

Degradación ruminal *in vitro* de las fracciones de carbohidratos contenidas en pastos tropicales fertilizados con nitrógeno

Erika Andrea Hernández ^a

Francisco Indalecio Juárez Lagunes ^{a*}

Alice N. Pell ^b

Maribel Montero Lagunes ^c

Juan Manuel Pinos Rodríguez ^a

Robert W. Blake ^b

^a Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 91710 Veracruz, Ver. México.

^b Cornell University. Department of Animal Science. Ithaca, NY. USA.

^c INIFAP. Campo Experimental La Posta. 94277. Medellín, Ver. México.

*Autor de correspondencia: juarezf@hotmail.com

Resumen:

El objetivo consistió en determinar las tasas de digestión de las fracciones de carbohidratos A (azúcares, oligosacáridos y ácidos orgánicos), B₁ (almidón y fibra soluble), CNE (carbohidratos no estructurales) y B₂ (FDN disponible) en cuatro pastos tropicales utilizando la técnica de producción de gas. Las muestras de forraje completo (FC), el residuo insoluble en etanol al 90% (RIE) y FDN aislada (FDNa) se fermentaron *in vitro* y se midió la producción de gas. Los volúmenes de gas fueron determinados a partir de las siguientes fracciones, A= FC menos RIE; B₁= RIE - DN; CNE= FC - DN; y B₂= DN. Los pastos fueron *Andropogon gayanus*, *Urochloa brizantha*, *Cynodon plectostachyus* y *Megathyrsus maximus*, cada uno cultivado en Veracruz, México, en cuatro parcelas (5 × 5 m), fertilizadas (relación

equivalente a 0 y 100 kg N / ha) y recortadas 35 días después de la fertilización con nitrógeno. Se utilizó un diseño de bloques completamente aleatorizado con arreglo factorial 4×2 y dos repeticiones por tratamiento. Los factores fueron las especies de gramíneas y la fertilización con nitrógeno. Los datos se ajustaron utilizando un modelo exponencial simple con retraso. El volumen (ml de gas / 100 mg de MO), la tasa (% / h) y el retraso (h) fueron: FE (22.8; 5.3; 2.1); A (3,2; 15,7; 0,5); B₁ (1.5; 15.7; 0.2); y B₂ (18.3; 6.6; 5.2). *Andropogon* y *Urochloa* tuvieron mayor contenido de CNE en comparación con *Megathyrus* y *Cynodon*, pero menor rendimiento de gas por unidad de CNE. Las tasas de digestión para la fracción B₂ oscilaron entre 4 y 8% / h; y la tasa de digestión CNE promedió 15.7% / h. La fertilización nitrogenada redujo el tamaño de las reservas de carbohidratos, pero no afectó las tasas de digestión. Se concluye que las tasas de digestión de las fracciones de carbohidratos difieren según la especie de pasto.

Palabras clave: Pastos C₄, Fracciones de carbohidratos, Tasas de digestión, Producción de gas, Modelo CNCPS.

Recibido: 29/03/2018

Aceptado: 13/11/2018

El contenido energético de los forrajes que está disponible para el animal no puede determinarse utilizando técnicas analíticas estándar. Por lo tanto, se necesitan otros medios para estimarlo. En el pasado el uso de ecuaciones de predicción empíricas basadas en la composición química, ayudado por el análisis del sistema de fibra detergente⁽¹⁾ ha sido la base para un sistema comprensivo de evaluación del forraje⁽²⁾. Sin embargo, la relación subyacente entre el contenido de energía y la composición química es inconsistente en forrajes tropicales con alto contenido de lignina, sílice, taninos y otros compuestos secundarios, que pueden interferir con la digestión.

Un enfoque alternativo utiliza el método de digestión ruminal *in vitro*⁽³⁾. Esta técnica se usa comúnmente para predecir la digestibilidad de un alimento. Sin embargo, el medir el grado de digestión por desaparición del sustrato tiene limitaciones: se supone que los componentes solubles son completamente digeribles y tienen valores de energía similares, independientemente de sus perfiles de carbohidratos o ácidos orgánicos⁽¹⁾. El modelo Cornell de Carbohidratos y Proteínas Netos (CNCPS) v.5 <http://blogs.cornell.edu/cncps/> fracciona los carbohidratos en tres componentes principales: fracción A (azúcares, oligosacáridos y ácidos orgánicos), fracción B₁ (almidón y fibra soluble) y fracción B₂ (carbohidratos estructurales digeribles)^(4,5). Últimamente el CNCPS además divide los carbohidratos en ocho fracciones digeribles⁽⁶⁾: A₁ (ácidos grasos volátiles); A₂ (ácido láctico); A₃ (otros ácidos orgánicos); A₄

(azúcares); B₁ (almidón); B₂ (fibra soluble); B₃ (FDN disponible); C (FDN no disponible). Sin embargo, el modelo CNCPS v6.5.5⁽⁷⁾ <http://blogs.cornell.edu/cncps/> considera sólo la información sobre las tasas de digestión de cuatro fracciones, A₄, B₁, B₂ y B₃. En este modelo (versión 6.5.5), la tasa de digestión asignada a la fracción A₄ (40 a 60 % / h) se obtuvo a partir de datos basados en microbios ruminales mixtos^(8,9) utilizando la técnica de producción de gas⁽¹⁰⁾. Esta técnica ha sido automatizada y utilizada para estimar la digestión de la FDN⁽¹¹⁾ y de los carbohidratos no estructurales (CNE)⁽¹²⁾. En consecuencia, las fracciones B₁ y B₂ tienen tasas de 20 a 40% / h, y la tasa de fracción B₃ varía entre 1 y 18 % / h.

La biblioteca de alimentos de los requerimientos nutricionales de bovinos de carne⁽¹³⁾ (<https://www.nap.edu/download/19014>) no incluye forrajes tropicales. Sin embargo, el Sistema Nutricional para Grandes Rumiantes (LRNS) v1.033⁽¹⁴⁾ (<http://nutritionmodels.com/lrns.html>) incluye tasas de digestión de las fracciones de carbohidratos A, B₁ y B₂ para pastos tropicales. En esta biblioteca, los pastos de México⁽¹⁵⁾ se diferencian de Brasil, Honduras y Florida. La biblioteca tropical actualizada del CNCPS v.6.5.5⁽⁷⁾ valida la base de datos de México y corrige las tasas de Brasil, Honduras y Florida mediante la asignación de valores fijos (% / h) de 40 para el A₄; 30 para B₁; 30 para B₂; y 3.0 para fracciones de carbohidratos B₃. Estos últimos valores están de acuerdo con los informes previos⁽¹⁶⁻¹⁹⁾. Sin embargo, se necesita más investigación para actualizar estas tasas.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue cuantificar químicamente las fracciones de carbohidratos, A, B₁, B₂ y C, y medir la cinética de digestión de cada una de estas fracciones midiendo la producción de gas en cuatro pastos tropicales fertilizadas con nitrógeno.

El estudio se realizó en la Campo Experimental La Posta del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de México, ubicado en la costa sureste de México en estado de Veracruz a 19 ° 02' N y 96 ° 08' O con una altitud de 12 m, clima tropical subhúmedo Aw con precipitaciones anuales promedio de 1,728 mm, 25 ° C de temperatura media y 81% de humedad relativa. El suelo se clasifica como Oxisol, franco predominantemente arenoso con > 15% de arcilla y 1.7% de materia orgánica, el pH fue de 5.35. El informe del análisis químico del suelo mostró el siguiente contenido mineral (ppm): P₂O₅, 12; K 108; Mg, 115; Ca, 545; NO₃, 9.5; S, 16; Mn, 13; Fe, 53; Cu, 0.45; y B, 0.6.

Los pastos seleccionados *Andropogon gayanus*, *Urochloa brizantha*, *Cynodon plectostachyus* y *Megathyrsus maximus* var. Guinea, son especies de uso común. Al comienzo de la temporada de lluvias, cada pasto se cultivó en cuatro parcelas (5 × 5 m). Dos parcelas no fueron fertilizadas, y las otras fueron fertilizadas con N de urea (relación equivalente a 100 kg de N/ha). Esta dosis es representativa de la que usan los productores locales de ganado. Todas las parcelas se cortaron previamente a una altura de 5 cm. Hubo dos períodos de muestreo (20 de junio y 25 de julio). Después de 35 días de rebrote, se recortó una muestra de 2 m² del centro de cada parcela a una altura de 10 cm. Se tomaron muestras entre las 0700 y las 0900 h.

Una submuestra de 500 g de material verde se congeló inmediatamente a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, y otra se colocó en un horno de aire forzado a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h para determinar el contenido de MS y se desechó. Al final del período de muestreo (25 de julio), cuatro muestras congeladas de cada pasto se liofilizaron, se colocaron en bolsas de congelador de $30 \times 25\text{ cm}$ y se enviaron a la Universidad de Cornell, EUA para su análisis químico.

Todas las muestras se molieron a través de un tamiz de 1 mm en un molino Wiley (Modelo 4, Arthur H. Thomas Co. Filadelfia, PA). La materia seca de corrección se determinó por secado directo al horno de muestras a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante la noche. La proteína cruda ($\text{N} \times 6.25$) se determinó mediante un procedimiento Macrokjeldahl⁽²⁰⁾, modificado, utilizando ácido bórico a una concentración de 4% durante la destilación. Se determinaron la fibra detergente neutra (FDN) (sin sulfito de sodio), la fibra detergente ácida (FDA), los carbohidratos no estructurales (CNE), la proteína insoluble en detergente neutro (PIDN) y la proteína insoluble en detergente ácido (PIDA)⁽²¹⁾. También se determinaron lignina por permanganato, celulosa y cenizas insolubles en ácido⁽²²⁾. La hemicelulosa se calculó como la diferencia de FDN menos FDA con la corrección apropiada para el contenido de ceniza y proteína cruda. El contenido de azúcar se determinó por extracción con etanol (RIE)⁽²³⁾.

Los carbohidratos totales y sus fracciones (CNE, A, B₁, B₂ y C) fueron estimados como se indica:

Carbohidratos totales = $100 - \text{PC} - \text{ceniza} - \text{grasa}$.

Fracción C = $\text{lignina}/\text{FDN} * 2.4$.

Fracción B₂ = $(\text{FDN}/\text{MO}) - \text{PIDN} - \text{Fracción C}$.

Fracción A = $(\text{DM} - \text{PC} - \text{ceniza}) - (\text{residuo insoluble de etanol} - \text{PC en el residuo insoluble de etanol} - \text{ceniza en el residuo insoluble de etanol})$.

CNE = $100 - \text{PC} - (\text{FDN} - \text{PIDN}) - \text{ceniza} - \text{grasa}$.

Fracción B₁ = $\text{SDN} - \text{A}$.

La cinética de digestión de las fracciones de carbohidratos se estimó a partir de mediciones de producción de gas⁽¹¹⁾ utilizando el procedimiento de sustracción de curvas⁽¹²⁾. Para lograr esto, el forraje completo, el residuo insoluble en etanol (RIE) y la FDN aislada (FDNa) se fermentaron por separado. Para RIE⁽²³⁾ 500 mg de muestra en 100 ml de etanol al 90% vol / vol se agitaron durante 4 h. La muestra se filtró a través de una malla de nylon de $37\text{ }\mu$ (Tetko®, Briarcliff Manor, NY) y se lavó tres veces con etanol al 90% sin vacío y una vez con acetona al vacío. La muestra se secó a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante la noche para eliminar la acetona residual.

Para la FDNa⁽¹¹⁾, se esterilizaron en autoclave 500 mg de muestra y 100 ml de solución de detergente neutro en viales de vidrio de 150 ml durante 1 h a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta FDNa se enjuagó con agua caliente y 100 ml de etanol, y se filtró a través de una malla de nylon de $37\text{ }\mu$. El

detergente residual se eliminó sumergiendo la FDNa durante la noche a 39°C en una solución de 1 M (NH₄)₂SO₄ (1 g de FDN a 100 ml 1 M (NH₄)₂SO₄). La FDNa se enjuagó nuevamente con agua caliente seguido de 100 ml cada uno de etanol y acetona y se secó al aire.

Para la digestión *in vitro*⁽²²⁾, el medio se hirvió para eliminar los gases disueltos y se enfrió, se añadió cisteína y el pH se ajustó a 6.8 según fuera necesario. El sulfuro de sodio fue reemplazado por un peso igual de clorhidrato de cisteína para proteger los sensores de presión utilizados para controlar el volumen de gas de las trazas de sulfuro de hidrógeno. El líquido ruminal se recogió aproximadamente 4 h después de la alimentación de dos de cada cuatro vacas Holstein maduras no lactantes alojadas en la LARTU (Unidad de Investigación y Enseñanza de Grandes Animales de la Universidad de Cornell) y se mantuvo en el heno Timothy (*Phleum pratense*) en Plena Floración (PB, 8%; FDN, 65%), de calidad similar a la de las gramíneas de este estudio, de acuerdo con el protocolo del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA).

Al comienzo de la fermentación, cada botella de suero de 120 ml contenía 8 ml de medio, 2 ml de fluido ruminal y 100 mg de forraje completo, RIE o FDN aislado. La producción de gas se midió cada 20 min durante una fermentación de 48 h utilizando un sistema de monitoreo computarizado^(11,12). La desaparición de FDN se determinó al final de cada fermentación⁽¹¹⁾. Todos los volúmenes de gas fueron corregidos a la presión atmosférica estándar (760 mm Hg).

La estimación de las tasas de digestión para las fracciones A, B₁, B₂ y CNE por sustracción de curva requiere que el volumen de gas producido por las preparaciones separadas (RIE y FDN) se ajuste a una base común proporcional al contenido de cada fracción dentro del forraje completo⁽⁸⁾. Por lo tanto, el volumen de gas producido se ajustó proporcionalmente al contenido de MO de todo el forraje.

La producción de gas durante la fermentación se registró cada 20 min durante 48 h. Punto por punto, los datos de la curva se restaron del gas producido por la fracción más grande^(8,24). El gas de la fracción A se estimó por la diferencia entre los rendimientos de gas de toda la muestra de forraje y su preparación RIE. La fracción B₁ se estimó por la diferencia entre la preparación de RIE y la FDNa. La fracción B₂ es el gas producido por la fermentación de la FDNa, y los CNE es la diferencia entre el forraje completo y su FDNa.

Los análisis de cinética de la producción acumulada de gas se obtuvieron mediante un modelo exponencial de grupo simple con retraso⁽²⁵⁾, $Y = a * (1 - \exp(-b * (xc)))$, donde Y= volumen de gas mL/100 mg MO a tiempo x; a= volumen máximo de gas, ml; b= tasa constante de producción de gas, % / h; c= término de retraso, h. Las curvas de gas obtenidas por sustracción para las fracciones A, B₁ y CNE alcanzaron sus asíntotas entre 12 y 24 h, lo que indica que estas fracciones se habían agotado⁽¹²⁾. Posteriormente, los cambios en el volumen de gas están

relacionados con el recambio microbiano y la posible no aditividad del enfoque de sustracción de curva^(26,27). Por esta razón, las curvas de gas para las fracciones A, B₁ y SDN se truncaron para el ajuste de la curva después de estabilizarse⁽⁸⁾. Todas las curvas se ajustaron utilizando el paquete computacional “Table curve” (versión 4.0, Jandel Scientific, San Rafael, CA).

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar con arreglo factorial y dos repeticiones por tratamiento, en el que los factores fueron las especies de gramíneas y la fertilización con nitrógeno. Se usó pasto Guinea (*M. maximus*) como estándar de laboratorio para controlar la variación del fluido ruminal entre los análisis *in vitro*. Se siguió una disposición factorial 4 × 2 de especies forrajeras (*A. gayanus*, *U. brizantha*, *C. plectostachyus* o *M. maximus* var. Guinea) y fertilización con N (0 y 100 Kg/ha) como factores. Las comparaciones planificadas entre los forrajes se evaluaron mediante el procedimiento W de Tukey. Los resultados se consideraron significativos a $P \leq 0.05$ para los efectos de las especies de gramíneas y la fertilización. Los análisis ANOVA se realizaron utilizando el MINITAB, Versión 10 (Minitab Inc., State College, PA)⁽²⁸⁾. Debido a que no hubo interacciones (pasto o fertilización con nitrógeno) de la disposición factorial de tratamientos 4 × 2, en los Cuadros 2 y 3 sólo se muestran las medias de los factores medios (fertilización pasto o N).

La composición química por especie de pasto y la cantidad de fertilización con N se presentan en el Cuadro 1. El crecimiento de los pastos se llevó a cabo bajo las mismas condiciones ambientales y de manejo, la composición química de los pastos difiere según la especie. *Urochloa* contenía menos FDN, proteína insoluble en detergente neutro (PIDN) y lignina que los otros pastos. *Andropogon* tenía altos niveles de PIDN y CNE. *Megathyrsus*, sin embargo, se distinguió por su alto contenido de cenizas y cenizas insolubles en ácido (CIA), y su bajo contenido (7.2%) de PC. Estos valores reflejan los encontrados en las mismas especies de edad similar con el clima A_{w0} en Guerrero, México⁽²⁹⁾. *Cynodon* tenía alta la FDN y bajo contenido de CNE. Los pastos variaron en sus distribuciones de componentes químicos, lo que refleja diferencias en la morfología y fisiología. Informes anteriores han indicado variaciones en la composición química de los pastos tropicales debido a las especies⁽³⁰⁾, la estación del año⁽³¹⁾ y la edad de la planta^(32,33). En estos estudios, se observaron consistentemente altas cantidades de cenizas en *Megathyrsus*, baja lignina en *Urochloa* y bajas cantidades de proteína cruda en *Cynodon*. Los resultados del componente químico son consistentes con otros informes para *Cynodon*⁽³⁴⁾, *Megathyrsus*⁽³⁵⁾, *Urochloa*⁽³⁶⁾ y *Andropogon*⁽²⁹⁾, lo que sugiere posibles diferencias de crecimiento inherentes en sus tejidos vegetales⁽³³⁾.

Cuadro 1: Composición química (g/100g MS) de cuatro pastos tropicales fertilizadas con Nitrógeno

	<i>A.</i> <i>gayanus</i>	<i>U.</i> <i>brizantha</i>	<i>C.</i> <i>plectosta-</i> <i>chyus</i>	<i>M.</i> <i>maximus</i>	SEM	No fertilizado	Fertilizado	EEM
Ceniza	8.2 ^c	9.6 ^b	9.5 ^b	11.3 ^a	0.12	8.3 ^b	10.9 ^a	0.06
EE	2.0 ^b	2.4 ^a	1.3 ^c	2.6 ^a	0.05	1.6 ^b	2.5 ^a	0.03
PC	9.1 ^a	9.0 ^a	8.3 ^{ab}	7.2 ^b	0.12	5.9 ^b	10.9 ^a	0.06
FDN	69.8 ^b	66.4 ^c	74.9 ^a	69.1 ^{bc}	0.36	72.6 ^a	67.5 ^b	0.18
PNID	4.4 ^a	1.2 ^c	3.1 ^{ab}	2.9 ^b	0.14	2.2 ^b	3.6 ^a	0.07
FDA	41.0 ^a	36.5 ^b	41.2 ^a	42.3 ^a	0.18	40.3 ^a	40.2 ^a	0.09
PIDA	0.6 ^b	0.3 ^c	0.8 ^a	0.6 ^b	0.02	0.5 ^b	0.7 ^a	0.01
CIA	4.3 ^{ab}	3.1 ^c	3.3 ^{bc}	5.0 ^a	0.13	3.5 ^a	4.4 ^a	0.06
Cel	32.2 ^a	29.7 ^b	32.3 ^a	33.0 ^a	0.09	32.4 ^a	31.2 ^b	0.05
Hem	28.2 ^b	31.3 ^a	33.1 ^a	28.3 ^b	0.22	33.1 ^a	27.3 ^b	0.11
CNE	16.5 ^a	14.7 ^{ab}	10.7 ^c	14.0 ^b	0.22	14.6 ^a	13.3 ^b	0.11
Lig	4.4 ^b	3.7 ^c	5.6 ^a	4.3 ^{bc}	0.06	4.5 ^a	4.5 ^a	0.03
RIE	87.2 ^{ab}	85.5 ^b	89.1 ^a	87.9 ^a	0.22	87.3 ^a	87.5 ^a	0.11

EE= extracto etéreo; PC= proteína bruta; FDN= fibra detergente neutra; PIDN= proteína insoluble en detergente neutro; FDA= fibra detergente ácida; PIDA= proteína insoluble en detergente ácido; CIA= ceniza insoluble en ácido; Cel= celulosa; Hem= hemicelulosa; CNE= carbohidratos no estructurales; Lig= lignina; RIE= residuo insoluble en etanol al 90%.

^{a,b,c} Medias con distintos superíndices difieren ($P \leq 0.05$) por el efecto del pasto o por el efecto de la fertilización.

La fertilización con N modificó la cantidad y el patrón de distribución de los nutrientes en estos pastos (Cuadro 1). Los contenidos de proteínas aumentaron tanto en la pared celular como en las fracciones solubles de la célula. Debido a que los aminoácidos y las proteínas en las plantas se sintetizan a partir de azúcares⁽³⁷⁾, un aumento en el suministro de N deprime el contenido de azúcar (menos CNE). La fertilización también reduce el contenido de FDN y la mayor parte de esta disminución ocurre en la hemicelulosa, la mayoría de la cual se deposita en la pared secundaria a medida que las plantas maduran. También se ha encontrado un aumento en la PC y la reducción de FDN en *Urochloa ruziziensis* fertilizada con 120 kg/N/ha y cosechada a 30 días de rebrote⁽³⁶⁾.

Los componentes químicos de la célula vegetal se han utilizado para predecir matemáticamente la energía del alimento disponible para el animal^(37,38). Un enfoque alternativo es integrar las tasas de digestión y paso utilizando la relación entre diferentes reservorios de energía, $Kd = Kd / (Kd + Kp)$, donde Kd es la tasa de digestión y Kp es la tasa de paso. Las reservas estimadas de carbohidratos de los pastos en este estudio se encuentran en el Cuadro 2. El contenido total de carbohidratos varió de 77.8 a 80.4 % de MO. El contenido de FDN digestible (fracción B₂) varió de 47.8 a 51.2% de la MO, siendo el menor valor para

Andropogon y el mayor para *Cynodon*. Por el contrario, el contenido de CNE fue mayor en *Andropogon* (17.4 % MO) y menor en *Cynodon* (10.7 % MO). La fracción C (Lignina / FDN * 2.4), que se supone no digerible, varió de 13.5 a 18.0 % con la mayor cantidad encontrada en *Cynodon* y la menor en *Urochloa*. Como proporción de CNE, la fracción A (azúcares, ácidos orgánicos y polisacáridos de cadena corta) constituía el 68 % del total con la fracción B₁ (almidón y fibra soluble) constituida por el resto. Si bien la fracción B₁ en los forrajes tropicales contiene el grupo más pequeño de carbohidratos (principalmente como almidón), representa aproximadamente un tercio (30 %) de CNE. Las fracciones de carbohidratos en este estudio coinciden con las mostradas en la biblioteca de alimentos del LRNS y del CNCPS. Se ha encontrado en otras partes del mundo tropical, que en pastos de la misma especie la fracción B₁ es la fracción de CHO y que está hecha principalmente de almidón⁽³⁹⁾. El CNE es una fracción compleja donde el almidón es parte de los carbohidratos no fibrosos (CNF) y las pectinas son parte de los carbohidratos estructurales no contabilizados en la fracción B₂.

Cuadro 2: Fracciones de carbohidrato (g/100g MO) de cuatro pastos tropicales fertilizados con Nitrógeno

	<i>A.</i> <i>gayanus</i>	<i>U.</i> <i>brizantha</i>	<i>C.</i> <i>Plectosta-</i> <i>chyus</i>	<i>M.</i> <i>maximus</i>	SEM	No fertilizado	Fertilizad o	EEM
CHO	80.4 ^a	79.7 ^a	79.9 ^a	77.8 ^b	0.12	83.7 ^a	75.2 ^b	0.06
A	10.6 ^a	10.8 ^a	7.9 ^b	9.6 ^{ab}	0.19	10.5 ^a	9.0 ^b	0.10
B ₁	6.8 ^a	4.7 ^{ab}	2.7 ^b	4.0 ^b	0.26	4.5 ^a	4.6 ^a	0.13
CNE	17.4 ^a	15.5 ^{ab}	10.7 ^c	13.6 ^b	0.24	15.0 ^a	13.6 ^b	0.12
B ₂	47.8 ^b	50.6 ^{ab}	51.2 ^a	49.4 ^{ab}	0.32	53.9 ^a	45.6 ^b	0.16
C	15.2 ^b	13.5 ^b	18.0 ^a	14.8 ^b	0.20	14.8 ^b	16.0 ^a	0.10

CHO= contenido de carbohidratos totales, % MO=100-PB-ceniza-grasa; A= (material seco ajustado para PC y ceniza) - (residuo remanente posterior a la extracción con etanol al 90% ajustado para PB y ceniza); B₁=CNE-A; CNE=carbohidratos no estructurales=100-PC-(FDN-PIDN)-grasa-ceniza; B₂=FDN en base de materia orgánica menos PNID menos la fracción C; C =Lignina/FDN*2.4.

^{a,b,c}Medias con distintos superíndices difieren ($P \leq 0.05$) por el efecto del pasto o por el efecto de la fertilización.

La fertilización nitrogenada tuvo un doble impacto negativo en las reservas de carbohidratos (Cuadro 2). Primero, el carbohidrato total de la planta se redujo debido a un grupo A más pequeño. Un aumento en las fracciones de N requiere una depresión correspondiente en los componentes que no son de nitrógeno, especialmente los azúcares⁽³⁷⁾. En segundo lugar, el grupo B₂ se redujo en un 15.4 %. A diferentes niveles de fertilización con N se ha demostrado el mismo efecto sobre la FDN⁽³⁶⁾. El efecto positivo de la fertilización con N en la reducción del contenido de FDN se compensa con un efecto negativo en el aumento de la lignificación. El resultado neto es una reducción en la disponibilidad de la fracción B₂ y un aumento en la fracción no digerible (C). El efecto general en la planta es una reducción en los carbohidratos totales disponibles. Esta puede ser la razón por la cual no hay mejoras en la DIVMS con

fertilización con N⁽³⁶⁾. Las predicciones del CNCPS⁽¹⁵⁾ encontraron que la FDN más baja en los pastos tropicales fertilizados con nitrógeno fue compensada por una mayor PC y cenizas, lo que redujo el contenido de CNE. Como resultado, la fertilización nitrogenada no cambió significativamente el nivel de EM para la leche. Sin embargo, mejoró drásticamente el nivel permitido de PM para la leche. Debido a que la fertilización con N aumentó tanto la PC como el contenido de proteína soluble de los pastos, aumentaron tanto el equilibrio ruminal de N como el equilibrio peptídico. Juárez-Lagunes *et al*⁽¹⁹⁾ concluyeron que se podría esperar que la fertilización con N mejore el nivel permitido de PM de la leche, principalmente debido al aumento de los tamaños de las reservas de PB y proteína soluble.

Otro desafío es establecer una conexión entre las reservas de carbohidratos, el rendimiento energético de la fermentación ruminal y la producción de gas. La producción de gas no solo se ve afectada por la cantidad de carbohidratos en una fracción dada, sino también por su disponibilidad. En este estudio se encontraron rangos de 27 a 30 ml de gas por 100 mg de MO de forraje completo. Se observó una producción de gas similar en 24 especies de gramíneas tropicales en Etiopía⁽⁴⁰⁾. *Cynodon* produjo menos gas que *Megathyrsus* (Cuadro 3) porque *Cynodon* contiene una fracción C mayor que *Megathyrsus* (Cuadro 2). Una gran fracción C indica menor disponibilidad de la pared celular. Sin embargo, la fracción C no explica la baja disponibilidad de CNE. En general, se supone que la fracción CNE es altamente digerible⁽³⁷⁾. Debido a que *Andropogon* tiene más carbohidratos totales con el mismo tamaño de fracción C que *Megathyrsus*, es de esperarse que *Andropogon* produzca más gas que *Megathyrsus*. Sin embargo, las producciones de gas fueron similares (Cuadro 3). Algo puede interferir con la producción de gas de *Andropogon*.

Cuadro 3: Producción de gas y tasas de digestión de cuatro pastos tropicales fertilizados con Nitrógeno

	A. <i>Gaya- nus</i>	U. <i>Brizan- tha</i>	C. <i>Plectosta- chyus</i>	M. <i>Maxi- mus</i>	SEM	No fertilizado	Fertili- zado	EEM
Carbohidratos totales								
Gas total, mL	23.7 ^a	23.0 ^a	21.6 ^b	23.6 ^a	0.11	24.0 ^a	21.9 ^b	0.05
Gas, mL/100 mg MO	29.5 ^{ab}	28.9 ^b	27.1 ^c	30.3 ^a	0.15	28.7 ^a	29.2 ^a	0.07
Tasa de degradación, %/h	5.1 ^{ab}	5.2 ^{ab}	4.8 ^b	6.0 ^a	0.10	4.9 ^b	5.7 ^a	0.05
Fase de retraso, h	2.2 ^b	2.4 ^b	1.0 ^c	3.0 ^a	0.06	2.1 ^a	2.2 ^a	0.03
Fracción B ₂								
Gas total, mL	19.4 ^a	18.6 ^{ab}	17.5 ^c	18.4 ^{ab}	0.14	19.2 ^a	17.8 ^b	0.07
Gas, mL/100 mg MO	40.9 ^a	36.9 ^{ab}	34.0 ^b	37.3 ^{ab}	0.43	35.3 ^b	39.2 ^a	0.21
Tasa de	7.3 ^{ab}	8.4 ^a	3.8 ^c	6.8 ^b	0.16	6.5 ^a	6.6 ^a	0.08

degradación, %/h									
Fase de retraso, h		4.5 ^b	5.2 ^b	4.6 ^b	6.7 ^a	0.14	5.2 ^a	5.3 ^a	0.07
Fracción CNE									
Gas total, mL		4.3 ^b	4.4 ^b	4.1 ^b	5.2 ^a	0.08	4.8 ^a	4.1 ^b	0.04
Gas, mL/100 mg		24.5 ^b	28.1 ^b	38.6 ^a	38.6 ^a	0.90	34.1 ^a	30.8 ^a	0.45
MO									
Tasa	de	13.8 ^b	27.4 ^a	13.2 ^b	8.6 ^b	0.77	17.5 ^a	14.0 ^a	0.38
degradación, %/h									
Fase de retraso, h		1.2 ^a	0.5 ^a	0.1 ^b	0.6 ^a	0.11	0.3 ^a	0.8 ^a	0.05
Fracción A ₁									
Gas total, mL		3.3 ^a	2.0 ^b	3.4 ^a	3.2 ^a	0.08	3.2 ^a	2.7 ^b	0.04
Gas, mL/100 mg		31.7 ^b	18.2 ^c	42.6 ^a	33.4 ^b	0.72	32.0 ^a	31.0 ^a	0.36
MO									
Fracción B ₁ ¹									
Gas total, mL		0.9 ^b	2.4 ^a	0.7 ^b	2.0 ^a	0.09	1.6 ^a	1.4 ^a	0.05
Gas, mL/100 mg		13.8 ^b	54.7 ^a	24.4 ^{ab}	51.4 ^a	3.44	39.8 ^a	32.3 ^a	1.72
MO									

Carbohidratos totales= 100 - PC - ceniza - grasa.

Fracción B₂ = carbohidratos estructurales digestibles= FDN/MO - PIDN - Fracción C.

Fracción CNE = carbohidratos no estructurales= 100 - PB - (FDN - PIDN) - ceniza - grasa.

Fracción A= azúcares y polisacáridos de cadena corta = materia seca ajustado para PC y ceniza) - (residuo remanente posterior a la extracción con etanol al 90% ajustado para PC y ceniza).

Fracción B₁ = almidón y fibra soluble = CNE - A.

¹Tasas de degradación (%/h) y fases de retraso (h) para las fracciones A y B₁ que fueron similares a la fracción CNE.

^{a,b,c} Medias con distintos superíndices difieren ($P \leq 0.05$) por el efecto del pasto o por el efecto de la fertilización.

Los volúmenes de gas producidos por el CNE también se muestran en el Cuadro 3. *Andropogon* y *Urochloa* contienen más CNE que *Cynodon* y *Megathyrus* (Cuadro 2), pero producen el mismo volumen de gas de la fracción CNE. Además, la cantidad de gas por 100 mg de CNE se reduce, lo que sugiere que se inhibieron las fermentaciones del CNE de *Andropogon* y *Urochloa*. Según la técnica de sustracción, la fermentabilidad de la fracción A de *Urochloa* y la fracción B₁ de *Andropogon* aparentemente se vieron afectadas. Se sospecha que sustancias similares a los taninos (TLS)⁽⁴¹⁾ u otros compuestos secundarios interfieren en la fermentación de CNE. Durante la preparación de la FDNa; los taninos, el silicio biogénico u otros compuestos secundarios se lavan, por lo que la fermentación del FDN aislado se vería afectada solo por el contenido de lignina.

Cuando se aplicó la sustracción de curva a CNE (forraje completo - FDNa), todas las sustancias potencialmente interferentes (taninos, sílice biogénico o compuestos secundarios) se contabilizaron en la fracción CNE, reduciendo así la producción de gas. En nuestro caso, la digestibilidad del FDN aislado fue 6.6 % mayor que para el FDN de forraje completo. Estas

diferencias fueron 6.9 % para *Andropogon* y *Urochloa*, y 6.2 % para *Cynodon* y *Megathyrus*. Como resultado, es posible que se haya experimentado una baja predicción de la producción de gas CNE. Debido a que las cantidades de sílice soluble fueron similares en *Cynodon* y en *Megathyrus* en comparación con *Andropogon* y *Urochloa* (ver AIA en el Cuadro 1), se supuso que la principal fuente de variación en el gas producido por la fracción CNE probablemente era resultado de compuestos secundarios. En una encuesta botánica, *Megathyrus* no contenía TLS, que obtiene la máxima expresión en *A. gayanus*⁽⁴¹⁾. En el estudio, *Urochloa* no parecía contener taninos condensados; sin embargo, se sospecha que de hecho puede haber otras sustancias interferentes. Estos hallazgos respaldan la sugerencia de que el contenido de lignina se debe agregar a la ecuación para estimar los carbohidratos totales por el modelo CNCPS. Por lo tanto, esta ecuación CNCPS modificada se convertiría en:

$$\text{CHO (g/kg DM)} = 1000 - [\text{PC (g/kg DM)} + \text{EE (g/kg DM)} + \text{MM (g/kg DM)} + \text{Lignina (g/kg DM)}]$$

La interferencia de los fenoles en la digestión de las leguminosas y los pastos amerita más estudio para un mejor manejo de la nutrición de los rumiantes en los trópicos.

La fertilización nitrogenada redujo la cantidad total de carbohidratos disponibles para la fermentación ruminal (Cuadro 2). El volumen de gas producido disminuyó proporcionalmente con la cantidad de carbohidratos (Cuadro 3). Por ejemplo, no hubo diferencia en la cantidad de gas por 100 mg de sustrato de forrajes fertilizados y sin fertilización. En la fracción B₂, el forraje fertilizado (FE) produjo menos gas que el forraje no fertilizado (NF) porque el FE contenía menos carbohidratos estructurales (CE) fermentables. En este estudio de forrajes de la misma edad, los pastos fertilizados contenían menos FDN y la misma cantidad de lignina como porcentaje de materia seca que los pastos no fertilizados (Cuadro 1), lo cual coincide con los hallazgos de otros^(42,43). Por lo tanto, había más lignina como porcentaje del FDN. Por otro lado, la diferencia en el contenido de CE entre NF y FE se debió principalmente a la hemicelulosa. Se sabe que la hemicelulosa tiene enlaces más complejos con la lignina que la celulosa⁽³⁷⁾. Por lo tanto, la hemicelulosa debería estar cada vez menos disponible a medida que la pared celular de la planta madura debido a la presencia de un mayor número de uniones entre la hemicelulosa y la lignina⁽³³⁾. Las gramíneas NF contenían más hemicelulosa y más paredes celulares maduras que el FE⁽⁴⁴⁾. Los vínculos entre la lignina y la hemicelulosa se reflejaron en la reducción de la cantidad de gas por 100 mg de SC de los pastos NF (Cuadro 3). En resumen, los pastos fertilizados produjeron 7.3 % menos de gas total porque tienen menor cantidad de CE. Sin embargo, esto se compensó con 10 % más de gas por unidad de SC porque estos pastos son menos maduros que los pastos NF a la misma edad.

Las tasas de digestión se presentan también en el Cuadro 3. El rango de las tasas de digestión obtenidas por la ecuación exponencial para todo el forraje fue de 4.8 a 6.0 %/h ($r^2 = 99.7 \pm 0.12$; valor $t = 61.2 \pm 12.04$), lo que coincide con otros reportes⁽⁴⁵⁾. Para el FDN aislado, las tasas de digestión variaron de 3.8 a 8.4% / h ($r^2 = 99.8 \pm 0.11$; valor $t = 62.6 \pm 14.07$), valores

que fueron más altos que los reportados en otros informes^(4,18,19) de 2 a 4 %/h para la fracción B₂, y que correspondieron a tasas de digestión FDN entre 5.16 y 9.34 para pastos C₄⁽⁴⁶⁾ y ensilajes de maíz⁽⁴⁷⁾. Las versiones actualizadas de los modelos de nutrición (CNCPS; LRNS; NRC) deben incorporar estas tasas para estimar con mayor precisión la energía disponible a nivel ruminal a partir del CE de los pastos C₄. En los pastos tropicales, la fracción B₂ es la mayor reserva de carbohidratos, por lo que el impacto en la EM disponible para el animal podría ser significativo. La EM predicha para leche por el CNCPS⁽¹⁵⁾ fue muy sensible al cambio en la tasa de digestión de la fracción de carbohidratos B₂. La EM predicha para leche aumentó 88 % cuando la tasa lo hizo de 3 a 6 %/h, y 24 % adicional cuando la tasa pasó de 6 a 9 %/h. La PM predicha para leche se incrementó de -0.8 a 5.7 kg/d, cuando la tasa de B₂ aumentó de 3 a 6 %/h, y se incrementó a 9.9 kg/día con una tasa de B₂ de 9 %/h. Estos incrementos son el resultado de una mayor degradación ruminal del CE.

En este estudio, debido a que la fracción B₁ era menos de 10 % del total de MS, se combinaron las tasas de A y B₁ y se utilizó la tasa de CNE combinada para ambas fracciones (Cuadro 3). Las tasas para el CNE fueron muy variables, desde 8.6 %/h en *Megathyrus* hasta 27.4 %/h en *Urochloa* ($r^2 = 99.2 \pm 0.52$; valores $t = 13.7 \pm 6.83$), con una media general de 15.7 %/h. Estos valores están cerca del promedio (13.7 %/h) para *Bromegrass*, *Orchardgrass* y alfalfa, en las que las tasas de digestión fueron 13.9 %/h para la fracción A y 11.8 para la fracción B₁⁽⁸⁾, también para gramíneas tropicales brasileñas con tasas de digestión para la fracción CNE entre 6 y 12%⁽⁴⁸⁾. Los valores tabulares de CNCPS de las tasas de digestión para la fracción A son fijos 40, y para la fracción B₁ son 30 en la mayoría de los pastos tropicales. Se necesita más investigación sobre las tasas de digestión de las fracciones de carbohidratos en los pastos tropicales, y una revisión más frecuente de los valores tabulares para uso en el campo. La fertilización nitrogenada no tuvo mucha influencia aparente en las tasas de digestión (Cuadro 3). Aparentemente, éstas se vieron más afectadas por la estructura física inherente a la planta. El volumen de gas producido y la extensión de la digestión estuvieron más relacionados con la composición química del forraje⁽⁴⁸⁾. La anatomía del tejido afecta fuertemente las tasas de degradación. Como el engrosamiento de la pared secundaria, la vascularización, el esclerénquima, la epidermis y el parénquima de las hojas del C₄ forman bloques sólidos y multicelulares que constituyen una barrera para el acceso microbiano a la superficie de la pared de las células vegetales⁽⁴⁹⁾. Si todas las células tuvieran solo paredes primarias delgadas (p. ej., el mesófilo, el floema y los tejidos del parénquima indiferenciados de hojas y tallos jóvenes), la pared celular se degradaría rápidamente.

En resumen, químicamente *Andropogon* y *Urochloa* contienen más CNE que *Megathyrus* y *Cynodon*, pero producen menos gas por unidad de CNE. Se sospecha interferencia de compuestos secundarios. Las tasas de digestión para la fracción B₂ oscilaron entre 4 y 8 %/h, y la tasa promedio de digestión para el CNE fue de 15.7 %/h. La fertilización nitrogenada tuvo un impacto negativo en el tamaño de las reservas de carbohidratos, pero no afectó las tasas de digestión.

Las tasas de digestión encontradas en este estudio sugieren que el CNCPS, LRNS y NRC deberían actualizar con mayor frecuencia la energía disponible a nivel ruminal de CE y CNE en forrajes tropicales. El impacto en la predicción de la EM disponible para el animal podría mejorarse significativamente.

Agradecimientos

Este trabajo fue auspiciado por el Departamento de Ciencia Animal de la Universidad de Cornell, USA.

Literatura citada:

1. Van Soest PJ. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *JAOAC*. 1963;(46):829-835.
2. Van Soest PJ. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. *J Anim Sci* 1967;(26):119-128.
3. Tilley JMA, and Terry RA. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage of forage crops. *J Br Grassland Soc* 1963;(18):104-111.
4. Sniffen CJ, O'Connor JD, Van Soest PJ, Fox DG, Russell JB. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J Anim Sci* 1992;(70):3562-3577.
5. Fox DG, Tedeschi LO, Tylutki TP, Russell JB, Van Amburgh ME, Chase LE, Pell AN, Overton TR. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. *Anim Feed Sci Technol* 2004;(112)(1-4):29-78.
6. Lanzas C, Sniffen CJ, Seo S, Tedeschi LO, Fox DG. A revised CNCPS feed carbohydrate fractionation scheme for formulating rations for ruminants. *Anim Feed Sci Technol* 2007;(136):167-190.
7. Van Amburgh ME, Collao-Saenz EA, Higgs RJ, Ross DA, Recktenwald EB, Raffrenato E, *et al.* The Cornell Net Carbohydrate and Protein System: Updates to the model and evaluation of version 6.5. *J Dairy Sci* 2015;(98):6361-6380.
8. Doane PH, Pell AN, Schofield P. Ensiling effects on the ethanol fractionation of forages using gas production. *J Anim Sci* 1998;76(3):888-895.
9. Molina DO. Prediction in intake of lactating cows in the tropics and of energy value of organic acids [doctoral thesis]. Ithaca, New York, USA: Cornell University; 2002.

10. Menke KHL, Raab A, Salewski H, Steingass D, Fritz Schneider W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J Agric Sci (Camb)* 1979;(93):217-222.
11. Pell AN, Schofield P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J Dairy Sci* 1993;(76):1063-1073.
12. Schofield P, Pell AN. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *J Anim Sci* 1995;(73):3455-3463.
13. Nutrient Requirements of Beef Cattle. 2016. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Eighth revised ed. Washington, DC: The National Academic Press.
14. Large Ruminant Nutrition System (LRNS) v1.033 <http://nutritionmodels.com/lrns.html>
15. Juarez-Lagunes FI, Fox DG, Blake RW, Pell AN. Evaluation of tropical grasses for milk production by dual-purpose cows in tropical Mexico. *J Dairy Sci* 1999;(82):2136-2145.
16. Ki KS, Su BP, Dong HL, Seongwon S. Evaluation of the nutritional value of locally produced forage in Korea using chemical analysis and *in vitro* ruminal fermentation. *Asian-Australas J Anim Sci* 2017;(30)(3):355-362.
17. Carvalho P, Da Silva CL, Nalcino FP, Scatolin OI, Dias LPR, Moreno FM. *In vitro* kinetic parameters of marandu palisadegrass associated with nonfiber carbohydrates. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina* 2016;37(5):3253-3264.
18. Ribeiro RCO, Villela SDJ, Valadares Filho SC, Santos SA, Ribeiro KG, Detmann E, Zanetti D, Martins PGMA. Effects of roughage sources produced in a tropical environment on forage intake, and ruminal and microbial parameters. *J Anim Sci* 2015;(93):2363–2374.
19. Tiwari UP, Turano B, Jha R. Nutritional characteristics and *in vitro* digestibility by near-infrared spectroscopy of local and hybrid napiergrass varieties grown in rain-fed and irrigated conditions. *Anim Prod Sci* 2014;(54):1775–1778.
20. AOAC Official methods of analysis. 15th ed. Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists. 1990.
21. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 1991;(74):3583-3597.
22. Goering HK, Van Soest PJ. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures, and

- some applications). Washington, DC, USA: Agric. Handbook No. 379. ARS-USDA; 1970.
23. Hall MB, Lewis BA, Van Soest PJ, Chase LE. A simple method for estimation of neutral-detergent soluble fiber. *J Sci Food Agric* 1997;(74):441-449.
 24. Schofield P, Pell AN. Validity of using accumulated gas pressure readings to measure forage digestion *in vitro*: a comparison involving three forages. *J Dairy Sci* 1995;(78):2230-2238.
 25. Mertens DR, Loften JR. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. *J Dairy Sci* 1980;(63):1437-1446.
 26. Stefanon B, Pell AN, Schofield P. Effect of maturity on digestion kinetics of water-soluble and water-insoluble fractions of alfalfa and brome hay. *J Anim Sci* 1996;(74):1104-1115.
 27. Cone JW, Van Gelder AH, Visscher GJW, and Oudshoorn L. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim Feed Sci Technol* 1996;(61):113-128.
 28. Minitab Inc. Minitab Reference Manual, Release 10, PC Version. Minitab Stat. Software. State College, Pensilvania, USA. 1994.
 29. Arzate-Vázquez GL, Castrejón-Pineda FA, Rosiles-Martínez R, Carrillo-Pita S, Ángeles-Campos S, Vargas-Bello-Pérez E. Effect of genus and growth stage on the chemical and mineral composition of tropical grasses used to feed dairy cows. *Cien Inv Agr* 2016;43(3):476-485.
 30. Lim F, Wong CC. Nutritive values and correlation equations on some improved tropical forages. *MARDI Res J* 1997;(202):173-180.
 31. Ramos-Santana R, McDowell LR. *In vitro* digestibility, crude protein content, and mineral concentrations of *Cynodon*, *Brachiaria* and *Digitaria* accessions in a humid tropical region of Puerto Rico. *Commun Soil Sci Plant Annal* 1996;(27):2687-2697.
 32. Grant RJ, Perez CB Jr, Van Soest PJ, McDowell RE. Composition and *in vitro* true digestion of some Philippine feedstuffs. *Philippine J Anim Sci* 1973;(10):63-76.
 33. Arroyo-Aguilú JA, Tessema S, McDowell RE, Van Soest PJ, Ramírez A, Randel PF. Chemical composition and *in vitro* digestibility of five heavily fertilized tropical grasses in Puerto Rico. *J Agric Puerto Rico* 1975;(59):186-198.
 34. Poczynek M, Mikael N, Egon HH, Bruno JV, Danúbia NF, Milaine P, Galbeiro S. Mass and nutritional quality of upper and lower strata of tropical forages. *Semina: Ciências*

Agrárias, Londrina 2016;37(4):Supl 1:2725-2736.

35. Espinoza-Guerra I, Pérez-Oñate C, Montenegro-Vivas L, Sánchez-Liaño A, García-Martínez A, Martínez-Marín AL. Composition and *in vitro* rumen degradation kinetics of saboya grass (*Megathyrsus maximus*) silage with inclusion of passion fruit rind (*Passiflora edulis* Sims.). Rev Cient FCV-LUZ / 2016;(26):(6):402–407.
36. Lima RK, Carlos Augusto Brandão De CCA, Vidal AFH, Muninz MPA. Sward structure and nutritive value of *Urochloa ruziziensis* under nitrogen and potassium fertilization. Rev Caatinga Mossoró 2017;(30):(1):220–229.
37. Van Soest PJ. Nutritional ecology of the ruminant. Ithaca, New York, USA. Cornell University Press. 1994.
38. Weiss WP, Conrad HR, St. Pierre NR. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. Anim Feed Sci Technol 1992;(39):95-110.
39. Fukushima RS, Bacha CB, Fuzeto AP, Port ACR, Herling VR, Velasquez AV. Utilization of equations to predict carbohydrate fractions in some tropical grasses. Anim Feed Sci Technol 2015;(208):12-22.
40. Bezabih M, Pellikaan WF, Tolera A, Khan NA, Hendriks WH. Chemical composition and *in vitro* total gas and methane production of forage species from the Mid Rift Valley grasslands of Ethiopia. Grass Forage Sci 2013;(69):4.
41. Ellis RP. Tannin-like substances in grass leaves. Mem Bot Survey S Africa 1990;(59):3-78.
42. Oliveira EM, Oliveira FJ, Oliveira RA, Oliveira RM, Cecon RP. Determination of Xaraés grass quality submitted to irrigation water levels and nitrogen and potassium doses. J Brazilian Assoc Agr Engineering 2017;(37):(1):64-74.
43. Campos FP, Nicacio DRO, Sarmiento P, Cruz MCP, Santos TM, Faria AFG, Ferreira ME, Conceicao MRG, Lima CG. Chemical composition and *in vitro* ruminal digestibility of hand-plucked samples of Xaraes Palisade grass fertilized with incremental levels of nitrogen. Anim Feed Sci Technol 2016;(215):1-12.
44. Campos FP, Sarmiento P, Nussio LG, Lugão SMB, Lima CG. Fiber monosaccharides and digestibility of Milenio grass under N fertilization. Anim Feed Sci Technol 2013;(183):17-21.
45. Mertens DR. Application of theoretical mathematical models to cell wall digestion and forage intake in ruminants [doctoral thesis]. Ithaca, New York, USA: Cornell University; 1973.

46. Raffrenato E, Erasmus LJ. Variability of indigestible NDF in C3 and C4 forages and implications on the resulting feed energy values and potential microbial protein synthesis in dairy cattle. *South African J Anim Sci* 2013;43(5):(Suppl 1).
47. Huhtanen P, Seppala A, Ots M, Ahvenjarvi S, Rinne M. In vitro gas production profiles to estimate extent and effective first-order rate of neutral detergent fiber digestion in the rumen. *J Anim Sci* 2008;(86):651–659.
48. Detmann E, Coelho da Silva JF, Maldonado VH, Lara TH, Ramalho HI. Kinetic parameters of carbohydrates ruminal degradation of four tropical grasses in different cutting ages and nitrogen fertilizer levels. *R Bras Zootec* 2009;38(1):149-158.
49. Wilson JR. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. *J Agric Sci (Camb)* 1994;(122):173-182.