

Efecto de la inclusión de *Musa* sp. en la conservación de ensilajes de *Trichanthera gigantea* (Humb. & Bonpl.) Nees.

Effect of the inclusion of *Musa* sp. on the conservation of silages of *Trichanthera gigantea* (Humb. & Bonpl.) Nees

Daniel Rojas-Cordero¹ <https://orcid.org/0000-0002-5295-1487>, Andrés Alpízar-Naranjo¹ <https://orcid.org/0000-0002-9612-4918>, Miguel Castillo-Umaña¹ <https://orcid.org/0000-0001-8114-744X>, Michael López-Herrera² <https://orcid.org/0000-0003-4301-9900>

¹Universidad Nacional de Costa Rica, Escuela de Ciencias Agrarias Heredia, Costa Rica. ²Universidad de Costa Rica, Escuela de Zootecnia, Centro de Investigación en Nutrición Animal, San José, Costa Rica. Correo electrónico: danielreds24@gmail.com

Resumen

Objetivo: Evaluar el efecto de la inclusión de diferentes niveles de *Musa* sp. en la calidad nutricional y fermentativa de ensilajes de *Trichanthera gigantea* (Humb. & Bonpl.) Nees.

Materiales y Métodos: Se utilizó un diseño irrestricto completamente, con cuatro tratamientos: T1) 100 % *T. gigantea*, T2) 85 % *T. gigantea*: 25 % *Musa* sp., T3) 70 % *T. gigantea*: 30 % *Musa* sp. y T4) 55 % *T. gigantea*: 45 % *Musa* sp. Los ensilajes se realizaron en bolsas plásticas de 5 kg durante 40 días. En el momento de la apertura se midieron sus características bromatológicas, así como los indicadores de fermentación. Se aplicó un análisis de varianza y se analizaron las posibles correlaciones entre todas las variables bromatológicas y los indicadores fermentativos.

Resultados: Se encontró mejora en los indicadores fermentativos de los ensilajes por incremento en la concentración de ácido láctico y disminución del pH, proporcional a la cantidad de *Musa* sp utilizada. La concentración de materia seca aumentó, a razón de 0,9 puntos porcentuales por cada incremento de *Musa* sp. en los ensilados. Asimismo, se generó aumento en el contenido de carbohidratos no fibrosos y almidón, lo que mejoró el aporte energético de los ensilados. Hubo disminución en la cantidad de proteína cruda y de fibra, a razón de 1,8 y 5,7 puntos porcentuales por cada incremento en la cantidad de *Musa* sp. respectivamente, sin efecto negativo en la digestibilidad de los ensilados.

Conclusiones: Las mezclas con 30 % *Musa* sp. presentaron características fermentativas y nutricionales adecuadas para su conservación y uso como suplemento de rumiantes. ; sin embargo , los niveles 0 y 15 % mostraron los valores más altos de proteína y fibra, pero bajos en energía. A su vez, las mezclas de 30 y 45 % lograron los mejores indicadores fermentativos.

Palabras clave: calidad nutricional, nutrición de rumiantes, arbustos forrajeros

Abstract

Objective: To evaluate the effect of the inclusion of different levels of *Musa* sp. on the nutritional and fermentative quality of *Trichanthera gigantea* (Humb. & Bonpl.) Nees.

Materials and Methods: A complete unrestricted design was used, with four treatments: T1) 100 % *T. gigantea*, T2) 85 % *T. gigantea*: 25 % *Musa* sp., T3) 70 % *T. gigantea*: 30 % *Musa* sp. and T4) 55 % *T. gigantea*: 45 % *Musa* sp. The silages were made in 5-kg plastic bags during 40 days. At the moment of opening their bromatological characteristics, as well as the fermentation indicators, were measured. A variance analysis was applied and the possible correlations among all the bromatological variables, as well as fermentation indicators, were measured. A variance analysis was applied and the possible correlations among all the bromatological variables and fermentative indicators, were analyzed.

Results: Improvement was found in the fermentative indicators of the silages due to increase in the concentration of lactic acid and pH decrease, proportional to the quantity of *Musa* sp. used. The dry matter concentration increased, at a rate of a 0,9 percentage points for each increase of *Musa* sp. in the silages. Likewise, increase was generated in the content of non-fibrous carbohydrates and starch, which improved the energy contribution of the silages. There was decrease in the quantity of crude protein and fiber, at a rate of 1,8 and 5,7 percentage points for each increase in the quantity of *Musa* sp., respectively, without negative effect on the digestibility of the silages.

Conclusions: The mixtures with 30 % *Musa* sp. showed adequate fermentative and nutritional characteristics for their conservation and use as supplement for ruminants; ; nevertheless, levels 0 and 5 % showed the highest protein and fiber values, but low in energy. In turn, the mixtures of 0 and 45 % achieved the best fermentative indicators.

Keywords: nutritional quality, ruminant nutrition, forage shrubs

Recibido: 22 de septiembre de 2020

Aceptado: 09 de marzo de 2021

Como citar este artículo: Rojas-Cordero, D.; Alpízar-Naranjo, A.; Castillo-Umaña, M. & López-Herrera, M. Efecto de la inclusión de *Musa* sp. en la conservación de *Trichanthera gigantea* (Humb. & Bonpl.) Nees como ensilaje. *Pastos y Forrajes*. 44:eE04, 2021.

Este es un artículo de acceso abierto distribuido en Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> El uso, distribución o reproducción está permitido citando la fuente original y autores.

Introducción

En los sistemas tropicales de producción se utilizan los pastos como principal fuente de alimento. Sin embargo, este recurso se afecta por las condiciones ambientales, lo que puede comprometer el adecuado consumo de nutrimentos y la productividad de los animales (Poppi *et al.*, 2018).

El uso de las arbustivas como complemento de las pasturas y fuente forrajera puede ayudar a mitigar los efectos ocasionados por el cambio climático (Alayon-Gamboa *et al.*, 2016), pues se considera una alternativa rentable que permite proveer a los animales de nutrientes, principalmente de proteína (Franzel *et al.*, 2014). No obstante, para obtener mayor provecho de estos alimentos se deben complementar con fuentes de energía que optimicen el uso de los nutrimentos en el rumen (Jiménez-Ferrer *et al.*, 2015).

Trichanthera gigantea (Humb. & Bonpl.) Nees es una planta tropical de zonas de clima húmedo. Posee características nutricionales, entre las que se destaca un contenido de proteína entre 18 y 30 % y digestibilidad de la materia seca de 69 % (Riascos-Vallejo *et al.*, 2020), que la convierten en una opción para la alimentación de rumiantes, tanto en estado fresco como en ensilaje (Daniel, 2015).

El guineo cuadrado (*Musa acuminata* x *Musa balbisiana*, Grupo ABB) (GC) ha demostrado ser una fuente energética, debido a su alto contenido de almidón (80,1 % MS). Además, es apto para la suplementación de rumiantes, ya que se puede conservar como ensilaje, sobre todo cuando se utiliza en estado inmaduro (López, 2017; López-Herrera *et al.*, 2019). Esta característica hace que sea una alternativa viable para su mezcla con plantas como *T. gigantea*, en función de favorecer el proceso de fermentación en el ensilaje y potenciar el uso de nutrimentos a nivel ruminal (López-Herrera *et al.*, 2019).

El ensilaje es el resultado de un proceso de fermentación láctica espontánea, que tiene lugar en condiciones anaeróbicas. Lo inducen las bacterias que forman parte de la microflora epífita en las plantas, en particular aquellas que son productoras de ácido láctico (Borreani *et al.*, 2018). Mediante la técnica del ensilado se han conservado diversos tipos de materiales que se pueden emplear en la alimentación de rumiantes (Grant y Ferraretto, 2018).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la inclusión de diferentes niveles de *Musa* sp. en algunos indicadores de la calidad nutricional y fermentativa de ensilajes de *T. gigantea*.

Materiales y Métodos

Localización. La investigación se llevó a cabo en la Finca Experimental Santa Lucía (FESL), de la Universidad Nacional de Costa Rica. Esta instalación se ubica entre las coordenadas 10° 01' 20" N y 84° 06' 45" O, a altitud de 1 250 msnm, en Barva, Heredia, Costa Rica. Los análisis de laboratorio se realizaron en el Centro de Investigación en Nutrición Animal de la Universidad de Costa Rica, ubicado en Montes de Oca, Costa Rica.

Diseño experimental y tratamientos. Se utilizó un diseño irrestricto, completamente aleatorizado, en el que se combinaron cuatro niveles de sustitución de forraje de *T. gigantea* por frutos de guineo cuadrado (GC), según los siguientes tratamientos: T1) 100 % *T. gigantea*, T2) 85 % *T. gigantea*: 25 % GC, T3) 70 % *T. gigantea*: 30 % GC y T4) 55 % *T. gigantea*: 45 % GC. Todos los tratamientos se sometieron a conservación por medio de la técnica de ensilaje en microsilos. A todos se les agregó 6 % peso/peso de melaza de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) sin diluir e inóculo bacteriano artesanal (elaborado por la fermentación de suero de leche, leche descremada y melaza, durante 30 días) con una concentración de *Lactobacillus* 1,0 x 10⁹, a dosis de 1 L/tonelada en fresco. Asimismo, cada tratamiento se repitió cuatro veces, para un total de 16 unidades experimentales (microsilos).

Procedimiento experimental

Materiales utilizados. El forraje de *T. gigantea* se obtuvo de una plantación ubicada en la FESL. Esta zona se caracteriza por presentar precipitación anual de 2 403 mm, humedad relativa de 80,5 % y temperatura media anual de 20,3 °C, con mínimas de 15,4 °C, y máximas de 25,2 °C (IMN, 2020). El material se cosechó de una plantación establecida en el 2004, con semilla asexual, a densidad de 20 000 plantas por hectárea. Durante el período experimental únicamente recibió control de arvenses. Se cosechó a 75 días de edad del rebrote y a 1 m de altura. Una vez recolectado, antes de la elaboración de los ensilados, se sometió a un proceso de deshidratación durante 48 horas en un invernadero para reducir el contenido de humedad.

Los frutos de GC (*Musa acuminata* x *Musa balbisiana*, Grupo ABB) se cosecharon en la Finca Agroecológica Vocaré, ubicada en Upala, Costa Rica, una zona ubicada a 120-180 msnm, con precipitación promedio de 2 500 mm anuales, temperatura promedio de 26 °C y humedad relativa de 80-90 % (IMN, 2020). La composición nutricional

previa al ensilaje de los materiales utilizados se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Valor nutricional de los materiales utilizados en la preparación de las mezclas a ensilar (% MS).

Nutrimiento	<i>Musa</i> sp.	<i>T. gigantea</i> presecado
MS	28,3	16,9
PB	5,1	19,9
FDN	8,7	30,6
Lignina	5,1	9,0
CNF	86,3	18,7
Almidón total	84,3	ND
TND	89,2	53,4

MS: materia seca, PB: proteína bruta, FDN: fibra en detergente neutro, CNF: carbohidratos no fibrosos y TND: total de nutrientes digestibles; ND: no detectado.

Procedimiento experimental. Los materiales se trocearon por separado con una picadora de motor eléctrico hasta obtener un tamaño de partícula promedio de 2,5 cm. Se mezclaron manualmente con los frutos de GC inmaduro. Para guardar los microsilos se utilizaron bolsas de polietileno para empaque al vacío, con capacidad para 5 kg y grosor de 0,063 mm. El material se depositó y se compactó manualmente. El aire se extrajo a fondo mediante una aspiradora. Posterior a la eliminación del oxígeno, las bolsas se sellaron con cinta plástica adhesiva y se colocaron dentro de una bolsa para ensilaje en el interior de un cuarto, protegidas del ataque de aves o labores rutinarias, que podrían afectar el proceso de ensilaje.

Muestreo y variables experimentales. Después de transcurridos 40 días de fermentación, de cada microsilo se tomó una muestra de 0,6 kg para determinar la calidad del ensilaje. Para ello se analizaron los siguientes indicadores fermentativos: pH con un potenciómetro con electrodo de hidrógeno por medio de la metodología propuesta por la WHO (2003) y ácido láctico de acuerdo con el método indicado en Ball *et al.* (2011) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Se tomó una muestra de cada repetición para realizar los análisis de composición nutricional, en los que se determinó la materia seca (MS), la proteína bruta (PB = N x 6,25), el extracto etéreo (EE) y las cenizas, según los métodos indicados en AOAC (1998). Los carbohidratos no fibrosos (CNF) se estimaron de acuerdo con Detmann y Valadares-Filho (2010).

Para la determinación del contenido de almidón se utilizó el método descrito en Salazar-Murillo y Granados-Chinchilla (2018), con la utilización de HPLC y un cromatógrafo Agilent 1260 Infinity, con

una columna Agilent Hi-Plex H. La concentración de fibra detergente neutro (FDN) y la lignina se determinaron mediante la metodología de Van Soest *et al.* (1991). La fibra detergente neutro digestible (dFDN) y el total de nutrientes digestibles (TND) se estimaron según la técnica descrita en Detmann *et al.* (2008). Las fracciones de energía se calcularon por medio de las ecuaciones referidas en las tablas de requerimientos del NRC (2001) para el ganado lechero.

Análisis estadístico. Los datos se tabularon y se analizaron por medio de modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) mediante el programa estadístico INFOSTAT® Profesional (Di-Rienzo *et al.*, 2019). Además, se realizó análisis de regresión para determinar la tasa de cambio en las variables nutricionales, en caso de ser significativo el efecto del tratamiento. De las ecuaciones de regresión se utilizó la pendiente significativa para la estimación de la tasa de cambio en cada variable. También se utilizó el análisis por medio de coeficientes de Pearson para hallar la correlación entre todas las variables bromatológicas y los indicadores fermentativos. En todos los análisis realizados se declaró significancia, cuando $p < 0,05$. Aunque se consideraron tendencia del tratamiento cuando se obtuvieron $p > 0,05$; pero $< 0,1$. Para la comparación entre medias se utilizó la prueba de Tukey, con nivel de confianza de 95 %.

Resultados y Discusión

Indicadores fermentativos y materia seca. El contenido de MS mostró diferencias significativas ($p < 0,001$) por efecto de la inclusión del fruto de GC. Se observó que cuando se incluyó el GC en la mezcla hubo incremento de la MS conforme aumentó la cantidad de GC. La ecuación de regresión para esta variable [$MS=0,06(x)+19,3$] indicó que por cada incremento de 15 % de GC aumentó en 0,9 puntos el contenido de MS de los ensilados. El tratamiento con 45 % de GC fue el que presentó mayor contenido de MS en comparación con el nivel 0 % de GC (tabla 2). En todos los silos analizados se encontró presencia de efluentes, sin existir diferencias entre tratamientos.

Las desigualdades halladas entre tratamientos resultaron significativas desde el punto de vista estadístico. Sin embargo, no lo fueron desde el punto de vista práctico, ya que la diferencia entre los tratamientos fue poca, y un cambio en las condiciones ambientales podría modificar el contenido de materia seca en el forraje, y finalmente en el ensilado (López-Herrera y Briceño-Arguedas, 2016).

Tabla 2. Medias de materia seca, pH y ácido láctico de los tratamientos ensilados.

<i>Musa</i> sp.	MS, %	pH	Ácido láctico, % MS
0	19,3 ^a	6,6 ^d	0,3 ^a
15	20,2 ^{ab}	5,6 ^c	0,7 ^a
30	21,1 ^b	5,2 ^b	2,6 ^b
45	22,0 ^c	4,1 ^a	7,3 ^c
EE ±	0,259	0,048	0,135
Valor - P	<0,001	<0,001	<0,001

Letras diferentes en la misma columna son diferentes $p < 0,05$

El contenido de MS en los ensilados pudo estar definido por la concentración de MS presente en ambos materiales que conforman el ensilado y por el método de conservación utilizado durante el experimento. Todos los ensilados presentaron contenidos menores de 35 % MS, lo que es esperable si se considera que el contenido de MS de los materiales empleados para elaborar los ensilajes fue menor (tabla 1). De acuerdo con Borreani *et al.* (2018) y Grant y Ferraretto (2018), cualquier material con contenido de MS menor de 35 % puede mostrar pérdidas menores por efluentes, que pueden lixivarse y reducir la disponibilidad de carbohidratos solubles, necesarios para la fermentación de las bacterias ácido lácticas. Esto puede afectar la reducción del pH y predisponer el desarrollo de fermentaciones secundarias producidas por otras bacterias, que pueden afectar la síntesis y cantidad final de ácido láctico.

El pH mostró diferencias significativas ($p < 0,001$) entre tratamientos. Las medias fueron menores conforme se incrementó la cantidad de GC. Así, el tratamiento con mayor pH fue el 0 % de GC, mientras que el de menor pH fue el 45 % de GC (tabla 2). La regresión calculada para esta variable [$pH = -0,06(x) + 6,6$] indicó que por cada incremento de 15 % de GC disminuye en 0,9 puntos el pH de los ensilados. La producción de ácidos orgánicos, principalmente de ácido láctico, provoca la reducción del pH durante el ensilaje (Kung *et al.*, 2001). No obstante, se puede afectar por la capacidad amortiguadora y por el contenido de humedad del material (Borreani *et al.*, 2018).

Como se muestra en la tabla 2 hubo diferencias entre tratamientos ($p < 0,001$), siendo el de 45 % de GC el que mostró la mayor concentración de ácido láctico, mientras que los tratamientos con menor concentración del ácido fueron los de 0 y 15 % de GC. Este comportamiento en la síntesis del ácido láctico se puede explicar a partir de los efectos an-

tes mencionados, ya que los tratamientos con 0 y 15 % de GC fueron los de mayor contenido de humedad (tabla 2), cenizas y PB (tabla 3), además de ser los de mayor valor de pH.

De acuerdo con Borreani *et al.* (2018), estos factores se asocian con el aumento de la capacidad amortiguadora del forraje y con pérdidas durante el proceso de ensilaje. De esta manera, el contenido de humedad produce efluentes que reducen la disponibilidad de carbohidratos solubles. Al mismo tiempo, se tiene una mezcla forrajera que posee mayor capacidad amortiguadora, lo que imposibilita la adecuada reducción del pH ($< 5,0$) en el silo. Esta situación predispone el desarrollo de fermentaciones secundarias, que reducen la síntesis y concentración del ácido láctico durante el ensilaje (Callejo-Ramos, 2018). Por el contrario, la concentración de ácido láctico aumenta 2,3 puntos por cada incremento de 15 % de GC.

Lo anterior se estimó a partir de la ecuación de regresión [$Lact = 0,15(x) - 0,68$], donde la pendiente resultó altamente significativa ($p < 0,001$). Así, el tratamiento con 45 % de GC fue el que mostró mayor cantidad de ácido láctico, debido a un mayor contenido de MS y menor capacidad amortiguadora (menor PB y cenizas), que provocó adecuada disminución del pH y producción de ácido láctico.

Este efecto de la MS y el pH en la producción de ácido láctico se reafirma mediante el cálculo de las siguientes correlaciones: la primera entre el contenido de MS y la concentración de ácido láctico ($\rho = 0,71$ $p = 0,002$), y la segunda entre la concentración de ácido láctico y el valor de pH ($\rho = -0,90$ $p < 0,001$).

Aunque la concentración de MS en todos los tratamientos fue menor a la esperada para un buen ensilaje ($< 35\%$), en los tratamientos con 30 y 45 % de GC hubo una producción de ácido láctico en el rango esperado para ensilajes o superior (2-4 % MS). Esto resulta muy favorable, ya que el ácido láctico se puede transformar a ácido propiónico en el rumen, según señalan Kung *et al.*

(2001). Estos autores informan que en ensilados con < 30 % de MS se pueden alcanzar concentraciones mayores a 4 % de MS en el ácido láctico, como sucede en esta investigación con el tratamiento con 45 % de GC. En este caso, la mejora proviene de un mayor aporte de carbohidratos solubles, ya que el GC inmaduro posee un contenido de CS de 6,2 % MS, que se suma a lo aportado por la melaza y el forraje para favorecer la fermentación y disminuir el pH (López-Herrera, 2019).

Componentes intracelulares. La proteína bruta (PB) presentó diferencias significativas ($p < 0,001$), debido a la cantidad de fruto de GC (tabla 3). El contenido de esta fracción se redujo conforme aumentó la cantidad de GC. En este caso, la ecuación de regresión $[PB = -0,12(x) + 14,2]$ señala que la reducción en la concentración de la proteína sucede a razón de 1,8 puntos porcentuales por cada incremento de 15 % en la cantidad de GC.

El tratamiento con mayor contenido de PB fue el tratamiento con 0 % de GC, mientras que el tratamiento con menor concentración fue el de 45 %. Estas diferencias se deben a la concentración propia de cada uno de los materiales utilizados para la mezcla y las proporciones aplicadas en cada tratamiento. Todos los tratamientos mostraron contenidos de PB mayores a 7 % de MS, valor necesario para evitar deficiencias en el metabolismo del nitrógeno y mantener el funcionamiento adecuado del rumen (Calsamiglia *et al.*, 2010), lo que permite que se consideren adecuados para la suplementación de ganado lechero.

Al comparar los datos de PB (tablas 1 y 3), se puede estimar que ocurre disminución de 28 % en el contenido de PB, al pasar del estado fresco al ensilado. De acuerdo con Kung *et al.* (2001), forrajes con alto contenido de humedad y de proteína, como es el caso del *T. gigantea* utilizado en este estudio, podrían estar expuestos a un intenso proceso

de proteólisis, producto de una fermentación clostridial. Esto origina mayores concentraciones de nitrógeno soluble y nitrógeno amoniacal, lo que genera en los ensilados menores valores de PB final.

Los ensilados mostraron niveles de PB comparables a los ensilados de *Cratylia argentea* (Desv.) O. Kuntze y *Erythrina poeppigiana* (Walp.) O.F. Cook con GC, informados en la investigación de Montero (2016), y fueron mayores que los referidos por Alpizar *et al.* (2014) en ensilados de *Sorghum bicolor* (L.) Moench y *Morus alba* L. Estas diferencias se deben a las características propias de cada especie, así como a la humedad presente en el forraje al momento del ensilaje (Grant y Ferraretto, 2018).

La PB mostró diferencias significativas ($p < 0,001$), debido a la cantidad de fruto de GC (tabla 3). El contenido de esta fracción se redujo conforme aumentó la cantidad de GC. En este caso, la ecuación de regresión $[PB = -0,12(x) + 14,2]$ señala que la reducción en la concentración de la proteína sucede a razón de 1,8 puntos porcentuales por cada incremento de 15 % en la cantidad de GC.

La concentración de CNF presentó diferencias significativas ($p < 0,001$) por efecto del GC. De este modo, a mayor cantidad de GC fue superior la concentración de CNF en el ensilado, siendo el tratamiento con 45 % de GC el que mostró mayor concentración de esta fracción (tabla 3). El incremento de CNF sucede, como promedio, a razón de 12,2 puntos por cada incremento de 15 % GC, al considerar que la regresión $[CNF = 0,81(x) + 19,7]$ resultó significativa para la estimación de los CNF (tabla 3). Este aumento en la concentración de CNF se debe a dos razones principales: mayor producción de ácidos orgánicos en el silo y mayor cantidad de almidón que proviene del GC.

De acuerdo con Detmann y Valadares-Filho (2010), los CNF incluyen azúcares simples, almidón

Tabla 3. Concentración de componentes intracelulares de los ensilados de *T. gigantea* con *Musa* sp. (% MS).

<i>Musa</i> sp.	PB	CNF	Almidón total	Cenizas
0	14,2 ^d	19,7 ^a	0,49 ^a	28,4 ^d
15	12,0 ^c	31,5 ^b	7,5 ^b	22,5 ^c
30	10,8 ^b	41,7 ^c	13,0 ^c	19,1 ^b
45	8,9 ^a	58,1 ^d	23,8 ^d	13,8 ^a
EE ±	0,282	1,337	1,140	0,537
Valor - P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Letras diferentes en la misma columna son diferentes $p < 0,05$

y ácidos orgánicos, siendo estos últimos propios de la bioquímica del ensilaje y necesarios para la disminución del pH (Kung *et al.*, 2001). Se determinó que existe correlación entre el valor de pH y los CNF ($\rho = -0,97$ $p < 0,001$), así como entre el ácido láctico y los CNF ($\rho = 0,94$ $p < 0,001$). De acuerdo con esto, se podría presumir que en los tratamientos con mejores indicadores se generó mayor cantidad de ácidos orgánicos, que forman parte parcial de los CNF.

El aumento en los CNF también proviene de una mayor utilización de GC en la mezcla ensilada, el cual aumenta la cantidad de almidón adicionado. El contenido de almidón total mostró diferencias ($p < 0,001$) entre los tratamientos ensilados, con aumento significativo ($p < 0,001$) de 7,61 puntos por cada incremento de 15 % de GC, de acuerdo con la ecuación de regresión [Almidón total = $0,51(x) - 0,49$]. El tratamiento con 45 % de GC fue el de mayor contenido de almidón total (tabla 3). El almidón es el compuesto principal en los frutos de GC, cuando están inmaduros, según señala López-Herrera (2019). Por tanto, al incrementarse la cantidad de GC, aumenta el almidón en los ensilados.

El almidón preservado durante el ensilaje se puede transformar en propionato en el rumen, por lo que su incremento podría influir de manera positiva en la productividad de los rumiantes (Owens y Basalan, 2016). Se debe considerar que existen pérdidas de almidón durante el ensilaje, ya que la amilasa bacteriana se puede mantener activa, inclusive hasta el día 56 de ensilaje (Ning *et al.*, 2017). Sin embargo, es importante garantizar un adecuado balance de almidón en la dieta para evitar acidosis ruminal (Humer *et al.*, 2018). En este estudio, todos los tratamientos con GC poseen menos de 34 % de almidón, valor que es inferior al que informan Ferraretto *et al.* (2018) para ensilados de *Zea mays* L. No obstante, resulta mayor que el valor referido por Serbester *et al.* (2015), quienes trabajaron con ensilados de *Z. mays* y *Glycine max* (L.) Merr. A pesar de esto, los ensilados estudiados aquí tienen mayor contenido de proteína, lo que los convierte en un complemento nutricional de calidad para su uso en programas de alimentación destinados a ganado lechero. Los ensilados deben estar balanceados para prevenir la fermentación de grandes cantidades de almidón en el rumen, que podría predisponer a acidosis ruminal (Zebeli *et al.*, 2010).

El contenido mineral (cenizas) demostró diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,001$) cuando se utilizó GC. El contenido de cenizas se redujo conforme aumentó la cantidad de GC. La

ecuación de regresión [Cenizas = $-0,32(x) + 28,4$] señala que la reducción en la concentración de las cenizas sucede a razón de 4,8 puntos porcentuales por cada incremento de 15 % en la cantidad de GC. De este modo, el tratamiento con 45 % de GC fue el que presentó menor concentración, para 13,8 % de MS (tabla 3).

La reducción que se encontró en el contenido de cenizas coincide con los resultados obtenidos por Rojas-Cordero *et al.* (2020), quienes informaron reducción en las cenizas cuando se incorpora GC en los ensilados. Montero-Durán (2016) indica que el GC posee 5 % de MS de cenizas, lo que explica su capacidad para reducir esta fracción. Por el contrario, Ramsuair *et al.* (2014) señalan que *T. gigantea* puede contener 26,7 % de MS en cenizas, de acuerdo con la edad de cosecha. Para estos autores, su aporte mineral es de calcio principalmente, lo que permite explicar los contenidos hallados con 0 % de GC.

Al disminuir la concentración en el contenido de cenizas, se obtienen dos efectos de importancia para el uso de estos materiales como complemento alimenticio. El primero se relaciona con la mejora en el aporte energético de los ensilados, ya que las cenizas carecen de dicho aporte (Carvalho *et al.*, 2016). Según Owens y Basalan (2016), la reducción de la ceniza aumenta la cantidad de materia orgánica que se fermenta en el rumen, y que aporta energía para la producción animal (tabla 4). El segundo efecto está relacionado con la reducción en la capacidad amortiguadora del forraje, que favorece una mejor conservación de los materiales en el silo (Borreani *et al.*, 2018). En este último caso, fue posible calcular una correlación entre el pH y las cenizas ($\rho = 0,97$ $p < 0,001$). Los datos expuestos en las tablas 2 y 3 apoyan este argumento. Los tratamientos con menor contenido de cenizas fueron los que presentaron mejores indicadores de fermentación.

Componentes de la pared celular y energía. La fibra en detergente neutro (FDN) de los ensilados mostró diferencias significativas ($p < 0,001$) por efecto de la inclusión de GC, siendo el tratamiento con 45 % de GC el que presentó menor contenido de FDN en comparación con el de 0 %, que fue el de mayor concentración (tabla 4). La reducción de la FDN sucede, como promedio, a razón de 5,7 puntos por cada incremento de 15 % de GC. La regresión lineal [FDN = $-0,38(x) + 36,4$] resultó significativa ($p < 0,001$) para la estimación de la FDN (tabla 4).

La reducción de la FDN es una tendencia que ha sido informada en otras investigaciones (Rojas-Cordero *et al.*, 2020). Esta reducción es favorable para el rumiante, ya

Tabla 4. Concentración de los componentes de la pared celular y energía de ensilados de *T. gigantea* con *Musa* sp.

<i>Musa</i> sp.	FDN, %	dFDN, %	Lignina, %	TND, %	EN _L , Mcal/kg MS
0	36,4 ^d	19,3 ^d	9,9 ^c	45,2 ^a	1,0 ^a
15	31,5 ^c	17,3 ^c	8,5 ^c	52,4 ^b	1,2 ^b
30	26,9 ^b	14,9 ^b	6,4 ^b	58,9 ^c	1,3 ^c
45	17,5 ^a	10,1 ^a	3,2 ^a	68,5 ^d	1,6 ^d
EE ±	0,792	0,446	0,275	0,802	0,020
Valor - P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

FDN: fibra en detergente neutro, dFDN: digestibilidad de la fibra en detergente neutro, TND: total de nutrientes digestibles, EN_L = energía neta de lactación
 Letras diferentes en la misma columna son diferentes (p < 0,05)

que se ha observado que altas cantidades de FDN reducen el consumo voluntario, lo que se debe a un llenado físico que provoca la distensión de las paredes del rumen (Souza, 2017). De este modo, es esperable que, al utilizar estos ensilados como complemento alimenticio, se estimule el consumo de MS. Sin embargo, se deben considerar como complemento, y no como la base en una dieta, debido a que poseen bajos contenidos de FDN, con moderada cantidad de almidón, sobre todo en los tratamientos con 30 % y 45 % de GC. Esto podría afectar la rumia, si no se balancea el consumo de fibra físicamente efectiva (Banakar *et al.*, 2018).

La lignina también mostró diferencias significativas (p < 0,001) entre tratamientos. Este compuesto disminuyó conforme aumentó la cantidad de GC, de modo tal que el tratamiento con 45 % de GC fue el que presentó menor concentración de lignina. La regresión calculada para estimar la reducción de la lignina fue significativa (p < 0,001). Por medio de la ecuación [Lignina=-0,13(x)+9,9] se pudo detectar que este compuesto disminuye, como promedio, a razón de 1,9 puntos por cada incremento de 15 % de GC. El descenso en el contenido de lignina lo provoca la concentración de este compuesto en el GC. Este comportamiento concuerda con el trabajo de Montero-Durán (2016), aunque es opuesto al que refieren López *et al.* (2017). En ambos casos, ello se debe a las diferencias que presentan los forrajes utilizados en este compuesto.

Los contenidos de lignina determinados en este estudio fueron mayores a los obtenidos por Roa y Galeano (2015), aunque menores que los informados por Ramsuair *et al.* (2014). Esto sugiere que el forraje utilizado se pudo cosechar a edades o alturas diferentes que el utilizado en las investigaciones citadas. Estas diferencias son importantes,

ya que se ha relacionado la cantidad de lignina con la digestibilidad de otros componentes de la pared celular (Banakar *et al.*, 2018). De acuerdo con Combs (2014), la digestibilidad de la fibra tiene mayor impacto en la productividad de los animales, si se compara con la digestibilidad de cualquier otro nutrimento.

Con respecto a lo anterior, Detmann *et al.* (2008) señalan que la dFDN depende de la concentración de fibra total, la concentración de lignina total y la relación de ambas en el material. Debido a esto, aunque es posible detectar diferencias significativas (p < 0,001) en la dFDN, con tendencia a disminuir la cantidad de dFDN conforme aumenta la cantidad de GC en el ensilado, no fue posible hallar diferencias significativas o tendencias en la dFDN [(dFDN/FDN) x 100]. Esto quiere decir que es similar la calidad de la FDN de los tratamientos. Sin embargo, como se ha indicado previamente, al utilizar estos materiales se debe balancear con otros recursos alimenticios que promuevan el consumo de fibra físicamente efectiva y prevengan la afectación de la rumia.

El contenido de energía en forma de TND o de energía neta de lactación (EN_L) mostró diferencias significativas (p < 0,001) entre los tratamientos. Se determinó que en el contenido de energía influyó directamente la cantidad de GC en los ensilados, de manera que el tratamiento con 45 % de GC fue el más energético. Las regresiones calculadas [TND=-0,5(x)+45,2] y [EN_L=-0,01(x)+0,99] fueron significativas (p < 0,001) y permitieron estimar que el aumento en el contenido energético ocurre a razón de 7,5 puntos de TND y 0,15 Mcal de EN_L, por cada incremento de 15 % de GC.

El incremento en el contenido energético de los ensilados se debe al aumento en la cantidad de GC

que se utilizó. Los frutos poseen mayor concentración de energía en comparación con *T. gigantea* (tabla 1). Este comportamiento es similar al determinado en otras investigaciones, donde se utilizó GC como aditivo para ensilaje (Montero-Durán, 2016; López *et al.*, 2019). Y esto se debe a que se hace sustitución de recursos forrajeros por GC con mayor energía (89,2 % TND).

A pesar del contenido energético de los tratamientos con 15 y 0 % de GC mostraron menor valor que los ensilajes de *Zea mays* L.- *Glycine max* (L.) Merr. estudiados por Serbester *et al.* (2015), aunque su contenido de proteína fue mayor. En tanto, los tratamientos con 30 y 45 % de GC presentaron un contenido energético similar que los ensilados informados por Serbester *et al.* (2015), con niveles de proteína comparables entre sí. Esto permite considerar los ensilados con GC como una alternativa efectiva para la suplementación del ganado lechero.

Conclusiones

Musa sp. demostró ser un aditivo con capacidad para mejorar el proceso de conservación del forraje de *T. gigantea*, con indicadores más favorables, ya que supone aumento en la materia seca y los carbohidratos no fibrosos del ensilado, sobre todo a niveles mayores de 30 %. Las mezclas presentaron características nutricionales adecuadas para su utilización como complemento alimenticio en dietas balanceadas para rumiantes. Se sugiere el desarrollo de investigaciones a mayor escala, que involucren el análisis del comportamiento y productividad animal.

Agradecimientos

Se agradece al Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA) de la Universidad de Costa Rica por su apoyo al proyecto de investigación «Evaluación de ensilajes de pastos y forrajeras con diferentes niveles de *Musa* sp. para la alimentación de rumiantes bajo normativa orgánica» y al desarrollo de esta investigación.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses entre ellos.

Contribución de los autores

- Daniel Rojas-Cordero. Realizó los experimentos en campo, el diseño y montaje de los experimentos, la toma y el procesamiento de datos, así como la redacción y los arreglos en el manuscrito.
- Andrés Alpízar-Naranjo. Realizó los experimentos en campo, el diseño y montaje de los experimentos, la toma y el procesamiento de datos,

así como la redacción y los arreglos en el manuscrito.

- Miguel Ángel Castillo-Umaña. Realizó los experimentos en campo, el diseño y montaje de los experimentos, la toma y el procesamiento de datos, así como la redacción y los arreglos en el manuscrito.
- Michael López-Herrera. Realizó los experimentos en campo, el diseño y montaje de los experimentos, la toma y el procesamiento de datos, así como la redacción y los arreglos en el manuscrito.

Referencias bibliográficas

- Alayon-Gamboa, J. A.; Jiménez-Ferrer, G.; Nahed-Toral, J. & Villanueva-López, G. Estrategias silvopastoriles para mitigar efectos del cambio climático en sistemas ganaderos del sur de México. *Agroproductividad*. 9 (9). <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/809>, 2016.
- Alpízar, A.; Camacho, María I.; Sáenz, C.; Campos, M. E.; Arece, J. & Esperance, M. Efecto de la inclusión de diferentes niveles de morera (*Morus alba*) en la calidad nutricional de ensilajes de sorgo (*Sorghum alnum*). *Pastos y Forrajes*. 37 (1):55-60. <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v37n1/pyf07114.pdf>, 2014.
- AOAC. *Official methods of analysis*. 6th ed., 4th rev. Gaithersburg, USA: AOAC International, 1998.
- Ball, S.; Bullock, S.; Lloyd, Linda; Mapp, Keeley & Ewen, A. *Analysis of carbohydrates, alcohols, and organic acids by ion-exchange chromatography*. USA: Agilent Technologies, Inc. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-8801EN%20Hi-Plax%20Compendium.pdf>, 2011.
- Banakar, P. S.; Anand Kumar, N. & Shashank, C. G. Physically effective fibre in ruminant nutrition. A review. *J. Pharmacogn. Phytochem*. 7 (4):303-308. <https://www.phytojournal.com/archives/2018/vol7issue4/PartF/7-3-580-454.pdf>, 2018.
- Borreani, G.; Tabacco, E.; Schmidt, R. J.; Holmes, B. J. & Muck, R. E. Silage review. Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *J. Dairy Sci*. 101 (5):3952-3979, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>.
- Callejo-Ramos, A. Conservación de forrajes. V. Fundamentos del ensilado. *Frisona española*. 223:70-78. <http://oa.upm.es/53336/>, 2018.
- Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Reynolds, C. K.; Kristensen, N. B. & Vuuren, A. M. van. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. *Animal*. 4 (7):1184-1196, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731110000911>.
- Carvalho, Walkíria G.; Costa, Kátia A. de P.; Epifanio, Patrícia S.; Perim, Rozana C.; Teixeira, D. A. A.

- & Medeiros, Lucilene T. Silage quality of corn and sorghum added with forage peanuts. *Rev. Caatinga*. 29 (2):465-472, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-21252016v29n224rc>.
- Combs, D. Using *in vitro* total-tract NDF digestibility in forage evaluation. *Focus on forage*. 15 (2):1-3. <https://fyi.extension.wisc.edu/forage/files/2016/02/TTNDFD-FOF.pdf>, 2014.
- Daniel, T. F. Synopsis of *Trichanthera* (Acanthaceae: Ruellieae: Trichantherinae). *Proc. Calif. Acad. Sci.* 62:1-23, 2015.
- Detmann, E. & Valadares-Filho, S. C. Sobre a estimação de carboidratos não fibrosos em alimentos e dietas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62 (4):980-984, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000400030>.
- Detmann, E.; Valadares-Filho, S.; Pina, D. S.; Henriques, L. T.; Paulino, M. F.; Magalhães, K. A. *et al.* Prediction of the energy value of cattle diets based on the chemical composition of the feeds under tropical conditions. *Anim. Feed Sci. Technol.* 143 (1-4):127-147, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2007.05.008>.
- Di-Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, Mónica G.; Gonzalez, Laura A.; Tablada, M. & Robledo, C. *InfoStat versión 2019*. Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.infostat.com.ar>, 2019.
- Ferraretto, L. F.; Shaver, R. D. & Luck, B. D. Silage review. Recent advances and future technologies for whole-plant and fractionated corn silage harvesting. *J. Dairy Sci.* 101 (5):3937-3951, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13728>
- Franzel, S.; Carsan, S.; Lukuyu, B.; Sinja, Judith & Wambugu, C. Fodder trees for improving livestock productivity and smallholder livelihoods in Africa. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 6:98-103, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2013.11.008>.
- Grant, R. J. & Ferraretto, L. F. Silage review. Silage feeding management: silage characteristics and dairy cow feeding behavior. *J. Dairy Sci.* 101 (5):4111-4121, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13729>.
- Humer, E.; Petri, R. M.; Aschenbach, J. R.; Bradford, B. J.; Penner, G. B.; Tafaj, M. *et al.* Practical feeding management recommendations to mitigate the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 101 (2):872-888, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13191>.
- IMN. *Datos climáticos. Periodo 1991-2018*. Heredia, Costa Rica: Estación Meteorológica Finca Experimental Santa Lucía, Universidad Nacional de Costa Rica. <https://www.imn.ac.cr/estaciones-automaticas>, 2020.
- Jiménez-Ferrer, G.; Mendoza-Martínez, G.; Soto-Pinto, L. & Alayón, A. Evaluation of local energy sources in milk production in a tropical silvopastoral system with *Erythrina poeppigiana*. *Trop. Anim. Health Prod.* 47 (5):903-990, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0806-7>.
- Kung, L. & Shaver, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis. *Focus on forage*. 3 (13). <https://fyi.extension.wisc.edu/forage/files/2016/10/Fermentation2.pdf>, 2001.
- López, M. *Degradabilidad in vitro del almidón en diferentes subproductos agrícolas e impacto sobre la producción de metano y parámetros de fermentación ruminal. Informe final del proyecto 739-B7-069*. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, 2019.
- López, M. *Degradabilidad in vitro del almidón en diferentes subproductos agrícolas e impacto sobre la producción de metano y parámetros de fermentación ruminal. Informe parcial del proyecto 739-B7-069*. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, 2017.
- López-Herrera, M. & Briceño-Arguedas, E. Efecto de la frecuencia de corte y la precipitación en el rendimiento de *Cratylia argentea* orgánica. *Nutr. Anim. Trop.* 10 (1):24-44, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.15517/nat.v10i1.24703>.
- López-Herrera, M.; Rojas-Bourrillon, A. & Zumbado-Ramírez, C. Características nutricionales y fermentativas de ensilados de pasto Camerún con plátano Pelipita. *Agron. Mesoam.* 28 (3):629-642, 2017. DOI: <https://doi.org/10.15517/ma.v28i3.25237>.
- López-Herrera, M. J.; Rojas-Bourrillon, A. & Briceño-Arguedas, E. Sustitución del pasto *Megathyrsus maximus* por guineo cuadrado y urea en mezclas ensiladas. *Agron. Mesoam.* 30 (1):179-194, 2019. DOI: <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.32478>.
- Montero-Durán, E. *Evaluación de las propiedades fermentativas, nutricionales y el costo de elaboración de ensilajes de poró (Erythrina poeppigiana) y cratylia (Cratylia argentea) con niveles crecientes de inclusión de guineo cuadrado (Musa sp.), para alimentación de rumiantes*. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Agronómica con énfasis en Zootecnia. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica, 2016.
- Ning, T.; Wang, H.; Zheng, M.; Niu, D.; Zuo, S. & Xu, C. Effects of microbial enzymes on starch and hemicellulose degradation in total mixed ration silages. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 30 (2):171-180, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0046>.
- NRC. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7th ed. USA: National Academy Press, 2001.
- Owens, F. N. & Basalan, M. Ruminant fermentation. In: D. D. Millen, M. D. B. Arrigoni and R. D. L. Pacheco, eds. *Rumenology*. Switzerland: Springer International Publishing, 2016.

- Poppi, D. P.; Quigley, S. P.; Silva, T. A. C. C. da & McLennan, S. R. Challenges of beef cattle production from tropical pastures. *R. Bras. Zootec.* 47:e20160419. <https://proceedings.science/imas/papers/challenges-of-beef-cattle-production-from-tropical-pastures?lang=en>, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/rbz4720160419>.
- Ramsumair, Ayanna; Mlambo, V. & Lallo, C. H. O. Effect of drying method on the chemical composition of leaves from four tropical tree species. *Trop. Agric., Trinidad.* 91 (3):179-186. https://www.researchgate.net/publication/264545539_Effect_of_drying_method_on_the_chemical_composition_of_leaves_from_four_tropical_tree_species#fullTextFileContent, 2014.
- Riascos-Vallejos, A. R.; Reyes-González, J. J. & Aguirre-Mendoza, L. A. Caracterización nutritiva de árboles del pie de monte amazónico, departamento del Putumayo, Colombia. *Cuban J. Agric. Sci.* 54 (2):257-265. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802020000200257&lng=es&tng=es, 2020.
- Roa, M. L. & Galeano, J. R. Calidad nutricional y digestibilidad *in situ* de ensilajes de cuatro leñosas forrajeras. *Pastos y Forrajes* 38(4): 431-440. <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v38n4/pyf07415.pdf>, 2015.
- Rojas-Cordero, D.; Alpizar-Naranjo, A.; Castillo-Umaña, M. Á. & López-Herrera, M. Efecto de la inclusión de *Musa* sp. en la conservación de *Morus alba* Linn. *Pastos y Forrajes.* 43 (3):210-219. <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v43n3/2078-8452-pyf-43-03-210.pdf>, 2020.
- Salazar-Murillo, Marcela M. & Granados-Chinchilla, F. Total starch in animal feeds and silages based on the chromatographic determination of glucose. *MethodsX.* 5:83-89, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.01.009>.
- Serbester, U.; Akkaya, M. R.; Yucel, C. & Gorgulu, M. Comparison of yield, nutritive value, and *in vitro* digestibility of monocrop and intercropped corn soybean silages cut at two maturity stages. *Italian J. Anim. Sci.* 14 (1), 2015. DOI: <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3636>.
- Sousa, D. O. de. *Alteração da digestibilidade da fibra para ruminantes. Efeitos sobre consumo, desempenho e ecossistema ruminal.* Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Pirassununga, Brasil: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidad de São Paulo, 2017.
- Van Soest, P. J.; Robertson, J. B. & Lewis, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74 (10):3583-3597, 1991. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
- WHO. pH in drink water. In: *Guidelines for drinking-water quality.* Vol. 2 Health criteria and other supporting information. 2nd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/38551>, 2003.
- Zebeli, Q.; Mansmann, D.; Steingass, H. & Ametaj, B. N. Balancing diets for physically effective fibre and ruminally degradable starch: A key to lower the risk of sub-acute rumen acidosis and improve productivity of dairy cattle. *Liv. Sci.* 127 (1):1-10, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.09.003>.