

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Determinación del contenido energético de materiales forrajeros a través de la relación entre la técnica de producción de gas *in vitro* y la ecuación mecanicista del NRC (2001)¹

Walter Arce-Ramírez², Augusto Rojas-Bourrillon³, Carlos M. Campos-Granados^{4✉}

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue estimar el contenido de energía metabolizable (EM) de fuentes forrajeras utilizadas en Costa Rica por medio de la ecuación del NRC (2001) y las ecuaciones utilizadas en la metodología de producción de gas *in vitro* a las 24 horas de incubación (PG24h). La composición química, bromatológica y la producción de gas se analizaron en el Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA). Se seleccionaron las dos ecuaciones de la metodología de gas con los mejores coeficientes de determinación respecto a la ecuación NRC (2001): Steingass y Menke (1980) y Menke y Steingass (1988). Mediante un análisis de correlación de Pearson y un análisis de regresión lineal se evaluó la relación entre la composición nutricional de los alimentos y ambas metodologías de estimación de energía. Los forrajes con mayor y menor EM obtenida con la ecuación NRC (2001) fueron el Ryegrass (2,59 Mcal kg/MS) y Camerún (1,79 Mcal kg/MS). De acuerdo a la ecuación del NRC (2001) se determinó que la fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y lignina influyen negativamente en la concentración de energía ($R^2 = -0,56$; $-0,54$; $-0,35$; $p < 0,05$, respectivamente), mientras que la proteína cruda (PC) y el extracto etéreo (EE) tienen una correlación positiva. La ecuación con el coeficiente de determinación más alto ($R^2 = 0,72$) considera las variables de PG24h, PC, FDN y lignina. La producción de gas no se ve afectada por la concentración de PC, cenizas y EE ($p > 0,05$), pero se ve afectada negativamente por la FDN, FDA y la lignina, con coeficientes de correlación de Pearson de $-0,44$, $-0,32$ y $-0,33$ ($p < 0,05$), respectivamente. El forraje con mayor PG24h fue la caña de azúcar, seguido de Festulolium y Ryegrass, mientras que el pasto Camerún y la Cratylia obtuvieron valores menores. El Ryegrass y el Camerún fueron los forrajes con mayor y menor energía respectivamente, estimados a partir de la ecuación de gas seleccionada. Las fracciones fibrosas se correlacionaron negativamente con la energía determinada mediante la ecuación de gas, mientras que la PC y EE presentan una relación positiva. La técnica de producción de gases demostró ser efectiva para estimar el contenido energético de fuentes forrajeras, a partir de una metodología que incluye menos análisis y por ende deriva en un menor costo por concepto de análisis de laboratorio.

Palabras clave: alimentación, rumiantes, contenido nutricional, energía.

¹ Proyecto de Investigación. 739-B5-142. Vicerrectoría de Investigación. Universidad de Costa Rica. Este trabajo forma parte de la tesis de licenciatura del primer autor. Ingeniería Agronómica con énfasis en Zootecnia. Escuela de Zootecnia. Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

² Alimentos del Norte S.A. (ALIANSA). Correo electrónico: walter.arceramirez@gmail.com

³ Universidad de Costa Rica. Escuela de Zootecnia y Centro de Investigación en Nutrición Animal. San José Costa Rica. Correo electrónico: augusto.rojas@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-9834-2361>)

^{4✉} Universidad de Costa Rica. Escuela de Zootecnia y Centro de Investigación en Nutrición Animal. San José Costa Rica. Autor para correspondencia: carlosmario.campos@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-0079-2621>)

Recibido: 14 agosto 2019

Aceptado: 26 marzo 2020

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



ABSTRACT

Determination of the energy content of forage materials through the relationship between the *in vitro* gas production technique and the mechanistic equation of the NRC (2001). The objective of this study was to estimate the metabolizable energy (ME) of different forage sources used in Costa Rica through the NRC equation (2001) and the equations used in the *in vitro* gas production methodology at 24 hours of incubation (PG24h). The chemical, bromatological composition and gas production were analyzed at the Animal Nutrition Research Center (CINA). The two equations with the best Pearson correlation coefficients with respect to the NRC (2001) were selected : that of Steingass and Menke (1980) and that of Menke and Steingass (1988). The relationship between the nutritional composition of the feedstuffs and both energy estimation methods was analyzed with Pearson analysis correlation and linear regression. The forages with the highest and lowest metabolizable energy obtained from the NRC methodology (2001) were Ryegrass (2.59 Mcal kg/DM) and Cameroon (1.79 Mcal kg/DM). According to the NRC equation (2001), it was determined that neutral detergent fiber (FDN), acid detergent fiber (FDA) and lignin negatively influence the energy concentration ($R^2 = -0.56$; -0.54 ; -0.35 ; $p < 0.05$, respectively), while crude protein (PC) and ether extract (EE) have a positive correlation. The equation with the highest determination coefficient ($R^2 = 0.72$) considers the variables of PG24h, PC, FDN and lignin. Gas production is not affected by the concentration of PC, ash and EE ($p < 0.05$), but it is negatively affected by the FDN, FDA and lignin, with a Pearson correlation coefficient of -0.44 , -0.32 and -0.33 ($p < 0.05$), respectively. The forage with the highest PG24h was sugar cane, followed by Festulolium and Ryegrass, while Cameroon and Cratylia grass obtained lower values. Ryegrass and Cameroon were the forages with the highest and lowest energy, respectively, estimated from the selected gas equation. The fibrous fractions were negatively correlated with the energy determined by the selected gas equation, while the PC and EE present a positive relationship. The gas production technique proved to be effective in estimating the energy content of forage sources, based on a methodology that includes less analysis and therefore results in a lower cost for laboratory analysis.

Key words: feeding, ruminants, nutritional content, energy.

INTRODUCCIÓN

Conocer la composición químico-bromatológica y la digestibilidad de los alimentos es imprescindible para la producción animal, ya que estos factores van a influir en el consumo de alimentos y en el aprovechamiento por parte del animal, afectando su desempeño productivo (Oliveira et al., 2014). En alimentación animal, la energía es el nutriente más limitante para el

desempeño productivo de los animales; es por esta razón que conocer su concentración y disponibilidad en los alimentos es de importancia para los nutricionistas (Rocha et al., 2003).

Según el NRC (1996), la energía es definida como el potencial para realizar trabajo y solo puede ser medida con referencias definidas y condiciones estandarizadas, donde todas las unidades son definidas de igual manera. Sánchez y Soto (1999) detallan que la energía que se libera de los alimentos consumidos por los animales es utilizada para mantener la temperatura corporal, el crecimiento, la actividad, la producción y la reproducción.

Cuantificar la cantidad total de energía de los alimentos (energía bruta) es relativamente simple, con el uso de una bomba calorimétrica se obtendría el valor, sin embargo, existe una variabilidad en la digestibilidad y en el metabolismo de los animales, que impide el uso de la energía bruta para la formulación de dietas o la comparación entre materias primas (Weiss, 1993).

El valor energético de los alimentos puede ser expresado de diversas maneras, desde la energía bruta (EB), energía digestible (ED), energía metabolizable (EM) y energía neta (EN) (Mendoza-Martínez et al., 2008), hasta los nutrientes digestibles totales (NDT); este último es similar a la ED. Los NDT incluyen una corrección para la digestibilidad de la proteína, pero no presenta ventajas o desventajas sobre la energía digestible como unidad que describe el valor de los alimentos o para expresar los requerimientos de energía del animal (1 kg de NDT equivale a 4,4 Mcal de ED) (NRC, 1996).

La mejor manera de conocer el valor energético de los alimentos en rumiantes, es mediante ensayos *in vivo* pues se consideran las mediciones más exactas y adecuadas para tal fin, pero su implementación es laboriosa y costosa, demanda gran cantidad de alimento, animales fistulados y disposición de instalaciones para su cuidado, de manera que se han desarrollado técnicas *in situ* o *in vitro*, para predecir la degradación ruminal (Abaş et al., 2005). Por esta razón, es importante la utilización de metodologías *in vitro* para las estimaciones de la calidad nutricional de los alimentos (Giraldo et al., 2006).

Las técnicas *in situ* e *in vitro* son métodos alternativos para predecir la degradabilidad de los alimentos de forma rápida, permitiendo la utilización de menor cantidad de alimento, así como la evaluación de diferentes alimentos al mismo tiempo (NRC, 1996). La metodología *in situ* presenta el inconveniente de que existe una falta de estandarización, por lo que existen diferencias en los resultados entre laboratorios, incluso cuando se utilizan las mismas condiciones de evaluación (Oliveira et al., 2014).

Uno de los métodos más utilizados para estimar el contenido energético de los alimentos, es la utilización de ecuaciones de predicción basadas en la composición química y/o en evaluaciones biológicas; entre esas ecuaciones de predicción se encuentra la desarrollada por Weiss et al. (1992), que utiliza un modelo mecanístico para predecir el valor de energía (Bruni et al., 2014). El modelo desarrollado por Weiss et al. (1992) utiliza los NDT para predecir el contenido energético. También se han realizado ecuaciones empíricas tomando en cuenta la fibra detergente ácida (FDA); que presentan errores de precisión en la predicción de 2 a 8 unidades porcentuales de NDT (Lundberg et al. 2004).

En Europa, utilizan ecuaciones de predicción donde se relacionan uno o más componentes químicos y/o el valor energético *in vitro* de los alimentos, mientras en Norte América, utilizan métodos sumativos que determinan la contribución de energía de cada componente químico para el contenido total de energía de los alimentos (Robinson et al., 2004).

Muchas técnicas *in vitro* que se utilizan para determinar el contenido nutricional de forrajes varían en su precisión, pero las que simulan un ambiente ruminal con microorganismos ruminales son las que ofrecen los mejores resultados (Cerrillo et al. 2012).

Por otra parte, la técnica de producción de gas simula de buena manera el ambiente ruminal (NRC, 1996). Evtayani et al. (2004) mencionan que esta técnica se ha expandido rápidamente, debido a la necesidad de contar con métodos de rutina y reproducibles para obtener la biodisponibilidad de los alimentos y su composición química.

Al ser Costa Rica un país tropical, cuenta con gran variedad de forrajes que son utilizados en la alimentación animal, por esta razón es importante evaluar su calidad nutricional con procedimientos que sean sencillos, económicos, precisos y que den el resultado en el menor tiempo posible. En los sistemas de producción en pastoreo, el contenido de energía de los forrajes tropicales es un componente crítico del sistema, debido al bajo contenido energético del material, y el gasto energético destinado a caminar en el potrero (Villalobos y Sánchez, 2010).

Debido a la importancia de estimar el contenido energético de las fuentes forrajeras utilizadas en la alimentación de rumiantes en Costa Rica, el objetivo de esta investigación fue realizar un análisis de correlación y regresión de los valores energéticos *in vitro* de materiales forrajeros obtenidos mediante la ecuación del NRC (2001) y la metodología de producción de gas *in vitro*, con la intención de utilizar una ecuación que permita predecir la energía de materiales forrajeros utilizando metodologías con menores costos económicos asociados y que tengan un grado de precisión aceptable.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

Este estudio se realizó en el Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA), de la Universidad de Costa Rica, entre los meses de julio y diciembre del año 2015.

Materiales utilizados

Para esta investigación se hizo uso de los siguientes forrajes: *Megathyrsus maximus* (Guinea), *Ischaemum ciliare* (Ratana), *Cynodon nlemfuensis* (Estrella africana), *Urochloa arrecta x Umutica* (Braquipará), *Cratylia argentea* (Cratylia), *Urochloa brizantha* (Brizantha), *Morus alba* (Morera), *Pennisetum purpureum* (Camerún), *Urochloa brizantha* var. Toledo, *Kikuyuocloa clandestina* (Kikuyo), *Lolium perenne* (Ryegrass), *Tithonia diversifolia* (Botón de oro), *Saccharum officinarum* (Caña de azúcar), *Urochloa brizantha* cv. Mulato, *Festulolium loliaceum* Huds. (Festulolium), *Hemarthria altissima* (Limpograss), *Megathyrsus maximus* (Jacq.) (Mombaza).

También se utilizaron ensilajes de los siguientes materiales: pasto Maralfalfa (*Pennisetum violaceum*) con melaza, pasto Maralfalfa + 15% guineo cuadrado (*Musa sp.* ABB), 30% guineo cuadrado y 45% guineo cuadrado, Cratylia, Sorgo (*Sorghum vulgare*), sorgo más pulpa de piña y rastrojo de piña.

Análisis químico y bromatológico

Los análisis bromatológicos de fibra detergente neutro (FDN) y lignina (L) se realizaron según la metodología de Van Soest et al. (1991). La determinación de nitrógeno insoluble en fibra detergente neutro (NFDN) y en fibra detergente ácido (NFDA) se realizó con la metodología desarrollada por Licitra et al. (1996). Los análisis químicos como proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE) y cenizas se efectuaron según el método de referencia AOAC 2001,11; 920.39 y 942.05, respectivamente (AOAC 1998). En el Cuadro 1 y 2 se muestra la composición nutricional de los diferentes alimentos utilizados en la investigación.

Modelo del NRC (2001) para predicción de energía

El contenido de NDT de los alimentos, como porcentaje de la materia seca, se calculó a partir de la suma de las digestibilidades verdaderas (dv) de las fracciones energéticas, que incluye a la proteína cruda (PC), los carbohidratos estructurales (FDN), los carbohidratos no fibrosos (CNF) y el extracto etéreo (EE) (multiplicado por 2,25 que hace referencia a la cantidad de energía encontrada respecto a los carbohidratos), asumiendo una pérdida endógena fecal de NDT del 7%, según lo detalla la ecuación del NRC (2001):

$$NDT \% = dPC + dCNF + (dFA * 2,25) + dFDN - 7$$

Para el cálculo de la Energía Metabolizable (EM) en forrajes con EE menor a 3,0% se utilizó la siguiente ecuación:

$$EM (Mcal/kg) = (1,01 * ED - 0,45).$$

Para forrajes con EE por encima de 3,0% se utilizó la siguiente ecuación:

$$EM (Mcal/kg) = (1,01 * ED - 0,45) + 0,0046 * (EE - 3).$$

La EN_L se deriva de dos ecuaciones, una para forrajes con menos de 3,0% de EE y otra para forrajes con más de 3,0% de EE:

$$EN_L (Mcal/kg) = (0,703 * EM - 0,19) \text{ para } EE < 3\%$$

$$EN_L (Mcal/kg) = (0,703 * EM - 0,19) + (((0,097 * EM + 0,19)/97) * (EE - 3)) \text{ para } EE > 3\%$$

La EN_m y EN_g se calculó a partir de las siguientes ecuaciones:

$$EN_m (Mcal/kg) = 1,37 * EM - 1,138 * EM2 + 0,0105 * EM3 - 1,12$$

$$EN_g (Mcal/kg) = 1,42 * EM - 0,174 * EM2 + 0,0122 * EM3 - 1,65$$

Cuadro 1. Promedios para las variables de composición nutricional expresada en base seca de los forrajes utilizados durante esta investigación.

Forraje (n)	Edad (días)	MS (%)	PC (%)	EE (%)	FDN (%)	FDA (%)	NFDN (%)	NFDA (%)	Cenizas (%)	L (%)
Guinea (2)	30	24,50	9,03	2,45	70,10	37,50	0,56	0,13	9,39	2,45
Ratana (4)	20-21	18,97	12,20	2,60	63,68	34,40	1,02	0,19	9,55	2,30
Estrella africana (4)	24-35	24,38	16,65	3,32	65,48	29,12	0,88	0,16	9,84	2,23
Braquipará (5)	24-33	17,22	13,29	3,56	61,86	31,72	0,89	0,16	10,40	2,20
Brizantha (2)	26	27,10	9,54	2,85	68,20	34,30	0,75	0,53	11,57	2,10
Camerún (3)	75	15,01	9,96	1,86	70,67	38,80	0,63	0,29	13,04	5,07
Morera (3)	55	25,86	11,10	2,32	54,70	35,73	0,59	0,25	6,97	5,67
Kikuyo (4)	30-33	14,15	21,96	2,79	57,28	26,62	1,02	0,17	12,86	1,33
Ryegrass (4)	34	14,79	21,66	5,66	42,13	20,32	0,84	0,17	12,28	2,08
Cratylia (3)	90	29,23	19,21	4,56	60,00	39,77	1,57	0,59	7,97	7,20
Toledo (2)	27	27,10	13,80	3,60	65,80	33,00	0,53	0,11	7,89	2,35
Guinea corte (3)	45-60	19,31	10,24	2,38	67,10	40,70	0,88	0,17	12,27	2,40
Botón de oro (1)	45	11,63	23,40	2,20	39,80	24,90	2,54	0,69	15,30	9,80
Caña de azúcar (1)	300	22,94	3,40	1,90	38,30	23,50	0,15	0,07	2,00	2,60
Mulato (3)	24-33	23,36	11,70	2,37	64,87	34,17	0,41	0,15	11,16	2,57
Festulolium (1)	30	12,17	21,10	5,70	47,80	27,40	0,73	0,13	13,6	0,70
Limpograss (1)	24	25,90	5,60	2,60	70,50	33,10	0,79	0,20	4,10	3,70
Mombaza (1)	19	16,00	8,30	2,30	66,60	37,60	0,92	0,21	10,9	2,80

MS: materia seca. PC: proteína cruda. EE: extracto etéreo. FDN: fibra detergente neutro. FDA: fibra detergente ácido. NFDN: nitrógeno insoluble en fibra detergente neutro. NFDA: nitrógeno insoluble en fibra detergente ácido. L: lignina.

Cuadro 2. Composición nutricional expresada en base seca de los diferentes ensilajes y subproductos utilizados en la investigación.

Material (n)	MS (%)	PC (%)	EE (%)	FDN (%)	FDA (%)	NFDN (%)	NFDA (%)	Cenizas (%)	L (%)
Cratylia (1)	26,52	21,13	3,10	45,90	33,20	0,94	0,40	8,38	11,50
Sorgo (2)	23,85	5,66	3,25	61,75	37,55	0,42	0,20	9,66	2,55
Sorgo+pulpa de piña (1)	19,20	11,14	3,85	56,40	32,10	0,40	0,20	9,38	2,60
Maralfalfa (1)	21,90	7,09	4,37	64,16	40,60	0,25	0,17	10,05	4,30
15% guineo ¹ (5)	21,10	5,88	4,22	61,65	38,60	0,25	1,65	7,69	5,00
30% guineo ¹ (5)	23,60	5,45	3,06	45,88	25,99	0,31	0,22	8,06	5,20
45% guineo ¹ (5)	23,90	4,75	2,51	43,01	29,24	0,31	0,24	6,32	5,20
Subproducto de piña (1)	13,28	6,63	2,94	64,50	37,90	0,44	0,21	4,97	2,60

¹Ensilaje de Maralfalfa con diferentes inclusiones de guineo cuadrado.

MS: materia seca. PC: proteína cruda. EE: extracto etéreo. FDN: fibra detergente neutro. FDA: fibra detergente ácido. NFDN: nitrógeno insoluble en fibra detergente neutro. NFDA: nitrógeno insoluble en fibra detergente ácido. L: lignina.

Producción de gas *in vitro* para determinación de energía

Las muestras se incubaron por duplicado en licor ruminal junto con cuatro soluciones (buffer, reductora, macro y microminerales). Se utilizaron muestras de 500 mg durante 24 horas a una temperatura de 39°C según la metodología de ANKOM^{RF} Gas Production System (2012). El licor ruminal fue colectado de vacas Jersey en producción, con una dieta que se componía de: pastoreo de forraje de Estrella africana, alimento balanceado comercial para ganado de leche en proporción de 3:1 (kg leche:kg alimento), ensilaje de sorgo y pulpa de cítricos peletizada. Dicho licor ruminal presentaba un pH entre 6,14 y 6,67. La agitación de los frascos se hizo de forma manual, con una agitación a las 2, 4, 6, 21 y 23 horas de haber iniciado la incubación, esto debido al horario del Centro de Investigación donde se llevó a cabo el experimento.

La incubación anaeróbica se realizó en el equipo automatizado Sistema de Producción de Gas, modelo ANKOM^{RF} Gas Production System que cuenta con una calibración interna de fábrica. La producción de gas se expresó en ml, y para ello se transformó de psi a ml como lo detalla el manual de ANKOM^{RF} Gas Production System (2012).

Energía metabolizable de los diferentes materiales con las ecuaciones de producción de gas

Para el cálculo de energía metabolizable se utilizaron las ecuaciones que se detallan en el Cuadro 3. Se obtuvo la ecuación que presenta la mejor aproximación utilizando un análisis de correlación lineal entre la metodología del NRC (2001) y las ecuaciones de producción de gas, hasta obtener el coeficiente de determinación (R^2) más alto.

Relación entre composición nutricional de los diferentes alimentos y la energía metabolizable obtenida por NRC (2001) y producción de gas.

Mediante un análisis de correlación de Pearson y un análisis de regresión lineal se evaluó la relación entre la composición nutricional de los alimentos utilizados en el experimento y la energía metabolizable obtenida por medio de la ecuación del NRC (2001) y las ecuaciones de la metodología de producción de gas.

Cuadro 3. Ecuaciones de estimación de energía a partir del modelo de producción de gas *in vitro* utilizadas en la investigación.

Ecuación EM (Mcal/kg MS)	Referencia
$EM = 2,2 + (0,136*PG24h) + (0,057*PC) / 4,184$	Kamalak y Canbolat (2010); Boga et al. (2014)
$EM = 2,2 + (0,136*PG24h) + (0,057*PC) + (0,0029*EE^2) / 4,184$	Cerrillo et al. (2012); Karabulut et al. (2007)
$EM = 1,54 + (0,145*PG24h) + (0,00412*PC) + (0,0065*PC^2) + (0,0206*EE) / 4,184$	Menke et al. (1979)
$EM = 1,2 + (0,1456*PG24h) + (0,007675*PC) + (0,01642*EE) / 4,184$	Steingass y Menke (1980)
$EM = 2,2 + (0,136*PG24h) + (0,0057*PC) + (0,0002859*EE^2) / 4,184$	Krishnamoorthy et al. (1995)
$EM = 1,24 + (0,1457*PG24h) + (0,007*PC) + (0,0224*EE) / 4,184$	Menke y Steingass (1988)
$EM = 0,72 + (0,1559 * (4,7+0,89*PG24h) + (0,0068*PC) + (0,0249*EE) / 4,184$	Menke y Steingass (1988)
$EM = 2,2 + (0,1136*PG24h) + (0,0057*PC) + (0,00029*EE) / 4,184$	Menke y Steingass (1988)
$EM = 0,728 + (0,0219*PG24h) + (0,0203*PC) + (0,124*EE)$	Seker (2002)

EM: Energía Metabolizable PG24h: Producción de gas a 24 h expresado en ml/500mg de muestra. PC: proteína cruda. EE: extracto etéreo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido energético de pastos y ensilajes con la metodología de NRC (2001)

De los forrajes analizados en esta investigación, el pasto Ryegrass fue el que presentó mayor concentración de EM (2,59 Mcal/kg de MS), y el de menor contenido de energía fue el pasto Camerún (1,79 Mcal/kg de MS). En el Cuadro 4 se puede encontrar la concentración promedio de la energía encontrada en los forrajes de esta investigación.

Cuadro 4. Contenido de energía metabolizable (EM) determinada mediante la ecuación del NRC (2001) de los diferentes materiales forrajeros utilizados en la investigación.

Material (n)	Energía metabolizable (Mcal/kg MS)
Ryegrass (4)	2,59
Guinea (5)	2,11
Ratana (4)	2,29
Estrella africana (4)	2,34
Braquipará (5)	2,30
Toledo (2)	2,33
Kikuyo (4)	2,41
Brizantha (2)	2,07
Limpograss (1)	2,16
Festulolium (1)	2,58
Mulato (3)	2,17
Botón de oro (1)	2,15
Caña de azúcar (1)	2,46
Morera (3)	2,18
Camerún (3)	1,79
Cratylia (3)	2,24
Mombaza (1)	2,09
Cratylia	2,17
Sorgo (2)	2,15
Sorgo+pulpa de piña (1)	2,29
Silo Maralfalfa + 0% guineo (1)	2,10
Silo Maralfalfa + 15% guineo (1)	2,11
Silo Maralfalfa + 30% guineo (1)	2,17
Silo Maralfalfa + 45% guineo (1)	2,20

El contenido energético de los forrajes obtenidos en este experimento, fue más alto que los presentados en varios forrajes de otros estudios (Salazar, 2007; Villalobos y Arce, 2014; Azevedo et al., 2011; Sánchez y Soto, 1997); entre ellos el pasto Ratana, Estrella africana, Braquipará, Toledo, Morera, Cratylia y Mombaza. Este comportamiento se puede deber a factores que afectan el valor nutritivo de los pastos, Pirela (2005) indica que los factores morfológicos, fisiológicos, climáticos o de manejo afectan el valor nutritivo de los forrajes, además de la metodología para obtener la concentración energética. Forrajes como el Ryegrass, Kikuyo, Limpograss, Mulato, Caña de azúcar y Camerún presentaron valores similares a los informados por otros investigadores (Andrade, 2006; Boga et al., 2014; Boschini-Figueroa, 2006; Campos et al., 2010; Ferro et al., 2013; Giraldo et al., 2006; Villalobos, 2006).

De acuerdo a la ecuación del NRC (2001) se determinó que la fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y lignina influyen negativamente en la concentración de energía ($R^2 = -0,56$; $-0,54$; $-0,35$; $p < 0,05$, respectivamente), mientras que la proteína cruda (PC) y el extracto etéreo (EE) tienen una correlación positiva.

Se dice que la determinación de la fibra del forraje es importante para conocer el valor nutritivo de los alimentos, ya que ocupa un lugar central en la evaluación de la disponibilidad de la energía, aportando una cantidad significativa de energía a bajo costo y siendo el componente químico con mayor variabilidad natural (Detmann et al. 2004). Por su parte, Weiss (1993) explica que la fibra es la variable más común para predecir el contenido de energía en los alimentos, debido a la relación negativa que existe entre el contenido de fibra (principalmente por el contenido de celulosa) y la energía disponible, causado por la baja digestibilidad de este compuesto.

Uno de los factores que impactan negativamente en el contenido energético de los forrajes es el componente estado fisiológico de la planta, ya que a medida que avanza el estado de madurez, aumenta la formación de componentes estructurales como la fibra detergente neutra y ácida (Pirela, 2005).

Producción de gas (ml/500 mg MS) de los diferentes alimentos

El forraje que presentó mayor producción de gas a las 12 y a las 24 h fue la caña de azúcar, con 52,51 y 61,64 ml, respectivamente. Mientras que, forrajes como el Festulolium y el Ryegrass presentaron igualmente una alta producción de gas (Cuadro 5).

El pasto Camerún fue el pasto que tuvo la menor producción de gas acumulada a las 12 horas (10,13 ml) y a las 24 horas (23,30 ml). Así mismo, el pasto guinea utilizado para corte fue el segundo material en producir menos gas a las 12 h (15,46 ml). El forraje Cratylia tuvo menor producción de gas entre las 12 y 24 h, siendo el segundo pasto con menor producción a las 24 h (25,55 ml).

La variable que más influyó sobre la producción de gas a las 24h fue la FDN, tuvo una un coeficiente de correlación de Pearson negativo de 0,44, reflejando un efecto inversamente proporcional de la FDN sobre la producción de gas, lo cual indica que forrajes con un mayor contenido de FDN presentan una menor PG 24h. Éste efecto también fue encontrado por Krishnamoorthy et al. (1995), en el que determinaron un coeficiente de correlación de Pearson negativo de 0,60.

Cuadro 5. Producción de gas acumulada de diferentes forrajes frescos incubados a 12 y 24 h con licor ruminal.

	n	Producción de gas acumulada (ml/500 mg MS)	
		12 h*	24 h*
Guinea	2	14,75-23,25 (19,00)	30,07-32,76 (31,42)
Ratana	4	19,75-30,51 (25,26)	31,38-45,76 (38,98)
Estrella africana	4	22,00-25,88 (23,69)	32,13-42,13 (37,06)
Braquipará	5	15,88-28,88 (23,83)	28,44-44,13 (38,68)
Cratylia	3	14,13-18,25 (15,88)	18,88-25,76 (23,07)
Brizantha	2	15,50-24,38 (19,94)	27,57-43,45 (35,51)
Camerún	3	7,50-12,00 (10,13)	16,82-27,07 (23,30)
Morera	3	22,50-30,76 (26,71)	36,19-39,38 (37,46)
Toledo	2	23,88-23,88 (23,88)	32,32-37,51 (34,92)
Kikuyo	4	17,25-30,26 (22,79)	29,76-44,57 (35,82)
Ryegrass	4	27,76-42,51 (37,26)	40,45-53,45 (48,39)
Guinea corte	3	13,63-18,00 (15,46)	26,38-33,01 (29,90)
Botón de oro	1	18,63	28,01
Caña de azúcar	1	52,51	61,64
Mulato	3	14,75-32,76 (24,26)	27,26-48,95 (40,72)
Festulolium	1	37,51	51,39
Limpograss	1	30,76	45,26
Mombaza	1	25,76	42,07

*Primer y segundo valor hace referencia al mínimo y máximo, respectivamente. El valor en paréntesis es el promedio del forraje.

Cerrillo y Juárez (2004) encontraron un coeficiente de correlación de Pearson negativo entre la producción de gas y las fracciones químicas relacionadas con el contenido de la pared celular de los forrajes (FDN -0,73 y FDA -0,90). La producción de gas involucra tanto la fermentación del almidón como los componentes fibrosos del material, por lo que la adición o presencia en la planta de carbohidratos no estructurales de rápida degradación disminuiría el componente de FDN, incrementando la producción de gas (Lara et al., 2009).

A partir de este análisis entre las variables, se determinó que el porcentaje de proteína cruda, de cenizas y extracto etéreo en los forrajes no tuvieron un efecto significativo en la producción de gas a las 24h ($p > 0,05$), así ninguna de las variables aumentó o disminuyó de forma

considerable la PG. Aunque el coeficiente de correlación es bajo, los componentes lignina, fibra detergente ácido y neutro presentan un efecto negativo en la PG (0,33, 0,32 y 0,44 ($p < 0,05$), respectivamente).

Una limitante en la degradación de ciertos materiales, es el alto contenido de nitrógeno degradable, que puede disminuir la producción de gas por la unión del dióxido de carbono con amoníaco. Aunado a esto, la degradabilidad de la FDN en el licor ruminal depende de las poblaciones de organismos presentes y al tiempo en el equipo. Ya que la fibra no será degradada y su efecto máximo sobre la producción de gas no se observará hasta 40 horas después y no a 24 horas cómo se observa en esta investigación (Krishnamoorthy et al. 1995).

En la presente investigación, el ensilaje que produjo mayor gas a las 12 y 24 h fue la mezcla de Maralfalfa con 45% de guineo (55,26 y 64,14 ml, respectivamente), debido a la disminución del valor de FDN producto de la fermentación en el ensilaje, además del aporte de carbohidratos de alta fermentación en rumen (almidones) que hace el guineo cuadrado (Lazo-Salas et al., 2018). El ensilaje de pasto Maralfalfa fue el de menor producción de gas acumulada a las mismas horas (12,00 y 22,07 ml), debido al mayor valor de FDN y menor aporte de carbohidratos de alta fermentación. El subproducto de piña presentó una buena producción de gas, acumulando 41,63 ml a las 12 h, y 67,33 ml a las 24 h (Cuadro 6), considerando que el aporte primordial de estos subproductos es pectina, la cual se degrada a una tasa media a alta en el rumen (Rojas-Bourrillon, 2011).

Cuando ocurre la fermentación de los alimentos se da la liberación de gas, lo cual genera una curva de degradación con forma sigmoideal. La curva generada está dividida en tres fases: una fase inicial (producción de gas lenta), una exponencial (producción de gas rápida) y una asintótica (producción de gas disminuye llegando a cero) (Oliveira et al. 2014). Como se puede observar en la Figura 1, la curva de producción de gas sigue en constante crecimiento desde las 0 hasta las 24 h, por lo que se podría interpretar que se encuentra en la fase exponencial; si se aumenta el tiempo de incubación aumentaría la PG.

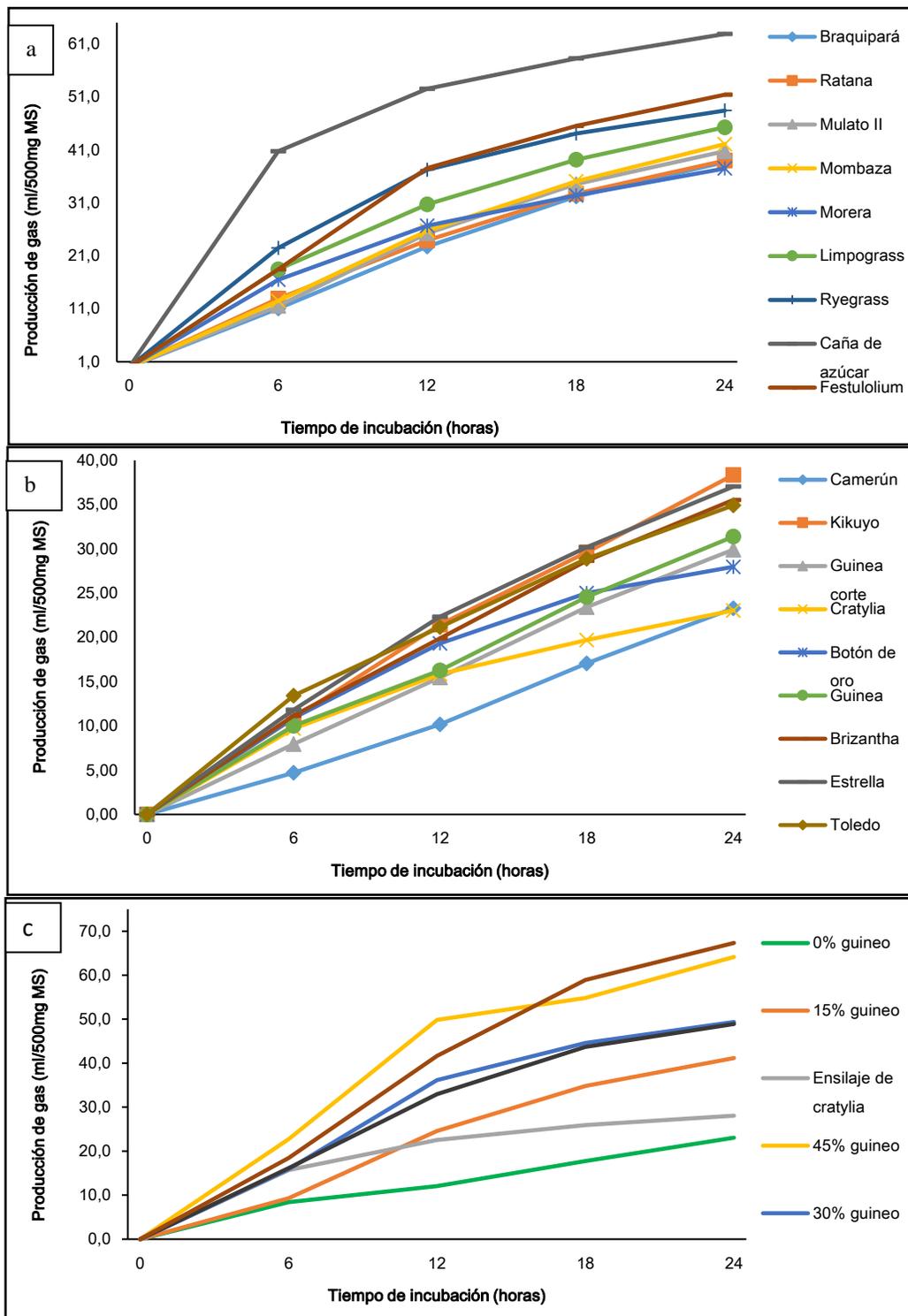


Figura 1. Producción acumulada de gas a las 24 h. a) Nueve forrajes con mayor producción de gas. b) Nueve forrajes con menor producción de gas. c) Ensilajes y subproducto de piña.

Cuadro 6. Producción de gas acumulada de diferentes ensilajes y subproductos incubados a las 12 y 24 h con licor ruminal.

Ensilajes	n	Producción de gas acumulada (ml/ 500mg)	
		12 h*	24 h*
Cratylia	1	22,50	26,82
Sorgo	2	22,50-24,13 (23,32)	39,13-44,38 (41,76)
Sorgo + pulpa de piña	1	33,01	48,88
Maralfalfa	1	12,00	22,07
15% guineo ¹	1	24,63	41,13
30% guineo ¹	1	41,63	49,32
45% guineo ¹	1	55,26	64,14
Subproducto Piña	1	41,63	67,33

*Primer y segundo valor hace referencia al mínimo y máximo, respectivamente. El valor en paréntesis es el promedio del forraje.

¹ Ensilaje de maralfalfa con diferentes inclusiones de guineo cuadrado.

Selección de una ecuación para estimar el valor energético a partir de la técnica de producción de gas

Para la selección de la ecuación de predicción de la EM a partir de la producción de gas, se utilizó una regresión lineal múltiple. Al analizar todas las ecuaciones que se mencionan en la metodología en el Cuadro 3, se obtuvieron dos ecuaciones con mejores coeficientes de correlación. Se decide utilizar una para todos los alimentos (Steingass y Menke (1980): forrajes, ensilajes y subproducto) y otra solamente para los forrajes (Menke y Steingass (1988)) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Ecuaciones seleccionadas para estimar el valor energético de forrajes, ensilajes y subproductos a partir de diferentes variables.

Ecuación	Ecuación	R ²	N
Steingass y Menke (1980)	$EM=2,36+(0,0048*PG24h)+(0,02*PC)+(-0,01*FDN)+(-0,02*L)$	0,72	56
Menke y Steingass (1988)	$EM=2,31+(0,01*PG24h)+(0,01*PC)+(-0,01*FDN)+(-0,02*L)$	0,73	47

Steingass y Menke (1980)= Todos los alimentos (forrajes, ensilajes y subproducto); Menke y Steingass (1988)= Forrajes. EM: Mcal/kg MS, PG24h: ml/500 mg MS en 24 h, PC: Proteína cruda, FDN: Fibra detergente neutro. L: Lignina, EE: Extracto etéreo (todas en % MS)

La ecuación de Steingass y Menke (1980) presentó un coeficiente de correlación alto (0,72; $p < 0,05$) comparado con el modelo sumativo del NRC (2001). Esta ecuación considera como variables la FDN, la lignina, PG24h y PC como variables para predecir la energía. Ferro et al. (2013) hacen énfasis en que, de los diferentes componentes de los alimentos, la fracción fibrosa es importante en los sistemas de producción tropicales, debido a que representa una cantidad significativa de energía a bajo costo y presenta una variabilidad mayor que otros componentes, por lo que debe de contemplarse para la predicción de la energía.

La proteína cruda fue una de las variables de predicción de la energía, Weiss (1993) indica que a pesar de que la PC es una fracción uniforme en la composición de los alimentos, no es un indicador preciso de la disponibilidad de la energía ya que constituye una fracción muy pequeña (de 5 a 25%) del forraje total, y además la variabilidad de la digestibilidad de la fracción no proteica puede ser alta.

Según Ferro et al. (2013), de los componentes químicos de un forraje, la proteína cruda y el extracto etéreo se correlacionan positivamente con la concentración energética del alimento. Dichos componentes presentan una correlación moderada y muy baja con la energía metabolizable obtenida con la ecuación de Steingass y Menke (1980) (PC, 0,76; EE, 0,34; $p < 0,05$), respectivamente. Así mismo, las fracciones fibrosas como la FDN y FDA presentan una correlación negativa con la disponibilidad energética, lo cual coincide con este experimento (-0,75, FDN; -0,63, FDA; $p < 0,05$). La lignina, por su parte, tuvo un coeficiente de correlación de -0,24; por lo que al aumentar la lignina disminuye la concentración energética en el forraje, por su efecto negativo sobre la degradabilidad de la fibra.

En un estudio realizado en Brasil, se comparó varias metodologías *in vitro* para estimar la energía metabolizable de alimentos voluminosos utilizados en el trópico. Se utilizaron metodologías *in vivo* por medio de la recolección de excretas, las metodologías *in vitro* del NRC (2001) y la técnica de producción de gas de Menke y Steingass (1988). Los investigadores concluyeron que los métodos *in vitro* subestiman la EM de los forrajes tropicales, pero el sistema sumativo del NRC (2001) estuvo entre las metodologías que presentó una estimación más precisa de la EM (Magalhães et al. 2010).

Campos et al. (2010) evaluaron la digestibilidad de los carbohidratos no fibrosos de alimentos voluminosos como caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), ensilaje de pasto elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum), ensilaje de maíz y ensilaje de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) con la ecuación del NRC (2001) y encontraron que la ecuación sobreestimó los valores observados que se obtuvieron por medio de la recolección de heces.

Azevêdo et al. (2011) utilizaron el modelo del NRC (2001) y observaron que la metodología no era exacta ni precisa para estimar los valores de la digestibilidad de la FDN de subproductos agrícolas, lo que indica una limitación en su uso por la alta concentración de los componentes fibrosos en productos tropicales.

De igual forma, Rocha et al. (2003) realizaron un estudio para validar el método del NRC (2001), y encontraron que no hubo diferencias significativas entre los valores obtenidos a partir de la ecuación del NRC y los valores de energía, proteína curda, fibra detergente extracto etéreo y carbohidratos no fibrosos de varios alimentos utilizados en condiciones brasileñas, pero que para los alimentos voluminosos la ecuación subestimaba la energía disponible de la FDN y la digestibilidad del EE, por lo que otras ecuaciones son necesarias para estimar la energía disponible de estas fracciones.

A pesar de que el uso de la ecuación del NRC (2001) en condiciones tropicales tiene discrepancias entre autores, es una ecuación que tiene una alta correlación con los valores que se encuentran en análisis *in vivo* de la disponibilidad energética. En esta investigación se seleccionaron dos ecuaciones (Steingass y Menke (1980) y Menke y Steingass (1988) que pueden predecir la EM a partir de la producción de gas que presentan una correlación de 0,83 y 0,84 con la ecuación del NRC (2001), respectivamente.

De acuerdo con la técnica de producción de gas, varios autores comentan que la principal ventaja es ser aplicable a cualquier alimento, incluyendo a alimentos tropicales. En Brasil el modelo subestimó la EM de los forrajes *in vivo*, no obstante, cuando se aumentó el período de incubación fue más precisa la predicción que con tiempos de incubación menor (EM, 24h<EM, 48h<EM, 72h) (Magalhães et al. 2010). Los mismos autores hacen referencia a que la técnica se ve afectada por la fuente del inóculo, la dieta, tiempo de incubación, el período de recolecta, el forraje incubado, el equipo utilizado para la medición del gas y el tamaño de partícula; estos podrían afectar la producción de gas.

Detmann et al. (2005) concluyeron que la limitante en la metodología de producción de gas *in vitro* para simular la degradación ruminal, es que no permite una simulación precisa de la dinámica del tránsito ruminal, ya que la utilización de tasas de digestión obtenidas *in vitro* sub y sobreestimaron la degradación ruminal de los carbohidratos fibrosos y los carbohidratos no fibrosos, respectivamente.

Debido a las diversas ventajas que tiene la técnica *in vitro* vs. la *in vivo* en su metodología, es importante contar con una ecuación que ayude a predecir la energía de una manera sencilla, económica y que se pueda realizar en menos tiempo. Las ecuaciones seleccionadas en esta

investigación presentan un R^2 ligeramente alto, generadas con valores de PG 24h, PC, lignina y FDN.

Estas ecuaciones fueron utilizadas con un número de muestras entre 47 y 56, incluyendo forrajes, ensilajes y subproductos. Los datos obtenidos pueden ser la base para futuros trabajos con la técnica de producción de gas en Costa Rica, siendo un método valioso y de gran relevancia para seguir explorando.

CONSIDERACIONES FINALES

La técnica de producción de gases resultó ser efectiva en la estimación del componente energético de materiales forrajeros.

La fibra detergente neutro fue el componente químico-bromatológico con mayor impacto en la producción de gas y el contenido energético de los alimentos analizados.

La energía metabolizable de los diferentes alimentos obtenida por medio de la ecuación del NRC (2001) comparada con otros estudios fue en algunos materiales más alta y en otros presentó un comportamiento similar al obtenido en otras investigaciones.

La energía metabolizable obtenida a través de la ecuación de Menke y Steingass (1988) y la producción de gas a las 24 h (ml/500mg MS), presentó valores similares comparada con otras investigaciones según el contenido de FDN en los forrajes.

Las ecuaciones utilizadas en esta investigación a partir de la producción de gas, son una alternativa para predecir el contenido energético de forrajes y ensilajes, dado que la metodología del NRC (2001) implica gran cantidad de análisis para generar el contenido de energía, y el uso de estas ecuaciones implica menor cantidad de análisis de laboratorio, esto podría significar un menor costo en la generación del resultado de energía.

En futuros estudios es necesario validar las ecuaciones seleccionadas en esta investigación y probarlas en diferentes alimentos y con más réplicas.

Debido a que la curva de producción de gas tiene un comportamiento sigmoideal, se recomienda en futuras investigaciones aumentar el tiempo de incubación y comparar la producción de gas a las 24 horas y en tiempos mayores.

Para una mayor precisión de la metodología de producción de gas, se recomienda el uso de algún instrumento con agitación orbital, con el fin de aumentar la simulación del ambiente ruminal.

LITERATURA CITADA

- Abaş I., Özpınar H., Kutay H., Kahraman R., Eseceli H. 2005. Determination of the metabolizable energy (ME) and net energy lactation (NEL) contents of some feeds in the marmara region by *In vitro* gas technique. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29: 751-757.
- ANKOM^{RF} Gas Production System. 2012. Operator's Manual. ANKOM TECHNOLOGY.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 1998. Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed, 4th rev. Gaithersburg, MD: AOAC International, USA.
- Azevêdo J., Valadares-Filho S., Detmann E., Pina D., Pereira L., Oliveira K., Fernandes H., Souza N. 2011. Predição de frações digestíveis e valor energético de subprodutos agrícolas e agroindustriais para bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia.* 40(2): 391-402.
- Boga M., Yurtseven S., Kilic U., Aydemir S., Polat T. 2014. Determination of nutrient contents and *In vitro* gas production values of some legume forages grown in the harran plain saline soils. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 27(6): 825-831.
- Bruni M., Trujillo A., Facchín L., Saragó L., Chilibroste P. 2014. Evaluación nutricional para rumiantes de la burlanda de sorgo húmeda obtenida de la producción de etanol de ALUR Paysandú. *Cangue.* 35: 28-38.
- Campos P., Valadares S., Detmann E., Cecon P., Leão M., Lucchi B., Souza S., Pereira O. 2010. Consumo, digestibilidade e estimativa do valor energético de alguns volumosos por meio da composição química. *Rev. Ceres, Viçosa.* 57(1): 79-86.
- Cerrillo M., Juárez A. 2004. *In vitro* gas production parameters in cacti and tree species commonly consumed by grazing goats in a semiarid region of North Mexico. *Lives. Res. Rural Develop.* 16:4
- Cerrillo M., Juárez A., Rivera J., Guerrero M., Ramírez R., Bernal H. 2012. Producción de biomasa y valor nutricional del forraje verde hidropónico de trigo y avena. *INTERCIENCIA.* 37(12): 906-913.
- Detmann E., Paulino M., Cabral L., Valadares-Filho S., Cecon P., Zervoudakis J., Lana R., Leão M., Melo A. 2005. Simulation and validation of digestive kinetic parameters using an *in vitro* gas production system in crossbred steers with pasture supplementation. *R. Bras. Zootec.* 34(6):2112-2122.
- Detmann E., Tilemahos J., Silva L., Ribeiro V., Júnior R., Valadares S., Queiroz A., Ponciano N., Magno A. 2004. Validação de equações preditivas da fração indigestível da fibra em detergente neutro em gramíneas tropicais. *R. Bras. Zootec.* 33(6): 1866-1875.

- Di Rienzo J., Casanoves F., Balzarini M., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C. 2014. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Evitayani L., Warly A., Fariani T., Fujihara T. 2004. Study in nutritive value of tropical forages in North Sumatra, Indonesia. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 17(11): 1518-1523.
- Ferro M., Avelino C., Moura A., Moura D., dos Santos J. 2013. Estimativas do valor energético de alimentos para bovinos de corte em condições tropicais: conceitos e aplicações. *Enciclopédia Biosfera*. 9(16): 1115- 1130.
- Giraldo L., Gutiérrez L., Sánchez J., Bolívar P. 2006 Relación entre presión y volumen para el montaje de la técnica *in vitro* de producción de gas en Colombia. *Livestock Research for Rural Development*. 18(6).
- Kamalak A., Canbolat O. 2010. Determination of nutritive value of wild narrow-leaved clover (*Trifolium angustifolium*) hay harvested at three maturity stages using chemical composition and *in vitro* gas production. *Tropical Grasslands*. 44: 128-133.
- Karabulut A., Canbolat O., Kalkan H., Gurbuzol F., Sucu E., Filya I. 2007. Comparison of *In vitro* gas production, metabolizable energy, organic matter digestibility and microbial protein production of some legume hays. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*. 20(4): 517-522.
- Krishnamoorthy U., Soller H., Steingass H., Menke K. 1995. Energy and protein evaluation of tropical feedstuffs for whole tract and ruminal digestion by chemical analyses and rumen inoculum studies *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. 52: 177-188.
- Lara P., Canché M., Magaña H., Aguilar E., Sanginés J. 2009. Producción de gas *in vitro* y cinética de degradación de harina de forraje de morera (*Morus alba*) mezclada con maíz. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 43(3): 273-279.
- Lazo-Salas, G., Rojas-Bourrillon, A., Campos-Granados, C., 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.
- Licitra G., Hernández T., Van Soest P. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 57(4): 347-358.
- Lundberg K., Hoffman P., Bauman L., Berzagui P. 2004. Prediction of forage energy content by near infrared reflectance spectroscopy and summative equations. *The Professional Animal Scientist*. 20: 262-269.

- Magalhães A., Valadares S., Detmann E., Diniz L., Pina D., Azevêdo J., Araújo F., Marcondes M., Fonseca M., Tedeschi L. 2010. Evaluation of indirect methods to estimate the nutritional value of tropical feeds for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 155: 44-54.
- Mendoza-Martínez G., Plata-Pérez F., Espinosa-Cervantes R., Lara-Bueno A. 2008. Manejo nutricional para mejorar la eficiencia de utilización de la energía en bovinos. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*. 24(1): 75-87.
- Menke K., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D., Schneider W. 1979. 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.* 93: 217-222.
- Menke K., Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*. 28: 7-55.
- NRC (National Research Council). 1996. Nutrient requirements of beef cattle. 7th rev. Ed. Washington, D.C. National Academy Press. 242 p.
- NRC (National Research Council). 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th rev. Ed. Washington, D.C. National Academy Press. 381 p.
- Oliveira V., Valença R., Santana-Neto J., Santana J., Santos C., Lima I. 2014. Utilização da técnica de produção de gás *In vitro* para estimar a digestibilidade dos alimentos. *Revista Científica de Medicina Veterinária*. XII (23). 10 p.
- Pirela M. 2005. Valor nutritivo de los pastos tropicales, pp. 176-182. In: C. González-Stagnaro y E. Soto (eds). *Manual de ganadería doble propósito*. Fundación GIRARZ.
- Robinson P., Givens D., Getachew G. 2004. Evaluation of NRC, UC Davis and ADAS approaches to estimate the metabolizable energy values of feeds at maintenance energy intake from equations utilizing chemical assays and *in vitro* determinations. *Animal Feed Science and Technology*. 114: 75-90.
- Rocha V., Valadares S., Borges Á., Detmann E., Magalhães K., Valadares R., Gonçalves L., Cecon P. 2003. Estimativa do valor energético dos alimentos e validação das equações propostas pelo NRC (2001). *R. Bras. Zootec.* 32(2): 480-490.
- Rojas-Bourrillon, A. 2011. Alimentación de bovinos con rastrojos de piña (*Ananas comosus*). *UTN Informa*. 58: 16-20.
- Sánchez J., Soto H. 1999. Estimación de la calidad nutricional de los forrajes del cantón de San Carlos. III. Energía para la producción de leche. *Nutrición Tropical*. 5(1): 31-49.

- Seker E. 2002. The determination of the energy values of some ruminant feeds by using digestibility trial and gas test. *Revue Méd. Vét.* 153(5): 323-328.
- Steingass H., Menke K. 1980. Die bestimmung der verdaulichkeit und der gehalte an umsetzbarer energie und nettoenergie-laktation im Hohenheimer futterwerttest. *krafftutter.* 11: 534-536.
- Van- Soest, P.V., J.B. Robertson, B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science.* 74:3583-3597.
- Villalobos L., Sánchez J. 2010. Evaluación agronómica y nutricional del pasto ryegrass perenne tetraploide (*Lolium perenne*) producido en lecherías de las zonas altas de Costa Rica. II. Valor nutricional. *Agronomía Costarricense.* 34(1): 43.52.
- Weiss W., 1993. Predicting energy values of feeds. *J. Dairy. Sci.* 76: 1802-1811.
- Weiss W., Conrad H., Pierre N. 1992. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. *Animal Feed Science and Technology.* 39 (1-2): 95-110.