una respuesta opuesta al incremento de la proporción de TD en la mezcla, ya que con el incremento del nivel de inclusión de TD, el porcentaje de FDN se reduce. Barahona y Sánchez<sup>(28)</sup> sugieren que el contenido de FDN en los forrajes oscila entre 30 y 80 % y que entre mayor es la proporción de fibra, disminuye la productividad de los animales que los consumen. Esto se asocia con el consumo de MS, así, mientras mayor sea el contenido de fibra, mayor será el tiempo de retención en el rumen, lo que disminuye el consumo voluntario de forraje. Cabe señalar que la FDN obtenida en los ensilajes que contienen TD fue entre 15 y 19 puntos más alta de los reportados en los ensilajes de esta misma especie<sup>(27)</sup> que fue de 54.5 %; también la FDA reportada por este autor fue más alta (32%) en 90 días de ensilaje. En el presente estudio, para la variable de FDA, el efecto de tratamiento no presentó diferencias significativas, aunque se muestra una tendencia a disminuir en T3. Estas diferencias posiblemente obedecen al estado de madurez de PP, el cual en este ensayo tubo una edad mayor (75 días) que el forraje de TD usado en los microsilos usados por Roa *et al*<sup>(27)</sup>. Las cenizas mostraron diferencias significativas en T3 respecto a T1 y T2 ( $P<0.0141$ ). La materia orgánica fue significativamente mayor en T3 respecto a T1 y T2.

Para el caso de la digestibilidad de los ensilajes, no se observó diferencias entre los tratamientos ( $P=0.1311$ ). Mayores contenidos de FDN sugieren una menor digestibilidad de la materia seca, especialmente cuando la proporción de lignina es mayor en tratamientos con especies leñosas -como T2, T3 y T4 que incluyeron hojas y tallos de TD-. Sin embargo, esto no se refleja en este

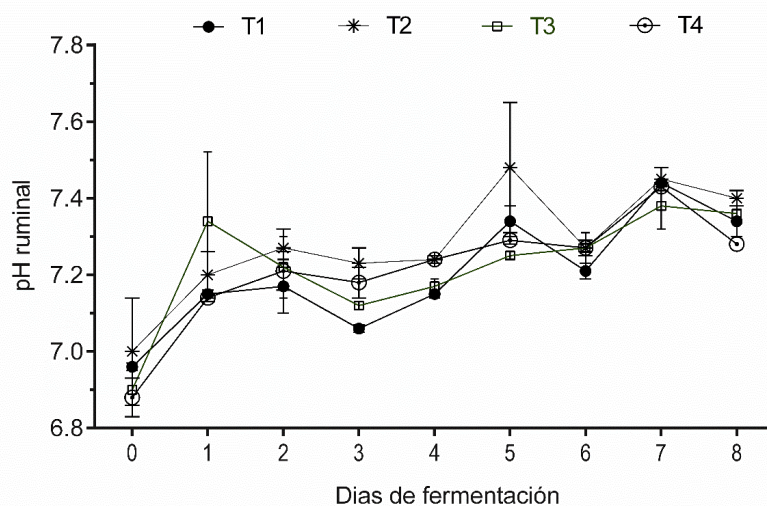


estudio. Las implicaciones de los altos contenidos de pared celular han sido reportadas como causa de una baja digestibilidad, lo cual puede restringir el uso de los forrajes para el consumo animal<sup>(8,16,28)</sup>.

### Características del líquido ruminal

El proceso de fermentación al interior de RUSITEC después de 8 días, indica que las características del líquido ruminal aislado (Figura 1), durante la evaluación de las dietas presenta un ligero aumento en el pH respecto a la acidez normal del rumen oscilando entre 7.3 y 7.4, sin embargo, entre tratamientos no presentó variación significativa ( $P>0.05$ ). Es probable que el incremento de pH constituya una respuesta a una dieta básicamente fibrosa, dado que la fibra larga estimula la rumia y la secreción puede incrementar la producción de saliva<sup>(29)</sup>, la cual actúa como lubricante del alimento consumido, con un pH 8.2 en promedio, alto contenido de sodio, potasio, bicarbonato y fosfato<sup>(29,30)</sup>. Estas características que se simulan en la saliva artificial del RUSITEC, podrían tender a subir el pH en el licor ruminal para luego estabilizarse por su capacidad buffer. Además de este efecto de la saliva artificial, la tendencia creciente, desde un pH ácido hacia la basicidad, puede explicarse en la tendencia a la baja, a medida que trascurren los días, de la producción de ácidos orgánicos.

**Figura 1.** Acidez del rumen de ensilajes elaborados a partir de *Pennisetum purpureum* (PP) y *Tithonia diversifolia* (TD) en RUSITEC

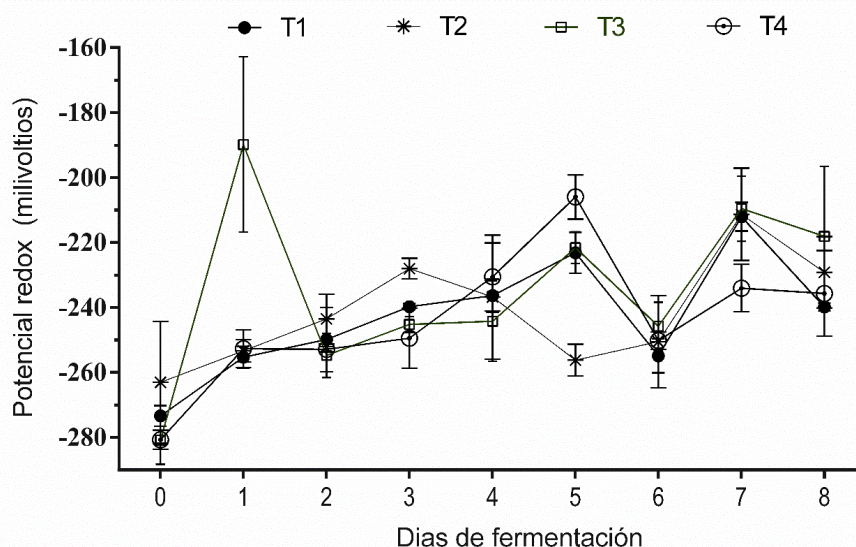


T1= ensilaje de PP al 100 % sin inóculo como grupo control; T2= mezcla de PP y TD (67:33%) sin inóculo; T3= mezcla de PP y TD (67:33%) adicionada con inóculo de bacterias ácido lácticas – BAL (*Lactobacillus paracasei* - T735); y T4= mezcla de PP y TD (67:33%) adicionada con inóculo comercial (Sil-all®4x4).

El equilibrio del ambiente ruminal se mantiene gracias a la solución tampón derivada de la secreción salival alcalina, que modula la acidez propia de la fermentación de carbohidratos en el rumen el cual se debe mantener alrededor de 5.8 a 7 por lo que tiende a mantener el pH del rumen cerca de la neutralidad<sup>(29)</sup>. De todos los factores del medio ruminal, el pH es el más susceptible a variación, y la ración es el factor más determinante de los cambios. El mantenimiento del pH ruminal es el resultado de la producción y la neutralización o eliminación de protones en el medio ruminal. Mientras que las fermentaciones de carbohidratos no estructurales (CNE) son energéticamente más eficientes, son altamente acidogénicas, y su aportación debe limitarse o contrarrestarse con carbohidratos estructurales (CE) ya que estos aportan capacidad de tampón al medio ruminal<sup>(31)</sup>.

El potencial redox se mantuvo en los niveles adecuados del ambiente ruminal (Figura 2), sin diferencias significativas entre tratamientos ( $p>0.05$ ); esto sugiere una simulación en el RUSITEC muy aproximada al ambiente anaerobio del rumen. Allí, es posible encontrar algo de oxígeno en ocasiones, producto posiblemente, de su introducción a través del alimento ingerido o el agua<sup>(3,15)</sup>. Así, la baja concentración de oxígeno, según lo indica un potencial negativo de oxidación (Eh) generan un Eh entre -250 y -450 milivoltios (mV), el cual estimula el crecimiento de microorganismos anaerobios<sup>(32)</sup>.

**Figura 2.** Potencial redox de ensilajes elaborados a partir de *Pennisetum purpureum* (PP) y *Tithonia diversifolia* (TD) en RUSITEC

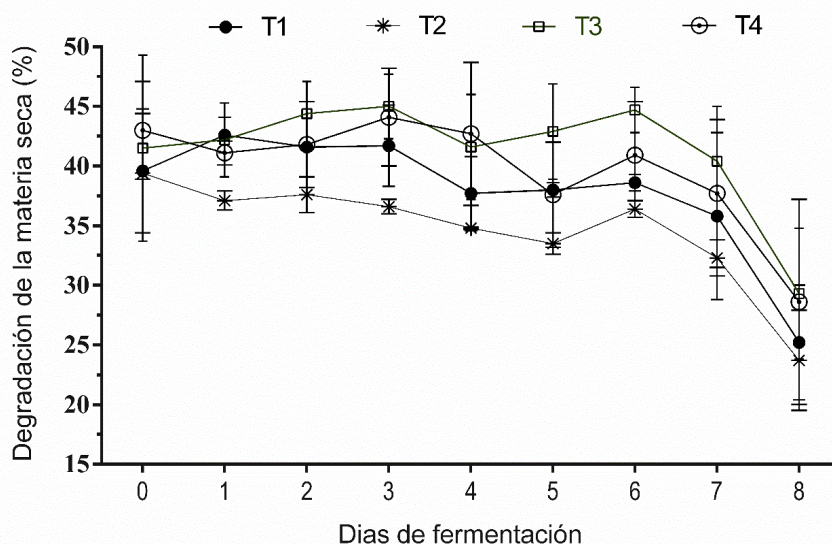


T1 ensilaje de PP al 100 % sin inóculo como grupo control; T2= mezcla de PP y TD (67:33%) sin inóculo; T3= mezcla de PP y TD (67:33%) adicionada con inóculo de bacterias ácido lácticas - BAL (*Lactobacillus paracasei* - T735); y T4= mezcla de PP y TD (67:33%) adicionada con inóculo comercial (Sil-all@4x4).

## Degradación de la materia seca

La degradación media de la MS en ocho días de digestión en RUSITEC fue significativamente más alta ( $P<0.0001$ ) en T3 ( $41.33\pm 5.63$ ) respecto a T1 ( $37.88 \pm 5.76$ ) y T2 ( $34.61 \pm 4.79$ ) (Figura 3) aunque sin diferencias significativas frente a T4 ( $39.71\pm 5.90$ ). El análisis longitudinal permite apreciar diferencias ( $P<0.0001$ ) de la degradación después de 8 días respecto al inicio. Las dietas con inclusión de TD en el ensilaje reflejan una mayor degradación de la MS, lo cual es explicado por el menor contenido de fibra de las dicotiledóneas proteicas no leguminosas y una mayor digestibilidad y degradabilidad de los forrajes, inversamente relacionados con su contenido de FDN<sup>(28)</sup>

**Figura 3.** Degradación de la materia seca de ensilajes elaborados a partir de *Pennisetum purpureum* (PP) y *Tithonia diversifolia* (TD) en RUSITEC



T1= ensilaje de PP al 100% sin inóculo como grupo control; T2= mezcla de PP y TD (67:33%) sin inóculo; T3= mezcla de PP y TD (67:33%) adicionada con inóculo de bacterias ácido lácticas - BAL(*Lactobacillus paracasei* - T735); y T4= mezcla de PP y TD(67:33%) adicionada con inóculo comercial (Sil-all®4x4).

## Ácidos grasos volátiles (AGV)

Como se puede ver en la Cuadro 3, la producción de AGV no fue afectada por los tratamientos, mostrando una producción menor para el T3 frente a los otros tratamientos y el control; sin embargo, no hubo diferencias significativas. Es importante anotar que con una dieta a base de forrajes, los AGV pueden proveer entre el 50 y el 85 % de los requerimientos energéticos del

animal; también es importante saber que la proporción entre AGV, gases de efecto invernadero (GEI) como CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y H<sub>2</sub> libre es en promedio 65, 27 y 0. 2% respectivamente, de los gases presentes en el rumen<sup>(33)</sup>.

**Cuadro 3.** Efecto de diferentes dietas de la mezcla *Pennisetum purpureun* (PP) y *Tithonia diversifolia* (TD) sobre la fermentación *in vitro* en el rumen

Variables	Testigo (100% PP)	Mezcla (33% TD + 67% PP)			P valor
	T1	Sin Inoculo T2	T-735 T3	Silall T4	
AGV, mmol/l	50.10±14.2a	40.5A±8.57a	39.87±10.2a	41.18±11.2a	0.3247
Acetato, mmol/l	27.86±8.5a	23.45±5.1a	24.34±6.2a	25.14±6.5a	0.4875
Propionato, mmol/l	13.34±2.9a	10.83±2.2a	10.86±2.5a	10.99±2.6a	0.3525
Butirato, mmol/l	8.35±2.6a	5.87±1.2b	4.22±1.1c	4.26±1.7c	<0.0001
Acetato/Propionato	2.06±0.2c	2.16±0.1bc	2.23±0.1ab	2.29±0.1a	0.0009
Metano, mmol/g	2.43±1.1a	1.53±0.9ab	1.42±1.6ab	1.36±1.4b	<0.0001
Amonio, mmol/l	0.13±0.07a	0.06±0.00bc	0.05±0.00bc	0.06±0.01bc	<0.0001
Protozoarios(1*10 <sup>5</sup> )	0.05±0.00a	0.1±0.00a	0.05±0.00a	0.15±0.00a	0.7681

T1= ensilaje de PP al 100% sin inóculo como grupo control; T2= mezcla de PP y TD (67:33%) sin inóculo; T3= mezcla de PP y TD(67:33%) adicionada con inóculo de bacterias ácido lácticas – BAL(*Lactobacillus paracasei* - T735); y T4= mezcla de PP y TD (67:33%) adicionada con inóculo comercial (Sil-all@4x4).

<sup>ab</sup> Letras diferentes significan diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

La composición de estos productos de la fermentación difiere entre las dietas. El efecto entre tratamientos, aunque no fue significativo ( $P= 0.4875$ ), sugiere que T1 aumentó el drenaje de acetato respecto a los tratamientos que incorporan TD. La misma tendencia se presentó en el drenaje de propionato, aunque sin diferencias estadísticas entre los tratamientos ( $P=0,3525$ ). En el caso del butirato, sí presentó diferencias significativas entre tratamientos ( $P<0.0001$ ), siendo notoria la mayor producción de este ácido en el testigo (T1) y más bajo en los tratamientos que incorporan TD, con una menor proporción en los tratamientos T3 y T4 posiblemente, por efecto del inóculo adicionado a estos dos tratamientos.

Es sabido que para el rumiante, la formación de propionato es energéticamente más eficiente que la de butirato y que la de acetato, ya que la producción de estos dos últimos lleva al escape de átomos de carbono que no pueden ser quemados, en forma de CH<sub>4</sub> (o átomos de H que no se convierten en AGV)<sup>(34)</sup>. Eso significa que las dietas de solo gramíneas conducen a una alta segregación de butirato, perdiendo carbonos en forma de CH<sub>4</sub>. Similar a lo reportado por García-González *et al*<sup>(35)</sup> en una evaluación de aditivos probados en RUSITEC, en este estudio se verifica que, si bien el total de AGV no fue afectado por los tratamientos, su perfil fue notablemente modificado. Esto se confirma en que hubo diferencias significativas en la relación

acetato/propionato, siendo significativamente mayor en T4 y T3 ( $P=0.0009$ ), respecto a T1. Según Jarrige *et al*<sup>(36)</sup>, la proporción molar de los AGV en el rumen es: acético (65 %); propiónico (20 %); butírico (13 %) y otros (2 %). Los perfiles de estos ácidos en el presente estudio están ligeramente alterados, sin embargo, se conserva la tendencia, siendo evidente que es en el T4 donde se encuentran las proporciones más cercanas a las sugeridas por Jarrige: 60.7; 26.7; 9.7 y 2.9 % para los ácidos acetato, propionato, butirato y otros, respectivamente. En dietas totalmente a base de forrajes, la relación acetato:propionato se acerca a 3:1 pero, a medida que se aumenta el porcentaje de concentrados en la dieta, la relación se estrecha a 2:1 o menor<sup>(16)</sup>.

### Nitrógeno amoniacal (NH<sub>3</sub>-N)

La producción de NH<sub>3</sub>-N (como medición del metabolismo del N dietario) fue más baja en los tratamientos que incluyeron TD. Esto podría indicar una más baja degradación de la proteína dietaria en estos tratamientos. El más alto nivel de amonio en el T1 está probablemente relacionado a una mayor proteólisis. La producción diaria de NH<sub>3</sub>-N cambió a lo largo del tiempo en todos los tratamientos ( $P<0.0001$ ). En general, los valores se incrementaron el primer día, pero luego decrecieron gradualmente, confirmando el desempeño de este parámetro reportado por Martínez *et al*<sup>(16)</sup>.

En el día 8 NH<sub>3</sub>-N fue más alto en T1 con diferencias significativas frente a los tratamientos que incorporan TD. Sin embargo, a pesar de lo similar de la digestibilidad de la MS en los tratamientos que contienen TD, NH<sub>3</sub>-N fue más bajo en T3, pero sin diferencias significativas frente a T4 y T2. Se observó esta respuesta a pesar de la mayor entrada de N en el sistema con T3. Estudios han demostrado que se aumenta la incorporación de N dietético en N microbiano y reduce NH<sub>3</sub>-N<sup>(37, 38)</sup> con forrajes de alta calidad proteica.

Esto indicaría un ritmo más lento la degradación de proteínas en las dietas que incorporan TD. La concentración de amoníaco que se observó en el líquido ruminal en los diferentes tratamientos fue mucho más baja respecto a lo reportado<sup>(39)</sup> de 3.26 mmol/l, pero más cercana a lo que encontraron Hess *et al*<sup>(3)</sup> (1.76 mmol/l) al incubar un sustrato compuesto por 1/3 de *Cratylia argentea* y 2/3 de *Brachiaria dictyoneura* en un sistema RUSITEC. Estas cifras están por debajo de la concentración sugerida por Satter y Slyter<sup>(40)</sup> de 3.6 mmol/l para maximizar la síntesis de proteína microbiana en el rumen.

## Emisión de metano

El análisis de la producción neta de CH<sub>4</sub> por g de MS, generado a los ocho días de incubación en RUSITEC (Cuadro 3.), fueron cercanas a las reportadas por Abreu *et al*<sup>(39)</sup> de 1.47 y 1.61 mmol/g de MS de una mezcla de heno de *Brachiaria dictyoneura* y con aditivos. Así, los resultados de este estudio indican que estas emisiones fueron mayores en T1 con diferencias significativas frente a T4 que fue el que menos cantidad de CH<sub>4</sub> emitido presentó. El T1 presenta las mayores emisiones dada su condición de ensilaje de gramínea con altos niveles de pared celular.

Debe recordarse que en un experimento con la metodología de producción de gases<sup>(41)</sup> a las 60 h después del inicio de la incubación, se detectó en el punto de inflexión un 80 a 88 % del gas total producido. En el estudio citado, los ensilajes de solo gramínea generaron altos niveles de CH<sub>4</sub> emitido, pero disminuye con la inclusión de TD. A su vez, es consistente con los datos reportados por La O<sup>(42)</sup>, que en mezclas de forraje (TD/PP) encontraron una producción descendente de CH<sub>4</sub> (33.3; 30.1 y 28.06 ml) a medida que se incrementa la inclusión de TD en 15, 30 y 100 %, respectivamente. Abreu *et al*<sup>(39)</sup> sugieren que la disminución en la emisión de CH<sub>4</sub> por gramo de MS degradada, es probable que se explique por la menor degradación de la fibra y sugiere que habrá menos CH<sub>4</sub> emitido por unidad de proteína animal comestible, a pesar de la cantidad total de CH<sub>4</sub> liberado no se reduzca.

La diferencia en la producción de CH<sub>4</sub> a partir de un ensilaje de PP/TD podría ser debido, en parte, a la acción de taninos condensados (TC), ya que se ha informado que la presencia de estos en forrajes de especies leñosas, reduce las emisiones de CH<sub>4</sub><sup>(43)</sup>. El forraje de TD, aunque presenta niveles leves de TC<sup>(9)</sup>, no es despreciable la presencia de estos TC entre un 1.0 y un 1.4 %, respectivamente, en épocas de bajas precipitaciones y estaciones de lluvia<sup>(44)</sup>.

Por otra parte, la mayor proporción de pared celular en un forraje está relacionada con una mayor producción de CH<sub>4</sub>, como es el caso del ensilaje T1. Esto debido a que la baja digestibilidad ruminal de la FDN, significa más FDN sobrepasante del rumen y ser depositada ésta en el intestino grueso, donde puede ser fermentada y producir CH<sub>4</sub> por acción de microbios metanogénicos<sup>(35, 43)</sup>.

La población de protozoarios, como medida de la biomasa microbiana del rumen constituye un buen indicador, dado su alto peso en la microbiota, pues aunque su número es menor en comparación con las bacterias, estos microorganismos tienen un mayor volumen individual, dando lugar a una masa celular de protozoarios semejante a la masa de las bacterias<sup>(16)</sup>, además estos microorganismos colonizan y degradan los tejidos vegetales en el rumen y producen enzimas capaces de degradar los polisacáridos vegetales y hemicelulosas<sup>(29)</sup>. En este estudio, esta población cambió a lo largo del tiempo en todos los tratamientos. En general, los valores decrecieron

gradualmente durante los tres primeros días, estabilizándose en valores medios sin diferencias significativas ( $P>0.05$ ) durante los últimos cuatro días.

No se presentaron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en el recuento de protozoos entre los diferentes tratamientos, sin embargo, entre los tratamientos que contenían TD (T2, T3 y T4) el número de protozoos se redujo en el ensilaje T3 que presentó el más alto porcentaje de PC, lo cual coincide con lo afirmado por Abreu *et al*<sup>(39)</sup> de que la mayor defaunación se presenta en un sustrato suplementado con una leguminosa de alta calidad. En su estudio, el mismo autor, sugiere que la reducción de la población ciliada (protozoos) está asociada a un potencial de defaunación de los forrajes con altos contenidos de metabolitos secundarios, como taninos y saponinas, que no necesariamente está relacionado con la reducción de la metanogénesis, pero sin duda la utilización de nitrógeno es más eficiente.

## Conclusiones e implicaciones

Las características del líquido ruminal aislado en el RUSITEC, se mantuvo en los niveles propios del rumen. Tanto el potencial de hidrogeniones como el potencial redox, no presentaron diferencias significativas en sus fluctuaciones tanto en los tratamientos de *Pennisetum purpureum* (PP) (100 %) y en las mezclas PP/ *Tithonia diversifolia* (TD), con y sin inoculo en el ensilaje. Los ensilajes que incorporaron TD, presentaron la menor cantidad de CH<sub>4</sub> emitido. Se presentó un ligero aumento en el pH respecto a la acidez normal del rumen (7.3 y 7.4). Sin embargo, entre tratamientos no hubo variación significativa. El potencial redox no presentó diferencias significativas entre tratamientos. El nitrógeno amoniacal, fue más bajo en los tratamientos que incluyeron TD. Los ensilajes que incorporaron TD presentaron la menor cantidad de CH<sub>4</sub> emitido. Esta reducción, podría traducirse en condiciones prácticas, en una reducción de CH<sub>4</sub> emitido por unidad de proteína animal producida que sería útil aun cuando la cantidad total de CH<sub>4</sub> emitido no disminuya.

## Agradecimientos

Se agradece al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y la Universidad del Tolima por el apoyo técnico y financiero. Especialmente, se agradece el apoyo técnico de Patricia Ávila y Orlando Trujillo del Laboratorio de Calidad de Forraje del CIAT.

## Literatura citada:

1. Rosales M. Mezclas de forrajes: uso de la diversidad forrajera tropical en sistemas agroforestales. En: Rosales M, Murgueitio E, Osorio H. Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica. Roma, FAO. 1999:201-231.
2. Holguín VA, Ortiz.Grisalez S, Velasco Navia A, Mora.Delgado J. Multi-criteria evaluation of 44 introductions of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray in Candelaria, Valle del Cauca. Rev Med Vet Zoot 2015; 62:57-72.
3. Hess HD, Monsalve LM, Lascano CE, Carulla JE, Díaz TE, Kreuzer M. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. Aust J Agric Res 2003;547:703-713.
4. Rao I, Peters M, Castro A, Schultze-Kraft R, White D, Fisher M. et al. Livestock Plus: sustainable intensification of tropical forage-based systems for improving livelihood and environmental benefits. Trop Grassl . Forr Trop 2015;3(2):59-82.
5. Ribeiro RS, Terry SA, Sacramento JP, Silveira SRE, Bento CBP, da Silva EF, et al. *Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows. PLoS One 2016;11:e0165751.
6. Holguín VA, Cuchillo HM, Mazabel J, Martens SD. *In-vitro* assessment for ensilability of *Tithonia diversifolia* alone or with *Pennisetum purpureum* using epiphytic lactic acid bacteria strains as inocula. Acta Sci Anim Sci 2018;40:e37940.
7. Ojeda F. Técnicas de cosecha y ensilaje. En: Mannedje L't. editor. Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. Roma: FAO. 2001:137-146
8. Pinto-Ruiz R, Hernández D, Guevara F, Gómez H, Medina F, Hernández A, et al. Preferencia de ovinos por el ensilaje de *Pennisetum purpureum* mezclado con arbóreas forrajeras tropicales. Livest Res Rural Dev 2010;22:106.
9. Lezcano Y, Soca M, Sánchez LM, Ojeda FF, Olivera Y, Fontes D, Santana HH. Caracterización cualitativa del contenido de metabolitos secundarios en la fracción comestible de *Tithonia diversifolia* Hemsl. A. Gray. Spanish. Past Forr 2012;353:283-292.
10. Fasuyi AO, Ibitayo FJ. Nitrogen balance and morphometric traits of weanling pigs fed graded levels of wild sunflower *Tithonia diversifolia* leaf meal. Afr J Food Agric Nutr Dev 2011;113:1-17.
11. Heinritz SN, Martens SD, Avila P, Hoedtke S. The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability. Anim Feed Sci Technol 2012;174(3.4):201-210.



12. Kleinschmit DH, Kung Jr L. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. *J Dairy Sci* 2006;89(10):4005-4013.
13. Rymer C, Huntington JA, Williams BA, Givens DL. *In vitro* accumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Anim Feed Sci Technol* 2005;123.124:9-30.
14. Menke KH, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim Res Dev* 1988;28:7-55.
15. Abel HJ, Irmgard I, da Costa Gómez C, Steinberg W. Effect of increasing dietary concentrate levels on microbial biotin metabolism in the artificial rumen simulation system RUSITEC. *Arch Tierernahr* 2001;554:371-376.
16. Martínez ME, Ranilla MJ, Tejido ML, Ramos SS, Carro MD. Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. I. Digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. *J Dairy Sci* 2010; 938:3684-3698.
17. Czerkawski JW, Breckenridge G. Design and development of a long-term rumen simulation technique Rusitec. *Br J Nutr* 1977;38:371.384.
18. Machmuller A, Soliva CR, Kreuzer M. *In vitro* ruminal methane suppression by lauric acid as influenced by dietary calcium. *Can J Anim Sci* 2002;82:233-239.
19. Hoedtke S, Zeyner A. Comparative evaluation of laboratory-scale silages using standard glass jar silages or vacuum-packed model silages. *J Sci Food Agric* 2011;91(5):841-849.
20. McDougall EI. Studies on ruminant saliva I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem J* 1948;43:99-109.
21. Association of Official Analytical Chemists. AOAC 973.18. Fiber acid detergent and lignin H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in animal feed. Gaithersburg, MD, USA. 2010.
22. Association of Official Analytical Chemists. AOAC 930.15. Moisture in animal, loss on drying at 135 C for 2 hours. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International. 2000.
23. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 1991;(7410):3583-3597.
24. Tilley JMA, Terry RA. A two stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. *Grass Forage Sci* 1963;182:104-111.

25. Moore JE. Procedures for the two-stage *in vitro* digestion of forages. In Harris, L.E. Nutrition research techniques for domestic and wild animals, Vol. 1. Logan: Utah State University. 1970.
26. Rojas A. Conceptos y práctica de microbiología general. Universidad Nacional de Colombia. Palmira. 2011.
27. Roa ML, Castillo CA, Tellez E. Influencia del tiempo de maduración en la calidad nutricional de ensilajes con forrajes arbóreos. Rev Sist Prod Agroecol 2010;11:63-73.
28. Barahona R, Sánchez S. Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. Rev Corpoica Ciencia y Tecnol Agropecuaria 2005;6:69-82.
29. Krause KM, Oetzel GR. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. Anim Feed Sci Technol 2006;126:215-236.
30. Emery RS, Smith CK, Grimes RM, Huffman CF, Duncan CW. Physical and chemical changes in bovine saliva and rumen liquid with different hay-grain rations. J Dairy Sci 1960;431:76-80.
31. Calsamiglia S, Ferret A. Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: acidosis y meteorismo. Curso de Especialización FEDNA. Barcelona, España. 2002. [www.produccion.animal.com.ar](http://www.produccion.animal.com.ar).
32. Araujo O, Vergara-López J. Propiedades físicas y químicas del rumen. Arch Latinoam Prod Anim 2007;15:133-140.
33. Mathison GW, Okine EK, McAllister TA, Dong Y, Galbraith J, Dmytruk OIN. Reducing methane emissions from ruminant animals J Appl Anim Res 1998;14:1:1-28.
34. Posada SL, Noguera RR. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes (*In vitro* technique of gas production: a tool for feed assesment for ruminants). Livest Res Rural Dev 2005;17Art. #36.
35. García-González RR, González JS, López SS. Decrease of ruminal methane production in Rusitec fermenters through the addition of plant material from rhubarb (*Rheum* spp). and alder buckthorn (*Frangula alnus*). J Dairy Sci 2010;938:3755-3763.
36. Jarrige R, Ruckbusch Y, Demarquilly C, Farce MH, Journet M. Nutrition des ruminants domestiques: Ingestion et digestion. Paris: INRA editions. 1995. [https://books.google.com.co/books?id=pIbmTs7\\_DDIC](https://books.google.com.co/books?id=pIbmTs7_DDIC)

37. Lee MRF, Merry RJ, Davies DR, Moorby JM, Humphreys MO, Theodorou MK, MacRae JC, Scollan ND. Effect of increasing availability of water-soluble carbohydrates on *in vitro* rumen fermentation. Anim Feed Sci Technol 2003;104(4):59-70.
38. Merry RJ, Lee MR, Davies DR, Dewhurst RJ, Moorby JM, Scollan ND, Theodorou MK. Effects of high-sugar ryegrass silage and mixtures with red clover silage on ruminant digestion. 1. *In vitro* and *in vivo* studies of nitrogen utilization. J Anim Sci 2006;8411:3049-3060.
39. Abreu A, Carulla JE, Kreuzer M, Lascano CE, Diaz TE, Cano A, Hess, HD. Efecto del fruto, del pericarpio y del extracto semipurificado de saponinas de *Sapindus saponaria* sobre la fermentación ruminal y la metanogenesis *in vitro* en un sistema RUSITEC. Rev Col Cienc Pecu 2003;162,147-154.
40. Satter LD, Slyter LL. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. British J Nutr 1974;32:199-208.
41. Holguín VA. Optimización de *Tithonia diversifolia* ensilada como alimento para ovinos de pelo [tesis doctorado]. Palmira, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2016.
42. La O O, Valenciaga D, González H, Orozco A, Castillo Y, Ruíz O, Gutiérrez E, Rodríguez C, Arzola C. Efecto de la combinación de *Tithonia diversifolia* y *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT.115 en la cinética y producción de gas *in vitro*. Rev Cuba Ciencia Agrí 2009;43:149-152.
43. Patra AK, Saxena J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. J Sci Food Agric 2011;91(1):24-37.
44. Verdecia D, Ramírez J, Leonard I, Álvarez Y, Bazán Y, Bodas R, Andrés S, Álvarez J, Giráldez F, López S. Calidad de la *Tithonia diversifolia* en una zona del Valle del Cauto. REDVET 2011; 125.