

## Concentración de metano ruminal en *Bos primigenius taurus* Linnaeus: modelo de medición *in vitro*\*

Elsa Beatriz Tequín-Ocampo<sup>1</sup>, Julio Ernesto Vargas-Sánchez<sup>2</sup>, William Narváez-Solarte<sup>3</sup>

### Resumen

**Objetivo:** utilizar la cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC FID) para establecer un protocolo de cuantificación de la producción *in vitro* de metano presente en el fluido ruminal de *Bos taurus*. **Metodología:** para establecer el protocolo de cuantificación de la producción *in vitro* de metano presente en el fluido ruminal de *Bos taurus*, se procedió con la estandarización del método de análisis cromatográfico para la cuantificación del CH<sub>4</sub>, siguiendo los siguientes pasos: a) creación de las condiciones del método, b) preparación de las concentraciones del estándar, c) creación de la curva de calibración d) reconocimiento del tiempo de retención y e) aplicación del método. **Resultados.** En cuanto a los resultados de la aplicación del método se tiene que el coeficiente de variación fue inferior al 15%, establecido por normas internacionales y descrito como límite para la adecuada validación de un procedimiento analítico; indica que el grado de concordancia obtenido a partir de las réplicas de la muestra es alto y los análisis son repetibles. **Conclusión:** los niveles de metano pueden aumentar o disminuir dependiendo de la dieta que se proporciona al *Bos Taurus*; en este sentido, si se realiza una correcta aplicación de los protocolos, la técnica permite cuantificar de forma efectiva, confiable y reproducible la cantidad de gas metano producido de forma *in vitro*.

**Palabras clave:** biogás; emisiones de metano; rumen; HPLC.

## Ruminal methane concentration in *Bos primigenius taurus*: *in vitro* measurement model

### Abstract

**Objective:** To use gas chromatography with a flame ionization detector (GC FID) to establish a protocol for quantification of the *in vitro* production of methane present in the ruminal fluid of *Bos taurus*. **Methodology:** To establish the protocol for the quantification of the *in vitro* production of methane present in the ruminal fluid of *Bos taurus*. The standardization of the chromatographic analysis method for the quantification of CH<sub>4</sub> was carried out following the following steps: a) creation of the of the method conditions; b) preparation of the standard concentrations; c) creation of the calibration curve; d) recognition of the retention time;

\*FR: 4-II-2021. FA: 25-II-2021.

<sup>1</sup> Magíster en Química. Lic. Biología y Química. Instituto Chipre, Manizales, Colombia. E-mail: elsateoca@hotmail.com.

 [orcid.org/0000-0002-6415-2367](https://orcid.org/0000-0002-6415-2367) **Google Scholar**

<sup>2</sup> Doctor, MVZ. Profesor Departamento de Producción Agropecuaria, Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia. E-mail: jvargas@ucaldas.edu.co.

 [orcid.org/0000-0001-9126-3452](https://orcid.org/0000-0001-9126-3452) **Google Scholar**

<sup>3</sup> Doctor, Zootecnista. Profesor Departamento de Salud Animal, Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia, Grupo de Investigación en Nutrición, Metabolismo y Seguridad Alimentaria. E-mail: wnarvaez@ucaldas.edu.co.

 [orcid.org/0000-0003-4698-3818](https://orcid.org/0000-0003-4698-3818) **Google Scholar**



### CÓMO CITAR:

Tequín-Ocampo, E. B., Vargas-Sánchez, J. E. Y Narváez-Solarte, W. (2021). Concentración de metano ruminal en *Bos primigenius taurus* Linnaeus: modelo de medición *in vitro*. *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. U. de Caldas*, 25(2):79-89. <https://doi.org/10.17151/bccm.2021.25.2.6>



and e) application of the method. **Results:** Regarding the results of the application of the method, the coefficient of variation was less than 15% established by international standards and described as a limit for the adequate validation of an analytical procedure. This indicates that the degree of concordance obtained from the sample replicates is high and the analyzes are repeatable. **Conclusion:** Methane levels can increase or decrease depending on the diet provided to *Bos Taurus*. In this sense, if a correct application of the protocols is carried out, the technique allows quantifying in an effective, reliable and reproducible way the amount of methane gas produced *in vitro*.

**Key words:** biogas; methane emissions; rumen; HPLC.

## Introducción

Al proceso de mantener el calor cerca de la superficie de la tierra, se le conoce como efecto invernadero. El metano ( $\text{CH}_4$ ), forma parte de los gases que provocan tal efecto, junto con el bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), que constituye la mayor proporción, el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), los hidrofluorocarbonados (HFC), los perfluorocarbonados (PFC) y el hexafluoruro de azufre ( $\text{SF}_6$ ). Estos gases son moléculas con dos o más átomos que se mantienen unidos con suficiente espacio entre sí para poder vibrar cuando absorben calor y de esta manera liberar radiación, la cual puede ser absorbida por otra molécula y generar el efecto invernadero. Aunque el  $\text{CH}_4$  se encuentra en menor concentración con respecto al  $\text{CO}_2$ , su capacidad de producir dicho efecto es de 21 a 30 veces mayor (Benaouda et al., 2017).

La agricultura y la producción pecuaria contribuyen ampliamente a las emisiones antropogénicas de  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  y  $\text{N}_2\text{O}$  a la atmósfera, destacándose la explotación bovina como la de mayor impacto. Según Steinfeld et al. (2009), estos animales son responsables del 18% de las emisiones de los gases de efecto invernadero (GEI) que emite el 9% del total del  $\text{CO}_2$  y el 37% de las emisiones de  $\text{CH}_4$ ; este último, equivalente a 104 millones de toneladas por año, provenientes de la fermentación entérica y del estiércol. Como alternativa de solución a esta problemática, se vislumbra el establecimiento de sistemas de producción sostenible, con raciones balanceadas y compuestas por ingredientes que reduzcan la producción de GEI, principalmente, que aumenten la digestibilidad de los carbohidratos en el rumen y, por ende, que disminuyan la metanogénesis (Bonilla-Cárdenas & Lemus, 2012; Carmona et al., 2005; Apráez-Guerrero et al., 2016).

El desarrollo de estrategias que mitiguen las emisiones de  $\text{CH}_4$  generadas por el *Bos taurus*, requiere que tales emisiones sean cuantificadas bajo un amplio rango de circunstancias. Esto implica diseñar estrategias experimentales basadas en el análisis cuantitativo de dichas emisiones con la ayuda de técnicas de medición como la espectrometría infrarroja, la cromatografía de gases, la espectroscopia de masa y la técnica de diodo laser. Para medir la cantidad de GEI, el animal debe permanecer en

una cámara respiratoria, la cual es una gran caja transparente, prácticamente sellada excepto por un flujo de aire fresco, en la cual se muestrea el contenido de  $\text{CH}_4$  en el aire que sale de ella. Los investigadores han propuesto otras mediciones, como los modelos matemáticos; sin embargo, los resultados de estos son inexactos debido a que durante el desarrollo experimental se ignoran variables tan importantes como la producción de ácidos grasos volátiles y el balance de carbono en cada una de las ecuaciones planteadas (Carmona et al., 2005); ante este problema surgen como alternativa las técnicas de producción de gases *in vitro*, usando como modelo el rumen artificial.

Las técnicas de producción de gases *in vitro*, usando como modelo el rumen artificial, son una opción para el estudio de la cinética de fermentación y producción de GEI en el rumen de *Bos Taurus*, de una manera rápida, precisa y económica. Estas simulan, a escala mínima y de manera acertada bajo condiciones controladas, los procesos naturales de la digestión ruminal y de la producción de gases (Rymer et al., 2005). Además, permiten determinar la extensión y la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou et al., 1994). Su principal ventaja radica en que el curso de la fermentación y el papel de los componentes solubles del sustrato pueden ser cuantificados a través de un método analítico, aun desde las primeras horas de incubación (Pell et al., 1997; Posada & Noguera, 2005; Posada et al., 2006).

Un método analítico, antes de ser puesto en práctica, debe ser estandarizado. Esto implica alcanzar buenos resultados al analizar el objeto de estudio mediante el procedimiento de una técnica, con características de confiabilidad y efectividad a la hora de utilizarlo. Además, debe permitir su validación con otros métodos. La estandarización puede variar en cuanto al analito a ser estudiado, a los parámetros a manejar y al grado de experimentación que se pueda tener para variar las condiciones en el momento indicado, dependiendo de los resultados esperados (Aguirre et al., 2001). Para estandarizar un método se deben tener en cuenta los parámetros de precisión, exactitud, linealidad, rango de trabajo, límite de detección y límite de cuantificación.

La precisión se expresa en términos de concordancia, o sea, que el análisis de la muestra presente los aspectos de repetitividad y reproducibilidad; entendida la primera como los resultados obtenidos a partir de los factores experimentales que los modifican; mientras que la segunda hace referencia a la efectividad de la técnica. La exactitud es la proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. La linealidad es la habilidad del procedimiento analítico de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra. El rango es el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito, para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito (Eurachem, 1988). El límite de detección,

es la cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Y finalmente, el límite de cuantificación, se entiende como la cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable (International Union of Pure and Applied Chemistry, 2014).

Teniendo en cuenta que el éxito de la medición del metano liberado durante la fermentación ruminal depende de la disponibilidad de técnicas de medición confiables y precisas, la presente investigación tiene como objetivo utilizar la cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC FID) para establecer un protocolo de cuantificación de la producción in vitro de metano presente en el fluido ruminal de Bos Taurus.

## **Materiales y Métodos**

La investigación se desarrolló en los laboratorios de Nutrición Animal y de Cromatografía de la Universidad de Caldas, Colombia. Para establecer el protocolo de cuantificación de la producción in vitro de metano presente en el fluido ruminal de Bos Taurus, se procedió con la estandarización del método de análisis cromatográfico para la cuantificación del CH<sub>4</sub>, siguiendo los siguientes pasos: a) creación de las condiciones del método, b) preparación de las concentraciones del estándar, c) creación de la curva de calibración d) reconocimiento del tiempo de retención y e) aplicación del método.

Creación de las condiciones del método. Se realizaron los cambios de volumen de inyección de la dilución entre el soluto y el solvente, en este caso el CH<sub>4</sub> y el CO<sub>2</sub>, respectivamente, hasta establecerlo en 200µl, con un flujo constante de 1mL/min y programación del horno con isoterma a 80°C durante 5 min, seguido de una temperatura post-corrída de 100°C durante un minuto.

Preparación de las diferentes concentraciones de estándar. Se utilizó CH<sub>4</sub> al 99% de pureza, se tomó un volumen de 250 mL y se depositó en un recipiente plástico hermético con vacío. De este volumen, se tomaron diferentes volúmenes para nuevas diluciones con CO<sub>2</sub> que conformaron los puntos de la curva.

Creación de la curva de calibración. En sendos recipientes plásticos herméticos con vacío, se inyectó el mismo día y por triplicado, los volúmenes establecidos de la dilución CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en la fase anterior, correspondientes a concentraciones de 2, 4, 6, 8, 10, 15, y 20%, los cuales entraron a conformar los puntos de la curva de calibración.

Reconocimiento del tiempo de retención. Del cilindro que contenía el CH<sub>4</sub> a una pureza de 99,999% de 1 m<sup>3</sup> de volumen se tomó la muestra en tubo vacutainer para diluirlo con CO<sub>2</sub>. De esta dilución se tomaron 100µl los cuales se inyectaron, con una jeringa Pressure-Lok® serie A2 de 1 mL, en un cromatógrafo Hewlett Packard 6890 Serie II equipado con detector de ionización de llama y una columna empacada, modelo GS-AL/KCl marca Agilet, de 50m de largo 0,53 mm de diámetro, con fase móvil de nitrógeno al 99,995% de pureza para hacer el reconocimiento del estándar y, posteriormente, establecer el tiempo de retención, considerando para esto la mejor resolución en el menor tiempo posible (Makkar y Vercoe, 2007).

### Aplicación del método

Preparación de las muestras. Las muestras de CH<sub>4</sub> que se analizaron se produjeron por simulación de la fermentación ruminal utilizando fermentadores *in vitro*. Estos fermentadores o botellas contenían el medio de cultivo, el inoculo y el sustrato.

Medio de cultivo. Todos los medios en uso tuvieron en común: tampón de bicarbonato y fosfato, un agente reductor, una fuente de nitrógeno, varios minerales y un indicador de potencial redox. La solución de minerales que contenía el medio de cultivo estuvo compuesta por 9,53 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O, 2,2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0,6 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 132 g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 100g/L MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 10g/L CoCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O y 80 g/L FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O). Como solución tampón se utilizó una mezcla de 4g/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> y 35g/L de NaHCO<sub>3</sub>. El indicador de potencial redox usado fue la rezasurina 0,01g/L y como agente reductor se usaron 625mg de HCl cisteína, 95ml de agua destilada, 4 mL de NaOH 1M y 625mg de Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O). Estas soluciones se diluyeron de la siguiente manera: los macrominerales en 500mL de agua destilada, los microminerales en 200mL de agua destilada, la solución tampón en 200mL de agua destilada, la solución indicadora en 1 mL de agua destilada. Las soluciones anteriormente citadas se mezclaron, seguidamente se aforaron al volumen de un litro, y finalmente se agitó la mezcla para ser saturada con CO<sub>2</sub> durante 2 horas (Mauricio et al., 2001).

Inóculo. Este inóculo, rico en bacterias, consistió en líquido ruminal obtenido de bovinos *Bos primigenius taurus* con ruminotomía, pertenecientes a la Granja Tesorito de la Universidad de Caldas. Este líquido se recolectó antes de la alimentación de los animales, para garantizar una mayor consistencia en su composición. El inóculo fue transportado al laboratorio en el menor tiempo posible y en termos para mantener la temperatura.

Sustrato. Es el alimento al cual se le desea cuantificar el CH<sub>4</sub> de la fermentación. Para el presente caso se utilizó muestras de pasto Rye grass (*Lolium perenne*),

gramínea procedente de la granja Tesorito de la Universidad de Caldas, la cual fue secada y molida en partículas finas previo a ser llevada a las botellas de fermentación. Las botellas con el medio de cultivo y el sustrato se inocularon, según corresponde, con 5 ml de líquido ruminal, usando una jeringa graduada. Posteriormente fueron selladas, agitadas rápidamente y transferidas a una estufa que se mantuvo a 39°C. Para analizar la reproducibilidad de las muestras, se prepararon diez fermentadores artificiales bajo las mismas condiciones de: medio de cultivo, inóculo y sustrato; y se prepararon tres fermentadores adicionales con estándar al 10% como blanco. En estos se efectuó la fermentación durante 18 horas, para enseguida obtener las muestras de cada fermentador por triplicado en tubos vacutainer®. Todas las muestras se analizaron por duplicado, con el mismo método, por la misma persona y en el mismo día.

**Tabla 1.** Medidas de la concentración de metano para coeficiente de variación

Repeticiones	Concentración de metano en %
1	12,813
2	12,440
3	14,823
4	11,946
5	13,571
6	12,624
7	13,090
8	12,654
9	13,917
<b>Promedio</b>	13,097
<b>Desviación estándar</b>	0,8756
<b>Coficiente de variación %</b>	6,6856

Fuente: Esta investigación.

## Resultados y Discusión

Curva de calibración. Para la estandarización de la técnica se consideró que las muestras del líquido ruminal a analizar contenían concentraciones de metano entre el 10 y 17% (Bonilla-Cárdenas et al., 2012). En la determinación de los parámetros de los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) se utilizó el método basado en la extrapolación de la recta calibrado a concentración cero (Arias y Gil, 2012). El intercepto en “Y” permitió obtener un valor de YLD tomado del intercepto más tres veces el valor de la desviación estándar del blanco (SB) como se presenta en la Ecuación 1; mientras que el LC se determinó con los mismos parámetros, pero con el intercepto en “Y” más diez veces el valor del SB, como descrito en la Ecuación 2 (Tabla 2)

### Ecuación 1.

$$(LC) = \frac{Y_{bl} + (10 * S_{bl})}{b * \sqrt{n}}$$

### Ecuación 2.

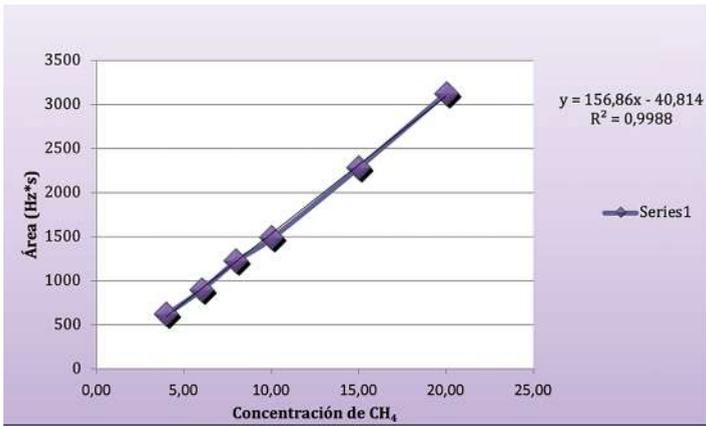
$$(LC) = \frac{Y_{bl} + (3 * S_{bl})}{b * \sqrt{n}}$$

**Tabla 2.** Datos curva de calibración *in vitro* de líquido ruminal

Concentración CH <sub>4</sub> (%)	Área (Hz*s)
4,00	618,96588
6,00	896,69901
8,00	1225,7395
10,00	1480,6084
15,00	2285,3428
20,00	3130,0872

Fuente: Esta investigación

El coeficiente de correlación de 0,9988 indica alta correlación entre la concentración de metano y el área obtenida. La precisión del método se evaluó con la desviación estándar y el coeficiente de variación de las lecturas realizadas al estándar del 15% de metano, punto de la curva tomado por ser el valor más cercano a las concentraciones referenciadas en las muestras.



**Figura 1.** Curva de calibración de metano en líquido rumial desde 2 al 20% in vitro  
Fuente: Esta investigación.

Como se aprecia en la Tabla 2, la cantidad mínima de analito detectable (LD) es de 0,69% de metano y el LC es de 2,3%. Valores adecuados para el nivel de concentración de las muestras analizadas debido a que presentan cantidades altas de CH<sub>4</sub> (10% a 17%).

El coeficiente de variación de 1,94% del estándar al 15% de metano, demuestra baja dispersión en las lecturas de los valores de área (Tabla 3). En los análisis cromatográficos de inyección manual, se aceptan como normales los coeficientes de variación que no superen el 5% (Coy, 2006); por lo tanto, el valor del coeficiente de variación obtenido, indica que el grado de concordancia obtenido a partir de las réplicas de la muestra es alto y los análisis son repetibles (Arias y Gil, 2012).

**Tabla 3.** Modelo utilizado para la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero

	Pendiente	Intercepto		
<b>m</b>	156,8623637	-40,8143539	b	y <sub>B</sub>
<b>S<sub>m</sub></b>	2,709760022	32,081392	s <sub>b</sub>	
<b>R<sup>2</sup></b>	0,998807754	36,30471716	s <sub>y/x</sub>	s <sub>B</sub>
<b>Y<sub>LD</sub></b>	68,09979758			
<b>L.D</b>	0,694329404			

$Y_{LQ}$	322,2328177
<b>L.Q</b>	2,314431346
<b>n</b>	6
<b>k</b>	5
<b>Promedio y</b>	1606,240465
$\Sigma(xi - promedio x)^{2=}$	179,50
<b>Lectura (Y)</b>	
<b>Concentración (X)</b>	0,260192139
$S_x$	0,225678971
$t_{n-2}$	2,02
$ts_x$	0,455871521
$x \pm ts_x$	

Fuente: Esta investigación.

En cuanto a los resultados de la aplicación del método se tiene que el coeficiente de variación fue inferior al 15%, establecido por normas internacionales y descrito como límite para la adecuada validación de un procedimiento analítico (De Silva et al., 2003). El coeficiente de variación del 1,9% se logró por medio de la preparación de estándares al 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 20% de metano. Los resultados revelaron homogeneidad entre las repeticiones y un valor de la desviación estándar aceptable, lo cual es indicativo de una buena preparación de los estándares y de la calibración del equipo. No obstante estos indicadores estadísticos, la heterogeneidad de los resultados de las mediciones en las muestras fue mayor y presentó un coeficiente de variabilidad de 6,7%, sugiriendo la existencia de una fuente de variabilidad no controlada. Para el caso específico, es posible que esa fuente de variabilidad haya estado direccionada al error biológico generado en la toma de la muestra del líquido ruminal y en la cantidad de microorganismos inoculados en las botellas (Rymer et al., 2005).

**Tabla 4.** Índices estadísticos del estándar (metano al 15%) para el análisis del CH<sub>4</sub> en la fermentación de líquido ruminal *in vitro*

Réplica	Área
1	2329,21924
2	2348,78271
3	2380,41012
4	2258,63037
5	2312,05518
<b>Promedio</b>	2325,81952
<b>Desviación estándar</b>	45,3399335
<b>Coefficiente de variación (%)</b>	1,94941753

Fuente: Esta investigación.

## Conclusión

La optimización del método de cuantificación de la concentración de metano en líquido ruminal, adelantada en esta investigación, permite disponer de una técnica para cuantificar de forma efectiva, confiable y reproducible la cantidad de gas metano producido de forma *in vitro*, siempre y cuando se sigan de manera correcta los protocolos.

## Referencias bibliográficas

- Aguirre, L., Pérez, A., Pujol, M. (2001). Validación de métodos analíticos. Barcelona, España: Ed. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria.
- Apráz-Guerrero, J., Delgado-Jurado, D., Solarte-Portilla, C. (2016). Evaluación *In vitro* de la producción de metano en variedades de pastos neozelandeses del altiplano de Nariño. *Veterinaria y Zootecnia*, 10(2), 90-105. <http://vip.ucaldas.edu.co/vetzootec/downloads/v10n2a08.pdf>
- Arias, A. M. y Gil, D. M. (2012). Estandarización de la técnica cromatografía de gases capilar para la identificación y cuantificación de fitosterol en semillas de *Luffa cylindrica* (Tesis de pregrado). Escuela de Química, Facultad de Tecnología, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
- Benaouda, M., González, M., Molina, L. y Castelán, O. (2017). Estado de la investigación sobre emisiones de metano entérico y estrategias de mitigación en América Latina. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(4), 965-974. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i4.20>
- Bonilla-Cárdenas, J., Lemus-Flores, C., Montañó-Gómez, M. F., González-Viscarra, V., Ly-Carmenatti, J. (2012). Fermentación ruminal, digestibilidad y producción de metano en ovinos alimentados con cuatro niveles de rastrojo de maíz. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(3), 499-509. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93924624003>
- Bonilla-Cárdenas y J., Lemus, C. (2012). Emisión de metano entérico por rumiantes y su Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. Revisión. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 3(2), 215-246. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v3n2/v3n2a6.pdf>

- Carmona, J., Bolívar, D., Giraldo, L. (2005). El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Rev Col Cienc Pec*, 18(1), 49–63. <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v18n1/v18n1a06.pdf>
- Coy, G. A. (2006). Estandarización de métodos analíticos. Bogotá, Colombia: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial – Subdirección de hidrología – Programa de fisicoquímica ambiental. [http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38152/Estandarizacion\\_metodos\\_analaticos.pdf/934bd941-dd47-4501-8507-d2721ef4f316](http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38152/Estandarizacion_metodos_analaticos.pdf/934bd941-dd47-4501-8507-d2721ef4f316)
- De Silva, B., Smith, W., Weiner, R., Kelley, M., Smolec, J., Lee, B., . . . Celniker, A. (2003). Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. *Pharmaceutical research*, 20(11), 1885–1900. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000003390.51761.3d>
- International Union of Pure and Applied Chemistry. (2014). Compendium of Chemical Terminology, Gold Book. Versión 2.3.3. [https://www.academia.edu/37293002/Compendium\\_of\\_Chemical\\_Terminology](https://www.academia.edu/37293002/Compendium_of_Chemical_Terminology)
- EURACHERM. (1988). Métodos analíticos adecuados a su propósito. Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (J. Guardado-Pérez y F. Mercader-Trejo, Trads.). LGC (Teddington) <http://www.eurachem.ul.pt/guides/valid.pdf>
- Makkar, H. y Vercoe, P. (Eds). (2007). Measuring Methane Production From Ruminants. IAEA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6133-2>
- Mauricio, R. M., Owen, E., Mould, F. L., Givens, I., Theodorou, M. K., France, J., Davies, D., Dhanoa, M. S. (2001). Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an *in vitro* gas production technique for evaluating forages. *Animal Feed Science and Technology*, 89(1-2), 33–48. [http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401\(00\)00234-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00234-0)
- Pell, A. N., Doane, P. H., Schofield, P. (1997). *In vitro* digestibility and gas production. Simposio sobre Tópicos Especiais em Zootecnia, Lavras, MG.
- Posada, S. L., Noguera, R., Bolívar, D. (2006). Relación entre presión y volumen para la implementación de la técnica *in vitro* de producción de gases en Medellín, Colombia. *Rev Colom Cienc Pecua*, 19(4), 407–414. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-06902006000400006&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902006000400006&lng=en&nrm=iso)
- Posada, S. L. y Noguera, R. R. (2005). Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*. 17. <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>
- Rymer, C., Huntington, J., Williams, B., Givens, D. (2005). *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124, 9–30. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.055>
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., Haan, C. (2009). La larga sombra del ganado. Problemas ambientales y opciones. Roma, FAO. <http://www.fao.org/3/A0701S/a0701s.pdf>
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3–4), 185–197. [http://dx.doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](http://dx.doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)