

CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN NUTRICIONAL DE LEGUMINOSAS ARBUSTIVAS TROPICALES PARA SU USO COMO SUPLEMENTO NITROGENADO EN RUMIANTES

Autores principales: Rafael Rodríguez Hernández¹ y Manuel Fondevila Camps

Otros autores: Mariano Mota, Pilar de Frutos, Sarai Gómez, Joaquín Balcells, Juana Luz Galindo Blanco, Niurca González Ibarra, Gustavo Febles, Arabel Elías, Yasmila Hernández y Abel Oramas Torres

Colaboradores: Yaneisy García Hernández, Daiky Valenciaga, Orestes La O León, Yordanka Martínez Almaguer, Verena Torres, Jatnel Alonso, Tomás Ruiz, Moisés Valera, Geovanis Achang, Lucía Sarduy, Marbelis Domínguez y Carmen Cecilia García.

Instituto de Ciencia Animal (ICA), Carretera Central km 47 ½, C.P 32700. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba Mayabeque, Cuba

Otras entidades participantes: Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria Universidad de Zaragoza (UNIZAR), España, Instituto de Ganadería de Montaña. CSIC, León, España, Universidad de Lleida, Cataluña, España

¹ Autor de correspondencia. Correo electrónico: rrodriguez@ica.co.cu

Rafael Rodríguez Hernández, DrC. (20%). Desarrolló la idea principal de la investigación. Fungió como jefe del proyecto PTCT "Seguridad Alimentaria" "Incremento en la disponibilidad de proteínas para rumiantes mediante la manipulación de dietas a base de *Pennisetum purpureum* (vc. CUBA CT-115) y leguminosas arbustivas tropicales" (CITMA Mayabeque). Fue responsable de las etapas principales de las investigaciones realizadas en dicho proyecto, en el marco de la realización de sus estudios doctorales y del proyecto de investigación de una estudiante del Programa Delfín de México. Participó directamente en la ejecución de todos los experimentos realizados. Además, redactó sus materiales de tesis de Maestría y de Doctor en Ciencias Veterinarias. Asimismo, el investigador contribuyó a la divulgación y posterior aplicación de los resultados a nivel nacional e internacional, a través de su presentación en eventos, Fórum de Ciencia y Técnica y en publicaciones de impactos, publicaciones nacionales y memorias de eventos.

Manuel Fondevila Camps, DrC. (18%). Participó activamente en la concepción de la idea principal de la investigación, financió una parte importante de los estudios, asesoró el trabajo experimental y favoreció con sus ideas el desarrollo de las investigaciones. Además, favoreció con sus conocimientos y aportes la extensa divulgación de los resultados obtenidos en revistas de impacto y eventos internacionales.

Mariano Mota, DrC. (8%). Participó en el desarrollo de una parte del trabajo experimental *in vitro*, durante el año 2002, en el Departamento PACA de la UNIZAR, así como en la divulgación de los resultados obtenidos.

Pilar de Frutos, DrC. (8%). Asesoró todos los estudios relacionados con el efecto de los taninos en la fermentación. Contribuyó con sus conocimientos al desarrollo de los índices de la reactividad de los taninos planteados en este trabajo, financió los análisis cuantitativos de taninos y favoreció con sus conocimientos la divulgación de los resultados en revistas de impacto.

Sarai Gómez (7%). Asesoró en los diseños experimentales y ejecutó parte de los análisis estadístico.

Joaquín Balcells, DrC. (7%). Asesoró el trabajo de estimación de la biomasa microbiana en los estudios realizados, así como en la revisión del material de tesis de doctorado.

Juana Luz Galindo Blanco, DrC. (6%). Asesoró sobre las técnicas microbiológicas y transmitió sus conocimientos en esta temática de investigación.

Niurca González Ibarra, DrC. (6%) Asesoró sobre la aplicación de las técnicas moleculares y transmitió sus conocimientos en esta temática de investigación.

Gustavo Febles, DrC. (5%). Permitió el acceso al material vegetal evaluado y asesoró el desarrollo de una parte del trabajo experimental. Además, favoreció con sus conocimientos el desarrollo de las investigaciones y la revisión de los materiales de tesis.

Arabel Elías, DrC. (5%). Asesoró la mayoría de las investigaciones realizadas, participando en la revisión de los documentos de tesis, fungiendo como co-tutor de tesis.

Yasmila Hernández (5%). Ejecutó parte del trabajo experimental de los estudios realizados en Cuba.

Abel Oramas Torres (5%). Ejecutó parte del trabajo experimental de los estudios realizados en Cuba.

RESUMEN

El empleo de leguminosas arbustivas tropicales como suplementos proteicos es una opción económica y ecológica para incrementar el valor nutritivo de dietas fibrosas para rumiantes, al permitir sustituir por fuentes naturales la importación de alimentos proteicos concentrados, los que tienen precios prohibitivos para nuestro país. En tal sentido, se desarrolló una secuencia experimental que tuvo como objetivo general determinar el valor nutricional de leguminosas arbustivas

tropicales para la alimentación de rumiantes mediante la combinación de técnicas con marcadores microbianos, moleculares y fermentativas. Las plantas evaluadas fueron *Albizia lebbekoides*, *Acacia cornigera* y *Enterolobium cyclocarpum*, su comparación con *Leucaena leucocephala*, leguminosa ampliamente estudiada en nuestro país. Para el estudio se ejecutaron once experimentos. Estos estudios permitieron evaluar el potencial nutritivo de las leguminosas a partir de su composición química, cinética de fermentación, y efecto de sus compuestos secundarios, efecto biológico y la reactividad de los taninos de las leguminosas y su contenido en saponinas en la fermentación de *Pennisetum purpureum* (vc. CUBA CT-115) o *Cynodon nlemfuensis*. Para conocer el valor como fuente proteica de las plantas se determinó el metabolismo del nitrógeno en el rumen (N) mediante síntesis de proteína microbiana (SPM) y eficiencia de síntesis de proteína microbiana (ESPM) así también las bases púricas (BP, adenina y guanina), y ¹⁵N. La cuantificación de las poblaciones de bacterias involucradas en la fermentación mediante PCR-RT mostraron que no hubo modificación cuando se utilizan las plantas e comparación con leucaena, lo que las hace atractivas para su empleo en la alimentación animal. Los resultados constituyen un importante aporte al conocimiento sobre estas leguminosas y los efectos de su empleo en la fermentación del pasto base. Además, constituye un material de alto valor práctico y económico para la ganadería cubana y de la región tropical. Igualmente, la información que se generó se divulgó en 13 artículos científicos, 1 tesis de Maestría, 1 tesis de Doctorado, 1 publicación divulgativa, 3 metodologías, 5 memorias de eventos internacionales, 18 participaciones en eventos internacionales, 4 nacionales y 10 en Fórum de Ciencia y Técnica, 9 de ellas premiadas.

Palabras clave: albizia, acacia, enterolobium, leucaena, factores antinutricionales, valor nutritivo

COMUNICACIÓN CORTA

Las leguminosas arbustivas tropicales tienen mayor contenido de proteínas y fibras más digestibles que los pastos de gramíneas (Coates, 1995). Sin embargo, muchas de estas especies contienen compuestos antinutricionales para los animales que las consumen (Makkar, 2005). Por su parte, el *P. purpureum* (vc. CUBA CT-115) es la gramínea cultivada que más se extiende en la ganadería cubana, por la posibilidad de pastorearla directamente y cubrir el déficit de biomasa en el período seco. No obstante, esta gramínea al igual que el resto de las gramíneas tropicales tiene moderados contenidos de nitrógeno y requiere ser suplementada.

El empleo de las leguminosas arbustivas tropicales como fuente de proteínas se instituye en una opción económica, ante los altos costos de la importación de alimentos proteicos concentrados, que puede tener un impacto ambiental positivo en el agroecosistema y en el bienestar animal. Sin embargo, su empleo en la

alimentación animal está condicionado a que su uso no afecte la utilización de la gramínea que constituye el alimento base, lo que generaría un descenso del consumo voluntario e implicaciones en la productividad de los animales. Aunque la leguminosa arbustiva que más se emplea es *L. leucocephala*, existen cientos de especies de leguminosas arbustivas tropicales con potencialidades para ser usadas como suplementos proteicos.

La presente propuesta expone los resultados del proyecto de investigación: Incremento en la disponibilidad de proteínas para rumiantes mediante la manipulación de dietas a base de *Pennisetum purpureum* (VC. Cuba CT-115) y leguminosas arbustivas tropicales, Código: 0460 del Instituto de Ciencia Animal recién finalizado y aprobados satisfactoriamente por el grupo de expertos del Programa de Seguridad Alimentaria del CITMA Mayabeque y tres becas de formación profesional MAEC-AECID en los años 2002, 2008, 2009-2010).

El presente trabajo tuvo como objetivo general, determinar el valor nutricional de leguminosas arbustivas tropicales para la alimentación de rumiantes mediante la combinación de técnicas con marcadores microbianos, moleculares y fermentativas. Las plantas evaluadas fueron: *Albizia lebbekoides*, *Acacia cornigera* y *Enterolobium cyclocarpum*, su comparación con *Leucaena leucocephala*, estudiada en nuestro país en cuanto a su valor nutritivo, contenido de compuestos antinutricionales y sus efectos en indicadores de la fermentación del pasto base. Los resultados que se obtuvieron constituyen un aporte al conocimiento de las cuatro leguminosas arbustivas tropicales en cuanto a su valor nutritivo, presencia y acción de sus factores antinutricionales, y su efecto como suplementos en la fermentación del pasto base, como alternativa para la alimentación animal en Cuba. Para ello, las investigaciones se dividieron en dos estudios: (I) Valor nutritivo y efecto de los taninos de tres leguminosas arbustivas tropicales (*A. lebbekoides*, *A. cornigera*, *E. cyclocarpum* y su comparación con *L. leucocephala*) y (II) Efectos de la suplementación con leguminosas arbustivas tropicales a pasto *Pennisetum purpureum* vc CUBA-CT-115 o *Cynodon nlemfuensis* en la fermentación ruminal.

Principales Resultados

Valor nutritivo y efecto de los taninos de cuatro leguminosas arbustivas tropicales (*A. lebbekoides*, *A. cornigera*, *E. cyclocarpum* y *L. leucocephala*.)

Se realizaron los estudios correspondientes, en seis experimentos, para determinar la composición química, factores antinutricionales, cinética de fermentación, degradabilidad ruminal y digestión intestinal de la fracción nitrogenada, participación de los taninos y su reactividad en el proceso fermentativo así como el uso del polietilenglicol (PEG) y la zeolita de tres leguminosas arbustivas en comparación con *Leucaena leucocephala*, leguminosa ampliamente estudiada en nuestro país

Los resultados alcanzados constituyen los primeros estudios integrales relacionados con *A. lebbekoides*, *A. cornigera*, *E. cyclocarpum*, comparados con *L. leucocephala*, como plantas promisorias para la alimentación animal. La composición química indicó que el contenido de N de las leguminosas fue elevado y muy variable (28,6- 46,7 g kg⁻¹ MS), siendo mayor en leucaena, intermedio en acacia y enterolobium y más bajo en albizia. En cuanto al nitrógeno insoluble en detergente ácido, fibra detergente neutra, fibra detergente ácida y lignina los estudios mostraron que, comparado con leucaena, la de mayor contenido fue enterolobium y la de menor fue acacia. Acacia presentó las proporciones más bajas de pared celular y enterolobium fue la menos lignificada (Rodríguez, 2004). Los taninos condensados libres constituyeron la fracción más importante del contenido total de taninos, y acacia y albizia mostraron los mayores valores. El contenido de taninos condensados ligados a la proteína de acacia fue 2 y 6 veces superior al de albizia y leucaena, respectivamente. Sin embargo, los niveles de taninos condensados ligados a la fibra de acacia y leucaena fueron similares, y su concentración fue aproximadamente 2,5 veces mayor a la de albizia. Enterolobium mostró contenidos muy bajos de estos compuestos. El contenido de fenoles totales fue similar en albizia y leucaena, aproximadamente tres veces el de acacia; mientras que albizia mostró mayor concentración de taninos totales respecto a leucaena y quintuplicó la de acacia. No se detectó presencia de saponinas en leucaena, albizia y acacia, mientras enterolobium mostró moderado contenido, equivalente a 43,6 mg g⁻¹ MO.

Se demostró que la fermentación ruminal entre leguminosas es variable al determinar su perfil de producción de gas y los parámetros de la cinética *in vitro* (Rodríguez *et al.*, 2006) y no hubo diferencias entre enterolobium y leucaena. Los parámetros cinéticos de la fermentación indicaron que acacia tiene un mayor potencial de producción de gas, aproximadamente 12, 80 y 90 % mayor que el de leucaena, enterolobium y albizia, respectivamente. Enterolobium mostró la mayor tasa fraccional, proporcionalmente mayor en 2, 4 y 8 veces a la de acacia, leucaena y albizia, respectivamente. Para alcanzar el 50 % del potencial de producción acumulada de gas, enterolobium sólo requirió 5 h, mientras que acacia necesitó el doble, leucaena aproximadamente 19 h y albizia más de 32 h.

Para estimar el potencial de las tres leguminosas evaluadas como fuente de proteínas, se determinó la degradabilidad del N (DNIV_G) mediante el empleo de la técnica de producción de gas *in vitro*, y se comparó con dos métodos convencionales: gravimétrico (DNIV_P) y enzimático (DNIV_E). Además, se determinó la digestibilidad *in vitro* y se estimó el aporte en N de cada leguminosa al rumen y al resto del tracto gastrointestinal (TGI) (Mota *et al.*, 2005). La degradabilidad del N de enterolobium fue mayor (P < 0,01) en relación a las otras leguminosas, lo cual ofrece la posibilidad de uso como fuente de nitrógeno soluble en rumen. La digestión del N no degradado en rumen fue mayor en acacia, comparado con leucaena, mientras que albizia registró los valores más bajos (P < 0,05). Respecto a la contribución de cada leguminosa al rumen y al resto del TGI

en términos de N por unidad de MS, se aprecia que los aportes fueron similares para acacia y enterolobium, mientras que albizia se mostró como una deficiente fuente de N porque el 68,8 % de su N es indigestible. Las contribuciones de acacia en N degradable y en N indegradable pero digestible fueron proporcionales al rumen y a las partes bajas del tracto gastro intestinal (TGI), pero enterolobium aportó casi todo su N disponible al rumen y apenas contribuyó con proteína indegradable pero digestible en el resto del TGI.

Para evaluar el efecto de los taninos de las leguminosas se incubó cada leguminosa, sola o con 1,6 g de PEG-6000 con el objetivo de inactivar sus taninos (Rodríguez *et al.*, 2006). La respuesta del perfil de fermentación a la inclusión de PEG varió según la especie de leguminosa, ($P < 0,01$). Y se encontró que a inclusión de PEG no afectó al perfil de producción de gas de enterolobium, pero en leucaena incrementó la producción de gas desde las 24 h, en acacia desde las primeras 6 h de fermentación y en albizia durante toda la incubación. El mayor efecto biológico (EB_{gas}) a las 48 h correspondió a albizia (2,50), mientras que acacia y leucaena tuvieron valores más moderados (1,23 y 1,07, respectivamente) y enterolobium no mostró efecto biológico de taninos (1,00). Las plantas evaluadas no afectaron la adhesión bacteriana al sustrato ($P > 0,05$), aspecto muy importante que garantiza el ataque de los microorganismos celulolíticos y, consecuentemente, garantiza la celulolisis ruminal.

Para determinar el efecto biológico y la reactividad de los taninos de las leguminosas estudiadas, se realizaron dos ensayos donde se excluyó a enterolobium debido su bajo contenido de taninos condensados totales y ausencia de EB_{gas} (Informe Final de proyecto CITMA, 2012, código 0460, Rodríguez *et al.*, 2013). Para ello se diseñó una metodología para estimar índices de reactividad de los taninos de leguminosas arbustivas tropicales a partir del uso combinado de la técnica de producción de gas, el PEG y la modelación matemática, lo cual constituye un aporte científico por ser de utilidad en la evaluación de la reactividad de taninos de diferentes fuentes vegetales. Es sencilla, económica y evita las limitaciones de los métodos disponibles en la actualidad (por ejemplo: extracción de taninos, uso de estándares externos, purificación de estándares internos, equipamiento, y otros). La metodología permitió comparar la reactividad de los taninos de las leguminosas que son objeto de estudio. Se estimaron dos índices de reactividad: IR (mg de PEG que se requieren para inactivar taninos hasta liberar una fracción de su potencial de producción de gas) y IR_{abs} (mg PEG que se requieren para inactivar taninos del sustrato hasta liberar un mL de gas). Ambos índices se estimaron para cada tiempos de incubación en que se midió la producción de gas (Informe Final de proyecto CITMA, 2012, código 0460).

A partir de los índices de reactividad estimados, se apreció que el comportamiento del IR y el IR_{abs} de las tres leguminosas variaron y disminuyeron en el tiempo de manera particular y probablemente en función de su proporción de taninos

hidrolizables y condensados. El IR de acacia decreció rápidamente desde las 2 (212,8 mg PEG) a las 6 h (113,6), y volvió a disminuir a las 24 h (76,9). Albizia mostró una ligera caída en su IR de las 2 a las 4 h (77,5 a 52,4) y luego mostró un comportamiento constante, también con una leve caída a las 24 h (48,1). Por su parte, leucaena mantuvo un valor de IR estable y bajo (16,4- 36,6) durante las 24 h de incubación. Entre leguminosas, el comportamiento del IR fue mayor en acacia comparado a albizia y el menor el control de leucaena, aunque las diferencias entre ellas se redujeron con el tiempo de incubación. En cuanto al IR_{abs}, acacia mostró los valores más elevados entre las 2 y 6 h y mayor variación del índice en el tiempo (18,42 y 0,86 mg PEG mL⁻¹ a las 2 y 24 h, respectivamente). Albizia tuvo un índice intermedio entre las 2 y 6 h (9,17- 2,23) y una tendencia a disminuir a partir de las 8 h, con valores similares a acacia a lo largo del resto de la incubación. En cuanto a leucaena, mostró los menores valores de IR_{abs} (1,99- 0,47).

Además, se determinó el efecto de los taninos en indicadores de la fermentación de las tres leguminosas (Rodríguez *et al.*, 2013). Las concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGV) totales fue mayor en acacia y menor en albizia (P< 0,001). La inactivación de los taninos incrementó los AGV totales (P< 0,05) y redujo la proporción de acético e incrementó la de butírico (P< 0,001). La especie de leguminosa afectó las proporciones de acético (albizia mayor que el resto), propiónico (albizia menor que el resto) y butírico (leucaena menor que el resto) (P< 0,05). La relación acético/ propiónico se comportó mayor para albizia (P< 0,001) y la inclusión de PEG disminuyó dicha relación (P< 0,05). Por otra parte, acacia tuvo las mayores concentraciones de NH₃ y albizia las menores (P< 0,001), mientras que la inactivación de los taninos con PEG aumentó la degradabilidad del N e incrementó los niveles de NH₃ en un 20 % (P< 0,001). La interacción entre los factores principales respecto a la síntesis microbiana indicó que albizia y leucaena incrementaron la síntesis de proteína microbiana cuando se inactivaron los taninos, mientras que acacia tuvo el comportamiento inverso (P< 0,001). Sin embargo, en ningún caso se afectó la eficiencia de síntesis microbiana (P> 0,10).

Finalmente, al evaluar el uso del PEG y la zeolita *in vitro* para mejorar el valor nutritivo de *A. lebbekoides* (Rodríguez *et al.*, 2008), se apreció que la producción acumulada de gas de los tratamientos con albizia sola y con zeolita no difirieron (P>0,05). Albizia incrementó la producción de gas al inactivar sus taninos en 385 % a las 4 h, más moderado a las 6 h (202 %) y se redujo a medida que transcurrió la fermentación hasta las 48 h (150 %). El potencial de producción de gas se incremento y la fase *Lag* disminuyó al inactivar los taninos. Por su parte, la inclusión de zeolita tendió a incrementar la velocidad de producción de gas aunque no tuvo efecto apreciable en el perfil de producción de gas de la leguminosa.

Efectos de la suplementación con leguminosas arbustivas tropicales a pasto *Pennisetum purpureum* vc CUBA-CT-115 o *Cynodon nlemfuensis* en la fermentación ruminal.

Los estudios que se realizaron contribuyen al conocimiento de los cambios que se producen en la fisiología digestiva ruminal cuando se suplementa con cuatro leguminosas arbustivas tropicales a pasto *P. purpureum* vc. CUBA CT- 115. Al respecto se realizaron cinco experimentos para estudiar detalladamente el efecto de la suplementación de *P. purpureum* (vc. CUBA CT-115) con las leguminosas objeto de estudio, en la cinética de fermentación *in vitro*, el efecto de los taninos en los indicadores de la fermentación y la adhesión de bacterias al sustrato, medido por PCR en tiempo real, así como el efecto de la materia orgánica fermentable y los extractos de saponinas de *E. cyclocarpum* en la fermentación del pasto base y la acción de los taninos de *A. lebbekoides* en la fermentación del pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*).

Cuando se determinó el efecto de la suplementación con 15 y 30% de las leguminosas arbustivas en el perfil de fermentación de *P. purpureum* (vc. CUBA CT-115) (Rodríguez *et al.*, 2009), el perfil de producción de gas del CUBA CT-115 con leucaena no mostró diferencias respecto a la gramínea sola. La suplementación con albizia disminuyó la producción de gas a partir de las 24 h ($P < 0,05$) y la inclusión de acacia la mejoró desde las 5 hasta las 12 h ($P < 0,05$). El CUBA CT-115 con enterolobium mostró mayor producción de gas que el pasto solo hasta las 9 h y ocurrió lo contrario desde las 24 (30 %) y 48 h (15 %). En cuanto a la linealidad de la respuesta en producción de gas al nivel de inclusión, se apreció que al inicio de la fermentación (5 h), la producción de gas se incrementó linealmente cuando se incluyó acacia, enterolobium y leucaena ($P < 0,05$). Sin embargo, no hubo respuestas lineales a la suplementación con leucaena al medio (24 h) o largo plazo (96 h), mientras que enterolobium y albizia redujeron linealmente la producción de gas tanto a las 24 como a las 96 h ($P < 0,01$). La degradabilidad de la MO se incrementó linealmente cuando se suplementó con acacia y con leucaena, y disminuyó con albizia ($P < 0,01$). El factor de partición, como indicador de eficiencia microbiana, se incrementó linealmente con el nivel de inclusión de enterolobium ($P < 0,05$). Los parámetros cinéticos indicaron que la suplementación con leucaena y acacia promovieron un mayor potencial de producción de gas ($P < 0,05$). El *Lag time* de la fermentación fue menor al suplementar con enterolobium ($P < 0,001$). Además, se apreció que la fermentación del pasto sólo se afectó al suplementar con 30% de enterolobium desde las 24 h ($P < 0,05$).

Para determinar el efecto de los taninos de las leguminosas en indicadores de la fermentación del CUBA CT-115, se realizaron dos ensayos (Rodríguez *et al.*, 2010). El primer ensayo mostró que la inactivación de los taninos no afectó el perfil de producción de gas cuando se añadió al CUBA CT-115 incubado solo o suplementado con enterolobium y acacia, pero sí incrementó la producción de gas en los tratamientos con albizia y leucaena. En el otro ensayo, al inactivar los taninos con PEG se incrementó la producción de gas cuando se suplementó el pasto con albizia (desde las 3 a las 48 h) y acacia (desde 6 a las 12 h), mientras

que no se apreció efecto para la gramínea sola o suplementada con leucaena o enterolobium (interacción, $P < 0,01$). No hubo efecto del PEG en la desaparición de la MS ($P > 0,10$) y sólo se observó efecto de la inactivación de los taninos en la producción de metano cuando se suplementó la gramínea con albizia ($P < 0,001$).

El efecto de los taninos extraídos de las leguminosas en la fermentación del pasto base (Rodríguez *et al.*, 2011a, b) mostró que los taninos extraídos de leucaena y albizia disminuyeron la producción de gas entre las 4 y 6 h, mientras que las tres tipos de taninos afectaron la producción de gas entre las 8 y 24 h de incubación ($P < 0,001$), aunque el efecto de los taninos de albizia fue mayor. A las 48 h, los taninos de acacia y albizia redujeron en igual magnitud la producción de gas ($P < 0,01$). Sin embargo, el ritmo de producción de gas ($\text{mL g}^{-1} \text{MOinc h}^{-1}$) mostró que realmente los taninos sólo afectaron la fermentación de la gramínea entre las 4 y 16 h. Además, se apreció que a las 24 h los taninos de acacia y albizia disminuyeron la proporción molar de acético e incrementaron la de propiónico, mientras los taninos de albizia disminuyeron la de butírico ($P < 0,05$). La digestibilidad aparente in vitro de la materia orgánica (DAIVMO) del pasto disminuyó con los extractos de albizia ($P < 0,001$).

Para estudiar el efecto de las leguminosas arbustivas en los indicadores del metabolismo del nitrógeno en el rumen (N): síntesis de proteína microbiana (SPM) y eficiencia de síntesis de proteína microbiana (ESPM) se emplearon diferentes métodos. También se utilizaron a las bases púricas (BP, adenina y guanina), determinadas mediante HPLC y la abundancia del isótopo ^{15}N mediante la técnica combinada de cromatografía de gases y espectrometría de masas, en los residuos sólido y líquido de la fermentación. No se observaron diferencias relacionadas con el efecto de los taninos de las leguminosas ($P > 0,10$) en cuanto a la cantidad total de bacterias adheridas al residuo sólido de CUBA CT-115 (ng de ADN o ng de ADN mg^{-1} MF) en ninguno de los dos tiempos de muestreo (12 y 24 h). La menor SPM se encontró en albizia sin PEG y la mayor en acacia sin PEG y la interacción entre los factores principales respecto a la SPM ($\text{mg } ^{15}\text{N} \cdot \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) no difirió entre las leguminosas ($p > 0,10$)

Al estudiar la adhesión de bacterias al sustrato determinado por PCR en tiempo real (PCR-RT) utilizando primers de tres bacterias celulolíticas del rumen, se observó que los taninos no afectaron la adhesión de bacterias totales del rumen del CUBA CT-115 ($P > 0,10$), pero disminuyeron la concentración de *R. albus* a las 12 y 24 h de incubación ($P < 0,01$). A las 12 horas de fermentación los taninos de enterolobium redujeron la abundancia de *Fibrobacter succinogenes* y de *Ruminococcus albus*, dos de las bacterias celulolíticas más importantes que integran la comunidad microbiana ruminal, mientras que la abundancia de *Ruminococcus flavefaciens* resultaron muy bajas.

Para caracterizar la respuesta en la fermentación del CUBA CT-115 al suplementarlo con *E. cyclocarpum* e identificar los efectos asociados al contenido

de saponinas y al aporte en MO fermentable de la leguminosa (Rodríguez *et al.*, 2012), se desarrolló una metodología en que el pasto se incubó en bolsas colocadas en las botellas de fermentación *in vitro*. A las 24 h, la gramínea sola produjo la mayor cantidad de gas y los menores valores fueron al suplementar con enterolobium, con y sin saponinas ($P < 0,0001$). La degradabilidad de la MS fue mayor cuando se suplementó sin saponinas, respecto a los tratamientos con saponinas ($P < 0,05$). La adhesión microbiana al pasto fue mayor al suplementar sin saponinas, respecto a los dos tratamientos con saponinas ($P < 0,05$). La suplementación con enterolobium (con y sin saponinas) produjo menos AGV totales, mientras que la inclusión con la leguminosa intacta disminuyó la proporción molar de acético ($P < 0,01$). Por su parte, los dos tratamientos con saponinas incrementaron la proporción de propiónico y disminuyeron la de butírico ($P < 0,01$). La suplementación con enterolobium incrementó la concentración de NH_3 ($P < 0,01$). La menor degradabilidad se apreció al suplementar la gramínea con enterolobium sin saponinas ($P < 0,001$). La producción de metano disminuyó cuando se suplementó con enterolobium, con y sin saponinas ($P < 0,001$). La suplementación con enterolobium, con y sin saponinas, incrementó la síntesis de biomasa microbiana ($P < 0,01$), aunque la eficiencia de síntesis, expresada como factor de partición, sólo se incrementó con la leguminosa intacta ($P < 0,05$).

Al evaluar el efecto de los taninos de *A. lebbekoides* en la fermentación del *C. nlemfuensis* (Rodríguez *et al.*, 2010), se observó que desde las 12 h, la producción de gas de la gramínea fue mayor que albizia ($P < 0,05$), duplicándola a las 48 h. Al suplementar con la leguminosa disminuyó el potencial de producción de gas y la degradabilidad aparente de la dieta, y mostró una tendencia a disminuir la tasa fraccional. La tasa fraccional de producción de gas se incrementó con la inclusión del PEG en los tratamientos con albizia.

Otro aporte del presente estudio se relaciona con el posible efecto de los taninos de las leguminosas en la producción de metano ruminal. Los resultados muestran que a las 12 h de fermentación se apreció una tendencia a disminuir la producción total de metano (mmol) al incubar el CUBA CT-115 con el extracto de albizia ($P = 0,08$). Sin embargo, los taninos de enterolobium incrementaron la producción de metano como proporción del volumen total de gas ($P < 0,05$) aunque cuando se expresó por unidad de MOF no hubo diferencias entre tratamientos ($P > 0,10$). Sin embargo, a las 24 h, la producción total de metano disminuyó al incubar el CUBA CT-115 con taninos de acacia y albizia ($P < 0,05$), al igual que cuando la producción de metano se expresó por unidad de MOF ($P < 0,01$). Cuando se expresó como proporción del gas total, sólo los taninos de acacia disminuyeron la proporción de metano respecto a la gramínea sola, mientras que los de enterolobium la incrementaron ($P < 0,001$).

Los resultados permiten comunicar que los taninos de las diferentes especies vegetales tienen diferentes efectos en la fermentación ruminal y varían en relación

con los taninos hidrolizables (TH) y condensados (TC), peso molecular, estructura (unidades monoméricas, grado de polimerización, tipo de enlaces entre monómeros) y reactividad química así como la dieta base y, consecuentemente, el ambiente ruminal predominante

Magnitud y alcance de los resultados obtenidos

Novedades científicas:

1. Establecer una metodología *in vitro* que combina la extracción de metabolitos secundarios de leguminosas y el empleo de técnicas moleculares como PCR en tiempo real (PCR-RT) para evaluar el efecto de dichos compuestos en la fermentación y la adhesión de poblaciones microbianas ruminales al pasto base.
2. Aplicar, por primera vez, las técnicas de bases púricas y ^{15}N como marcadores microbianos para determinar el crecimiento microbiano durante la fermentación de leguminosas arbustivas y para evaluar su efecto como suplementos del *P. purpureum* (vc. CUBA CT-115).
3. Definir que el efecto antimetanogénico de *A. cornigera* y *L. leucocephala* es independiente del efecto biológico de sus taninos, que en el caso de *A. lebbekoides* está específicamente relacionado con la concentración de estos compuestos, mientras que en *E. cyclocarpum* se asocia a su contenido de saponinas y al perfil de fermentación de su materia orgánica.
4. Desarrollar una metodología para determinar la reactividad de los taninos de leguminosas a partir del empleo de la técnica de producción de gas *in vitro*, el polietilenglicol para inactivar taninos y la modelación matemática.
5. Determinar por primera vez, el potencial de las leguminosas arbustivas tropicales *A. cornigera*, *E. cyclocarpum* y *A. lebbekoides* como suplementos de *P. purpureum* (vc. CUBA CT-115) y sus efectos en el potencial fermentativo de la gramínea.

Los resultados representan un importante aporte al conocimiento científico al:

1. Demostrar las potencialidades de *A. cornigera* como fuente de proteínas tanto en términos de aporte de nitrógeno degradable en el rumen como digestible en intestino, las potencialidades de *E. cyclocarpum* como fuente de N degradable en el rumen y el bajo valor como suplemento proteico de *A. lebbekoides* debido a la escasa disponibilidad de su nitrógeno; aunque en este caso se demostró que la inactivación de los taninos garantiza un incremento en la fermentabilidad y en la síntesis de biomasa microbiana, lo que sugiere que existen posibilidades prácticas de incrementar su valor nutritivo.
2. Obtener los primeros resultados en Cuba sobre el papel de los taninos de las cuatro leguminosas evaluadas en el perfil y ritmo de fermentación del CUBA CT-115, así como su incidencia en los indicadores químicos, síntesis y

eficiencia de síntesis microbiana, y la adhesión de bacterias totales y de especies celulolíticas durante la fermentación de la gramínea.

3. Demostrar que la estimación de la degradabilidad del nitrógeno *in vitro* a partir de la relación entre la concentración de amoníaco y la producción de gas es un método simple, que evita la posible desviación de la estimación gravimétrica *in situ* a partir de materiales muy frágiles y que está altamente correlacionado con los métodos gravimétricos y enzimáticos *in vitro* convencionales. Este resultado es de gran valor para evaluaciones futuras de nuevos recursos fitogenéticos.
4. Establecer una metodología sencilla y económica para medir la producción de gas *in vitro* en botellas mediante el desplazamiento del embolo de jeringas de vidrio al punzonar los sellos de goma de las botellas.
5. Demostrar que el efecto biológico de los taninos de las leguminosas evaluadas depende tanto de su concentración como de su reactividad, y la magnitud de uno y otro factor es variable en función de la especie vegetal en estudio.

A su vez, el material cuenta con una gran importancia metodológica, relacionada con la secuencia de investigación utilizada en el presente trabajo, que constituye una guía a seguir por investigadores y profesionales relacionados con la rama agropecuaria para la evaluación del valor nutricional y el efecto de los factores antinutricionales de nuevos recursos fitogenéticos. Además, por el alto valor como material de consulta y la posibilidad de utilizar estos resultados en la docencia de pre y postgrado de las ciencias agropecuarias.

Impactos económicos de los resultados obtenidos

Los estudios realizados constituyen una pauta para el empleo de nuevas fuentes proteicas nacionales para sustituir las costosas importaciones de alimentos concentrados, que se pueden utilizar más eficientemente en la alimentación humana o de animales monogástricos. Además, las leguminosas arbustivas tropicales brindan beneficios adicionales al productor, pues fijan nitrógeno al suelo y lo enriquecen con su hojarasca, dan sombra y evitan el estrés calórico de los animales, lo cual tiene un impacto económico indirecto pues en ambos casos mejoran las condiciones para incrementar la producción tanto de carne como de leche. A esto se adiciona que la introducción de las arbustivas en los agroecosistemas ganaderos incrementa la biodiversidad de la flora y la fauna en estos ecosistemas y contribuye a la sostenibilidad de estos, en armonía con la naturaleza. Además, la evaluación de nuevas especies es una garantía para evitar que un exceso de uso de una sola especie en la ganadería que pueda conducir a desastres como los que pueden ocurrir al introducirse una plaga que sea específica para *L. leucocephala*, por solo citar un ejemplo.

Asimismo, dicha evaluación se llevó a cabo teniendo en cuenta sus efectos al suplementar el *P. purpureum* (vc. CUBA CT-115), que es la gramínea más extendida en nuestra ganadería y que por su moderado valor nutritivo normalmente requiere de la suplementación con concentrados proteicos para

cubrir los requerimientos nutricionales de los animales y alcanzar producciones mayores. Esto además de tener un impacto económico y ambiental, es sumamente práctico porque el empleo combinado de arbustivas proteicas y gramíneas altas productoras de biomasa incrementa la soberanía alimentaria de los sistemas de producción ganadera y los hace menos dependiente de insumos externos, generalmente importados con la consecuente derogación de divisas convertibles.

Conjuntamente, de dichos estudios se derivaron el desarrollo o aplicación de metodologías que de manera más económica y accesibles para las condiciones de los laboratorios de nuestras instituciones nacionales, permiten la evaluación integral de nuevas fuentes de alimentos para rumiantes que constituyan sustitución de importaciones. La metodología desarrollada para medir la producción de gas sin necesidad de tener disponible el equipamiento que normalmente se emplea en el mundo, permitió que durante años el departamento de Ciencias Biofisiológicas avanzara en el uso de la técnica de producción de gas y que se cumplieran numerosos compromisos con proyectos de investigación nacionales e internacionales, se utilizara como parte del protocolo experimental de tesis de doctorado, maestría y de grado y se empleara para capacitar a investigadores del Instituto y de otros Centros y Universidades del país.

Igualmente, la metodología para determinar la reactividad de los taninos es una forma económica respecto a cualquiera de las metodologías propuestas en la literatura y que además resuelve las contradicciones que estas técnicas presentan al utilizar estándares no específicos y asumir los valores de reactividad como equivalentes de dichos estándares. La aplicación de esta metodología en los próximos años permitirá profundizar en el estudio de los efectos de los taninos en los rumiantes y su relación con sus concentraciones químicas en las plantas y la naturaleza y estructura molecular de estos compuestos secundarios presentes en cada especie vegetal, los que determinan su reactividad en el rumen de los animales que consumen estas plantas.

ANEXOS

Formación de Recursos Humanos:

Los estudios realizados permitieron la formación de un Máster en Bioquímica, un Doctorado en Producción Animal, la capacitación de una estudiante mexicana del Programa de intercambio Delfín de México en el uso de las técnicas de evaluación *in vitro* de recursos forrajeros y a una reserva científica del Departamento de Ciencias Biofisiológicas en el empleo de la técnica de producción de gas *in vitro* y en el desarrollo de la metodología de investigación. Además, una gran parte de estos estudios fueron realizados durante tres estancias de investigación realizadas en el Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España (Financiadas por

becas de formación profesional MAEC-AECID en los años 2002, 2008, 2009-2010).

Tesis de Maestría: 1

Rafael Rodríguez Hernández. 2004. Uso de la técnica de producción de gas *in vitro* en la valoración nutritiva de *Leucaena leucocephala*, *Albizia lebbekoides*, *Acacia cornigera* y *Enterolobium cyclocarpum*. Tesis en opción al grado de Master en Bioquímica, mención Nutrición. Facultad de Biología, Universidad de la Habana. La Habana, Cuba. 81 p.

Tesis de Doctorado: 1

Rafael Rodríguez Hernández. 2010. Estudio *in vitro* del valor nutritivo y de los efectos antinutricionales de cuatro leguminosas arbóreas tropicales con potencialidades como suplementos del *Pennisetum purpureum* (vc. CUBA CT-115). Tesis en opción al Grado de Doctor en Ciencias, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España. 212 p.

Publicaciones periódicas: 13

- Mota, M., Rodríguez, R., Fondevila, M. & Balcells, J. 2003. Effect of supplementation with two levels of tropical browse legumes on *in vitro* fermentation of *Pennisetum purpureum*. Tropical and Subtropical Agroecosystems and International Multidisciplinary Journal. Vol. 3, No. 1-3: 147- 150 (*Indexada*)
- Mota, M., Rodríguez, R., Solanas, E. & Fondevila, M. 2005. Evaluation of four tropical browse legumes as nitrogen sources: comparison of *in vitro* gas production with other methods for determination of N degradability. Anim. Feed Sci. Technol. 123-124, Part 1: 341-350 (*Factor de Impacto: 1.691; 2.399 en los últimos 5 años*).
- Rodríguez, R., Mota, M., Fondevila, M, de la Fuente, G., 2006. *In vitro* fermentation of four tropical browse legumes: estimation of the effect of tannins by gas production. En: C.J. Sandoval-Castro, J.F.J. Torres-Acosta, A.J. Ayala-Burgos and F.D.DeB. Hovell (eds.), Herbivores - Assessment of intake, digestibility and the roles of secondary compounds. BSAS Occasional publication No. 34: 101-107.
- Rodríguez, R., Sosa, A. & Rodríguez, Y. 2007. Microbial protein synthesis in rumen and its importance to ruminants. Cuban J. Agric. Sci., 41 (4): 287-294 (*Indexada*)
- Rodríguez, R., García, C.C., Oramas, A., Hernández, Y. & Domínguez, M. 2008a. Use of polyethylene glycol and zeolite to improve the nutritive value of *Albizia lebbekoides* in *in vitro* conditions. Cuban J. Agric. Sci., 42 (3): 263-268 (*Indexada*)
- Rodríguez, R., Sosa, A. & Rodríguez, Y. 2008b. Models of prediction and methods of estimation of the production of microbial protein in the rumen. Cuban J. Agric. Sci., 42 (2): 121-129 (*Indexada*)

- Rodríguez, R., Fondevila, M. & Castrillo, C. 2009. *In vitro* ruminal fermentation of *Pennisetum purpureum* CT-115 supplemented with four tropical browse legume species. Anim. Feed Sci. Technol., 151: 65- 74 (*Factor de Impacto: 1.691; 2.399 en los últimos 5 años*)
- Rodríguez, R., Alfonso, D., Oramas, A. & Hernández, Y. 2010a. Effect of tannins of *Albizia lebbekoides* on the *in vitro* fermentation of Star grass (*Cynodon nlemfuensis*) during dry season. Cuban J. Agric. Sci., 44 (3): 261-265 (*Indexada*)
- Rodríguez, R., Mota, M., Castrillo, C., Fondevila, M. 2010b. *In vitro* rumen fermentation of the tropical grass *Pennisetum purpureum* and mixtures with Browne legumes: effects of tannin contents. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl). 94: 696- 705 (*Factor de Impacto: 1.254*)
- R. Rodríguez, A. Britos, N. Rodríguez-Romero & M. Fondevila. 2011a. Efecto de extractos de taninos de diversas leguminosas sobre la concentración de bacterias fibrolíticas *in vitro*. XIV Jornadas de Producción Animal. AIDA-ITEA (17 y 18 de mayo de 2011, Zaragoza, España). Tomo II: 827- 829
- Rodríguez, R., Britos, A, Rodríguez-Romero, N. & Fondevila, M. 2011b. Effect of plant extracts from several tanniferous browse legumes on *in vitro* microbial fermentation of the tropical grass *Pennisetum purpureum*. Anim. Feed Sci. Technol. 168: 188– 195 (*Factor de Impacto: 1.691; 2.399 en los últimos 5 años*)
- Rodríguez R & Fondevila M. 2012. Effect of saponins from *Enterolobium cyclocarpum* on *in vitro* microbial fermentation of the tropical grass *Pennisetum purpureum*. J Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl). 96 (5): 762-769 (*Factor de Impacto: 1.254*)
- Rodríguez, R., de la Fuente, G., Gómez, S. & Fondevila, M. 2013. Biological effect of tannins from different vegetal origin on microbial and fermentation traits *in vitro*. (Animal Production Science, manuscript ID: AN13045) (*Factor de Impacto: 1.228*)

Memorias en Eventos Internacionales: 5

- R. Rodríguez *et al.* 2007. Efecto del inóculo microbiano en el sustrato vegetal en la cinética de producción de gas *in vitro*. Memorias del VI Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias, Palacio de las Convenciones, Ciudad de la Habana, Cuba, ISBN: 978-959-282-047-3
- R. Rodríguez *et al.* 2007. Empleo del polietilenglicol y la zeolita para mejorar el valor nutritivo de *Albizia lebbekoides* a través de la manipulación de su fermentación *in vitro*. Memorias del II Congreso de Producción Animal, ICA, La Habana, Cuba, ISBN 978-959-7171-12
- R. Rodríguez *et al.* 2008. Efecto de la suplementación con cuatro leguminosas tropicales en la fermentación *in vitro* de *Pennisetum purpureum* (vc. CUBA CT-115). III Encuentro Internacional Jóvenes Agropecuarios INTERJOVEN'2008, ICA, La Habana, Cuba, ISBN 9789592421271-6

- R. Rodríguez *et al.* 2010. Efecto de los taninos de *Albizia lebbekoides* en la fermentación *in vitro* del pasto estrella (*Xynodon nlemfuensis*) durante el período seco. Memorias del IV Encuentro Internacional de Jóvenes Agropecuarios INTERJOVEN´2010, ICA, Mayabeque, Cuba, ISBN 978-959-7171-30-0
- Rodríguez, R., Fondevila, M. & Rodríguez-Romero, N. 2010. Efecto biológico de los taninos de *L. leucocephala*, *A. lebbekoides* y *A. cornigera* en su fermentación ruminal *in vitro*. Memorias del III Congreso de Producción Animal Tropical, La Habana, Cuba. ISBN 978-959-7171-31-7

Publicaciones Divulgativas: 1

- Rodríguez, R. 2007. Leguminosas arbustivas tropicales: una necesidad para la recuperación ganadera en Cuba. Revista ACPA. 1: 52- 54

Registros: 1

- T.E. Ruiz *et al.* 2012. Experiencia en el manejo de *Leucaena leucocephala* para la producción animal en Cuba. Depósito Legal facultativo de obras protegidas. Reg. 2108-2012

Eventos y Fórum de Ciencia y Técnica: 32

- R. Rodríguez *et al.* 2003. Fermentación *in vitro* de cuatro leguminosas arbustivas tropicales. Efecto del contenido de taninos condensados. Evento Científico Juvenil AGROJOVEN´2003, Granma, Cuba
- R. Rodríguez *et al.* 2003. Efecto de los taninos condensados en la fermentación *in vitro* de cuatro leguminosas tropicales. II Foro Latinoamericano de Pastos y Forrajes, La Habana, Cuba
- R. Rodríguez *et al.* 2003. Aplicación, adaptación y comparación de una técnica para determinar la degradación *in vitro* de la proteína de leguminosas tropicales. XV Forum de Ciencia y Técnica, ICA, La Habana, Cuba
- M. Fondevila *et al.* 2003. Effect of supplementation with two levels of tropical browse legumes on *in vitro* fermentation of *Pennisetum purpureum*. The Sixth International Symposium on the Nutrition of Herbivores, Yucatán, México
- M. Fondevila *et al.* 2003. In vitro fermentation of four tropical browse legumes: estimation of the effect of tannins by gas production. Satellite symposia Wild and domestic herbivore diet characterization, Yucatán, México
- R. Rodríguez *et al.* 2004. Aplicación, adaptación y comparación de una técnica para determinar la degradación *in vitro* de la proteína de leguminosas tropicales. XI Expo Forjadores del Futuro (Base y Municipal)
- R. Rodríguez *et al.* 2004. Potencialidades de dos leguminosas arbustivas tropicales como fuentes de proteína para sistemas productivos de bajos

- insumos. I Encuentro Internacional de Jóvenes Agropecuarios INTERJOVEN´2004, ICA, La Habana, Cuba
- R. Rodríguez et al. 2004. Cinética de la fermentación, efecto de los taninos condensados, degradabilidad y digestibilidad *in vitro* del nitrógeno de cuatro leguminosas arbustivas tropicales. VI Taller Internacional sobre la Utilización de los Sistemas Silvopastoriles para la Producción Animal, Holguín, Cuba
 - R. Rodríguez et al. 2004. Valoración nutricional *in vitro* de *Leucaena leucocephala* y *Acacia cornigera*, dos leguminosas arbustivas con potencialidades de uso en ecosistemas ganaderos degradados. I Congreso Internacional de Agricultura en Ecosistemas Frágiles y Degradados, Granma, Cuba.
 - R. Rodríguez et al. 2004. Evaluación *in vitro* de las proteínas de cuatro leguminosas arbustivas tropicales. XII Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal, UCV, Maracay, Venezuela
 - R. Rodríguez et al. 2004. Efecto del inóculo microbiano y el sustrato vegetal en la cinética de producción de gas *in vitro*. VII Jornada Provincial de Veterinaria, La Habana, Cuba
 - R. Rodríguez et al. 2005. Metodología *in vitro* para la evaluación nutricional de recursos filogenéticos tropicales. XVI Forum de Ciencia y técnica. Relevante (ICA, Forum UNAH), San José de las Lajas, La Habana, Cuba
 - R. Rodríguez *et al.* 2005. Uso de la técnica de producción de gas *in vitro* en la evaluación nutricional de recursos filogenéticos tropicales. Concurso Científico Juvenil. BTJ. Ponencia Premiada, San José de las Lajas, La Habana, Cuba
 - S. Gómez et al. 2006. Aplicación práctica de los modelos estadísticos para el procesamiento de experimentos con mediciones repetidas en el tiempo sobre la misma unidad experimental. XVI Forum de Ciencia y Técnica (Mención), ICA, La Habana, Cuba
 - R. Rodríguez et al. 2006. Aplicación de la técnica de producción de gas *in vitro* en la evaluación y comparación de la cinética de fermentación de la guinga (*Phiticilobium dulce*) con leucaena (*Leucaena leucocephala*) y guinea (*Panicum maximum*). II Encuentro Internacional Jóvenes Agropecuarios INTERJOVEN´2006, 5-8, La Habana, Cuba
 - R. Rodríguez et al. 2006. Evaluación *in vitro* de recursos locales para la alimentación animal. Efecto del inóculo microbiano y la naturaleza del sustrato. II Congreso de Agricultura en Ecosistemas Frágiles y Degradados. AGROMAS´2006. 7-9 de Diciembre del 2006, Bayamo, Cuba.
 - S. Gómez *et al.* 2006. Aplicación práctica de los modelos estadísticos para el procesamiento de experimentos con mediciones repetidas en el tiempo sobre la misma unidad experimental. XVI Forum de Ciencia y técnica. (Mención)
 - R. Rodríguez et al. 2007. Efecto del inóculo microbiano en el sustrato vegetal en la cinética de producción de gas *in vitro*. VI Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias, Palacio de las Convenciones, Ciudad de la Habana, Cuba

- S. Gómez et al. 2007. Determinación del tamaño de muestra en la producción de gas por la técnica *in vitro*. XVII Forum de Ciencia y Técnica. Ponencia Destacada, ICA, La Habana, Cuba
- R. Rodríguez *et al.* 2007. Empleo del polietilenglicol y la zeolita para mejorar el valor nutritivo de *Albizia lebbekoides* a través de la manipulación de su fermentación *in vitro*. II Congreso de Producción Animal, ICA, La Habana, Cuba
- R. Rodríguez, M. Mota, C. Castrillo & M. Fondevila. 2008. In vitro effect of secondary compounds from included browse legumes on the microbial fermentation pattern of a tropical grass. 12nd Meeting of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition. Viena (Austria), 25-27 Septiembre 2008.
- R. Rodríguez et al. 2008. Efecto de la suplementación con cuatro leguminosas tropicales en la fermentación *in vitro* de *Pennisetum purpureum* (vc. CUBA CT-115). III Encuentro Internacional Jóvenes Agropecuarios INTERJOVEN´2008, ICA, La Habana, Cuba
- R. Rodríguez et al. 2008. Efecto de la suplementación con cuatro leguminosas tropicales en la fermentación *in vitro* de *Pennisetum purpureum* (vc. CUBA CT-115). XVI Forum de Ciencia y Técnica (Mención). ICA, La Habana, Cuba
- R. Rodríguez et al. 2009. Caracterización cualitativa y semicuantitativa de extractos de saponinas obtenidos a partir de tres leguminosas arbustivas tropicales XVI Forum de Ciencia y Técnica. Ponencia Destacada, ICA, La Habana, Cuba
- S. Gómez et al. 2009. Determinación del tamaño de muestra en la técnica *in vitro* de producción de gas (Mención). XVI Forum de Ciencia y Técnica (Mención). ICA, La Habana, Cuba
- Fondevila, M., Rodríguez, R., Bergoug, H., de la Fuente, G. 2010. Effect of saponins from *Enterolobium cyclocarpum* on *in vitro* microbial attachment and fermentation. 14th Conference of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition. Zurich, Switzerland. Zurich, Suiza
- R. Rodríguez, D. Alfonso, A. Oramas & Y. Hernández. 2010. Efecto de los taninos de *Albizia lebbekoides* en la fermentación *in vitro* del pasto estrella (*Xynodon nlemfuensis*) durante el período seco. IV Encuentro Internacional de Jóvenes Agropecuarios INTERJOVEN´2010, ICA, Mayabeque, Cuba
- R. Rodríguez et al. 2010. Estimación del efecto biológico de los taninos de *L. leucocephala*, *A. lebbekoides* y *A. cornigera* en su fermentación ruminal *in vitro*. III Congreso de Producción Animal, Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba
- R. Rodríguez, Fondevila, M., Bergoug, H., Febles, G., Gómez, S. & Achang, G. 2010. Metodología para la estimación de la reactividad de los taninos de leguminosas XVI Forum de Ciencia y Técnica. Mención, ICA, La Habana, Cuba
- R. Rodríguez, Fondevila, M., Febles, G., Gómez, S. & Achang, G. 2011. Efectos de los taninos extraíbles de tres leguminosas arbustivas en indicadores químicos y microbiológicos de la fermentación *in vitro* del

Pennisetum purpureum (vc. CUBA CT-115). XVI Forum de Ciencia y Técnica. Mención, ICA, La Habana, Cuba

- Rodríguez, R., Britos, A., Rodríguez-Romero, N., Fondevila M. 2011. Efecto de extractos de taninos de diversas leguminosas sobre la concentración de bacterias fibrolíticas in vitro. III Simposio sobre Microbiología Digestiva, XIV Jornadas sobre Producción Animal, Zaragoza, España
- R. Rodríguez, M. Fondevila & C. Castrillo. 2012. Índices de la reactividad de los taninos de tres especies de leguminosas arbustivas tropicales. II Convención Internacional AGRODESARROLLO 2012, Matanzas, Cuba