

Revisión bibliográfica

Arbustivas forrajeras y ácidos grasos: estrategias para disminuir la producción de metano entérico en bovinos¹

Fodder shrubs and fatty acids: strategies to reduce enteric methane production in cattle

Juan Leonardo Cardona-Iglesias², Liliana Mahecha-Ledesma², Joaquín Angulo-Arizala²

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue analizar el uso de arbustos forrajeros y ácidos grasos poliinsaturados como estrategia nutricional para mitigar la producción de metano entérico en bovinos. Se hizo especial énfasis en el uso de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (botón de oro), como especie con potencial antimetanogénico. La búsqueda de información bibliográfica para llevar a cabo esta revisión se llevó a cabo durante los meses de junio a septiembre de 2015, mediante términos claves. El metano es un gas de efecto invernadero (GEI), el aumento en su concentración atmosférica, es causada principalmente por emisiones del sector agrícola y la industria, pero se estima también que una proporción es emitida por los rumiantes como producto de la fermentación entérica y anaeróbica de la dieta. Lo anterior causa un problema ambiental y de ineficiencia productiva en los sistemas ganaderos alrededor del mundo. Aunque existe controversia sobre el verdadero aporte de metano por los rumiantes y su incidencia sobre la problemática ambiental, la cantidad de emisiones se deben tratar de mitigar. El presente documento hace énfasis en la búsqueda de estrategias nutricionales, tales como la suplementación con especies arbustivas forrajeras y fuentes de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales han demostrado tener potencial para mantener la eficiencia productiva del animal y una posible reducción en la síntesis de metano entérico.

Palabras claves: metanogénesis, sistema silvopastoril, suplementación lipídica, *Tithonia diversifolia*.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the use of fodder shrubs and polyunsaturated fatty acids as a nutritional strategy to mitigate enteric methane production in cattle. Special emphasis was made on the use of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Mexican sunflower), as a species with antimethanogenic potential. Bibliographic information for this review was obtained between July and September 2015 by using key words. Methane is a powerful greenhouse gas (GHG), the increase of its atmospheric concentration is caused mainly by emissions from agriculture and industry, but it is also estimated that a proportion of methane is emitted by ruminants as a product of enteric and anaerobic fermentation of diet. This causes an environmental and productive problem in livestock production systems worldwide. Although there is controversy about the real contribution of methane by ruminants and its impact on environmental issues, the amount of emissions should try to be reduced. This document emphasizes the search for nutritional strategies such as supplementation with forage shrubs and sources of polyunsaturated fatty acids, which have shown potential to maintain animal production efficiency and decrease enteric methane synthesis.

Keywords: methanogenesis, silvopastoral system, lipid supplementation, *Tithonia diversifolia*.

¹ Recibido: 18 de noviembre, 2015. Aceptado: 18 de febrero, 2016. El trabajo forma parte de la tesis de grado de la maestría en Ciencias Animales del primer autor. Financiado por el proyecto "Fortalecimiento de la producción de la cadena láctea del distrito Norte Antioqueño", convenio N° 2012AS180031 firmado entre la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural del Departamento de Antioquia, la Universidad Nacional de Colombia (sede Medellín) y la Universidad de Antioquia, con recursos del Sistema General de Regalías- SGR. Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias. Medellín, Colombia.

² Universidad de Antioquia, Grupo de investigación en Ciencias Agrarias - GRICA, AA 1126, Ciudadela Robledo, Cra 75 No 65 -87. Medellín, Colombia. Teléfono +5742199147. juanleo012@gmail.com, lilianaamahechaledesma@gmail.com (autora para correspondencia), joaquin.angulo@udea.edu.co



INTRODUCCIÓN

El calentamiento global se considera como un problema ambiental, económico y social, el cual debe enfrentar el planeta Tierra. Esta problemática en gran parte es atribuida a las emisiones de los gases de efecto invernadero (GEI) de origen antropogénico (Marín, 2013). Las proyecciones de las variables climáticas, pronostican que el calentamiento global será mayor que el experimentado desde hace alrededor de diez mil años y se considera que será evidente el cambio en los patrones naturales, de las variables ambientales, modificando marcadamente el valor medio mundial de estas (FAO, 2009).

Los principales GEI, asociados con el fenómeno del calentamiento global, son el dióxido de carbono (CO₂), el metano (CH₄) y el óxido nitroso (N₂O). Según estadísticas de la comunidad científica mundial, el metano es el GEI que en el último siglo más ha aumentado sus concentraciones atmosféricas, debido principalmente al aumento de sus emisiones antropogénicas (fermentación entérica en rumiantes, cultivos de arroz, explotación de combustibles fósiles etc.). Para el año 2014 se alcanzó una concentración atmosférica máxima de 1833 ppm (partes por millón), equivalente a 254% de su nivel preindustrial (FAO, 2009; Marín, 2013; OMM, 2015).

Reportes de la FAO ubican principalmente al ganado bovino, la industria y el transporte, como grandes contribuyentes de la contaminación ambiental (Roig, 2013). En cuanto al ganado bovino, independiente de la fuente y cantidad de metano emitido al medio ambiente, deben buscarse alternativas para su mitigación.

La producción de CH₄ entérico, depende de aspectos de manejo nutricional dentro de los sistemas productivos, tales como el nivel de consumo del animal, la composición de la dieta y la digestibilidad aparente de la ración (Soliva y Hess, 2007). En la actualidad, una de las estrategias de alimentación que permiten diversificar la oferta nutricional de los rumiantes y el ecosistema dentro de los sistemas ganaderos es el establecimiento de los llamados sistemas silvopastoriles (SSP), los cuales consisten en la introducción de especies arbustivas y forrajeras en monocultivos de gramíneas, con el fin, entre otros, de ser modificadores de la fermentación ruminal (Ortiz et al., 2014). En el trópico alto colombiano, especies forrajeras como

la *Tithonia diversifolia* (botón de oro) se ha venido posicionando, debido a su buen aporte de nutrientes (Medina et al., 2009) y a la presencia de metabolitos secundarios. Estas características pueden mejorar el balance ruminal de energía y proteína y de paso disminuir el impacto ambiental por concepto de emisión de GEI (Lezcano et al., 2012; Gallego et al., 2014).

La suplementación nutricional en bovinos con ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), ha demostrado tener cierto potencial para disminuir la producción de metano entérico, debido a que los AGPI son utilizados por las bacterias ruminales como una alternativa para la captación de H₂ a nivel ruminal, evitando así que gran parte del H₂ sea utilizado por los microorganismos metanogénicos. También se ha evidenciado que los AGPI tienen un efecto tóxico sobre las poblaciones metanogénicas (Dohme et al., 2000; Patra, 2013; Pirondini et al., 2015). Tomando como punto de partida el contexto anterior, esta revisión tuvo como objetivo analizar el uso de arbustos forrajeros y ácidos grasos poliinsaturados como estrategia nutricional para mitigar la producción de metano entérico en bovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo de revisión bibliográfica se realizó durante los meses de junio a septiembre de 2015, mediante una búsqueda de publicaciones científicas en varias bases de datos certificadas de la web, así como también en bases de datos de universidades y revistas electrónicas disponibles en internet. Se incluyeron en la búsqueda: artículos científicos, revisiones bibliográficas, metaanálisis, capítulos de libros y de folletos, los cuales estuvieron disponibles al emplear el término de búsqueda en español o su similar en inglés. Los términos empleados para la búsqueda fueron principalmente: “calentamiento global”, “gases de efecto invernadero”, “metano entérico”, “forrajeras tropicales”, “sistemas silvopastoriles”, “metabolitos secundarios”, “botón de oro”, “*Tithonia diversifolia*”, “metanogénesis”, “ácidos grasos poliinsaturados”, “biohidrogenación ruminal” y “suplementación lipídica en bovinos”. Dicha búsqueda se realizó sin restricción de fecha de publicación, pero en su mayoría se escogió el material publicado en los últimos diez años. Posteriormente, se realizó el estudio detallado y síntesis del material bibliográfico consultado con el

fin de concretar de la manera más coherente posible el tema central del documento.

CALENTAMIENTO GLOBAL

El panel internacional de expertos sobre el cambio climático (IPCC, 2007), ha evidenciado que las actividades humanas en los últimos cincuenta años, han influenciado drásticamente el cambio climático global a través de la emisión de los llamados gases de efecto invernadero (GEI). El efecto invernadero es un mecanismo clave en la regulación de la temperatura de la tierra, ya que permite que su valor promedio no sea de - 6 °C sino de 15 °C. Normalmente la tierra retorna la energía que recibe del sol nuevamente al espacio, por medio de la reflexión de luz y por emisión de calor, pero gran parte de ese calor está siendo absorbido por efecto de los GEI (CORPOICA, 2011). El grupo más significativo de GEI, lo componen el dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O), hidrofluorocarbonos (HFC), perfluorocarbonos, (PFC) y hexafluoruro de azufre (SF₆). Todos estos gases tienen en común que poseen moléculas con dos o más átomos, que se mantienen unidos con suficiente espacio entre sí, para absorber el calor de la atmósfera y retenerlo (Marín, 2013).

El efecto invernadero conllevará a que en las próximas décadas se incremente drásticamente la formación de fenómenos naturales destructivos, como huracanes, ciclones o tsunamis (Duque, 2008). Los patrones climatológicos cambiantes, conllevarán a la aparición de enfermedades tropicales como el dengue o la malaria y a la extinción de especies animales y vegetales (IDEAM, 2009). Sin embargo, y pese a las recomendaciones de los expertos, las emisiones de GEI a nivel mundial siguen elevando su concentración atmosférica. Las emisiones de los GEI abordadas en el protocolo de Kioto, aumentaron de 1970 hasta 2004, en aproximadamente un 70% (de 28,7 a 49 Gt CO₂ eq (Gt: Giga toneladas de CO₂ equivalente), siendo el dióxido de carbono (CO₂), la mayor fuente, con un crecimiento cercano al 80%, seguido del CH₄ con un incremento del 40% (Marín, 2013).

Una de las razones del incremento de los GEI, se debe a la fermentación entérica del ganado bovino, responsable de aproximadamente el 16% de las emisiones antropogénicas de CH₄ (Kebreab et al.,

2006). Otras fuentes significativas de emisión de CH₄ son los pantanos naturales (21%), los cultivos de arroz (20%), pérdidas por combustión de hidrocarburos (14%), combustión de biomasa (10%), rellenos sanitarios, entre otros (Wheeler et al., 2008).

GANADERÍA BOVINA Y EMISIONES DE METANO ENTÉRICO

El metano se conoce como un biogénico traza, ya que tiene origen biológico, la importancia de estudiarlo, dentro del contexto ganadero, se debe a que científicamente es conocido que la ganadería bovina, representa una proporción de las fuentes antropogénicas de emisión de CH₄.

Si se tiene en cuenta que los rumiantes pueden producir entre 250 y 500 l de CH₄ por día (Johnson y Johnson, 1995), la estimación de este parámetro, debería incidir en la determinación de la eficiencia del sistema ganadero, en términos ambientales y económicos. Otros autores han estimado que un bovino adulto puede producir entre 300 a 600 l/CH₄/animal /día (Jouany, 1994). La síntesis y emisión de CH₄ en bovinos difiere principalmente según el sistema de producción, el tipo de dieta ofrecido y la eficiencia productiva de los animales. En países como Australia el aumento de la producción por vaca lechera y el mejoramiento de la eficiencia productiva de los hatos, ha conllevado a que los animales produzcan en promedio 6000 l/leche/animal/año y se estima que han disminuido su emisión de metano a 24 g CH₄/l/leche producido (600 l CH₄/animal/día) (Moate, 2010)

Emisiones de metano entérico, en vacas lecheras hasta de 793 l/CH₄/animal/día (Chase, 2007) estimados a partir del sistema de valoración proteica y energética desarrollado por la Universidad de Cornell, conocido como “Cornell net carbohydrate and protein system (CNCPS)”. El valor anterior está por debajo de lo indicado en Colombia, donde para vacas lecheras de alta producción en trópico alto, se estimaron valores de hasta 670 l CH₄/animal/día (Marín, 2013) y el informado por Jouany (1994) para vacas lecheras adultas el cual fue de 600 l CH₄/animal/día.

En vacas lecheras con acceso a forraje de buena calidad y con una óptima rotación de potreros, se han estimado valores de 33 kg/CH₄/animal/año (138 l CH₄/animal/día), los mismos autores reportan para sistemas

extensivos con poca mejora de calidad nutritiva de la dieta, valores promedio de 55 kg/CH₄/animal/año (230 l CH₄/animal/día) (Kinsman et al., 1995). Se han obtenido valores de emisión de metano en novillas para carne de 134 y 347 l CH₄/animal/día y en vacas adultas para carne de 251 y 397 l CH₄/animal/día, respectivamente (DeRamus et al., 2003), los valores más bajos corresponden a las épocas cuando los animales estaban en pastoreo rotacional y en praderas mejoradas.

Se estima de manera general que las vacas producen aproximadamente 23 g de CH₄/kg materia seca consumida (35 l/CH₄/kg MSC), esta tasa se puede aplicar a una amplia variedad de dietas, independiente si las vacas están en pico de producción o lactancia tardía e incluso en ganado de carne (Moate, 2010). Cuando los bovinos pastorean forrajes de baja calidad nutricional, la producción de metano entérico puede representar pérdidas que varían entre el 15 y el 18% de la energía digestible de la dieta (Carmona et al., 2005). Por lo anterior, los sistemas ganaderos deberán ser cada vez más eficientes, productiva y ambientalmente, para afrontar el incremento de la demanda mundial de carne y leche bovina (Sosa et al., 2007; Buddle et al., 2011).

SÍNTESIS DE METANO ENTÉRICO

Los organismos metanogénicos se clasifican dentro del grupo de los procariotas, subgrupo *Archaea*. Viven en medios estrictamente anaerobios y obtienen la energía mediante la producción de metano (Deppenmeier y Müller, 2008), poseen una pared celular que no es de peptidoglicano como la de las bacterias, sino principalmente de un compuesto llamado pseudomureina (Marín, 2013). Los metanógenos colonizan rápidamente el rumen en bovinos, incluso antes de que la dieta contenga material forrajero, básicamente por contacto con otros bovinos y con el medio ambiente. Alrededor del día veintiuno de vida las poblaciones de metanógenos alcanzan una densidad de 10⁹ células/ml (Skillman et al., 2004).

Durante la fermentación microbiana de los alimentos y sobre todo de los carbohidratos, además de sintetizarse productos de desecho como los ácidos grasos volátiles (AGV), también se libera hidrógeno (H₂) y dióxido de carbono (CO₂) (Ramírez et al., 2014). Estos compuestos son utilizados por los microorganismos metanogénicos, los cuales producen

metano como estrategia metabólica para obtener energía (Janssen, 2010). La producción de metano a nivel entérico, contribuye al balance del ambiente ruminal, ya que es una estrategia biológica para mantener una baja concentración de H₂ en el medio (Schink, 2006). No obstante, existen otras vías de remoción del hidrógeno ruminal, como por ejemplo el proceso de biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados y la formación de ácido propiónico (Van Soest, 1994).

La producción de metano es una vía metabólica única, en la cual el paso principal en el aporte de energía se asocia con la reducción del grupo metilo a metano (Deppenmeier, 2002). Los electrones para este paso reductivo se obtienen principalmente por la oxidación de H₂, formiato, metanol y metilaminas (Takahashy, 2005). El CH₄ se forma entonces por los metanógenos ruminales, utiliza H₂ (80%) y el formiato (18%) como sustratos (Demeyer y Fievez, 2000). En los rumiantes, el tiempo de retención de los sustratos no permite el desarrollo de microorganismos de crecimiento lento, como los acetógenos productores de H₂. Por tal razón, los ácidos grasos de cadena corta como el acetato, propionato y butirato no se utilizan como sustrato para la metanogénesis ruminal (Demeyer y Fievez, 2000; Sosa et al., 2007).

El pH ruminal es uno de los principales factores que puede afectar la conformación de la población microbiana y los niveles de ácidos grasos producidos en el rumen. Las bacterias celulolíticas y metanogénicas pueden verse reducidas cuando el pH comienza a caer por debajo de 6 (Marín, 2013). Las dietas basadas en forrajes de baja calidad, tienden a mantener un pH cercano a 7 (básico), menor digestibilidad y están asociados a una mayor producción de CH₄ (Moss y Givens, 2002; Vargas et al., 2012). Mientras que dietas que garanticen contenidos medios o altos de carbohidratos solubles, generalmente disminuyen la producción de CH₄, siempre y cuando el consumo sea lo suficientemente alto para causar una disminución del pH en rumen.

A nivel ruminal se ha evidenciado una relación de género específica, sobre todo entre microorganismos metanógenos y protozoarios, estos últimos ofrecen una superficie de adhesión facilitando la formación de flóculos (glóbulos), para que los metanógenos se puedan adherir (Angarita, 2013). Se han encontrado varios grupos de bacterias metanogénicas sobre la

superficie de los protozoos, posiblemente usan el hidrógeno que estos últimos producen, vía transferencia directa. En varias investigaciones se ha estimado que los metanógenos asociados a los protozoarios ciliados fueron responsables entre el 9 y 25% de la metanogénesis ruminal (Moss et al., 2000).

De manera general, se podría afirmar que la fermentación y la subsecuente producción de gases como el metano aumenta a medida que los compartimientos digestivos del rumiante se van desarrollando (Carmona et al., 2005). La mayor parte del metano entérico se sintetiza en el retículo – rumen, y del 97 al 98% del metano producido, se elimina principalmente a través de la boca (eructo) y de los orificios nasales (expiración). Solo un 2 a 3% de las emisiones se efectúan vía rectal (Murray et al., 1976; Muñoz et al., 2012).

ESTRATEGIAS NUTRICIONALES Y SU EFECTO SOBRE LA DISMINUCIÓN DE LA METANOGÉNESIS RUMINAL

En sistemas de ganadería bovina es pertinente utilizar estrategias de alimentación basadas en suplementación estratégica con forrajes tropicales y/o con fuentes lipídicas, las cuales han demostrado mantener un óptimo balance ruminal que mejora la productividad animal y disminuye la producción de GEI como el metano (Galindo et al., 2005). El uso de ciertas especies forrajeras y arbóreas tropicales en la alimentación de bovinos han mostrado una tendencia a disminuir la síntesis de CH_4 , debido a la presencia de un grupo de compuestos llamados metabolitos secundarios (MS), los cuales al parecer tienen cierto efecto antimetanogénico, además de que aumentan el consumo y la velocidad de paso de los alimentos, mostrando así una importante disminución en la producción de CH_4 por unidad de forraje digerido (Navas, 2008; Angarita, 2013). Por otra parte, se considera que la suplementación con ácidos grasos, principalmente aquellos poliinsaturados, puede constituir una alternativa dietaria encaminada a disminuir la metanogénesis ruminal (Martin et al., 2010). Esto ha sido relacionado principalmente a que los lípidos tienen un efecto tóxico sobre las bacterias metanogénicas y los protozoos, además

captan ciertas cantidades de H_2 durante el proceso de biohidrogenación ruminal (Jalc et al., 2002).

La baja calidad de las pasturas en el trópico hace que el uso de follaje de especies forrajeras, arbustivas y arbóreas en la alimentación de bovinos represente una alternativa para el desarrollo de sistemas ganaderos, ambiental y económicamente sostenibles (Galindo et al., 2005). La introducción de árboles y arbustos como modificadores de la fermentación ruminal, con la finalidad de reducir la metanogénesis, podría llegar a ser un enfoque promisorio para la ganadería bovina mundial. Actualmente, se han identificado plantas que tienen propiedades antimetanogénicas, debido a que poseen compuestos como taninos y saponinas, los cuales están presentes en diversas especies de forrajes y arbustivas que se pueden incluir dentro de la alimentación de los rumiantes y cuyo establecimiento y manejo no requieren de grandes inversiones económicas (Apráez et al., 2012).

En la actualidad existe un interés marcado en el estudio, validación y uso de los metabolitos secundarios de las plantas (MSP), ya que representan una alternativa natural para disminuir los aditivos químicos, cuyos residuos pueden alcanzar los alimentos de origen animal (Patra y Saxena, 2010). La mayoría de los MSP conocidos se encuentran en especies forrajeras de uso tradicional, por lo tanto, es propicio diversificar los sistemas de pastoreo y no establecer únicamente especies gramíneas en monocultivos (Apráez et al., 2012; Bonilla y Lemus, 2012).

EFECTO DE LOS MSP, DE ALGUNAS FORRAJERAS ARBUSTIVAS Y ARBÓREAS SOBRE LA MICROFLORA RUMINAL Y LA EMISIÓN DE METANO

La mayoría de plantas producen diversos compuestos biológicos que son clasificados como metabolitos primarios y secundarios. Los primarios son esenciales para el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas (Bodas et al., 2012). Mientras que los metabolitos secundarios constituyen principalmente mecanismos de defensa, contra la presencia depredadora de otros organismos, su presencia puede variar entre especies, así como también por la edad de la planta y factores medioambientales (Wallace, 2004; Bodas et al., 2012; Pavarini et al., 2012).

Existen cientos de metabolitos secundarios, que suelen ser agrupados según las sustancias químicas que los constituyen (Pavarini et al., 2012). Entre los más relacionados con la disminución de metano entérico en bovinos se encuentran los taninos y las saponinas. Los primeros son compuestos polifenólicos de alto peso molecular que tienen la capacidad de formar complejos con otros compuestos (Waghorn, 2008). Los taninos se clasifican en hidrolizables (TH) y condensados (TC) (Barbehenn y Constabel, 2011), dichos compuestos reaccionan con iones de calcio de la pared celular, lo cual causa un cambio en la permeabilidad de la célula, que permite su penetración, con lo que se inactivan permeasas del periplasma involucradas en el transporte de aminoácidos y carbohidratos. Lo anterior provoca cambios morfológicos e induce a deficiencias nutricionales y posterior muerte celular (Posada et al., 2005; Ortiz et al., 2014).

Las saponinas son otro grupo de MSP, son glúcidos de alto peso molecular, se componen de una aglicona (hidrófoba) y un sacárido (hidrófilo) (Sparg et al., 2004). Poseen un característico sabor amargo y son sustancias solubles en agua, capaces de formar espuma. La mayoría de las plantas que contienen saponinas no tienen un solo compuesto, sino una mezcla compleja, lo que influye en sus propiedades (Apráez et al., 2012). Al igual que los taninos, las saponinas poseen gran actividad antibacteriana, relacionada con cambios en la permeabilidad de la célula (Patra y Saxena, 2009).

El efecto de los metabolitos secundarios sobre la microbiota ruminal, depende principalmente de la composición química de la planta y del pH ruminal (Patra y Saxena, 2009). Los TC inhiben el crecimiento de cierto grupo de bacterias y protozoarios debido a que no pueden ser degradados por los microorganismos del rumen, como consecuencia de su alto peso molecular, pero si son capaces de degradar los TH, cuyo peso molecular es más bajo. Se ha reportado una mayor disminución en la producción de metano entérico, cuando se incluyen TC frente a los TH y cuando la concentración de estos en la dieta varía entre 2 y 4% (Vargas et al., 2012).

Algunos árboles forrajeros en el trópico han evidenciado un posible efecto como defaunadores en rumiantes, esto debido a la presencia de sustancias fenólicas en sus hojas (Carmona, 2007). Entre otros se encuentran el Nacadero (*Trichantera gigantea*),

Cachimbo (*Erythrina poeppigiana*), Jaboncillo (*Sapindus saponaria*) y el Orejero (*Enterolobium cyclocarpum*). Con respecto al *Enterolobium cyclocarpum* y *Sapindus saponaria*, el efecto como defaunantes de estas especies se debe a la presencia de sustancias detergentes, como las saponinas en sus hojas (Navas et al., 1992).

Al evaluar a nivel *in vitro* el efecto de diferentes niveles de taninos condensados extraídos de *Leucaena leucocephala* (0, 15, 20, 25 y 30 ml), la producción de CH₄ (ml/g MS) y las poblaciones de archaea metanogénica y protozoos, mostraron una reducción lineal con el incremento en el nivel de taninos (Tan et al., 2011). Los taninos presentes en muchas leguminosas, como *Calliandra calothyrsus*, pueden estar asociados con la reducción en la producción de CH₄, hasta en un 50%, respecto a la dieta tradicional de pasto solo (Hess et al., 2002). Relacionado con lo anterior, Molina et al. (2013), a través de la técnica *in vitro* de producción de gases, incubaron *Leucaena leucocephala* y pasto Guinea (*Megathyrsus maximus*). La producción de CH₄ fue 36% menor para el tratamiento con *Leucaena* en relación con el pasto Guinea, el efecto fue atribuido al contenido de taninos concentrados de la *Leucaena*.

La introducción de especies forrajeras, leguminosas y arbóreas, representan una alternativa nutricional y de mitigación de GEI como el CH₄ (Barahona et al., 2003). Lo ideal es que haya un contenido moderado de metabolitos secundarios en la dieta de los bovinos, que contribuyan a disminuir la metanogénesis ruminal, sin afectar los parámetros de la dinámica ruminal, como la digestibilidad de la ración, el perfil de fermentación o la tasa de sobrepaso. En el Cuadro 1, se presentan algunos datos de producción de metano *in vitro*, y otras características de especies forrajeras y arbóreas, utilizadas en nutrición de bovinos.

Las especies arbustivas y arbóreas forrajeras en general son de fácil establecimiento en el trópico y su uso en la alimentación animal depende de capacitación e información, más que de grandes recursos económicos para establecerlos. De la excepcional diversidad de especies arbustivas forrajeras del trópico, la *Tithonia diversifolia* se está convirtiendo en una alternativa nutricional y una estrategia potencial para la mitigación del metano entérico en rumiantes, como se mostrará a continuación.

Cuadro 1. Producción de metano *in vitro*, caracterización fitoquímica y conteo de protozoos de algunas forrajeras y arbóreas, utilizadas en la alimentación de bovinos en el trópico, según varios autores. Colombia. 2015.

Table 1. Production of *in vitro* methane, phytochemical characterization and counting of protozoa, some forage and tree used in feed for cattle in the tropics, according to several authors. Colombia. 2015.

Planta forrajera	ml CH ₄ /g materia seca fermentada	Presencia de metabolitos secundarios		Presencia de protozoos (10 ⁵ células/ml)
		Taninos	Saponinas	
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	64,77	+++	++	5,1
<i>Gliricidia sepium</i>	29	+	++	5,7
<i>Guazuma ulmifolia</i>	38	++	+	5,8
<i>Leucaena leucocephala</i>	16,4	+++	++	4
<i>Moringa olifera</i>	25,3	++	+	3,8
<i>Morus alba</i>	13,8	++	+++	2,3
<i>Samanea saman</i>	4,3	++	+	4,1
<i>Sapindus saponaria</i>	14	++	+	5
<i>Tithonia diversifolia</i>	9,2	++	+	4
<i>Trichantera gigantea</i>	10,8	++	-	3,5

+++ : presencia cuantiosa; ++: presencia notoria; +: presencia leve; - : ausencia / +++: substantial presence; ++: strong presence; +: slight presence; - : absence.

Fuente/Source: adaptado de / adapted from Rosales et al. (1989); Días et al. (1993) Galindo et al. (2005); Delgado et al. (2007); González et al. (2010); Delgado et al. (2012); Galindo et al. (2014).

USO DE BOTÓN DE ORO (*Tithonia diversifolia* HEMSL. A Gray) COMO FORRAJERA CON POTENCIAL PARA LA DISMINUCIÓN DE CH₄ ENTÉRICO

El botón de oro (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A Gray, es una planta forrajera no leguminosa, de la familia Asterácea, originaria de América Central y la cual ha sido introducida en el trópico en todo el mundo (Maina et al., 2012). Esta especie se adapta a suelos ácidos y poco fértiles, en países como Colombia se desarrolla desde el nivel del mar hasta los 2500 m de altura y en sitios con precipitaciones que fluctúan entre 800 y 5000 mm. Tiene un rápido crecimiento y su cultivo requiere mínimas cantidades de insumos y de manejo (Calle y Murgueitio, 2008). El uso de esta especie como recurso forrajero para la alimentación de bovinos, viene en incremento debido a su buen valor nutricional y capacidad de rebrote tras el corte o pastoreo (Medina et al., 2009).

La composición química de la planta puede presentar variaciones, principalmente en función de las condiciones medioambientales y del suelo en donde

se cultive (Gallego et al., 2014). La edad o la parte de la planta, influyen en el contenido de metabolitos secundarios. El nivel de taninos extractables totales puede estar entre 29,2 y 37,7 gramos por kilogramo de materia seca, para hojas maduras y jóvenes, respectivamente (Maina et al., 2012). En un estudio realizado en Colombia, se reportaron para plantas adultas de *T. diversifolia* (hojas y peciolas), valores de polifenoles de 6,3 g/kg MS, de taninos totales de 5,4 g/kg MS, de taninos condensados de 6,6 g/kg MS (Santacoloma y Granados, 2012) y un valor bajo de saponinas (2,5 mm de altura en espuma) según la metodología de Cuellar et al. (1999).

La edad de corte, la época y ecotipo, influyen directamente sobre los valores de metabolitos secundarios reportados para *T. diversifolia* (Galindo et al., 2011). El contenido de metabolitos secundarios de esta especie fue evaluado durante dos épocas (época de lluvia y época de poca lluvia) y en dos edades de la planta, a los treinta y sesenta días de rebrote, respectivamente. En la época de lluvia, no se detectaron taninos en la fracción foliar en ninguna de las edades, mientras que en el periodo de poca lluvia, se encontraron de forma leve casi en todas las

fracciones (excepto en los tallos), para ambas edades (Lezcano et al., 2012). Según los resultados anteriores, es probable que los taninos aumenten su concentración en las épocas de sequía, como una respuesta fisiológica de la planta al estrés hídrico.

Los metabolitos secundarios del botón de oro por encontrarse en niveles moderados, no afectan el consumo ni la digestibilidad de la materia seca (Dardon y Duran, 2011). Por otra parte, los niveles bajos de taninos (3 – 6% MS) no causan problemas en la digestibilidad del alimento (Kaitho et al., 1997), pero se considera que la concentración ideal de taninos en la dieta de bovinos, debe variar entre el 2 y 4% de la materia seca (Barry y McNabb, 1999).

La presencia de metabolitos secundarios en el forraje fresco de *T. diversifolia* fue evaluado por Lezcano et al. (2012) en diferentes épocas; los autores no encontraron presencia de saponinas, glucósidos cardiotónicos ni flavonoides, pero sí de taninos. En otra investigación se reportó un bajo contenido de fenoles y ausencia de saponinas (Vargas, 1994). Cabe anotar que la edad de la planta, la época de corte y la metodología utilizada para la detección de los metabolitos secundarios en laboratorio, son aspectos que pueden influir en la detección y cuantificación de estas moléculas.

En la Figura 1 se puede observar como los taninos condensados (totales y ligados a la fibra) aumentan su presencia después de los 120 días de edad de la planta, contrario al comportamiento de los taninos ligados a la fibra y lo taninos totales. En cuanto a los taninos concentrados libres se les observa un crecimiento exponencial desde el día 60 en adelante.

En cuanto al control de microorganismos metanogénicos, se evaluó a nivel *in vitro*, el efecto de la especie *T. diversifolia*, y no se encontraron efectos negativos sobre la producción de bacterias viables totales, pero sí una disminución de hasta tres veces de la bacteria *Archaea metanógena* y una significativa reducción de los protozoos. Se asume esta disminución de la especie *Archaea*, como un efecto directo de la presencia de metabolitos secundarios en el follaje de la especie (Delgado et al., 2012). También se ha investigado sobre la producción de CH₄, por parte de la especie *T. diversifolia*. El potencial de producción de metano en condiciones *in vitro* de *Brachiaria brizantha* cv. *Marandu* con inclusión de *T. diversifolia* en las proporciones de 0, 25, 50, 75

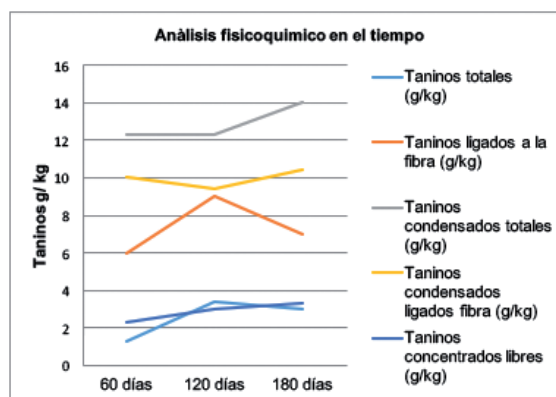


Figura 1. Perfil poli fenólico de *Tithonia diversifolia*, en diferentes edades de corte. Colombia. 2015.

Figure 1. *Tithonia diversifolia* polyphenolic profile in different cutting ages. Colombia. 2015.

Fuente: adaptado de Verdecia et al. (2011) / Source: adapted from Verdecia et al. (2011).

y 100%, disminuyeron cuando la proporción de *T.* fue del 50% o mayor, en los demás tratamientos no se presentaron diferencias estadísticas significativas (Mauricio et al., 2014). Lo anterior se relaciona con lo reportado por Delgado et al. (2012), quienes en un estudio a nivel *in vitro* evaluaron el efecto de la inclusión de *Tithonia*, en una proporción del 30 y 70% de pasto Estrella (*Cynodon nlemfluencis*) sobre la población de bacterias metanógenas totales, arrojando valores menores en cuanto a esta población en el tratamiento que incluía mayor proporción de *Tithonia diversifolia* de $1,24 \times 10^{10}$ UFC/ml, comparado con el tratamiento control de pasto Estrella solo, el cual arrojó valores de $1,85 \times 10^{10}$ UFC/ml. Resultados similares fueron encontrados al evaluar el efecto del uso de botón de oro sobre la población de protozoos y metanógenos ruminales en condiciones *in vitro*. La inclusión del 10 y 20% de forraje de *Tithonia* en base seca en la dieta para rumiantes, produjo un marcado efecto reductor de la población de protozoos en rumen; además, se mantuvo estable la digestibilidad de la fibra, debido al incremento de las poblaciones de bacterias celulolíticas (Galindo et al., 2011).

En Colombia se evaluó el efecto de la inclusión de *T. diversifolia*, sobre las emisiones de CH₄ entérico *in vivo*, con la técnica del politunel, en dos sistemas diferentes de producción bovina, tanto de trópico

alto (S1) (vacas lecheras) como de trópico bajo (S2) (novillos cebuinos). Para ambos sistemas (S1 y S2) se propusieron dos dietas: la tradicional, que para el caso de S1 estaba basada en pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y suplemento energético, mientras que para S2 fue a base de *Brachiaria decumbens*. En cada uno de los sistemas se incluyó el consumo de forraje de *Tithonia* en diferentes proporciones, para comparar algunas variables relacionadas con la producción de CH₄ entérico. Al corregir por el consumo de materia seca, no hubo diferencia en la emisión diaria de CH₄, en la dieta tradicional vs la que incluía *Tithonia* en el S1: 21,7 vs 21,9 g CH₄/kg materia seca consumida (MSC), (P-value=0,891) y en el S2: promedio para ambas dietas de 33,8 g CH₄ /kg MSC (P-value= 0,645). Se concluyó que la inclusión de *T. diversifolia* en la dieta de bovinos no afectó las emisiones entéricas de metano netas, pero sí ayudó a aumentar el consumo de materia seca y de nutrientes, además de menores emisiones por unidad de producto (Molina et al., 2015). Las pruebas de emisión de metano *in vivo* utilizando *T. diversifolia* aún son escasas, lo que hace propicio realizar otros estudios a nivel de campo que contrasten con los datos mencionados y donde se incluyan más efectos.

CONSIDERACIONES SOBRE EL USO DE LÍPIDOS COMO ESTRATEGIA DE SUPLEMENTACIÓN, PARA LA DISMINUCIÓN DE CH₄ ENTÉRICO EN BOVINOS

Las dietas corrientes de los rumiantes contienen generalmente entre 2 y 5% máximo de lípidos, de los cuales cerca de la mitad son ácidos grasos (Doreau y Ferlay, 1994). Los lípidos cuantitativamente más importantes en la alimentación de los rumiantes son aquellos que contienen ácidos grasos unidos a glicerol: triglicéridos, glicolípidos y fosfolípidos. Los triglicéridos son mayoritarios en los lípidos de las materias primas no forrajeras y los glicolípidos y fosfolípidos predominan dentro de la fracción lipídica del forraje (Morand-Fehr y Tran, 2001). En los forrajes verdes predominan los ácidos linolénico y linoléico, los cuales representan entre el 50 y 20% del total de ácidos grasos, respectivamente. En la suplementación lipídica para rumiantes, también pueden ser utilizados los aceites de origen marino, estos se caracterizan por

su riqueza (>35%) en ácidos grasos insaturados de 20 y 22 carbonos, los cuales son buenas fuentes de omegas 3 y 6 (Morand-Fehr y Tran, 2001).

Existen varios motivos por los cuales se suministra grasa como suplemento en la dieta de los bovinos, una de las razones principales es aumentar la concentración energética de la ración (Chilliard y Ollier, 1994). Además, la inclusión de una fuente apropiada de lípidos en la dieta permite incrementar el contenido del ácido linoléico conjugado (ALC) y los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de la serie n-3, eicosapentaenoico y docosahexaenoico, en la carne y la leche de rumiantes. De esta manera se mejora la calidad nutricional de dichos derivados, lo que los convierte en productos funcionales que mejoran la salud del ser humano (Moos et al., 2000; Collomb et al., 2006; Givens et al., 2006).

Se considera en general que los ácidos grasos de la dieta en rumiantes, principalmente aquellos poli-insaturados, pueden constituir una alternativa dietaria promisoría encaminada a disminuir la metanogénesis ruminal (Martin et al., 2010). Lo anterior se debe posiblemente a la acción que dichos compuestos ejercen sobre la actividad de las bacterias metanogénicas, la reducción del número de protozoos y a través del uso de hidrógeno durante el proceso de biohidrogenación de los ácidos grasos como el oleico, linoleico y linolénico (Jalc et al., 2007).

En el rumen, los lípidos ingeridos en la dieta sufren dos procesos metabólicos, la lipólisis y la biohidrogenación. La lipólisis se refiere a la liberación por hidrólisis de los ácidos grasos esterificados en los triglicéridos, glicolípidos y fosfolípidos, mientras que la biohidrogenación consiste en la reducción de los enlaces dobles existentes en los ácidos grasos liberados. Generalmente, los ácidos grasos saturados liberados no sufren modificaciones en el rumen, pero los insaturados son rápidamente hidrogenados por las bacterias ruminales (Chow et al., 2004). Por otro lado, la biohidrogenación ruminal es un mecanismo adaptativo de los microorganismos ruminales para reducir la toxicidad de los ácidos grasos. Los ácidos grasos de cadena larga inhiben el metabolismo microbiano, y esta actividad inhibitoria aumenta cuando incrementa su grado de insaturación.

Entre las bacterias ruminales responsables de la biohidrogenación de los ácidos grasos, *Butyrivibrio fibrisolvens* jugaría el papel más relevante (Fukuda et al., 2006), aunque se sabe que otras bacterias como

Ruminococcus, *Eubacterium* y *Fusocillus* pueden estar también implicadas (Palmquist et al., 2005). El proceso de biohidrogenación ruminal es un mecanismo que se torna relevante en cuanto a la captura de H_2 . De esta manera se reduce la concentración ruminal de este producto, quedando menos sustrato disponible, para ser utilizado por las bacterias metanógenas en la posterior formación de CH_4 (Johnson y Johnson, 1995). La cantidad de H_2 utilizada en el proceso de biohidrogenación ruminal es muy baja y no excede el 1 al 2% (Johnson y Johnson, 1995; Odongo et al., 2007), aunque otros autores como Machmüller et al. (2002); Soliva et al. (2003); Ungerfeld et al. (2005) y Ramírez et al. (2014) coinciden en afirmar que este valor puede variar dependiendo la fuente de lípidos y podría ser una alternativa metabólica para la captación de H_2 .

En varias investigaciones se ha comprobado que en bovinos la suplementación con ácidos grasos, deprime la metanogénesis ruminal (Moate et al., 2013; Pirondini et al., 2015), sin embargo, se debe tener en cuenta su nivel de inclusión y el tipo de lípido utilizado, para que no haya un efecto negativo sobre la producción y la composición de la leche. Pero lo anterior es un tema que aún requiere de una mayor investigación (Martin et al., 2008). Beauchemin et al. (2007) compararon la grasa animal (sebo) y el aceite de girasol, en vacunos con una dosis suplementaria del 3,4% de la MS del alimento; en este ensayo, la producción de CH_4 se redujo aproximadamente en un 12% con ambas fuentes de lípidos y no se encontraron efectos sobre la digestibilidad de la MS y de la FDN.

La reducción de CH_4 inducida por la adición de grasa a la dieta puede alcanzar hasta un 50% (Machmüller et al., 1998) y se ha observado que está probablemente asociada a la disminución de protozoarios (Cieslak et al., 2006) y a la toxicidad que ejercen algunos ácidos grasos de cadena larga y media sobre las bacterias metanógenas (Dohme et al., 2000). Generalmente los aceites vegetales, por ejemplo los de canola, soja o linaza, se utilizan con frecuencia, mientras que el uso de aceites alternativos ricos en n-3 AGPI, tales como el aceite de pescado, es poco común. Los aceites de origen marino, poseen una alta concentración de ácidos grasos insaturados de cadena larga, los cuales han demostrado tener potencial para disminuir la metanogénesis ruminal (Fievez et al., 2003). Asimismo, se ha observado que la depresión en la producción de CH_4 es proporcional al grado de insaturación de los ácidos grasos (Giger-Reverdin et

al., 2003). Se plantea también que los isómeros cis son mucho más activos que los isómeros trans.

Se ha demostrado una significativa disminución de la metanogénesis con aceites de coco, canola, rábano, girasol (Gil, 2006) y aceites de pescado basados en ácido n-3-eicosapentanoico (EPA) y ácido n-3-docosahexanoico (DHA) (Fievez et al., 2003). Cuando se evaluaron las propiedades antimetanogénicas potenciales de un ácido hexadecatrienoico altamente insaturado, aislado del alga *Chaetoceros*, este disminuyó la producción de metano hasta en un 97%, pero disminuyó en mediana proporción la fermentación, por lo cual, es necesario tener en cuenta el nivel de inclusión de los lípidos, con el fin de no alterar los parámetros de la fermentación ruminal (Ungerfeld et al., 2005).

Cuando se evaluó la emisión de CH_4 en vacas lecheras en pastoreo, las cuales fueron suplementadas con aceite de pescado y aceites vegetales, los lípidos disminuyeron en un 27% las emisiones de metano en la semana once de suplementación, en comparación con las primeras semanas de iniciada la investigación (Woodward et al., 2006). En otro experimento similar al anterior pero en condiciones *in vitro*, se encontró que dosis altas de DHA disminuyeron la producción de CH_4 hasta en un 80% (Fievez et al., 2007). En otro estudio la inclusión de 73 g de DHA/vaca/día, se asoció con una disminución del 46% de la ingestión de materia seca voluntaria (Boeckaert et al., 2008). Al respecto, los autores argumentaron que se deben seguir realizando estudios para determinar los niveles adecuados de aceites de origen marino que garanticen la disminución de CH_4 , sin afectar la productividad en vacas lecheras.

En un metaanálisis relacionando 33 tratamientos, cada uno con adición de 1% de grasa en la dieta, se encontró una reducción de 5,6% de CH_4 g/kg de materia seca (MSC) (Beauchemin et al., 2008). En otro metaanálisis se concluyó que los lípidos suministrados a vacas lecheras redujeron la producción diaria de CH_4 en 0,305 g/kg de MSI, por cada aumento que se haga del 1% de extracto etéreo en la ración (Eugene et al., 2008).

El uso de fuentes lipídicas en la suplementación de bovinos, con el objetivo de disminuir la metanogénesis ruminal, es una estrategia que aunque ya se ha venido desarrollando, necesita aún de muchas más investigaciones, sobre todo en sistemas ganaderos del trópico. Solo mediante trabajos de investigación, se podrá determinar cuáles niveles de inclusión y fuentes lipídicas son las más efectivas para lograr la

disminución de metano entérico, sin ir en contra de la productividad y salud animal. Es importante investigar niveles de suplementación lipídica, acompañados de la inclusión de especies arbóreas forrajeras y leguminosas, para evaluar el efecto sobre parámetros productivos y la emisión de metano entérico en bovinos en pastoreo. En el Cuadro 2, se recopilan diferentes fuentes bibliográficas que indican la producción de CH₄ entérico en bovinos lecheros, al incluir diferentes fuentes de lípidos en la dieta.

CONSIDERACIONES FINALES

En la actualidad, uno de los temas de mayor importancia a nivel mundial es el relacionado con el calentamiento global y su impacto sobre el medio ambiente, la salud humana, la economía y en general con el modo de vida humana. Uno de los factores que contribuyen a esta problemática es el efecto que ejercen los gases de efecto invernadero (GEI) sobre el planeta

Tierra, el cual cada vez es mayor y las soluciones claras al respecto, aún no se vislumbran. Mientras no se cree conciencia y estrategias viables para la mitigación de los GEI, la población mundial seguirá produciendo contaminantes en cantidades enormes, hasta el punto que sea imposible su mitigación y control.

Dentro de los GEI con potencial más contaminante se encuentra el metano. Este gas se produce por múltiples actividades humanas, sobre todo aquellas que tienen que ver con la industria y el sector agropecuario. La ganadería bovina es responsable de cierto porcentaje de la emisión de metano entérico al medio ambiente, por eso es de considerable importancia crear y validar estrategias, desde los sistemas de producción, que disminuyan la síntesis y emisión de este compuesto al medio ambiente.

El aspecto nutricional es clave a la hora de buscar posibilidades para tratar de disminuir la producción de metano entérico en bovinos. La utilización de especies arbustivas y arbóreas forrajeras podrían ser útiles para este fin. La *Tithonia diversifolia* se constituye como

Cuadro 2. Producción de CH₄, al incluir diferentes fuentes lipídicas en dietas para vacas lecheras de alta producción, según varios autores. Colombia. 2015.

Table 2. Production of CH₄, by including different lipid sources in diets for high producing dairy cows, according to several authors. Colombia. 2015.

	Control	Con aceite girasol	Con aceite linaza	Con aceite canola
A				
g/CH ₄ /día	293	264	241	265
g CH ₄ /kg MSC	16,3	14,6	13,4	13,7
	Control 0 g DHA	T1. 125 g/DHA/día	T2. 250 g/DHA/día	T3. 375 g/DHA/día
B				
g/CH ₄ /día	543	563	553	520
C				
	Control	Con aceite coco	Con aceite pescado	
CH ₄ (mmol)	1,33	1,23	1,23	
	DBA + AP	DAA +AP		
D				
g/CH ₄ /día	415	400		
g CH ₄ /kg MSC	17	18,3		

g: gramos; MSC: materia seca consumida; DHA: ácido docosahexaenoico; DBA: dieta baja en almidón; DAA: dieta alta en almidón; AP: aceite pescado; T1,T2,T3: tratamientos / g: grams; DMC: Dry matter consumed; DHA: docosahexaenoic acid; DLS: diet low in starch ; DHS: diet high in starch ; OF: fish oil; T1,T2,T3: treatments.

Fuente/source: adaptado de/adapted from: A. Beauchemin et al. (2009); B. Moate et al. (2013); C. Patra, 2013; D. Pirondini et al. (2015).

una especie forrajera con potencial para disminuir la síntesis de metano entérico, además de que podría incrementar los parámetros productivos en bovinos.

Es propicio realizar trabajos de investigación, que incluyan especies forrajeras de fácil establecimiento como la *Tithonia diversifolia*, más la inclusión de diferentes niveles y fuentes lipídicas (origen animal y vegetal), en bovinos bajo condiciones de pastoreo. La combinación de estas fuentes nutricionales podría ser la puerta de entrada para solucionar en parte la problemática ambiental y el déficit nutricional que enfrentan la mayoría de los sistemas ganaderos tropicales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al proyecto “Fortalecimiento de la producción de la cadena láctea del distrito Norte Antioqueño”, convenio N° 2012AS180031 firmado entre la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural del Departamento de Antioquia, la Universidad Nacional de Colombia (sede Medellín) y la Universidad de Antioquia, con recursos del Sistema General de Regalías- SGR, por el apoyo económico para ejecutar este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Angarita, E.A. 2013. Efecto de la inclusión de un forraje tanífero sobre las poblaciones metanogénicas del ecosistema ruminal en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Tesis MSc. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, COL.
- Apráez, J., J.M. Delgado, y J.P. Narváez. 2012. Composición nutricional, degradación *in vitro* y potencial de producción de gas, de herbáceas, arbóreas y arbustivas encontradas en el trópico alto de Nariño. *Livest. Res. Rural Dev.* 24(3). <http://www.lrrd.org/lrrd24/3/apra24044.htm>
- Barahona, R., C. Lascano, N. Narváez, E. Owen, P. Morris, and M. Theodorou. 2003. *In vitro* degradability of mature and immature leaves of tropical forage legumes differing in condensed tannin and non-starch polysaccharide content and composition. *J. Sci. Food Agric.* 83:1256-1266.
- Barbehenn, R.V., and C.P. Constabel. 2011. Review tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry* 72:1551-1565.
- Barry, T., and W. McNabb. 1999. The effect of condensed tannins in temperate forages on animal nutrition and productivity. *Tannin Livestock Human Nutr.* 92:30-35.
- Beauchemin, K., M. Kreuzer, F. O'Mara, and T. McAllister. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust. J. Exp. Agr.* 48:21-27.
- Beauchemin, K.A., S. McGinn, C. Benchaar, and L. Holtshausen. 2009. Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. *J. Dairy Sci.* 92:2118-2127.
- Beauchemin, K., S. McGinn, T. Martínez, and T. McAllister. 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 85:1990-1996.
- Bodas, R., N. Prieto, R. García-González, S. Andrés, F. Giráldez, and S. López. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176:78-93.
- Boeckert, C., B. Vlaemink, J. Dijkstra, A. Issa-Zacharia, T. Van Nespén, W. Van Straalen, and V. Fievez. 2008. Effect of dietary starch or micro algae supplementation on rumen fermentation and milk fatty acid composition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:4714-4727.
- Bonilla, J.A., y C.L. Lemus. 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 3:215-246.
- Buddle, B.M., M. Denis, E. Altermann, G. Attwood, P. Janssen, R. Ronimus, C. Pinares, S. Muetzel, and N. Wedlock. 2011. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *The Veterinary J.* 188:11-17.
- Calle, Z., y E. Murgueitio. 2008. El botón de oro: arbusto de gran utilidad para sistemas ganaderos de tierra caliente y de montaña. *Carta Fedegan* 108:54-60.
- Carmona, J. 2007. Efecto de la utilización de arbóreas y arbustivas forrajeras sobre la dinámica digestiva en bovinos. *Rev. Lasallista Invest.* 4:40-50.
- Carmona, J.C., D.M. Bolívar, y L.A. Giraldo. 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 18:49-63.
- Chase, L. 2007. Methane emissions from dairy cattle. In: E. Muhlbauer et al., editors, *Proceedings of mitigating air emissions from animal feeding operations conference*. College of Agriculture and Life Sciences, IA, USA. p. 106-109.
- Chilliard, Y., et A. Ollier. 1994. Alimentation lipidique et métabolisme du tissu adipeux chez les ruminants.

- Comparaison avec le porc et les rongeurs. INRA Prod. Anim. 7:293-308.
- Chow, T., V. Fievez, A. Moloney, K. Raes, D. Demeyer, and S. De Smet. 2004. Effect of fish oil on *in vitro* rumen lipolysis, apparent biohydrogenation of linoleic and linolenic acid and accumulation of biohydrogenation intermediates. Anim. Feed Sci. Technol. 117:1-12.
- Cieslak, A., R. Miltko, G. Bełżecki, M. Szumacher-Strabel, A. Potkański, E. Kwiatkowska, and T. Michałowski. 2006. Effect of vegetable oils on the methane concentration and population density of the rumen ciliate, *Eremoplastron dilobum*, grown *in vitro*. J. Anim. Feed Sci. 15:15-18.
- Collomb, M., A. Schmid, R. Sieber, D. Wechsler, and L. Ryhanen. 2006. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. Int. Dairy J. 16:1347-1361.
- CORPOICA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria). 2011. Evaluación de sistemas de alimentación en vacas Holstein y su efecto sobre la productividad animal, la emisión de metano y de óxido nitroso y la captura de carbono en la Sabana de Bogotá. Informe técnico. http://agronet.gov.co/www/recursos_2011/documentos_cambio/doc4.pdf. (consultado jun. 2015).
- Cuellar, A., Márquez, I. Hernández, y J. Alemán. 1999. Estudio fotoquímico de la especie *Hibiscus elatuss*. w. Rev. Cub. Farm. 33:127-31.
- Dardon, V., y M. Durán. 2011. Cuantificación espectrofotométrica de taninos y análisis bromatológico proximal de cuatro diferentes mezclas de forrajes a base de gramíneas y leguminosas. Trabajo de graduación Lic. Universidad El Salvador, San Salvador, ESA.
- Delgado, D., J. Galindo, R. González, N. González, I. Scull, L. Dihigo, J. Cairo, A. Aldama, and O. Moreira. 2012. Feeding of tropical trees and shrub foliage as a strategy to reduce ruminal methanogenesis: studies conducted in Cuba. Trop. Anim. Prod. 44:1097-1104.
- Delgado, D., C. González, J. Galindo, J. Cairo, and M. Almeida. 2007. Potential of *Trichantera gigantea* and *Morus albat* reduce *in vitro* rumen methane production. Cub. J. Agric. Sci. 41:319
- Demeyer, D., et V. Fievez. 2000. Ruminants et environnement: la méthanogénèse. Ann. Zootech. 49:95-112.
- Deppenmeier, U. 2002. The unique biochemistry of methanogenesis. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 71:223-283.
- Deppenmeier, U., and V. Müller. 2008. Life close to the thermodynamic limit: how methanogenic archaea conserve energy. Results Probl Cell Differ. 45:123-152.
- DeRamus, H.A., T. Clement, D. Giampola, and P. Dickison. 2003. Methane emissions of beef cattle on forages: efficiency of grazing management systems. J. Environ Qual. 32:269-277.
- Días, A., M. Avendaño, and A. Escobar. 1993. Evaluation of *Sapindus saponaria* as a defaunating agent and its effects on different ruminal digestion parameters. Livest. Res. Rural Dev. 5:1-6.
- Dohme, F., A. Machmüller, A. Wasserfallen, and M. Kreuzer. 2000. Comparative efficiency of various fats rich in medium-chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. Can. J. Anim. Sci. 80:473-482.
- Doreau, M., and A. Ferlay. 1994. Digestion and utilization of fatty acids by ruminants. Anim. Feed Sci. Technol. 45:379-396.
- Duque, G. 2008. Cambio climático y turismo en Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Santa Marta, COL. <https://core.ac.uk/download/pdf/11051968.pdf> (consultado 10 jul. 2015).
- Eugene, M., D. Masse, J. Chiquette, and C. Benchaar. 2008. Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. Can. J. Anim. Sci. 88:331-334.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2009. La larga sombra del ganado, problemas ambientales y opciones. <http://www.fao.org/docrep/011/a0701s/a0701s00.htm> (consultado 5 jul. 2015).
- Fievez, V., F. Dohmeb, M. Danneels, K. Raes, and D. Demeyer. 2003. Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. Anim. Feed Sci. Tech. 104:41.
- Fievez, V., B. Vlaeminck, T. Jenkins, T. Enjalbert, and M. Doreau. 2007. Assessing rumen biohydrogenation and its manipulation *in vivo*, *in vitro* and *in situ*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 109:740-756.
- Fukuda S., Y. Suzuki, M. Murai, N. Asanuma, and T. Hino, 2006. Isolation of a novel strain of *Butyrivibrio brisolvens* that isomerizes linoleic acid to conjugated linoleic acid without hydrogenation, and its utilization as a probiotic for animals. J. Appl. Microbiol. 100:787-794.
- Galindo, J., D. Delgado, R. Pedraza, and D. García. 2005. Impact of trees, shrubs and other legumes on the ruminal ecology of animals fed fibrous diets. Rev. Pastos y Forrajes 28:59-68.

- Galindo, J., N. González, A. Sosa, T. Ruíz, V. Torres, A. Aldana, H. Díaz, O. Moreira, L. Sarduy, y A. Noda. 2011. Efecto de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (botón de oro) en la población de protozoos y metanógenos ruminales en condiciones *in vitro*. *Rev. Cub. Cienc. Agríc.* 45:33-37.
- Gallego, L.A., L. Mahecha, y J. Angulo. 2014. Potencial forrajero de *Tithonia diversifolia* Hemsl. A Gray en la producción de vacas lecheras. *Agron. Mesoam.* 25:393-403.
- Giger-Reverdin, S., P. Morand-Fehr, and G. Tran. 2003. Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle. *Livest. Prod. Sci.* 82:73-79.
- Gil, S. 2006. Sistema de producción de carne bovina: Engorde intensivo (feedlot), elementos que intervienen y posibles impactos en el medio ambiente. http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/invernada_o_engorde_a_corral_o_feedlot/08-feedlot.pdf. (consultado 10 jul. 2015).
- Givens, D.I., K.E. Kliem, and R.A. Gibbs. 2006. The role of meat as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids in the human diet. *Meat Sci.* 74:209-218.
- González, N., J. Galindo, A. Aldana, O. Moreira, L. Sarduy, L. Abadía, and M. Santos. 2010. Evaluation of different varieties of mulberry (*Morus alba*) in the control of methanogenesis in buffalo rumen liquid. *Cub. J. Agric. Sci.* 44:37.
- Hess, H.D., L.M. Monsalve, J.E. Carulla, C.E. Lascano, T.E. Díaz, and M. Kreuzer. 2002. *In vitro* evaluation of the effect of *Sapindus saponaria* on methane release and microbial populations. http://www.ciat.cgiar.org/forrajes/pdf/output1_2002.pdf. (accessed 5 jun. 2015).
- IDEAM (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales). 2009. Inventario nacional de fuentes y sumideros de gases de efecto invernadero 2000–2004. Bogotá D.C. <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/021471/InventarioGEI/IDEAM1.pdf> (consultado 10 feb. 2016).
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2007. Climate change 2007: synthesis report. http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/syr/ar4_syr.pdf (accessed 10 jul. 2015).
- Jalc, D., M. Certik, K. Kundrikova, and P. Namestrova. 2007. Effect of unsaturated C18 fatty acids (oleic, linoleic, and α -linolenic acid) on ruminal fermentation and production of fatty acid isomers in an artificial rumen. *Vet. Med.* 52:87-94.
- Jalc, D., S. Kisidayova, and F. Nerud. 2002. Effect of plant oils and organic acids on rumen fermentation *in vitro*. *Folia Microbiol.* 47:171-177.
- Janssen, P.H. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 160:1-22.
- Johnson, K.A., and D.E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2483-92.
- Jouany, J. 1994. Methods of manipulating the microbial metabolism in the rumen. *Ann. Zootech.* 43:49.
- Kaitho, R., N. Umunna, I. Nsahlai, S. Tamminga, and J. Van Bruchem. 1997. Utilization of browse supplements with varying tannin levels by ethiopian menz sheep, intake, digestibility and live weight changes. *Agrofor. Syst.* 39:145-159.
- Kebreab, E., J. France, B. McBride, N. Odongo, A. Bannink, J. Mills, and J. Dijkstra. 2006. Evaluation of models to predict methane emissions from enteric fermentation in North American dairy cattle. In: E. Kebreab et al., editors, *Nutrient digestion and utilization in farms animals: modelling approaches*. CAB International, Wallingford, GBR. p. 229-313.
- Kinsman, R., F. Sauer, H. Jackson, and M. Wolynetz. 1995. Methane and carbon dioxide emissions from dairy cows in full lactation monitored over a six month period. *J. Dairy. Sci.* 78:2760-2766.
- Lezcano, Y., M. Soca, L. Sánchez, F. Ojeda, Y. Olivera, D. Fontes, I. Montejo, y H. Santana. 2012. Caracterización cualitativa del contenido de metabolitos secundarios en la fracción comestible de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) *Rev. Pastos y Forrajes* 35:283-291.
- Machmüller, A., C. Soliva, and M. Kreuzer. 2002. *In vitro* ruminal methane suppression by lauric acid as influenced by dietary calcium. *Can J Anim Sci.* 82(2): 233-239.
- Machmüller, A., D. Ossowski, M. Wanner, and M. Kreuzer. 1998. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation *in vitro* (Rusitec). *Anim. Feed Sci. Technol.* 71:117-130.
- Maina, I., S. Abdulrazak, C. Muleke, and T. Fujihara. 2012. Potential nutritive value of various parts of wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) as source of feed for ruminants in Kenya. *J. Food Agric.* 10:632-635.
- Marín, A. 2013. Estimación del inventario de emisiones de metano entérico de ganado lechero en el departamento de Antioquia, Colombia. Tesis MSc. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, COL.

- Martin C., J. Rouel, J. Jouany, M. Doreau, and Y. Chilliard. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *J. Anim. Sci.* 86:2642-2650.
- Martin, C., D. Morgavi, and M. Doreau. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4(3):351-365.
- Maurício, R., R. Ribeiro, S. Silveira, P. Silva, L. Calsavara, L. Pereira, y D. Paciullo. 2014. *Tithonia diversifolia* for ruminant nutrition. *Trop. Grasslands* 2:82-84.
- Medina, M., E. García, L. González, L. Cova, y P. Morantinos. 2009. Variables morfo-estructurales y de calidad de la biomasa de *Tithonia diversifolia* en la etapa inicial de crecimiento. *Zootec. Trop.* 27:121-134.
- Moate, P. 2010. Reducing methane emissions from dairy cows. Gippsland – How Now Gippy Now - September 2010. <http://www.dpi.vic.gov.au/agriculture/about-agriculture/newsletters-andupdates/newsletters/how-now-gippy-cow/september/reducing-methaneemissions-from-dairy-cows>. (accessed jun. 2015).
- Moate, P., S. Williams, M. Hannah, R. Eckard, M. Auldish, B. Ribaux, J. Jacobs, and W. Wales. 2013. Effects of feeding algal meal high in docosahexaenoic acid on feed intake, milk production, and methane emissions in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:5073-5087.
- Molina, I., G. Donney's, S. Montoya, G. Villegas, J. Rivera, J. Lopera, J. Chará, y R. Barahona. 2015. Emisiones *in vivo* de metano en sistemas de producción con y sin inclusión de *Tithonia diversifolia*. En: P. Peri, editor, 3º Congreso Nacional de Sistemas Silvopastoriles-VIII Congreso Internacional de Sistemas Agroforestales. Ediciones INTA, ARG. p. 678-682.
- Molina, I., J. Cantet, S. Montoya, G. Correa, y R. Barahona. 2013. Producción de metano *in vitro* de dos gramíneas tropicales solas y mezcladas con *Leucaena leucocephala* o *Gliricidia sepium*. *Rev. CES Med.Vet. y Zootec.* 8:15-31.
- Morand-Fehr, P., et G. Tran. 2001. La fraction lipidique des aliments et les corps gras utilisés en alimentation animale. *INRA Prod. Anim.* 14:285-302.
- Moss, A., and D. Givens. 2002. The effect of supplementing grass silage with soya bean meal on digestibility, in sacco degradability, rumen fermentation and methane production in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 97:127-143.
- Moss, A., J. Jouany, and J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49:231-253.
- Muñoz, C., T. Yan, D. Wills. S. Murray, and A. Gordon. 2012. Comparison of the sulfur hexafluoride tracer and respiration chamber techniques for estimating methane emissions and correction for rectum methane output from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:3139-3148.
- Murray, R., A. Bryant, and R. Leng. 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *Brit. J. Nutr.* 36:1-14.
- Navas, A. 2008. Efecto de los sistemas silvopastoriles en la reducción del estrés calórico y su importancia en la producción bovina tropical. *Rev. El Cebú.* 359:14-17.
- Navas, A., M. Laredo, A. Cuesta, H. Anzola, and J. León. 1992. Evaluation of *Enterolobium cyclocarpum* as dietary alternative to eliminate protozoa from the rumen. *Livest. Res. Rural Dev.* 4: art. 7. <http://www.lrrd.org/lrrd4/1/orejero.htm>
- Odongo, N., M. Or-Rashid, E. Kebreab, J. France, and B. McBride. 2007. Effect of supplementing myristic acid in dairy cows rations on ruminal methanogenesis and fatty acid profile in milk. *J. Dairy Sci.* 90:1851-1858
- OMM (Organización Meteorológica Mundial). 2015. Boletín sobre los gases de efecto invernadero. <https://www.wmo.int/media/es/content/las-concentraciones-de-gases-de-efecto-invernadero-vuelven-batir-un-r%C3%A9cord>. (consultado 4 feb. 2016).
- Ortiz, D., R. Noguera, y S. Posada. 2014. Efecto de metabolitos secundarios de las plantas sobre la emisión entérica de metano en rumiantes. *Livest. Res. Rural Dev.* 26: art. 11 <http://www.lrrd.org/lrrd26/11/orti26211.html>
- Palmquist, D., A. Lock, K. Shingfield, and D. Bauman. 2005. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. *Adv. Food Nutr. Res.* 50:179-217.
- Patra, A. 2013. The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: A meta-analysis. *Livest. Sci.* 155:244-254.
- Patra, A., and J. Saxena. 2009. A review of the effect and mode of action of saponins on microbial population and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutr. Res. Rev.* 22:204-219.
- Patra, A., and J. Saxena. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71: 1198-1222.
- Pavarini, D., S. Pavarini, M. Niehues, and N. Lopes. 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176:5-16.
- Pirondini, M., S. Colombini, M. Mele, L. Malagutti, L. Rapetti, G. Galassi, and G. Crovetto. 2015. Effect of dietary starch concentration and fish oil

- supplementation on milk yield and composition, diet digestibility, and methane emissions in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:357-372.
- Posada, S., G. Montoya, y A. Ceballos. 2005. Caracterización de los taninos en la nutrición de rumiantes. *Biogénesis: Bioquímica, nutrición y alimentación de la vaca* 161-180.
- Ramírez, J.F., S. Posada, y R. Noguera. 2014. Metanogénesis ruminal y estrategias para su mitigación. *Rev. CES Med. Vet. Zootec.* 9:307-323.
- Roig, N.A. 2013. Alimentación y calentamiento global: «La larga sombra del ganado» en la prensa española. *Estudios sobre el Mensaje Periodístico* 19:17-33.
- Rosales, M., M. Laredo, A. Cuesta, A. Anzola, and L. Hernandez. 1989. Use of tree forages for the control of rumen protozoa. *Livest. Res. Rural Dev.* 1:79.
- Santacoloma, L., y J. Granados. 2012. Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* y algunas propiedades físicoquímicas del suelo. *RIAA* 3(1): 53-62.
- Schink, B. 2006. Syntrophic associations in methanogenic degradation. In: J. Overmann, editor, *Molecular basis of symbiosis*. Springer, HOL. p. 1-19.
- Skillman, L.C., P.N. Evans, G.E. Naylor, B. Morvan, and G.N. Jarvis. 2004. 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* 10:277-285.
- Soliva, CR., and H. Hess. 2007. Measuring methane emission of ruminants by *in vitro* and *in vivo* techniques. In: H. Makkar, and P. Vercoe, editors, *Measuring methane production from ruminants*. Springer, HOL. p. 15-31.
- Soliva, CR., I. Hindrichsen, L. Meile, M. Kreuzer, and A. Machmüller. 2003. Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen methanogens and methanogenesis *in vitro*. *Lett. Appl. Microbiol.* 37(1):35-39.
- Sosa, A., J. Galindo, y R. Bocourt. 2007. Metanogénesis ruminal: aspectos generales y manipulación para su control. *Rev. Cubana Cienc. Agríc.* 41:105-114.
- Sparg, S., G. Light, and M. Staden. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* 94:219-243.
- Takahashi, J. 2005. Emission of GhG from livestock production in Japan. *Inter. Congress Series* 1293:13-20.
- Tan, Y., C. Sico, N. Abdullah, J. Liang, X. Huang, and Y. Ho. 2011. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 169:185-193.
- Ungerfeld, E., S. Rust, R. Burnett, M. Yokoyama, and J. Wang. 2005. Effects of two lipids on *in vitro* ruminal methane production. *Anim. Feed Sci.* 119:179.
- Van Soest, P.J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2ª ed. Cornell University Press, USA.
- Vargas, J.E. 1994. Caracterización de recursos forrajeros disponibles en tres agroecosistemas del Valle del Cauca. Tesis MSc., Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, COL.
- Vargas, J., E. Cárdenas, M. Pabón, y J. Carulla. 2012. Emisión de metano entérico en rumiantes en pastoreo. *Arch. Zootec.* 61:51-66.
- Verdecia, D., J. Ramírez, I. Leonard, Y. Álvarez, Y. Bazán, R. Bodas, S. Andrés, J. Álvarez, F. Giráldez, y S. López. 2011. Calidad de la *Tithonia diversifolia* en una zona del Valle del Cauca. *REDVET* 12(5). <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050511/051113.pdf> (consultado 10 jul. 2015).
- Waghorn, G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-progress and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147:116-139.
- Wallace, R.J. 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc. Nutr. Soc.* 63:621-629.
- Wheeler, D., S. Ledgard, and C. DeKlein. 2008. Using the OVERSEER nutrient budget model to estimate on-farm greenhouse gas emissions. *Austr. J. Exp. Agric.* 48:99-103.
- Woodward, S., G. Waghorn, and N. Thomson. 2006. Supplementing dairy cows with oils to improve performance and reduce methane? does it work. *NZSAP* 66:176-181.