


Concentraciones de nutrientes, digestibilidad *in vitro* y fermentación ruminal de residuos agroindustriales de *Cannabis sativa* L. como fuente potencial de forraje para rumiantes



Elia Esther Araiza-Rosales ^a

Esperanza Herrera-Torres ^b

Francisco Óscar Carrete-Carreón ^c

Rafael Jiménez-Ocampo^d

Daniel Gómez-Sánchez ^e

Gerardo Antonio Pámanes-Carrasco ^{f*}

^a Universidad Juárez del Estado de Durango. CONACYT. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Carretera Durango-Mezquital km 11.5, Durango, Dgo. México.

^b Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana. México.

^c Universidad Juárez del Estado de Durango. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

^d Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México.

^e Instituto de Investigación del Aprovechamiento de la *Cannabis sativa*. México.

^f Universidad Juárez del Estado de Durango. CONACYT. Instituto de Silvicultura e Industria de la Madera. México.

* Autor de correspondencia: gerardo.pamanes@gmail.com

Resumen:

Este estudio tuvo como objetivo determinar la concentración de PC, EE, CNS, fibras, CFT, TC, CBD, THC, digestibilidad *in vitro* de materia seca y parámetros de fermentación ruminal

de residuos agroindustriales de *Cannabis sativa* L. de dos procesos extractivos de cannabinoides, como fuente potencial de forraje en la alimentación de rumiantes. La flor de *Cannabis sativa* se expuso al proceso de extracción por prensado en frío (CPF) y extracción alcohólica (CEA); los residuos vegetativos obtenidos después de las extracciones se compararon con la flor cruda como testigo (FCC) utilizando un diseño completamente al azar y la prueba de Tukey para la comparación de medias. Los procesos extractivos disminuyeron el EE, CFT y cannabinoides (CBD y THC). En contraste, las fibras, CNS y digestibilidad, aumentaron después de los procesos extractivos en CPF y CEA. Del mismo modo, la degradabilidad *in vitro* aumentó después de ambos procesos extractivos por encima del 120 %, así como el período de latencia. Además, los protozoos aumentaron con CPF, pero no se observaron cambios en CEA. Asimismo, no se observaron cambios en las bacterias celulolíticas en CPF y CEA. Sin embargo, las bacterias totales se redujeron después de ambas extracciones. Además, el N-amoniaco en las fermentaciones ruminales disminuyó con CPF y CEA, mientras que los ácidos grasos volátiles totales aumentaron. Además, la producción de gas aumentó por encima del 75 % en CPF y CEA; sin embargo, no se observaron cambios en el período de latencia. Además, la producción de metano y CO₂ aumentó por encima del 80 y 60 %, respectivamente, para CPF y CEA; estos aumentos se asocian positivamente con mejoras en las fermentaciones ruminales. En conclusión, el residuo agroindustrial de *Cannabis sativa* L. obtenido después de los procesos extractivos analizados puede surgir como una fuente potencial de forraje en la alimentación de rumiantes.

Palabras clave: Cáñamo, Metano, Degradabilidad, Fermentación Ruminal, Cinética de producción de gas.

Recibido: 06/04/2022

Aceptado: 04/11/2022

Introducción

La aceptación general y la perspectiva regulatoria con respecto a los cultivos de *Cannabis* spp. han cambiado en los últimos años. Esta planta ya no se trata sólo como una fuente de agentes psicotrópicos; los compuestos biológicos se han centrado en enfoques terapéuticos con éxito⁽¹⁾. De hecho, el cannabidiol (CBD) y el tetrahidrocannabinol (THC) son los principales compuestos bioactivos contenidos en la planta; estos compuestos se sintetizan principalmente en la flor y las hojas⁽²⁾. Debido a esto último, la industria farmacéutica ha estado tratando de actualizar y purificar los compuestos extractivos de *Cannabis* spp. para su

uso en medicamentos y drogas^(1,3). De hecho, algunos cultivos de *Cannabis* sp. se han utilizado como proveedores de cáñamo para la industria textil⁽⁴⁾, para la producción de biocombustibles⁽⁵⁾ y como componente en la industria automotriz⁽⁶⁾. Además, algunos ganaderos utilizan semillas como aditivos en la alimentación animal⁽⁷⁾. Sin embargo, los métodos extractivos de compuestos bioactivos de la planta generan residuos agrícolas que pueden contener concentraciones mínimas de cannabinoides pero contenidos considerables de fibra, celulosa y hemicelulosa; estos contenidos pueden surgir como una importante fuente de forraje en la alimentación animal, principalmente rumiantes. La información a nivel mundial sobre la producción y plantaciones de *Cannabis* sp. es limitada debido a las características legales. Sin embargo, informes del USDJ afirmaron que la producción de cáñamo alcanzó las 10,000 ton en México en 2006; a pesar de que las plantaciones de más de 31,000 ha fueron erradicadas⁽⁸⁾. En consecuencia, una creciente producción de *Cannabis* sp. para la extracción de cannabinoides con fines médicos puede representar una expansión sustancial de residuos agrícolas que potencialmente pueden utilizarse como fuente de forraje en la alimentación de rumiantes⁽⁹⁾. Sin embargo, la información publicada sobre el valor nutricional de los subproductos del cáñamo en la nutrición animal es limitada. Además, este estudio tuvo como objetivo determinar la concentración de proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE), carbohidratos no estructurales (CNS), fibras, compuestos fenólicos totales (CFT), taninos condensados (TC), cannabidiol (CBD), delta-9-tetrahidrocannabinol (THC), digestibilidad *in vitro* de materia seca y parámetros de fermentación ruminal de residuos agroindustriales de *Cannabis sativa* L. de dos procesos extractivos de cannabinoides como fuente potencial de forraje en la alimentación de rumiantes.

Material y métodos

Área de estudio

Este estudio se llevó a cabo en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Juárez del Estado de Durango, ubicada en Durango, México.

Ingredientes y material vegetativo

Todo el material vegetativo fue donado por el IIAC (Instituto de Investigación y Aprovechamiento del Cannabis) ubicado en Durango, México. La flor de *Cannabis sativa* L. se procesó mediante dos métodos de extracción, los cuales se realizaron por el IIAC.

Brevemente, muestras de la flor de *Cannabis sativa* L. se prensaron en frío para la obtención de aceite; el proceso no superó los 35 °C y no se utilizaron disolventes. Los residuos obtenidos después del prensado en frío se nombraron CPF debido a la torta de flor de *Cannabis sativa* L. prensada en frío obtenida. Por otro lado, otras muestras de la flor de *Cannabis sativa* L. se expusieron a una extracción alcohólica, que se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 5 h. Posteriormente, el subproducto o residuo se obtuvo filtrando el disolvente; este tratamiento se denominó CEA (extracción alcohólica de torta de flor de *Cannabis sativa* L.). Así, utilizando flor cruda de *Cannabis sativa* L. (FCC) como testigo, se comparó con residuos agroindustriales obtenidos después de los procesos extractivos. Posteriormente, las muestras de residuos agroindustriales de *Cannabis sativa* L. se secaron en un horno de aire forzado (Felisa, Modelo FE-294AD) a 55 °C durante 48 h y se molieron en un molino (Thomas Wiley Miller Lab, Modelo 4) a un tamaño de partícula de 1 mm. En consecuencia, las muestras se almacenaron para su posterior análisis.

Composición química

Las muestras se analizaron para materia seca (MS), extracto etéreo (EE), proteína cruda (PC) y cenizas de acuerdo con procedimientos estandarizados⁽¹⁰⁾. La celulosa, la hemicelulosa, la fibra detergente neutro (FDN), la fibra detergente ácido (FDA) y la lignina detergente ácido (LDA) se evaluaron de acuerdo con lo propuesto por Van Soest *et al*⁽¹¹⁾. Los carbohidratos no estructurales (CNS) se estimaron con la siguiente ecuación:

$CNS = 100 - (PC + EE + FDN + C)$; donde CNS= carbohidratos no estructurales (% MS); PC= proteína cruda (% MS); EE= extracto etéreo (% MS); FDN= fibra detergente neutro (% MS); C= cenizas (% MS).

La digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) se estimó utilizando el equipo DAISYII® (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY) y de acuerdo con los procedimientos del fabricante⁽¹²⁾. La energía metabolizable se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación⁽¹³⁾:

$EM = [2.20 + 0.136(PG_{24}) + 0.0057(PC) + 0.0029(EE)^2] / 4.184$; donde EM= energía metabolizable (MCal/kg); PG_{24} = producción de gas *in vitro* a las 24 h (ml/g); PC= proteína cruda (g/kg); EE= extracto etéreo (g/kg).

Metabolitos secundarios

Las muestras secas para cada tratamiento se expusieron a extracción alcohólica (0.5 g disueltos en 45 ml de solución etanol al 70 %-agua) durante la noche. Posteriormente, las muestras se filtraron y se evaporaron al vacío (a 40 °C) hasta la eliminación total de la solución de etanol y se dejaron secar durante la noche. Los rendimientos de las extracciones concentradas se calcularon en base a la materia seca. Las muestras secas se almacenaron para análisis adicionales de metabolitos secundarios.

Análisis de taninos condensados (TC)

Brevemente, las muestras para cada tratamiento se diluyeron (0.5 g disueltos en 45 ml de solución de etanol al 70 %-agua) y se dejaron extraer durante la noche. Posteriormente, alícuotas de 50 µl se mezclaron con una solución al 4 % de vainillina-metanol y HCl concentrado según Heimler *et al*⁽¹⁴⁾. La absorbancia se midió a 500 nm utilizando catequina como patrón. El rendimiento de TC se estimó con la concentración final en solución y el rendimiento en materia seca.

Análisis de compuestos fenólicos totales (CFT)

Brevemente, las muestras para cada tratamiento se diluyeron (0.5 g disueltos en 45 ml de solución de etanol al 70 %-agua) y se dejaron extraer durante la noche. Los compuestos fenólicos totales se estimaron mediante el método de Folin-Ciocalteu adaptado por Dewanto *et al*⁽¹⁵⁾ utilizando ácido gálico como patrón y midiendo la absorbancia a 760 nm para cada muestra diluida. El rendimiento de CFT se estimó con la concentración final en solución y el rendimiento en materia seca.

Análisis de cannabinoides

Para la detección de cannabinoides (específicamente CBD y THC) se utilizó el método de cromatografía en capa fina (CFF), según los procedimientos propuestos por Novak *et al*⁽¹⁶⁾. Este ensayo se realizó en las instalaciones del IIAC.

Degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS)

Para este análisis, se colocó 1 g (MS) de muestra de cada tratamiento experimental en bolsas de nylon (F57, ANKOM Technology, Corp., Macedon, NY) en módulos de vidrio equipados con transductores electrónicos para la medición de presión de acuerdo con los procedimientos del fabricante (ANKOM, EUA) y se incubó por triplicado con soluciones tampón (CaCl₂ 13.2 % p/v; MnCl₂ 10 % p/v; CoCl₂ 1 % p/v; FeCl₃ 8 % p/v; NaHCO₃ 39 % p/v) e inóculo ruminal en una proporción 2:1, de acuerdo con Theodorou *et al*⁽¹⁷⁾. El inóculo ruminal se obtuvo de dos novillos Angus fistulados alimentados con una dieta a base de heno de alfalfa antes de la alimentación de la mañana; el licor ruminal se extrajo del rumen e inmediatamente se colocó en un recipiente térmico precalentado a 39 °C y luego se transportó al laboratorio para su posterior análisis. Las bolsas de nylon se incubaron individualmente para cada tiempo de fermentación (0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 h). Las bolsas se retiraron de los módulos y se lavaron hasta obtener agua cristalina. Se colocaron en el horno a 55 °C durante 48 h. Se registraron cambios en la materia seca y los datos de digestibilidad se ajustaron a la función de Gompertz para la estimación de los parámetros cinéticos según Murillo *et al*⁽¹⁸⁾.

$$Deg = A_d e^{-L_d e^{-(k_d t)}}$$

Donde: Deg= degradabilidad de la materia seca (% MS); A_d= degradabilidad máxima (% MS); k_d= tasa constante de degradabilidad (h⁻¹); L_d= tiempo de latencia antes de que comience la degradabilidad (h).

Producción de gas *in vitro* y parámetros de fermentación ruminal

Para la producción de gas *in vitro*, se colocó 1 g de muestra de cada tratamiento previamente secado en módulos de vidrio equipados con transductor de presión (ANKOM, USA) con 120 ml de una mezcla de soluciones tampón (CaCl₂ 13.2 % p/v; MnCl₂ 10 % p/v; CoCl₂ 1 % p/v; FeCl₃ 8 % p/v; NaHCO₃ 39 % p/v) e inóculo ruminal en 2:1 y se incubó a 39 °C durante 24 h por triplicado de acuerdo con Theodorou *et al*⁽¹⁷⁾; el inóculo ruminal se obtuvo de dos novillos Angus fistulados alimentados con una dieta a base de heno de alfalfa antes de la alimentación de la mañana; el inóculo ruminal se extrajo del rumen e inmediatamente se colocó en un recipiente térmico precalentado a 39 °C y luego se transportó al laboratorio para su posterior análisis. Así, los cambios en el volumen de gas se registraron a las 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 h y los datos se ajustaron a la función de Gompertz para la estimación de parámetros cinéticos de acuerdo con Murillo *et al*⁽¹⁸⁾.

$$PG = A_g e^{-L_g e^{-(k_g t)}}$$

Donde: PG= producción de gas (ml); A_g= producción máxima de gas (ml); k_g= tasa constante de producción de gas (h⁻¹); L_g= tiempo de latencia antes de que comience la producción de gas (h). Por su parte, dos alícuotas de 10 ml de fermentación ruminal *in vitro* se destinaron a

la determinación de parámetros ruminales *in vitro* después de 24 h de tiempo de fermentación, se procesaron con ácido metafosfórico (25 % p/v) y ácido sulfúrico (50 % v/v) para ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno-amoniaco (N-NH₃), respectivamente, y de acuerdo con Galyean⁽¹⁹⁾.

Asimismo, el mismo número de tratamientos experimentales se incubaron en módulos de vidrio (ANKOM, USA) hasta 24 h de tiempo de fermentación⁽¹⁷⁾. Una vez transcurrido el tiempo, se abrió la válvula de liberación de presión de los módulos y se midió el gas liberado para las composiciones de metano y CO₂ de acuerdo con los procedimientos propuestos por Herrera Torres *et al*⁽²⁰⁾ utilizando el analizador de gases portátil GEM5000 (Landtec, EUA).

Determinación de bacterias ruminales y protozoos

Este ensayo se determinó pesando 1 g de muestra de cada tratamiento previamente secado y se colocó en módulos de vidrio equipados con transductor de presión (ANKOM, USA) con 120 ml de una mezcla de soluciones tampón e inóculo ruminal en una proporción 2:1, y se incubaron a 39 °C durante 24 h por triplicado⁽¹⁷⁾; el inóculo ruminal se obtuvo de dos novillos Angus alimentados con una dieta a base de heno de alfalfa. Posteriormente, las concentraciones de bacterias totales y celulolíticas se determinaron según Dehority⁽²¹⁾, los protozoos se analizaron según Ogimoto e Imai⁽²²⁾, mientras que los hongos se determinaron según Joblin⁽²³⁾ para cada tratamiento. Brevemente, los medios de cultivo se prepararon en placas de Petri estériles con agar nutritivo (BD, Bioxon, EUA) para las determinaciones de bacterias totales y agar nutritivo (BD, Bioxon, EUA) más carboximetilcelulosa (SIGMA, EUA), como fuente de celulosa para las determinaciones de bacterias celulolíticas. El inóculo se obtuvo a partir de fermentaciones ruminales *in vitro* de los tratamientos y se realizaron diluciones hasta alcanzar 10⁻⁶. Después, las diluciones con inóculo se colocaron en placas de Petri previamente etiquetadas y se incubaron bajo atmósfera de CO₂ a 39 °C. Las placas de bacterias totales se incubaron durante 48 h, mientras que las placas de bacterias celulolíticas se incubaron durante 72 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se abrieron las placas de Petri y se midieron los microorganismos mediante la técnica del número más probable⁽²⁴⁾. Para la determinación fúngica, el medio de cultivo se preparó con agar PDA (3 %) y se colocó en placas en condiciones estériles. Posteriormente, 10 ml de inóculo ruminal *in vitro* se mezclaron con solución de peptona (proporción 1:9) y se prepararon diluciones con 1 ml de solución inoculada hasta alcanzar 10⁻⁵ y se colocaron en placas previamente etiquetadas. Inmediatamente, una muestra de cada dilución se enjuaga con CO₂ y se incuba bajo atmósfera de CO₂ a 39 °C durante 120 h para su identificación. Para la determinación de protozoos, el inóculo ruminal *in vitro* se filtró a través de cuatro capas de tela de queso y el filtrado obtenido se colocó en un embudo de separación durante 15 min

aproximadamente, hasta que los protozoos se precipitaron (un anillo blanquecino apareció en el fondo del embudo). Posteriormente, 1 ml de la muestra obtenida con protozoos se mezcló con 4 ml de inóculo ruminal (previamente incubado a 39 °C y enjuagado en condiciones de CO₂) en tubos de cultivo de 18 x 150 mm y se colocó una vez más en la incubadora; este último paso se repitió cinco veces por cada dilución hasta alcanzar 10⁻⁵. En consecuencia, el número de protozoos se determinó mediante cuantificación directa en la cámara de Neubauer utilizando un microscopio de contraste (Collegiate 400) y una amplificación de 400x.

Diseño estadístico

Los datos obtenidos para todos los residuos agroindustriales se analizaron a través de un diseño completamente al azar utilizando el procedimiento GLM en SAS⁽²⁵⁾. La comparación de medias se evaluó con la prueba de rango múltiple de Tukey declarando significancias en $P < 0.05$.

Resultados y discusión

La composición química y la digestibilidad de la materia seca para los tratamientos se muestran en el Cuadro 1. El método utilizado para la extracción de cannabinoides afectó principalmente los contenidos de cenizas, EE y fibras (FDN y FDA). De hecho, los cannabinoides se separan de la flor en una fase orgánica, que se elimina dentro de la fracción EE⁽³⁾. Como consecuencia, hay una reducción del 95 % y 40 % en EE para los tratamientos de CEA y CPF después de la extracción, respectivamente ($P < 0.05$). En cambio, el contenido de cenizas aumentó 17 y 8 % en CEA y CPF, respectivamente, en comparación con el control (FCC) ($P < 0.05$). Estos aumentos se asocian positivamente con una redistribución de los componentes químicos después del proceso extractivo; los valores restantes de FDN, FDA y CNS representan fracciones más altas en la composición química, mientras que reducen la fracción de EE una vez que se extrajo. Por otro lado, el contenido de fibra en CPF sigue siendo similar al control. La extracción por prensado en frío eliminó más fracciones de fibra en comparación con la técnica de extracción alcohólica. La prensa en frío es uno de los métodos más utilizados para la extracción de aceite; este método requiere menos energía que otros y se considera un proceso ecológico⁽²⁶⁾. Sin embargo, la fuerza mecánica aplicada en el proceso puede eliminar mayores fracciones de fibra que cualquier otro proceso. Además, otros autores⁽²⁷⁾ presentaron contenidos similares de fibra en su estudio. Asimismo, el contenido de PC fue similar entre los tratamientos ($P > 0.05$). Sin embargo, se asume que una

pequeña fracción de proteína soluble se elimina en el proceso de extracción; la proteína restante puede ser menor en cantidad, pero similar en proporción después de la redistribución de nutrientes después de la extracción. Del mismo modo, se observó este comportamiento en colza en procesos de extracción por prensado en frío⁽²⁸⁾. Adicionalmente, otra investigación⁽²⁷⁾ reportó concentraciones similares de proteína en la torta de semilla de cáñamo después de la extracción por prensado en frío. En cambio, los CNS aumentaron en CEA y CPF ($P < 0.05$); estos aumentos están vinculados con un efecto de dilución debido a una reducción en las fracciones de fibra como se explicó anteriormente. De hecho, Jarrell⁽²⁹⁾ introdujo este término relacionado con los estudios de nutrición vegetal a principios de los años 80. Además, los procesos extractivos redujeron el CFT y TC ($P < 0.05$). Los metabolitos secundarios como compuestos fenólicos y taninos condensados se extraen en soluciones alcohólicas⁽¹⁴⁾. Los metabolitos secundarios juegan un papel muy importante en la mitigación del metano en rumiantes. Así, se observaron diferentes mecanismos de acción directa o indirectamente en la fermentación de rumiantes o microorganismos de rumiantes dependiendo de las concentraciones de ciertos metabolitos (saponinas, taninos condensados, compuestos fenólicos, etc.)⁽³⁰⁾. De ahí la importancia en la evaluación de las concentraciones de CFT y TC. Las fracciones de fibra (FDN y FDA) aumentaron después del proceso de extracción alcohólica ($P < 0.05$). Estos cambios están conectados positivamente a una mayor extracción de grasa cruda en EE. Por lo tanto, cuanto más EE se extrae en CEA, mayores son las composiciones de fibra. Adicionalmente, la DIVMS aumentó alrededor de 142 y 97 % en CEA y CPF, respectivamente, en comparación con el control (FCC) ($P < 0.05$). Además, los cannabinoides también fueron afectados por los procesos extractivos ($P < 0.05$). Tanto el CBD como el THC disminuyeron sustancialmente sus concentraciones. De esta manera, las concentraciones de CBD se redujeron un 73 y un 28 % en CEA y CPF, respectivamente. Del mismo modo, las concentraciones de THC disminuyeron 99 y 88 % en CEA y CPF, respectivamente. La extracción alcohólica es más eficiente en la extracción de cannabinoides en comparación con una extracción por prensado en frío. Aparentemente, una extracción polar puede ser más efectiva y menos costosa cuando se compara con un proceso extractivo que utiliza fuerza mecánica, que puede eliminar otros nutrientes sin interés⁽²⁶⁾. La información publicada sobre el consumo inofensivo de CBD y THC en animales es muy limitada. Sin embargo, Kleinhenz⁽³¹⁾ ofreció cáñamo industrial a terneros como recurso alimenticio. Estos autores administraron 1142 y 120 mg de CBD y THC a terneros que pesaban aproximadamente 215 kg de peso vivo, respectivamente; no se observaron cambios en el comportamiento, la ingesta de alimentación o la química del suero sanguíneo (glucosa, BUN, creatinina y proteína total) en los animales. Además, no se detectó THC en el plasma sanguíneo; el CBD fue totalmente metabolizado y no se detectó después de 48 h. Asimismo, Cornette⁽³²⁾ administró 5 mg de CBD/kg de peso vivo y tampoco observó cambios en el comportamiento. Por lo tanto, según este último, el CEA presentado en este estudio, puede ofrecerse de forma inofensiva hasta 2 kg por animal por día (animales que pesan aproximadamente 215 kg de peso vivo) y no se esperarían efectos sobre ninguno de los parámetros químicos o el comportamiento. No obstante, no se dispone de información sobre

la seguridad de la carne y el consumo de cáñamo en rumiantes. De acuerdo con los resultados proporcionados en el presente estudio, concentraciones más bajas de cannabinoides (CBD y THC) y concentraciones más altas de CNS condujeron a una mayor DIVMS y EM. De hecho, otro estudio⁽¹⁶⁾ reportó actividad antimicrobiana de los cannabinoides, lo que puede afectar directamente la digestibilidad. En consecuencia, la DIVMS aumentó aproximadamente dos veces en comparación con el control (FCC). Además, estos cambios no pudieron atribuirse a variaciones en el CFT y los TC, ya que sus concentraciones son similares entre los tratamientos de CEA y CPF; los cambios en la DIVMS en CEA y CPF no pudieron correlacionarse con las concentraciones de CFT y TC en ambos tratamientos.

Cuadro 1: Composición química y digestibilidad *in vitro* de residuos agroindustriales de *Cannabis sativa* L.

Variable	FCC	CEA	CPF	P	EEM
%, MS					
Ceniza	11.5±0.25 ^b	13.5±0.25 ^a	12.5±0.04 ^{ab}	0.001	1.33
PC	21.2±0.25 ^a	20.9±0.29 ^a	20.2±0.028 ^a	0.10	0.12
EE	12.3±0.06 ^a	0.5±0.04 ^b	7.5±0.0 ^b	<0.001	0.08
FDN	27.9±0.39 ^b	32.2±0.33 ^a	28.0±0.86 ^b	0.003	0.58
FDA	16.5±0.02 ^b	18.9±0.69 ^a	15.5±0.19 ^b	0.015	1.47
LDA	2.2±0.15 ^b	2.5±0.08 ^a	2.3±0.006 ^{ab}	0.002	0.07
HEM	11.5±0.31 ^b	13.3±2.23 ^a	12.4±0.28 ^a	<0.001	1.06
CEL	14.4±0.14 ^a	16.4±0.36 ^a	13.1±0.11 ^a	0.009	1.24
CNS	26.5± 0.16 ^b	32.7± 0.82 ^a	31.1± 1.0 ^a	<0.001	0.77
mg/g, MS					
CFT	15.7±0.10 ^a	14.8±0.08 ^b	15.4±0.05 ^b	<0.001	0.06
TC	6.7±0.09 ^a	4.6±0.16 ^c	5.4±0.05 ^b	<0.001	0.09
DIVMS, %	23.9±1.11 ^c	57.9±1.58 ^a	47.2±2.74 ^b	<0.001	1.58
EM, Mcal	1.4 ± 0.04 ^c	1.9±0.07 ^a	1.6 ± 0.06 ^b	<0.001	0.05
CBD, g/kg	1.8± 0.01 ^a	0.5± 0.003 ^c	1.3± 0.006 ^b	<0.001	0.03
THC, g/kg	10.9± 0.07 ^a	0.08± 0.0001 ^c	1.4± 0.007 ^b	<0.001	0.001

FCC= flor cruda de *Cannabis sativa* L.; CEA= residuos de flor de *Cannabis sativa* L. extraídos con alcohol.; CPF= residuos de flor de *Cannabis sativa* L. prensados en frío; EEM= error estándar de la diferencia entre medias; PC= proteína cruda; EE= extracto etéreo; FDN= fibra detergente neutro; FDA= fibra detergente ácido; LDA= lignina detergente ácido; HEM= hemicelulosa; CEL= celulosa; CNS= carbohidratos no estructurales; CFT= compuestos fenólicos totales; TC= taninos condensados; DIVMS= digestibilidad *in vitro* de la materia seca; EM= energía metabolizable; CBD= cannabinol; THC= tetrahidrocannabinol.

^{abc} Medias con letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

La degradabilidad ruminal *in vitro* para los tratamientos se presenta en el Cuadro 2. Los procesos extractivos afectaron la degradabilidad; CEA y CPF aumentaron la degradabilidad

máxima (parámetro A_d) por encima del 120 % en ambos tratamientos en comparación con el control ($P < 0.05$). Del mismo modo, los procesos extractivos aumentaron la tasa específica de degradabilidad (parámetro k_d) alrededor del 120 % para ambos tratamientos, mientras que el período de latencia (parámetro L_d) aumentó un 140 % para ambos tratamientos ($P < 0.05$). Los aumentos en los parámetros cinéticos pueden estar asociados positivamente con una reducción en el contenido de cannabinoides y cambios en los CNS; estos efectos se observaron anteriormente en la DIVMS. Valores más altos en A_d , k_d y L_d se presentan en el tratamiento con valores más bajos de cannabinoides (CEA). De acuerdo con esto, Semwogerere *et al*⁽³³⁾ informaron que la digestibilidad de la torta de semilla de cáñamo es menor que la digestibilidad de la harina de canola y la harina de soja. De hecho, se afirmó que la torta de cáñamo aumentó el tiempo de retención ruminal que es comparable con el tiempo de fermentación en ensayos *in vitro*⁽²⁷⁾; este efecto se observó en este estudio. En realidad, CEA y CPF presentaron valores más altos en la tasa específica de degradabilidad (parámetro k_d), lo que llevó a alcanzar el valor asintótico (A_d) en un tiempo más corto; la FCC necesitaría más tiempo para alcanzar A_d , lo que es consistente con estudios previos⁽²⁷⁾. En cambio, se necesita más tiempo para que los microorganismos comiencen la degradación del sustrato como se observa en los valores de tiempo de latencia (parámetro L_d) para CEA y CPF. Lo último puede estar asociado con cambios en las poblaciones de microorganismos (protozoos y bacterias), lo que se discutirá más adelante.

Cuadro 2: Parámetros de degradabilidad ruminal *in vitro* de residuos agroindustriales de *Cannabis sativa* L. después de dos métodos extractivos

Parámetro	FCC	CEA	CPF	P	EEM
A_d , %	24.1±0.29 ^c	57.6±0.01 ^a	54.6±0.81 ^b	<0.001	0.502
L_d , h	1.9±0.01 ^b	4.7±0.04 ^a	4.6±0.16 ^a	0.004	0.096
k_d , %/h	0.14±0.005 ^b	0.31±0.005 ^a	0.32±0.000 ^a	<0.001	0.002

FCC= Flor cruda de *Cannabis sativa* L.; CEA= residuos de flor de *Cannabis sativa* L. extraídos con alcohol; CPF= residuos de flor de *Cannabis sativa* L. prensados en frío; EEM= error estándar de la diferencia entre medias; A_d : degradabilidad máxima; k_d = tasa específica de degradabilidad; L_d = período de latencia antes de que comience la degradación; (fase de retraso).

^{abc} Medias con letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

La población de microorganismos después de la fermentación ruminal de diferentes residuos se muestra en el Cuadro 3. Los protozoos aumentaron después del proceso extractivo en CPF en comparación con el control ($P < 0.05$); no se observaron cambios en CEA ($P > 0.05$). Por el contrario, no se observaron rastros de hongos en el control (FCC); sin embargo, los hongos aumentaron después del proceso extractivo ($P < 0.05$). En cambio, las bacterias totales se redujeron después del proceso extractivo en ambos tratamientos ($P < 0.05$). Sin embargo, no se registraron cambios en las bacterias celulolíticas ($P > 0.05$). Novak *et al*⁽¹⁶⁾ afirmaron que los extractos de cáñamo exhibieron actividad antimicrobiana en la mayoría de los hábitats bacterianos de humanos y animales, pero estos cambios no se observaron en hongos; por el

contrario, los extractos de cáñamo mostraron actividad antifúngica en ensayos *in vitro* reportados anteriormente⁽³⁴⁾. Además, las reducciones en las bacterias totales se asocian con un aumento en las poblaciones de protozoos. Esto está de acuerdo con otros autores⁽³⁵⁾, que afirman que la depredación de bacterias es causada principalmente por la actividad de los protozoos.

Cuadro 3: Poblaciones de microorganismos en fermentación ruminal *in vitro* de residuos agroindustriales de *Cannabis sativa* L. después de dos métodos extractivos

Microorganismos	FCC	CEA	CPF	P	EEM
Protozoos, ml ⁻¹ x10 ⁴	7.3±0.07 ^b	15.8±0.30 ^{ab}	26.6±0.37 ^a	0.007	0.22
Bacterias celulolíticas, ml ⁻¹ x10 ⁵	142.1±2.88 ^a	127.6±14.77 ^a	115.6±7.21 ^a	0.232	7.84
Bacterias totales, ml ⁻¹ x10 ⁵	187.2±20.20 ^a	100.6±6.74 ^b	115.2±6.92 ^b	0.006	10.57
Hongos, UFC	ND	7.2±0.57 ^a	6.3±1.15 ^a	0.001	0.60

FCC= flor cruda de *Cannabis sativa* L.; CEA= residuos de flor de *Cannabis sativa* L. extraídos con alcohol; CPF= residuos de flor de *Cannabis sativa* L. prensados en frío; UFC: unidades formadoras de colonias; ND= no detectado; EEM= error estándar de la diferencia entre medias.

^{abc} Medias con letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas ($P<0.05$).

Los parámetros de fermentación ruminal y la cinética de producción de gas se muestran en el Cuadro 4. No se observaron cambios en el pH ($P>0.05$). Sin embargo, los procesos extractivos en CEA y CPF afectaron las concentraciones de N-amoniaco y AGVT ($P<0.05$). Una reducción en el N-amoniaco se asocia positivamente con una defaunación de bacterias ruminales debido a la presencia de protozoos. De hecho, Wang *et al*⁽³⁶⁾ reportaron una reducción en las poblaciones de protozoos al usar aceite de semilla de cáñamo en fermentaciones ruminales. Por lo tanto, se espera que la FCC promueva una reducción de protozoos y un aumento en las poblaciones de bacterias; lo último fomenta un aumento del N-amoniaco. Además, se esperaría una reducción de la desaminación de proteínas como consecuencia de un aumento de bacterias, lo que daría lugar a una reducción del N-amoniaco⁽³⁷⁾. Estas afirmaciones fueron observadas en este estudio. Los protozoos aumentaron con ambos tratamientos y se observa una reducción de bacterias totales ($P<0.05$). Además, los protozoos juegan un papel importante en la síntesis de algunos ácidos grasos volátiles. De hecho, se ha afirmado⁽³⁸⁾ que la capacidad de los protozoos para digerir ácidos grasos podría desviar más carbono hacia la síntesis de ácidos grasos volátiles; estos cambios se observaron en el presente estudio en CEA y CPF con las mayores poblaciones de protozoos. En cuanto a la cinética de producción de gas, A_g aumentó por encima de 87 y 77 % en CEA y CPF, respectivamente ($P<0.05$). Estos cambios sugieren una mejor utilización de nutrientes de los microorganismos que condujo a un mayor proceso de fermentación y una mayor producción de gas; por lo tanto, se espera una mayor tasa de producción de gas. Sin embargo, no se observaron cambios en el período de latencia (L_g) y

la tasa específica de producción de gas (kg) ($P>0.05$), pero se observan tendencias similares a las de degradabilidad.

Por otro lado, la producción de metano aumentó 81 y 97 % en CEA y CPF, respectivamente ($P>0.05$). Del mismo modo, el CO_2 aumentó alrededor del 60 % en ambos tratamientos en comparación con el control ($P<0.05$). Aparentemente, la reducción de cannabinoides y el aumento de CNS llevaron a un aumento del proceso de fermentación, lo que aumentó la producción de metano. Mientras que, la proporción de $\text{CH}_4:\text{CO}_2$ aumentó 18 % en CPF en comparación con el control ($P<0.05$). Esta relación indica el volumen de metano producido dividido en el volumen de CO_2 presente en el proceso; valores más altos de esta variable sugieren que se está sintetizando más metano a través de la vía de reducción de CO_2 ⁽¹⁸⁾. Por lo tanto, estos cambios en la proporción de $\text{CH}_4:\text{CO}_2$ pueden sugerir que se está sintetizando más metano a través de la vía CO_2 y que los aumentos en la producción de metano no solo están asociados a una mejora en la fermentación ruminal y una extensión de la producción total de gas. De hecho, la presencia de cannabinoides puede resultar como inhibidores en la metanogénesis a través de la vía de reducción de CO_2 , ya que valores más bajos de la proporción de $\text{CH}_4:\text{CO}_2$ se presentan con valores más altos de cannabinoides. Cuanto más altos son los cannabinoides, más bajos son los protozoos; la síntesis de metano y el número de protozoos están positivamente asociados⁽³⁹⁾. Por lo tanto, si hay una reducción en los protozoos, también se esperaría una reducción en el metano. Un aumento en los protozoos puede afectar a las bacterias, incluidos los metanógenos. En cuanto a este último, se reportó⁽³³⁾ que el aceite de semilla de cáñamo es más eficiente en la inhibición de metanógenos ya que tiene más terpenos, polifenoles y lignina. Del mismo modo, Embaby *et al*⁽⁴⁰⁾ encontraron una reducción del 10 % en la producción de metano cuando utilizaron aceite de semilla de cáñamo y se comparó con el aceite de maíz. Sin embargo, Patra *et al*⁽⁴¹⁾ afirmaron que las reducciones en la producción de metano se asocian a la presencia de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que a la presencia de cannabinoides; estos ácidos grasos no se evaluaron en este estudio. Según los hallazgos de este estudio, la flor cruda en FCC inhibe no solo la degradabilidad, sino también la síntesis de metano y las poblaciones de protozoos. Sin embargo, estas afecciones están altamente asociadas con la utilización de nutrientes de microorganismos, lo que puede conducir a un mejor proceso de fermentación ruminal como se expuso previamente en este estudio.

Cuadro 4: Parámetros de fermentación ruminal y cinética de producción de gas de residuos agroindustriales de *Cannabis sativa* L. después de dos métodos extractivos

Variable	FCC	CEA	CPF	P	EEM
pH	6.8±0.11 ^a	6.9±0.10 ^a	6.8±0.12 ^a	0.251	0.13
N-NH ₃ , mg/dl	15.2±0.08 ^a	10.9±0.11 ^c	13.8±0.11 ^b	<0.001	0.29
AGVT, mM	0.11±0.007 ^b	0.16±0.003 ^a	0.16±0.008 ^a	<0.001	0.05
A _g , ml/g MS	41.82±8.89 ^b	78.46±5.13 ^a	74.27±2.08 ^a	<0.009	4.93
L _g , h	2.6±0.64 ^a	3.6±0.35 ^a	3.24±0.37 ^a	0.384	0.15
k _g , %/h	0.09±0.05 ^a	0.22±0.01 ^a	0.24±0.02 ^a	0.063	0.02
CH ₄ , ml/g MS	3.7±0.15 ^b	6.7±0.29 ^a	7.3±0.20 ^a	<0.001	0.22
CO ₂ , ml/g MS	32.5±2.470 ^b	52.8±0.89 ^a	52.3±1.52 ^a	<0.001	1.75
Proporción CH ₄ /CO ₂	0.11±0.004 ^b	0.12±0.003 ^{ab}	0.13±0.005 ^a	0.023	0.004

FCC= Flor cruda de *Cannabis sativa* L.; CEA= residuos de flor de *Cannabis sativa* L. extraídos con alcohol; CPF= residuos de flor de *Cannabis sativa* L. prensados en frío; EEM= error estándar de la diferencia entre medias; N-NH₃: N-amoniaco; AGVT= ácidos grasos volátiles totales; A_g: producción máxima de gas; k_g= tasa específica de producción de gas; L_g= período de latencia antes de que comience la producción de gas (fase de retraso).

^{abc} Medias con letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

Conclusiones e implicaciones

Ambos residuos obtenidos después de los dos procesos extractivos ofrecen propiedades nutricionales aceptables en la alimentación animal. Los residuos obtenidos después de la extracción alcohólica ofrecieron una mejor utilización de nutrientes de los microorganismos presentes en la fermentación ruminal, lo que condujo a un aumento de la DIVMS y los parámetros de fermentación. Por lo tanto, el residuo agroindustrial de *Cannabis sativa* L. obtenido después de los procesos extractivos puede surgir como una fuente potencial de forraje en la alimentación de rumiantes. Sin embargo, se recomiendan ampliamente más ensayos *in vitro* e *in vivo* que utilicen estos residuos agroindustriales como parte de una ración, teniendo en cuenta los posibles efectos secundarios de los cannabinoides en la salud animal y la seguridad alimentaria.

Agradecimientos

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Durango por su apoyo a través de la beca #2020-123. Los autores desean agradecer también al Instituto de Investigación y

Aprovechamiento del Cannabis por la disponibilidad de material vegetativo y las instalaciones utilizadas en algunos análisis.

Literatura citada:

1. Jenatová A, Franková A, Tlustos P, Hamouz K, Bozik M, Kloucek P. Yield and cannabinoids contents in different cannabis (*Cannabis sativa* L.) genotypes for medical use. *Ind Crops Prod* 2018;(112):363-367.
2. Suero-García C, Martín-Banderas L, Holgado MA. Efecto neuroprotector de los cannabinoides en las enfermedades neurodegenerativas. *Ars Pharm* 2015;56(2):77-87.
3. León CJJ. Editorial: El aceite del cannabis. *Rev Soc Quím Perú* 2017;83(3):261-263.
4. Ebskamp MJ. Engineering flax and hemp for an alternative to cotton. *Trends Biotechnol* 2002;20(6):229-230.
5. Small E, Marcus D. Hemp: A new crop with new uses for North America. In: Janick J, Whipkey A. editors. *Trends in new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, VA. 2002:284–326.
6. Hernández-Díaz D, Villar-Ribeira R, Julián F, Tarres Q, Espinach FX, Delgado-Aguilar M. Topography of the interfacial shear strength and the mean intrinsic tensile strength of hemp fibers as a reinforcement of polypropylene. *Mater* 2020;13(1012):1-16.
7. Bailoni L, Bacchin E, Trocino A, Arango S. Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seed and co-products inclusion in diets for dairy ruminants: A review. *Anim* 2021;(11)856.
8. USDJ (National drug threat assessment 2008: Marijuana) United States Department of Justice. <https://www.justice.gov/archive/ndic/pubs25/25921/marijuan.htm> Accessed march 29, 2022.
9. Kleinhenz MD, Magnin G, Ensley AM, Griffin JJ, Goeser J, Lynch E, PAS, Coetzee JF. Nutrient concentrations, digestibility, and cannabinoid concentrations of industrial hemp plant components. *Appl Anim Sci* 2020;36(4):489-494.
10. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official Methods of Analysis*. 2019.
11. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 1991;74(10): 3583-3597.
12. ANKOM (Gas production system operator's manual). ANKOM Technology, USA. 2015.

13. Menke KH, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim Res Dev* 1988;28(1):7-55.
14. Heimler D, Isolani L, Vignolini P, Tombelli S, Romani A. Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads. *J Agric Food Chem* 2007;(55):1724-1729.
15. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RA. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2002;(42):3010-301.
16. Novak J, Zitterl-Eglseer K, Deans SG, Franz CM. Essential oils of different cultivars of *Cannabis sativa* L. and their antimicrobial activity. *Flavour Fragr J* 2001;(16):259–262.
17. Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 1994;(48):185-197.
18. Murillo OM, Herrera TE, Corral LA, Pámanes CG. Effect of inclusion of graded level of water hyacinth on *in vitro* gas production kinetics and chemical composition of alfalfa hay based beef cattle diets. *Indian J Animal Res* 2018;52(8):1298-1303.
19. Galyean ML. *Laboratory Procedures in Animal Nutrition Research*. 13th ed. Lubbock: USA; 2010.
20. Herrera-Torres E, Murillo-Ortiz M, Méndez J, Araiza-Rosales E, Reyes Jáquez D, Pámanes-Carrasco G. *In vitro* methane production and *in situ* degradability of prickly pear pretreated with yeast cultures. *Trop Subtrop Agroecosystems* 2021;(24):100.
21. Dehority BA. *Rumen microbiology*. Nottingham: Nottingham University Press; 2003:372.
22. Ogimoto K, Imai S. *Atlas of Rumen Microbiology*. Japan Sci Soc Press. Tokyo 1981:231.
23. Joblin KN. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Appl Environ Microbiol* 1981(30):27-37.
24. Harrigan WF, McCance EM. *Métodos de laboratorio en microbiología de los alimentos y productos lácteos*. España: Ed. Academia. León, 1979;(32-35):361-366.
25. SAS. *SAS User's Guide (Release 9.1.3)*. Cary NY, USA. SAS Inst.Inc. 2003.
26. Çakaloğlu B, Özyurt VH, Ötles S. Cold press in oil extraction: A review. *Ukr J Food* 2018;7(4):640-654.

27. Hessle A, Eriksson M, Nadeau E, Turner T, Johansson B. Cold-pressed hempseed cake as a protein feed for growing cattle. *Acta Agric Scand Anim Sci* 2008;(58):136–145.
28. Östbring K, Malmqvist E, Nilsson K, Rosenlind I, Rayner M. The effects of oil extraction methods on recovery yield and emulsifying properties of proteins from rapeseed meal and press cake. *Foods* 2020;9(19):2-14.
29. Jarrell WM, Beverly RB. The dilution effect in plant nutrition studies. *Adv Agron* 1981;(34):197-224.
30. Ku-Vera JC, Jiménez-Ocampo R, Valencia-Salazar Sara S, Montoya-Flores MD, Molina-Botero IC, *et al.* Role of secondary plant metabolites on enteric methane mitigation in ruminants. *Front Vet Sci* 2020;7:1-14.
31. Kleinhenz MD. Plasma concentrations of eleven cannabinoids in cattle following oral administration of industrial hemp. *Appl Anim Sci* 2020;36(4):489-494.
32. Cornette HE. Pharmacokinetics of single feeding of cannabidiol in cattle: A pilot study. Honors College Thesis, Murray State University Honors College, 2022.
33. Semwogerere F, Chenaimoyo LF, Katiyatiya1 OC, Chikwanhal MC, Cletos M. Bioavailability and bioefficacy of hemp by-Products in ruminant meat production and preservation: A Review. *Front Vet Sci* 2020;(7).
34. Ali EMM, Almagboul AZI, Khogali SME, Gergeir UMA. Antimicrobial activity of *Cannabis sativa* L. *J Chinese Med* 2012;3(6):1–4.
35. Belanche A, de la Fuente G, Pinloche E, Newbold CJ, Balcells J. Effect of diet and absence of protozoa on the rumen microbial community and on the representativeness of bacterial fractions used in the determination of microbial protein synthesis. *J Anim Sci* 2012;(90):3924–3936.
36. Wang S, Kreuzer M, Braun U, Schwarm A. Effect of unconventional oilseeds (safflower, poppy, hemp, camelina) on in vitro ruminal methane production and fermentation. *J Sci Food Agric* 2017;(97):3864–3870.
37. Getahun D, Alemneh T, Akebereg D, Getabalew M, Sewdie D. Urea metabolism and recycling in ruminants. *Biomed J Sci Tech Res* 2019;20(1):14790–14796.
38. Karnati SKR, Sylvester JT, Ribiero DM, Gilligan LE, Firkins JL. Investigating unsaturated fat, monensin, or bromoethanesulfonate in continuous cultures retaining ruminal protozoa. I. Fermentation, biohydrogenation, and microbial protein synthesis. *J Dairy Sci* 2009;(92):3849-3860.

39. Guyader J, Eugéne M, Nozière P, Morgavi DP, Doreau M, Martin C. Influence of rumen protozoa on methane emission in ruminants: a meta-analysis approach. *Animal* 2014;8(11):1816-1825.
40. Embaby MG, Günal M, Abughazaleh A. Effect of unconventional oils on *in vitro* rumen methane production and fermentation. *Cienc Investig Agrar* 2019(46):276–285.
41. Patra A, Park T, Kim M, Yu Z. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *J Anim Sci Biotechnol* 2017;(8):13.