

Efecto del ensilaje y el heno de *Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla*, *Cratylia argentea* y *Vigna unguiculata* sobre la producción de gas *in vitro*

L. Bernal¹, P. Ávila^{2,3}, G. Ramírez^{2,4}, C. E. Lascano^{2,5}, T. Tiemann⁶ y H. Hess⁷

Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Zoot. Est. Maestría
Ciencias Agrarias Producción Animal Tropical.
Recibido Diciembre 20, 2007. Aceptado Febrero 15, 2008

Effect of the *Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla*, *Cratylia argentea* y *Vigna unguiculata* silage and hay on *in vitro* gas production

ABSTRACT. The volume of gas produced when tanniniferous legumes silages and hay were fermented was evaluated. 28 treatments (14 with silages and 14 with hays), 3 repetitions by treatment and 14 of them had polyethylene glycol (PEG) to inactive the tannins. The silages treatments were: T1: *Calliandra calothyrsus* 100%, T2: *Flemingia macrophylla* 100%, T3: *Vigna unguiculata* 100%, T4: *Cratylia argentea* 100%, T5: *Calliandra calothyrsus/Vigna unguiculata* 33/67%, T6: *Flemingia macrophylla/Vigna unguiculata* 33/67%, T7: *Cratylia argentea/Vigna unguiculata* 33/67%. Hays: T8: *Calliandra calothyrsus* 100%, T9: *Flemingia macrophylla*, T10: *Vigna unguiculata* 100%, T11: *Cratylia argentea* 100%, T12: *Calliandra calothyrsus/Vigna unguiculata* 33/67%, T13: *Flemingia macrophylla/Vigna unguiculata* 33/67% y T14: *Cratylia argentea/Vigna unguiculata* 33/67%. The magnitude and fermentation rate was determined using the Gas Trasduder Technique (GTT) proposed by Theodorou *et al* (1994). The gas production dates obtained after 144 hours or incubation to the Gompertz mathematic model were adjusted. The silages have greater rate of gas production than the hays ($P < 0.05$). There was no effect of addition of PEG. There was an effect of the type of forage incubated, being highest for *Vigna* than for *Calliandra* and *Flemingia*. The ammonium (mmol/l) and the protein degradation (%) were significant differences ($P < 0.05$) being highest for hays, and for the forages *Vigna* and *Cratylia* than for *Calliandra*. The mixture of legumes with tannins reduce the gas production, the ammonium liberation and the proteins degradation rate.

Key words: *Calliandra calothyrsus*, *Cratylia argentea*, *Flemingia macrophylla*, taninos, Gas Trasduder Technique (GTT) y *Vigna unguiculata*.

RESUMEN. Se evaluó el volumen de gas producido cuando se fermentaron ensilajes y henos de leguminosas taníferas. Se emplearon 28 tratamientos (14 con ensilajes y 14 con henos), 3 repeticiones por tratamiento y a 14 de ellos se les adicionó polietileno glicol (PEG) para inactivar los taninos. Los tratamientos ensilados fueron T1: *Calliandra calothyrsus* 100%, T2: *Flemingia macrophylla* 100%, T3: *Vigna unguiculata* 100%, T4: *Cratylia argentea* 100%, T5: *Calliandra calothyrsus/Vigna unguiculata* 33/67%, T6: *Flemingia macrophylla/Vigna unguiculata* 33/67%, T7: *Cratylia argentea/Vigna unguiculata* 33/67%. Henos: T8: *Calliandra calothyrsus* 100%, T9: *Flemingia*

¹Autor para la correspondencia, e-mail: lcbernalb@palmira.unal.edu.co

¹Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Zoot. Est. Maestría Ciencias Agrarias Producción Animal Tropical.

²Programa Leguminosas y Forrajes Tropicales. Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT. Cali Colombia

³Jefe de Laboratorio de Calidad de Forrajes. CIAT. Email: p.avila@cgiar.org

⁴Estadista. CIAT Email: g.ramirez@cgiar.org

⁵Líder Programa de Leguminosas y Forrajes Tropicales. CIAT. Email: c.lascano@cgiar.org

⁵Líder Programa de Leguminosas y Forrajes Tropicales. CIAT.

⁶Candidato a PhD. ETH Zurich, Instituto de Producción Animal, ETH-Centro/LFW, CH-8092 Zurich, Suiza.

⁷Agroscope Liebefeld-Posieux, Estación de Investigación en Producción Animal y productos Lácteos, CH-1725 Posieux, Suiza.

macrophylla, T10: *Vigna unguiculata* 100%, T11: *Cratylia argentea* 100%, T12: *Calliandra calothyrsus/Vigna unguiculata* 33/67%, T13: *Flemingia macrophylla/Vigna unguiculata* 33/67% y T14: *Cratylia argentea/Vigna unguiculata* 33/67%. La magnitud y la tasa de fermentación fue determinada utilizando la Técnica de Producción de Gas (TPG) propuesta por Theodorou *et al* (1994). Los datos de producción de gas obtenidos después de las 144 horas de incubación se ajustaron al modelo matemático de Gompertz. Los ensilajes presentaron mayor tasa de producción de gas que los henos ($P < 0.05$). La adición de PEG no tuvo efecto sobre las variables estudiadas. Hubo efecto del tipo de forraje incubado, la producción de gas fue mayor para *Vigna* que para *Calliandra* y *Flemingia*. El amonio (mmol/l) y la degradación de proteína (%) presentaron diferencia significativas ($P < 0.05$) siendo mayor para henos, y para los forrajes *Vigna* y *Cratylia* que para *Calliandra*. Se concluye que la mezcla de leguminosas con taninos reduce la producción de gas, la liberación de amonio y la tasa de degradación de proteínas.

Palabras clave: *Calliandra calothyrsus*, *Cratylia argentea*, *Flemingia macrophylla*, taninos, técnica de producción de gas, *Vigna unguiculata*.

Introducción

La producción animal en la zona tropical de la región Colombiana ha tenido que enfrentar los problemas de baja disponibilidad de forraje y pobre calidad nutritiva de las pasturas que son la base de alimentación del sistema ganadero. No obstante, Colombia se caracteriza por tener una gran biodiversidad vegetal que se ofrecen como una potencialidad para la disposición de forraje, en variedad y calidad útil en la alimentación animal, y necesario para suplir sus necesidades alimenticias que proveerán la proteína de origen animal indispensable en el consumo humano. Así mismo, se deben generar mezclas entre leguminosas que por sus potencialidades ofrezcan de manera combinada el aprovechamiento de las calidades y limitaciones nutricionales (compuestos antinutricionales como taninos) de una u otra. Como consecuencia de lo an-

terior se planteo la utilización de alternativas de alimentación en la época seca, la de aprovechar la sobreoferta forrajera que se presenta en la época lluviosa para conservarla en forma de heno y ensilaje y determinar mediante evaluaciones como la de este ensayo cual sería su potencial de utilización a nivel de la flora bacteriana en un sistema de fermentación cerrado. Ante esto, se planteo como objetivo principal de esta investigación la de evaluar el efecto de las mezclas de leguminosas con taninos *Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla* y sin taninos *Cratylia argentea* y *Vigna unguiculata* henificadas y ensiladas sobre la tasa de producción de gas, la degradación de materia seca y proteína cruda con la Técnica de Producción de gas (Gas Pressure Transducer Technique - GTT).

Materiales y Métodos

En esta prueba se seleccionaron como especies forrajes con presencia de taninos *Calliandra calothyrsus* (CIAT 22310) y *Flemingia macrophylla* (CIAT 17403), y sin taninos Caupi (*Vigna unguiculata* CIAT 1088/4, 288, 391, 9611 Y 715) y *Cratylia argentea* (CIAT 18516-18668) cosechadas en la Estación experimental Santander de Quilichao (CIAT). Se emplearon 28 tratamientos (14 con ensilajes y 14 con henos), 3 repeticiones por tratamiento. A los tratamientos del 15 al 28, se les adicionó polietileno glicol (PEG) para inactivar los taninos.

Dietas experimentales. Los tratamientos fueron: T1: Ensilaje *Calliandra calothyrsus* 100%, T2: Ensilaje *Flemingia macrophylla* 100%, T3: Ensilaje *Vigna unguiculata* 100%, T4: Ensilaje *Cratylia argentea* 100%, T5: Ensilaje *Calliandra calothyrsus/Vigna unguiculata* 33/67%, T6: Ensilaje *Flemingia macrophylla/Vigna*

unguiculata 33/67%, T7: Ensilaje *Cratylia argentea/Vigna unguiculata* 33/67%, T8: Heno *Calliandra calothyrsus* 100%, T9: Heno *Flemingia macrophylla* 100%, T10: Heno *Vigna unguiculata* 100%, T11: Heno *Cratylia argentea* 100%, T12: Heno *Calliandra calothyrsus/Vigna unguiculata* 33/67%, T13: Heno *Flemingia macrophylla/Vigna unguiculata* 33/67% y T14: Heno *Cratylia argentea/Vigna unguiculata* 33/67%.

Se utilizó el método de producción de gas propuesto por Theodorou *et al*, 1994 que consiste en fermentar 1 g de sustrato durante 144 horas en botellas de 125 ml, a las cuales se les adicionó 10 ml de líquido ruminal, 85 ml de buffer y 4 ml de solución reductora. La producción de gas en términos de presión y volumen se determinó con un medidor de presión y una jeringa a diferentes horas de la fermenta-

ción 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 y 144 horas.

Se determinó la composición bromatológica para materia seca (%), materia orgánica (%), proteína cruda (%) y fibras (%). Se cuantificó la cantidad de amonio por el Método del Indofenol de McCullough (1982) y taninos condensados para *Calliandra calothyrsus* y *Flemingia macrophylla* por el método de butano-HCL de Till and Terrill *et al*, 1992. La degradación de proteína y materia seca se determinó por diferencia de peso de las muestras al inicio y al final.

Diseño experimental. Los datos de producción de gas obtenidos para cada tratamiento después del periodo de incubación de 144 horas fueron ajustados al modelo matemático de regresión exponencial propuesto por Gompertz de la forma:

$$y = a * e^{-b * e^{-cx}}$$

Con el fin de determinar la producción total de gas de

las leguminosas en sus diversas combinaciones y en los dos tipos de procesamientos Heno y ensilajes. Donde:

y: representa el volumen ml/g

x: representa las horas

a: indica la asíntota (valor al cual tiende el volumen cuando x es muy grande.

b: punto de inicio (corte con eje y)

c: indica la tasa de crecimiento (ml/h) entre más grande sea c el crecimiento será más rápido.

Para estimar estos parámetros del modelo (a, b y c) se hizo un análisis de regresión no lineal (Nlin) seguido de un análisis general multivariado para los parámetros del modelo (MANOVA) con el cual se pudo notar las diferencias globales entre las curvas para las diferentes fuentes de variación. Las variables PC degradada (%), MS degradada (%) y amonio (mmol) se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) en el programa SAS, versión 9.1 de 2003.

Resultados y Discusión

En el Cuadro 1 se presenta la composición bromatológica de las dietas. Se observó que consistentemente el nivel de PC de los forrajes ensilados fue menor que en los henificados, particularmente en el caso de las leguminosas sin taninos (*Vigna* y *Cratylia*) y sus mezclas con leguminosas taníferas. Por otra parte, también fue evidente que el nivel de fibra (FDN) fue mayor en las leguminosas sin taninos henificadas y en las mezclas de estas con leguminosas taníferas.

En el Cuadro 2 aparecen los efectos por procesamiento, adición de PEG y forraje incubado sobre los parámetros de Gompertz en la producción de gas. Se puede observar que los ensilajes tuvieron mayor tasa de fermentación del gas que los henos (P<0.05) y que la adición de polietileno glicol (PEG) no tuvo efecto. Por otra parte, hubo un efecto altamente significativo sobre la producción de gas debido al tipo de forraje incubado. La mayor tasa de producción de gas fue para *Vigna* comparadas con leguminosas taníferas *Calliandra* y *Flemingia*.

Los perfiles de acumulación de la producción de gas presentaron diferencia por el tipo de forraje incubado, su calidad nutricional y nivel de inclusión. El mayor perfil de producción de gas fue para los ensilajes y para las leguminosas sin taninos como *Vigna* (Figura 1).

Se encontró interacción entre el procesamiento y el forraje sobre la tasa de producción de gas, así los ensilajes produjeron mayor gas, aunque *Flemingia* 33%, produjo mas gas henificado. Asimismo, se encontró interacción entre nivel de inclusión del forraje

en las mezclas y la adición de PEG sobre la producción del gas. *Calliandra* y *Flemingia* mostraron que la adición de PEG aumentó su producción de gas, logrando inactivar los taninos.

Por otro lado, las degradaciones de las fracciones materia seca, proteína cruda y la concentración de amonio para los forrajes incubados aparecen en el Cuadro 3. La degradación de materia seca fue mayor para los henos que para los ensilajes (P<0.05). Hubo efecto por el tipo de forraje incubado, *Vigna* y sus mezclas presentaron degradaciones de materia seca y proteína superiores que para las leguminosas taníferas *Calliandra* y *Flemingia*. La adición de PEG tuvo efecto significativo sobre la degradación de la proteína. Como consecuencia de esta degradación de proteína, la concentración de amonio fue mayor para henos que para ensilajes (P<0.05) y la adición de PEG tuvo efecto significativo sobre la concentración de amonio.

La concentración de amonio fue mayor en las especies no taníferas como *Vigna* y *Cratylia* y en sus combinaciones. La *Calliandra* 100% presenta la más baja concentración de amonio.

Producción de gas y degradación. La mayor producción de gas, degradabilidad de materia seca y proteína, y la concentración de amonio fue para *Vigna* y *Cratylia*, debido a la ausencia de taninos condensados, alta PC y bajo FAD que hace más disponible los nutrientes para la fermentación microbial, aunque es de anotar que *Cratylia* reporta altos valores de FDN que coinciden con lo reportado por (Abreu *et al.*, 2003 y Valencia, 2003). Como consecuencia, los más bajos

Cuadro 1. Composición bromatológica de los forrajes empleados (valores expresados como porcentaje de la materia seca)

Tratamientos	MS%	PC %	FDN %	FDA %	TC Total (%)*
Ensilajes					
<i>Calliandra calothyrsus</i> 100%	94,41	14,15	53,90	67,13	2,95
<i>Flemingia macrophylla</i> 100%	95,24	16,17	66,65	57,18	2,57
<i>Vigna unguiculata</i> 100%	84,27	13,26	39,50	30,56	-
<i>Cratylia argentea</i> 100%	88,61	19,12	59,14	41,35	-
<i>Calliandra calothyrsus</i> / <i>Vigna unguiculata</i> 33/67%	90,69	13,03	44,25	42,63	0,97
<i>Flemingia macrophylla</i> / <i>Vigna unguiculata</i> 33/67%	91,06	13,36	48,46	39,34	0,84
<i>Cratylia argentea</i> / <i>Vigna unguiculata</i> 33/67%	87,54	14,72	45,98	34,12	-
Henos					
<i>Calliandra calothyrsus</i> 100%	91,78	16,08	52,49	46,08	23,00
<i>Flemingia macrophylla</i> 100%	89,91	17,96	61,44	53,18	3,66
<i>Vigna unguiculata</i> 100%	90,62	18,96	58,08	31,33	-
<i>Cratylia argentea</i> 100%	90,83	16,60	75,11	46,42	-
<i>Calliandra calothyrsus</i> / <i>Vigna unguiculata</i> 33/67%	91,00	18,01	56,24	36,20	7,59
<i>Flemingia macrophylla</i> / <i>Vigna unguiculata</i> 33/67%	90,38	18,63	62,49	38,54	1,20
<i>Cratylia argentea</i> / <i>Vigna unguiculata</i> 33/67%	90,68	18,18	63,70	36,31	-

* Taninos Condensados totales: comprende la cuantificación de los condensados solubles e insolubles.

registros se reportaron para las especies taníferas *Calliandra* y *Flemingia*, lo cual coincide con lo reportado por Sanabria *et al.* (2006).

El valor de MS degradada de *Cratylia* fue similar al obtenido por Narváez (2002), siendo en ambos casos superiores a los reportados por Dzewella y

Cuadro 2. Efecto de forma de conservación del forraje y de adición de PEG sobre la tasa de producción de gas de leguminosas con y sin taninos.

Tratamientos	Parámetros de Gompertz		
	a (ml) asíntota	b (h) tasa inicial	c (ml/h) tasa crecimiento
Efecto procesamiento*			
Henos	159 ^a	2.48 ^a	0.061 ^b
Ensilajes	144 ^b	2.22 ^b	0.069 ^a
Efecto PEG*			
Con PEG	155 ^a	2.39 ^a	0.065 ^a
Sin PEG	148 ^a	2.31 ^a	0.064 ^a
Efecto forrajes*			
<i>V. unguiculata</i> 100%	214 ^a	2.63 ^a	0.087 ^a
<i>Cratylia argentea</i> / <i>V. unguiculata</i> 33/67%	188 ^b	2.53 ^{ab}	0.075 ^b
<i>Calliandra</i> / <i>V. unguiculata</i> 33/67%	172 ^c	2.37 ^{bc}	0.068 ^c
<i>Cratylia</i> 100%	159 ^d	2.24 ^{cd}	0.062 ^d
<i>Flemingia macrophylla</i> / <i>V. unguiculata</i> 33/67%	156 ^d	2.39 ^{bc}	0.074 ^b
<i>Calliandra</i> 100%	93 ^e	2.16 ^d	0.040 ^f
<i>Flemingia macrophylla</i> 100%	80 ^f	2.13 ^d	0.048 ^e

* Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.05)

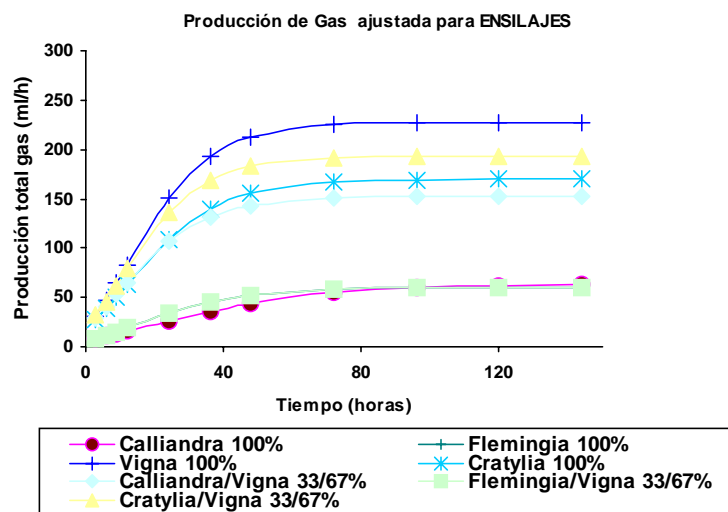


Figura 1. Perfil de la producción de Gas acumulada de los forrajes ensilados.

Topps (1995), aunque estos difieren con los obtenidos con *Calliandra* y *Flemingia* pues obtiene valores más altos a los encontrados en este ensayo. Por otra parte, la baja producción de gas y degradación de MS y PC de *Calliandra* y *Flemingia* puede estar relacionado con sus contenidos de proteína cercanos al 16%, alta fibra y la presencia de taninos condensados en sus estructuras, que dada su potencialidad de formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, saponinas entre otros (Mueller – Harvey, 1989; Mueller-Harvey y McAllan, 1992; Fajardo, 1998) pueden ligar componentes de la pa-

red celular y hacen en gran parte indisponible los nutrientes para los microorganismos.

La inclusión de *Calliandra* y *Flemingia* en niveles altos disminuyó la degradación de MS y PC. Sin embargo, las combinaciones de estas dos taníneras con *Vigna* permiten recomendar su inclusión en el nivel del 33% en las dietas sin tener efectos negativos. Estos resultados coinciden con lo reportado por Hess *et al.* (2004) y Sturm *et al.* (2006).

Efecto de la adición de PEG. La adición de PEG mostró mayor degradación de PC, aumento de la degradación de MS como lo reporta Carulla (1994),

Cuadro 3. Degradación de materia seca (%), proteína (%) amonio (mmol) con y sin PEG en henos y ensilajes.

Tratamientos	MS degradada (%)	PC degradada (%)	NH3 mmol
Henos	49.25 ^a	52, 0 ^a	15.8 ^a
Ensilajes	44.82 ^b	36,4 ^b	13.8 ^b
Efecto de PEG			
Con PEG	47.28 ^a	50,1 ^a	15.7 ^a
Sin PEG	46.80 ^a	38,2 ^b	14.0 ^b
Efecto de forraje			
<i>Cratylia</i> 100%	51.2 ^c	64,1 ^a	15.4 ^b
<i>Vigna</i> 100%	68.5 ^a	57,5 ^a	16.6 ^a
<i>Calliandra</i> 100%	25.6 ^e	18,7 ^d	11.5 ^d
<i>Flemingia</i> 100%	25.0 ^e	25,8 ^d	14 ^c
<i>Flemingia/Vigna</i> (33/67%)	47.5 ^d	35,6 ^c	15 ^{bc}
<i>Calliandra/ Vigna</i> (33/67%)	50.8 ^c	46,6 ^b	14 ^c
<i>Cratylia/ Vigna</i> (33/67%)	60.5 ^b	60,9 ^a	17 ^a

* Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.05)

Barahona et al. (1997), Martin et al. (2004), Canbolat et al. (2003) y Makkar et al. (1995). Los forrajes que tiene contenidos de taninos en sus hojas no responden de forma similar a la suplementación de PEG, por ejemplo en este ensayo la producción de gas para *Calliandra* + PEG se incrementó en mayor proporción (28%) que para *Flemingia* (20%) y su mezcla (2.4%), posiblemente esta diferencia es debida a la composición química y la estructura de los taninos para cada especie. Lo anterior concuerda con lo reportado por Getachew et al. (2004). La tasa de producción de gas (c) encontrada en este estudio para *Calliandra* con y sin PEG coincide de manera muy similar con la reportado por Sturm et al. (2006) y Hess et al. (2006) a las 144 horas de incubación, pero no para *Vigna* y *Flemingia* pues en este estudio los valores encontrados fueron mayores.

Amonio. La concentración de amonio puede estar influenciada por la tasa de degradación de los carbohidratos y las componentes de cadenas nitrogenada, mientras aumenta la degradación de carbohidratos la concentración de amonio se vera afectada por que promueve el crecimiento microbial que se refleja en perdidas de nitrógeno amoniacal (Getachew et al., 2000). De hecho la presencia en los forrajes de taninos afectó la concentración de amonio, en este ensayo se encontraron valores bajos de amonio

para *Calliandra* y *Flemingia* que para las leguminosas sin taninos, esto coincide con lo reportado para *Calliandra* y *Cratylia* en el estudio de Hess et al. (2006)

Efectos del procesamiento. Es claro que el proceso de ensilaje disminuyó el contenido de PC y degradabilidad de la MO y produjo un aumento de FDN y FDA. La dinámica de la fermentación muestra una clara diferencia entre henos y ensilajes para alcanzar la curva, esto se debe a que los ensilajes han experimentado un proceso de fermentación previo que ha favorecido la degradación de nutrientes, dejando disponible la materia orgánica para la actividad microbial que liberó mayor cantidad de gas. Los contenidos de taninos de las leguminosas *Calliandra* y *Flemingia* hacen que las produccion de gas sean bajas, con un coeficiente de correlación de 0.96, igual de alto como el reportado por Barahona (1999) y Giner-chavez (1996), donde se presenta que a mayor contenido de taninos menor producción de gas (Sanabria et al., 2006). La producción de gas estuvo afectada por la degradación de materia seca con un $r^2=0.96$ para los ensilajes y de $r^2=0.91$ para los henos, y con la degradación de proteína, con $r^2=0.62$ para ensilajes y $r^2=0.73$ para los henos. Esto puede explicarse por los complejos que se forman entre los taninos con la proteína o con otras moléculas.

Conclusión

La evaluación de leguminosas con la Técnica de Producción de Gas - (GTT) evidenció un efecto marcado por el tipo de forraje que fue incubado, así las leguminosas sin taninos *Vigna unguiculata* y *Cratylia argentea* presentaron los valores mas altos de producción de gas y degradación de materia seca y proteína cruda al igual que la concentración de amonio. Los ensilajes presentaron mayor tasa de producción del gas pero fueron los henos quienes hicieron mayor

degradación de nutrientes. Las leguminosas taníferas *Calliandra calothyrsus* y *Flemingia macrophylla* no lograron ser degradadas cuando sus niveles de inclusión fueron altos, pero se ve el efecto que se produce sobre la producción de gas y la tasa de degradación de materia seca y proteína, que logran disminuirse cuando se incluyen las mezclas de leguminosas con y sin taninos.

Literatura Citada

- Abreu, A., J.E. Carulla, M. Kreuzer, C.E. Lascano, T. Diaz, A. Cano y H.D. Hess. 2003. Efecto del fruto, del pericarpio y del extracto semipurificado de saponinas de *sapindus saponaria* sobre la fermentación ruminal y la metanogenesis *in vitro* en un sistema rusitec. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 16: 147-154
- Barahona, R. 1999. Condensed tannins in tropical forage legumes: their characterisation and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships. The University of Reading. A thesis submitted for the degree of doctor of philosophy. 312 p.
- Barahona, R., C.E. Lascano, R. Cochran, J. Morrill, and E. C. Titgemeyer, 1997. Intake, digestion, and nitrogen utilization by sheep fed tropical legumes with contrasting tannin concentration and astringency. J. Anim. Sci. 75: 1633-1640.
- Canbolat, O., A. Kamalk, E. Ozkose, C.O. Ozkan, M. Sahin, and P. Karabay. 2005. Effect of polyethylene glycol on *in vitro* gas production, metabolizable energy and organic matter digestibility of quercus cerris leaves. Livestock Research for Rural Development 17 (4).
- Carulla, J.E. 1994. Forage intake and n utilization by sheep as affected by condensed tannins. A dissertation presented to the faculty of the graduate college at the university of nebraska in partial fulfillment of requirements for the degree of doctor of philosophy. Lincoln, Nebraska. May. 126 p.
- Dzowella, B., L. Hove, and J. Topps. 1995. Nutritional and antinutritional characters and rumen degradability of dry matter and nitrogen from some tree species with potential for agroforestry in Zimbabwe. Animal feed science and technology 55: 207-214.

- Fajardo, C.H. 1998. Estudio de la interacción *in vitro* entre proteínas de origen vegetal y taninos. Trabajado de grado para optar al título de químico. Universidad nacional de Colombia. Sede Bogotá. Facultad de ciencias. Departamento de química. 76 p.
- Getachew, G., E. Depeters and P. Robinson. 2004. *In vitro* gas production provides effective method for assessing ruminant feeds. In *California agriculture*. 58:54-58
- Getachew, G., H.P.S. Makkar, and K. Becker. 2000. Effect of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. *British journal of nutrition* 84:77-83.
- Giner-Chavez, B. I. 1996. Condensed tannins in tropical forages. Ph. D. Dissertation. Cornell University. N.Y., USA.
- Hess, H.D., T.T. Tiemann, F. Noto, S. Franzel, C. E. Lascano, and M. Kreuzer. 2006. The effects of cultivation site on forage quality of *Calliandra calothyrsus* var. Patulul. In *Agroforest syst.* April 2006.
- Hess, H.D., Valencia, F.L., Monsalve, L.M., Lascano, C.E. and Kreuzer, M., 2004. Effects of tannins in *calliandra calothyrsus* and supplemental molasses on ruminal fermentation *in vitro*. *Journal of animal and feed science*, 13, (suplemento 1): 95-98.
- Makkar H.P.S., M. Blummel, and K. Becker. 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrrolidones or polyethylene glycols and their implication in gas production and true digestibility *in vitro* techniques. *Br. J. Nutr.* 73:897-913.
- Martin, I., D. Yañez, A. Mohumen, and E. Molina. 2004. Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal supply on two-stage olive cake fermentation. In: *Animal Research* 53: 245-257
- Mueller-Harvey and A. B. McCallan. 1992. Tannins and their biochemistry and nutritional properties. *Adv. Plant Cell Biochem. and Biotec.* 1. 151-217
- Mueller-Harvey, I. 1989. Identification and importance of polyphenolic compounds in crop residues. In: Chesso, A., Ørskov, E. R. (Eds). *Physio-chemical characterization of plant residues for industrial and feed use*. Elsevier Scie. Pub. Co., inc. New York. Pp. 88-109.
- Narváez, N. 2000. Caracterización nutritiva de especies arbóreas con potencial forrajero en Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias agropecuarias. Escuela de postgrados. Tesis de grado presentada como requisito para optar al título de magíster en ciencias agrarias con énfasis en producción animal tropical. 150 p.
- Sanabria, C.P., Barahona, R., Tiemann, T.T., Lascano, C.E., Martín, E. y Rodríguez, F. 2006. Efecto de la inclusión de forraje de *Vigna unguiculata*, *Flemingia macrophylla* y *Calliandra calothyrsus* a una dieta basal de *Brachiaria humidicola* sobre los principales grupos de microorganismos ruminales y parámetros de fermentación *in vitro*. En: segundo taller de taninos en la nutrición de rumiantes en Colombia. Bogotá noviembre 30-diciembre 1. Pág 30-34
- SAS. 2003. SAS/stat software. Release 9.1 (Sas Institute Inc: Cary, Nc)
- Stúrm, C.D., T.T. Tiemann, C.E. Lascano, M. Kreuzer and D. Hess. 2006. Nutrient composition and *in vitro* ruminal fermentation of tropical legumes mixtures with contrasting tannin content. In *animal feed science and technology*. Doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.11.008
- Theodorou, M.K., B.A. William. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal feed science and technology* 48. Pag 185-197.
- Tilley, J.M.A and R. Terry. 1963. A two stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassld. Soc.* 18:104-111
- Valencia, F.L. 2003. Efecto de la mezcla de leguminosas tropicales en relación con la presencia de taninos y emisiones de metano en un sistema *in vitro* (rusitec). Tesis de grado presentada para obtener título de magister en ciencias agrarias con énfasis en producción animal tropical. Universidad nacional de Colombia. Sede Palmira. 83 p.