



Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2022; 12:1-17. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2022.22>
Artigo Original. Recebido: 07/01/2022. Aceito:27/07/2022. Publicado: 19/08/2022. Chave: e2022-1.
<https://www.youtube.com/watch?v=dNnxkdLbHUA>

Fermentação ruminal *in vitro* de *Muntingia calabura* e *Bauhinia divaricata* folhagem apenas e em combinação com *Pennisetum* sp

Ruminal fermentation *in vitro* of *Muntingia calabura* and *Bauhinia divaricata* foliages alone and combinet with *Pennisetum* sp



Bernardino Candelaria-Martínez^{1ID}, Adrián Sandoval-Pelcastre^{1ID}, Norma Rodríguez-Ávila^{1ID}, Mónica Ramírez-Mella^{2*ID}

¹Tecnológico Nacional de México campus Instituto Tecnológico de Chiná, Calle 11 s/n entre 22 y 28, Chiná, Campeche, México. C.P. 24520. ²CONACYT-Colegio de Postgraduados Campus Campeche. Carretera Haltunchén-Edzná km 17.5, Sihochac, Champotón, Campeche, México, C.P. 24450. Autor para correspondência: Mónica Ramírez Mella, CONACYT-Colegio de Postgraduados Campus Campeche. Carretera Haltunchén-Edzná km 17.5, Sihochac, Champotón, Campeche, México, C.P. 24450 E-mail: bcm8003@gmail.com, adr.y92@hotmail.com, norma.ra@china.tecnm.mx, monicara@colpos.mx

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as características de fermentação ruminal das folhagens *Bauhinia divaricata* e *Muntingia calabura* sozinhas e combinadas com *Pennisetum* sp. Cinco tratamentos foram avaliados: P=*Pennisetum* sp. (100%); Mc=*M. calabura* (100%); Bd= *B. divaricata* (100%); McP= *M. calabura* (30%)/*Pennisetum* sp. (70%), e BdP= *B. divaricata* (30%)/*Pennisetum* sp. (70%). Os tratamentos com maior degradabilidade de matéria seca *in vitro* (DMS) foram P, BdP, McP e Bd (>50%) ($P \leq 0.05$). Não houve diferenças significativas ($P > 0.05$) na produção de gás (PG) entre os tratamentos Bd, BdP, McP e P; entretanto, Mc produziu 35% menos gás ($P \leq 0.05$) do que os outros tratamentos. Em contrapartida, Mc produziu 153% mais metano (CH_4) que Bd ($P \leq 0.05$), sendo Bd e BdP os tratamentos com a menor produção de CH_4 . Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0.05$) na concentração de ácido graxo volátil (AGV), exceto para o ácido acético entre Mc e P com Bd, e ácido isovalérico entre Mc e Bd ($P \leq 0.05$). Em conclusão, a folhagem de *B. divaricata* diminuiu a produção de CH_4 e não afetou negativamente outras variáveis de fermentação ruminal, representando assim uma alimentação alternativa para reduzir a metanogênese ruminal do gado nos trópicos.

Palavras-chave: produção de gás, metano, metabólitos secundários, árvores forrageiras, ruminantes.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the ruminal fermentation characteristics of *Bauhinia divaricata* and *Muntingia calabura* foliages alone and combined with *Pennisetum* sp. Five treatments were evaluated: P = *Pennisetum* sp. (100%); Mc = *M. calabura* (100%); Bd = *B. divaricata* (100%); McP = *M. calabura* (30%)/*Pennisetum* sp. (70%), and BdP = *B. divaricata* (30%)/*Pennisetum* sp. (70%). The treatments with the highest *in vitro* dry matter degradability (DMS) were P, BdP, McP and Bd (> 50%) ($P \leq 0.05$). There were no significant differences ($P > 0.05$) in gas production (PG) among treatments Bd, BdP, McP and P; however, Mc produced 35% less gas ($P \leq 0.05$) than the other treatments. Conversely, Mc produced 153% more methane (CH_4) than Bd ($P \leq 0.05$), being Bd and BdP the treatments with the lowest CH_4 production. No significant differences ($P > 0.05$) were observed in volatile fatty acid (VFA) concentration, except for acetic acid between Mc and P with Bd, and isovaleric acid between Mc and Bd ($P \leq 0.05$). In conclusion, *B. divaricata* foliage decreased CH_4 production and did not negatively affect other ruminal fermentation



variables, thus representing a dietary alternative to reduce the ruminal methanogenesis of cattle in the tropics.

Keywords: gas production, methane, secondary metabolites, forage tree, ruminants.

INTRODUÇÃO

Estima-se que até 2050, a população mundial será de aproximadamente 9,7 bilhões de pessoas (ONU, 2019). Como resultado, a produção e o consumo de alimentos de origem animal aumentará, o que aumentará as emissões de gases de efeito estufa (GEE); isto terá um impacto negativo na mudança climática (Garnett, 2010). A pecuária é uma atividade antropogênica, que em 2010 gerou aproximadamente 8,1 gigatoneladas de CO₂-eq em todo o mundo, das quais 62% foram atribuídas ao gado. Dessas emissões, cerca de 44% resultam da fermentação entérica do processo digestivo, dando origem a altas quantidades de metano (CH₄) (FAO, 2017). O CH₄ é um GEE com um potencial de aquecimento global 28 vezes maior que o dióxido de carbono (CO₂) (Roehle *et al.*, 2016). É produzido pela arca metanogênica usando H₂ e CO₂ derivado da fermentação ruminal de carboidratos e é expelido para o meio ambiente através de arrotos. Estima-se que um bovino adulto pode produzir 250 a 500 L de CH₄ por dia, o que também constitui uma perda de energia, já que aproximadamente 2 a 12% da energia bruta consumida pelo animal é utilizada para a produção deste gás (Johnson & Johnson, 1995).

A produção de CH₄ ruminal é fortemente influenciada pela composição da ração, de modo que a pesquisa para reduzi-la tem se concentrado na manipulação do ambiente ruminal, modificando a diversidade microbiana e os padrões de fermentação ruminal através da dieta (Haque, 2018). Entre as estratégias estudadas para reduzir a produção de CH₄, o uso de metabólitos secundários (M_{Sec}) como taninos, saponinas e flavonóides presentes em várias plantas (Bodas *et al.*, 2012), que demonstraram ter atividade antimicrobiana e reduzir a disponibilidade de H₂ no rúmen (Hook *et al.*, 2010).

O efeito de várias forrageiras tropicais e arbustos na redução das emissões de CH₄ foi investigado, sendo *Leucaena leucocephala* uma das espécies mais utilizadas para este fim (Delgado *et al.*, 2012; Meale *et al.*, 2012; Molina *et al.*, 2015; Rivera *et al.*, 2015). Outras espécies arbóreas como *Samanea saman*, *Sapindus saponaria*, *Albizia lebbek*, *Tithonia diversifolia*, *Gliricidia sepium* e *Vetellaria paradoxa* também demonstraram reduzir as emissões de CH₄ ruminal *in vitro* (Delgado *et al.*, 2012; Meale *et al.*, 2012); entretanto, nas regiões tropicais do México existe uma grande diversidade de plantas forrageiras que têm sido menos estudadas apesar de terem potencial nutricional e antimetanogênico, tais como *Bauhinia divaricata* e *Muntingia calabura*. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a fermentação ruminal e a produção de gás (PG) *in vitro* da folhagem *B. divaricata* e *M. calabura* sozinhas e combinadas com *Pennisetum* sp.



MATERIAL E MÉTODOS

Localização e coleta de material vegetal

A coleta de material vegetal foi realizada em fevereiro de 2018 no Rancho Xamantún, pertencente ao Instituto Tecnológico de Chiná do Tecnológico Nacional de México, localizado a 19°43' de latitude norte e 90°24' de longitude oeste. O local tem um clima quente sub úmido A(W1) (García, 2004), com temperatura média anual e precipitação de 26°C e 1.138 mm, respectivamente, e uma elevação de 36 m.

Um kg de folhagem fresca, constituída de folhas e caules tenros, foi coletado, simulando a navegação de um bovino adulto a uma altura máxima de dois metros, das seguintes 10 espécies de árvores e arbustos: *B. divaricata*, *M. calabura*, *Lysiloma latisiliquum*, *Tithonia diversifolia*, *Sida acuta*, *Guazuma ulmifolia*, *Moringa oleifera*, *Acacia farnesiana*, *Samanea saman* e *Coccoloba cozumelensis*, assim como 5 kg de *Pennisetum* sp. var. maralfalfa. As amostras foram secas em um forno de ar forçado à temperatura de 55°C por 72 h. As amostras foram então moídas em uma fresadora. Em seguida, foram moídas em um moinho Willey com uma peneira de 1 mm e armazenadas à temperatura ambiente (24 °C) até o uso.

Presença de metabólitos secundários

A presença qualitativa de vários metabólitos secundários foi determinada a partir da folhagem das 10 espécies forrageiras e arbustivas mencionadas acima. Para este fim, 25 g do material vegetal foram tomados e colocados em frascos de vidro.

Posteriormente, 3 v/v de 96% de etanol foi adicionado como solvente para extrair MSec. Uma vez obtidos os extratos de etanol, a presença de MSec foi determinada seguindo o protocolo de Valencia del Toro e Garín (Valencia-Del Toro e Garín-Aguilar, 2010). Os resultados são mostrados na Tabela 1.

Tratamentos

Levando em consideração os perfis MSec obtidos, bem como a escassa informação sobre seus efeitos na fermentação ruminal, duas espécies vegetais foram selecionadas por seu alto conteúdo de metabólitos inibidores da atividade microbiana: *M. calabura*, que apresentava uma alta presença de saponinas esteroidais e flavonóides do tipo xantona e flavona, e *B. divaricata*, que apresentava um conteúdo moderado de taninos derivados do catecol. Com base no exposto acima, foram avaliados cinco tratamentos: P=*Pennisetum* sp. (100%); Mc=*M. calabura* (100%); Bd=*B. divaricata* (100%); McP=*M. calabura* (30%)/*Pennisetum* sp. (70%), e BdP=*B. divaricata* (30%)/*Pennisetum* sp. (70%).



Tabela 1. Ocorrência de metabólitos secundários na folhagem de árvores forrageiras e arbustos tropicais

ESPÉCIE VEGETAL	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS												
	Alcalóides	Saponídeos			Taninos		Quinólios	Cardenólides	Laucoantocianidinas	Flavonoides			
		Esteróides	Triterpenóides	Lactonas	Ácido gálico	Catecol				Auronas	Chalconas	Xantonas	Flavonas
<i>Acacia farnesiana</i>	-	+++	-	+++	+++	-	-	-	+	-	-	+++	+++
<i>Muntingia calabura</i>	-	+++	-	+++	++	-	-	-	+	-	-	+++	+++
<i>Moringa oleifera</i>	-	-	+	+++	+++	-	-	-	++	-	-	+++	+++
<i>Samanea saman</i>	-	+++	-	+++	++	-	-	-	+	-	-	++	++
<i>Lysiloma latisiliquum</i>	-	+++	-	+++	+++	-	-	-	+	-	-	+	+
<i>Tithonia diversifolia</i>	-	+++	-	+++	-	++	-	-	+	+	+	-	-
<i>Sida acuta</i>	-	+++	-	+++	-	-	-	-	++	-	-	+	+
<i>Bauhinia divaricata</i>	-	++	-	+++	-	++	-	-	-	-	-	+	+
<i>Guazuma ulmifolia</i>	-	+	-	+++	-	+++	-	-	-	-	-	+	+
<i>Coccoloba</i>	-	++	-	+	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>cozumelensis</i>	-	++	-	+	-	+++	-	-	-	-	-	-	-

. (+++) Alto; (++) Moderado; (+) Baixo; (-) Sem presença.

Análise química

Amostras secas e moídas dos cinco tratamentos foram analisadas em triplicata para matéria seca (MS), cinzas, proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) de acordo com AOAC (2006); enquanto a fibra detergente neutra (FDN) e a fibra detergente ácida (FDA) foram determinadas de acordo com a técnica de [Van Soest et al. \(1991\)](#). Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Composição química das folhagens de *Muntingia calabura* e *Bauhinia divaricata* sozinhas ou combinadas com *Pennisetum* sp

Tratamento	MS ¹	Cinza ^{1,2}	FDN ^{1,2}	FDA ^{1,2}	PB ^{1,2}	EE ^{1,2}
Mc	95.77	8.31	53.02	52.42	13.56	6.55
Bd	96.85	8.46	49.89	48.12	14.74	1.74
McP	96.45	10.97	69.35	57.83	7.94	6.42
BdP	96.56	10.69	68.02	55.24	8.12	1.78
P	96.94	11.84	76.85	59.02	6.02	1.99

¹Valores expressos em porcentagem; ²Valores expressos em base seca; P=*Pennisetum* sp. (100%); Mc=*M. calabura* (100%); Bd=*B. divaricata* (100%); McP=*M. calabura* (30%)/*Pennisetum* sp. (70%), e BdP=*B. divaricata* (30%)/*Pennisetum* sp. (70%).



Fermentação *in vitro*

O procedimento para a coleta do fluido ruminal (FR) foi realizado de acordo com a Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 "Technical Specifications for the Production, Care and Use of Laboratory Animals" (NOM-062-ZOO-1999., 1999). Os FR utilizados foram obtidos de quatro novilhos machos não castrados, de diferentes cruzamentos de raças suíças Black Sardinian, Gyr, Brahman e Brown, de um ano de idade e com peso médio de 250 kg. Sua alimentação consistia de uma dieta integrada (70:30 forragem: concentrado) composta de *Echinochloa polystachya* e palha de capim *Brachiaria brizantha*, milho moído, grãos secos de destiladores, melaço e pré-mistura mineral, que era oferecida duas vezes ao dia (8:00 e 16:00 horas). Diariamente os bois consumiam o equivalente a 3% MS de seu peso vivo.

A extração FR foi realizada pela manhã, uma hora antes da primeira ração do dia, utilizando um coletor manual FR (Rumen-Mate com RFE, Drench-Mate®). O FR coletado foi colocado em um frasco térmico previamente aquecido a 39°C e imediatamente transportado para o laboratório. Uma vez no laboratório, o FR foi filtrado através de quatro camadas de manta celeste e usado para preparar o inóculo, que foi preparado de acordo com a metodologia de Menke *et al.* (1979). Posteriormente, 50 mL de inóculo foram adicionados a 120 mL de frascos de vidro âmbar contendo 0,5 g de cada tratamento, tampados com uma rolha de borracha, selados com um anel de alumínio e colocados em um banho de água a 39°C, agitando manualmente a cada 2 horas. Um total de três fermentações foram realizadas, com três réplicas cada uma.

Degradabilidade da matéria seca *in vitro*

A degradabilidade da matéria seca *in vitro* (DMS, mg/g MS) foi determinada às 24 e 72 horas. Ao final de cada vez, os frascos foram retirados do banho de água e colocados em água gelada por 2 horas para interromper a atividade microbiana. Posteriormente, o conteúdo de cada frasco foi filtrado com uma bomba de vácuo; o material filtrado foi colocado em uma estufa a 70°C por 24 horas até peso constante.

Produção de gás *in vitro*

A produção de gás (PG) foi registrada em 2, 4, 6, 8, 12, 12, 16, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 60 e 72 horas utilizando um manômetro (Theodorou *et al.*, 1994). Após cada gravação, a pressão em cada garrafa era igualada a zero. Para obter o volume máximo (Vmax), taxa de fermentação (S) e fase de defasagem (L), foi utilizado o procedimento NLIN do software estatístico SAS (2004) versão 9.0, utilizando o modelo mencionado por Kholif *et al.* (2017).



Determinação de CH₄ e CO₂

A determinação de CH₄ e CO₂ foi realizada de acordo com [Kholif et al. \(2017\)](#), com as seguintes modificações: a cada 6 h por 24 h, o gás produzido nos frascos foi coletado com uma seringa de vidro de 60 mL; posteriormente, este gás foi transferido para outro frasco contendo 50 mL de uma solução de NaOH (1N), agitado para garantir a incorporação do gás nesta solução, coletado novamente e o gás foi registrado com a mesma seringa de vidro. A mistura do gás com a solução de NaOH permitiu a absorção de CO₂, e o volume de gás coletado na seringa foi considerado como CH₄.

Determinação do AGV

A determinação do VFA foi realizada por cromatografia de gás ([Erwin et al., 1961](#)). Após 72 horas de fermentação, 1,6 mL de líquido foi coletado de cada frasco, colocado em um tubo de microcentrifugação com 0,4 mL de ácido metafosfórico a 25% e armazenado a -20 °C.

Energia metabolizável e fator de partição

O cálculo da energia metabolizável foi realizado seguindo o modelo proposto por [Menke et al. \(1979\)](#). O fator de partição (proporção de DMS (mg/g) para PG (ml/g MS)), foi calculado após 24 horas de incubação usando o modelo mencionado por [Kholif et al. \(2017\)](#).

Projeto experimental e análise estatística

Foi utilizado um projeto de blocos completamente aleatórios, utilizando o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + F_j + E_{ij}$$

Onde: Y_{ij} = é cada observação do i -ésimo tratamento (T_i) da j -ésimo fermentação (F_j); μ = média aritmética; E_{ij} = erro experimental.

Os resultados foram analisados com o procedimento GLM do programa estatístico [SAS \(2004\)](#) versão 9.0 e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Presença de metabólitos secundários e análise química

As espécies forrageiras avaliadas tiveram a presença de vários MSec, mas nenhuma mostrou a presença de alcalóides, quinonas ou laucoantocianidinas (Tabela 1). Observou-se que *M. oleifera*, *A. farnesiana* e *L. latisiliquum* tinham um alto teor de taninos derivados de ácido gálico e *G. ulmifolia* em taninos derivados de catecol; enquanto *M. calabura* e *S. saman* tinham um teor moderado em taninos derivados de ácido gálico, e *B. divaricata* e *T. diversifolia* em taninos derivados de catecol. Em relação aos saponídeos, as espécies com maior presença de esteróides foram *M. calabura*, *L. latisiliquum*, *T. diversifolia*, *S. acuta*, *A. farnesiana* e *S. saman*, enquanto apenas *M. oleifera* tinha uma baixa presença de terpenóides. Do grupo dos flavonoides, as espécies forrageiras com alta presença de xantonas e flavonas foram *M. calabura*, *M. oleifera* e *A. farnesiana*, enquanto *S. saman* teve uma presença moderada; o resto das espécies teve uma presença baixa, com exceção de *T. diversifolia*, que foi a única espécie com baixa presença de auronas e chalcones.

Os metabólitos secundários são compostos produzidos em diferentes vias de metabolismo secundário de plantas, que não são essenciais para o crescimento e reprodução. Estas biomoléculas desempenham vários papéis, notadamente em resposta ao estresse ambiental, imunidade e proteção contra microorganismos patogênicos, pragas (Pang *et al.*, 2021) e animais herbívoros (Ugbogu *et al.*, 2019). Foi demonstrado que alguns desses metabólitos secundários podem ter atividade antimicrobiana em microorganismos ruminais, sendo a diminuição da metanogênese ruminal um de seus principais efeitos (Patra *et al.*, 2017), que tem sido amplamente reportado para taninos e saponinas (Anantasook *et al.*, 2013; Ugbogu *et al.*, 2019; Patra *et al.*, 2017) e, em menor grau, para flavonóides (Patra *et al.*, 2017). Ao contrário de Delgado *et al.* (2012), que relataram presença moderada ou alta de alcalóides em misturas de folhagens de árvores com gramíneas, este metabólito não foi detectado no presente estudo. Os alcalóides possuem atividade antimicrobiana, mas também demonstraram ser tóxicos tanto para animais quanto para humanos. Em geral, os animais não consomem grandes quantidades de plantas com alto teor de alcalóides devido ao seu sabor amargo (Guil-Guerrero *et al.*, 2016).

A seleção de *M. calabura* e *B. divaricata* se deveu às suas características fitoquímicas e à escassa informação sobre seus efeitos na fermentação ruminal. O valor nutricional das duas espécies de árvores avaliadas neste estudo é semelhante ao relatado em outros estudos (Tabela 2). De acordo com Gómez-Fuentes-Galindo *et al.* (2017), *B. divaricata* tem um menor conteúdo de NDF (46%) e maior conteúdo de PB (12,8%) do que gramíneas como *Panicum maxima* ou *Paspalum langei* que têm em média 70% de NDF e 6,5% de PB, características que poderiam favorecer um maior consumo voluntário e uma taxa de passagem mais rápida. Outros autores relataram que *B. divaricata* tem entre



12 e 18% PB, entre 30 e 40% de digestibilidade ruminal *in vitro*, entre 1,5 e 3,8% de taninos, e a presença de saponinas e alcalóides (Albores-Moreno *et al.*, 2018; Cab-Jiménez *et al.*, 2018; Gómez-Fuentes-Galindo *et al.*, 2017; Sosa-Rubio *et al.*, 2004). Com relação à *M. calabura*, as informações nutricionais são praticamente inexistentes. Kongvongxay *et al.* (2011) relataram que as folhas de *M. calabura* contêm 13% PB, mas apontam que muito pouco se sabe sobre seu valor nutricional, pois é pouco utilizado para alimentação animal. Com relação ao conteúdo de metabólitos secundários, suas frutas (Pereira *et al.*, 2018) e folhas (Pujaningsih *et al.*, 2018) foram relatadas como contendo compostos bioativos com atividade antioxidante e antimicrobiana, entre os quais se destacam vários compostos fenólicos, incluindo antocianinas e flavonóides.

Degradabilidade *in vitro* de matéria seca

A tabela 3 mostra os resultados da DMS às 24 e 72 h de *M. calabura* e *B. divaricata* folhagem sozinha e combinada com *Pennisetum* sp. e mostra diferenças entre tratamentos ($P \leq 0.05$). Os tratamentos com o DMS mais alto às 24 h foram BdP, seguido por P e Bd; entretanto, às 72 h foram P, seguido por BdP e McP. *M. calabura* sozinho tinha a DMS mais baixa em ambos os momentos, o que está de acordo com Puspitaning (2012), que menciona que usando 20% de *M. calabura* na dieta diminui a DMS. Por outro lado, o DMD da *B. divaricata* foi maior (53%) do que o relatado por outros autores (32 e 39%) (Albores-Moreno *et al.*, 2018; Sosa-Rubio *et al.*, 2004).

Tabela 3. Degradabilidade da matéria seca *in vitro* de *Muntingia calabura* e *Bauhinia divaricata* folhagem somente e em combinação com *Pennisetum* sp

Treatment	DMS (mg/g MS)	
	24h	72h
Mc	231.62 ^c	404.57 ^d
Bd	404.78 ^{ab}	528.85 ^c
McP	377.86 ^b	570.71 ^b
BdP	461.82 ^a	592.52 ^{ab}
P	422.86 ^{ab}	628.33 ^a
E.P.M	18.41	13.31

P=*Pennisetum* sp. (100%); Mc=*M. calabura* (100%); Bd= *B. divaricata* (100%); McP= *M. calabura* (30%)/*Pennisetum* sp. (70%), e BdP= *B. divaricata* (30%)/*Pennisetum* sp. (70%); E.P.M: erro padrão da média; ^{a, b, c, d} diferentes literais na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$)

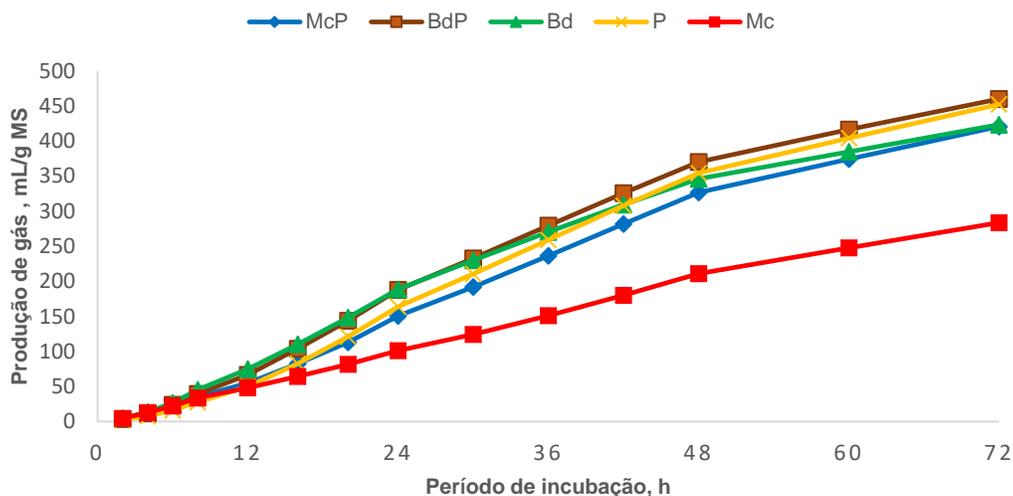
Kamalak *et al.* (2004) concluem que o conteúdo da parede celular nas forragens afeta negativamente os parâmetros de fermentação ruminal. Zhang *et al.* (2017) enfatizaram que a incorporação de folhagem de algumas espécies arbóreas e arbustivas tropicais nas dietas de ruminantes à base de gramíneas aumenta o conteúdo de PB e diminui o conteúdo total estrutural de carboidratos na dieta. Tais afirmações foram parcialmente observadas neste estudo. Os tratamentos Mc e Bd (correspondentes apenas às folhagens) tiveram $\approx 33\%$ menor conteúdo de NDF e $\approx 57,5\%$ maior conteúdo de PB, comparado ao P, que é semelhante ao relatado por Gómez-Fuentes-Galindo *et al.*



(2017), que relataram conteúdos de NDF e PB de 46,5 e 12,8%, respectivamente, para *B. divaricata*. Entretanto, o menor conteúdo de NDF e maior conteúdo de PB de *M. calabura* e *B. divaricata* não melhorou o DMS, o que contrasta com os relatados para outras folhagens, tais como *L. leucocephala*, que aumenta o DMS em 18% quando incluído a 25% nas dietas de gado herbáceo (Molina *et al.*, 2015). No presente estudo, a inclusão de *M. calabura* afetou negativamente a DMS ($P \leq 0.05$), pois foi 10% menor no tratamento McP do que em P.

Produção de gás *in vitro*

PG é apresentado na Figura 1. Não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) durante as 72 h de fermentação entre os tratamentos Bd, BdP, McP e P, que tiveram um PG acumulado médio de 439 mL/g MS; entretanto, houve diferenças significativas ($P \leq 0,05$) com Mc que teve um PG acumulado de 283,49 mL/g MS. Albores-Moreno *et al.* (2018) relataram um PG de 200,59 mL/g de MS às 72h com folhagem *B. divaricata*, que é 53% menor do que o observado no presente estudo. Por outro lado, o PG de *M. calabura* folhagem relatado por Silivong *et al.* (2013) era de 269 mL/g MS às 24 h, 166% maior que o obtido com Mc. Estas variações no PG podem ser atribuídas a diferenças na composição das forragens, geralmente quando apresentam altas concentrações de PB, fibra e polifenol (Vargas *et al.*, 2012). Em nosso estudo, Mc foi o tratamento com o PG mais baixo e degradabilidade.



P=*Pennisetum* sp. (100%); Mc=*M. calabura* (100%); Bd= *B. divaricata* (100%); McP= *M. calabura* (30%)/*Pennisetum* sp. (70%), e
BdP= *B. divaricata* (30%)/*Pennisetum* sp. (70%)

Figura 1. Produção de gás de folhagem de *Muntingia calabura* e *Bauhinia divaricata* sozinho e combinado com *Pennisetum* sp



Características de fermentação *in vitro* e produção de CH₄ e CO₂

Os resultados da produção de Vmax, S, L, CH₄ e CO₂, EM e FP são mostrados na Tabela 4. O Vmax e S do tratamento Mc foi significativamente menor ($P \leq 0.05$) que o resto dos tratamentos; entretanto, o L de Bd e Mc (os tratamentos somente para folhagem) foi cerca de 20% menor que o L dos tratamentos McP, BdP e P. Em relação à produção de CH₄ também houve diferenças significativas ($P \leq 0.05$), sendo Mc o tratamento com maior produção de CH₄, enquanto Bd e BdP tiveram a menor produção. Em relação ao conteúdo de EM, observou-se que os valores mais altos foram apresentados por Bd e BdP, sendo próximos a 2 Mcal/kg de MS, que foram significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) dos tratamentos Mc e McP, com 1,5 Mcal/kg de MS em média. Não houve diferenças ($P > 0,05$) no PF às 24 h, mas houve diferenças às 72 h ($P \leq 0.05$) entre os tratamentos com folhagem isolada, sendo maior com Mc e menor com Bd.

Tabela 4. Características de fermentação *in vitro* e produção de CH₄ e CO₂ de *Muntingia calabura* e *Bauhinia divaricata* folhagens sozinhas e em combinação com *Pennisetum sp*

Variável	Tratamento					E.P.M
	Mc	Bd	McP	BdP	P	
Vmax, mL/g MS	288.28 ^b	403.71 ^a	414.88 ^a	444.28 ^a	439.47 ^a	10.88
S, h ⁻¹	0.019 ^c	0.025 ^a	0.022 ^b	0.02 ^{ab}	0.024 ^{ab}	0.00
L, h	8.829 ^{bc}	7.63 ^c	10.602 ^{ab}	9.24 ^{abc}	11.426 ^a	0.32
CO ₂ , % 24h	85.30 ^d	96.38 ^a	89.88 ^{bcd}	92.78 ^{ab}	87.86 ^{cd}	0.94
CH ₄ , % 24h	14.70 ^a	3.62 ^d	10.12 ^{bcd}	7.22 ^{cd}	12.04 ^{ab}	0.94
CO ₂ , mL/g MS 24h	350.22	332.23	339.79	367.23	365.70	11.12
CH ₄ , mL/g MS 24h	60.33 ^a	16.56 ^c	45.12 ^{ab}	28.20 ^{bc}	50.21 ^a	4.04
EM, Mcal/kg MS	1.37 ^d	1.95 ^a	1.61 ^c	1.86 ^{ab}	1.67 ^{bc}	0.04
FP 24h*	3.18	2.58	3.05	2.86	3.06	0.09

P=*Pennisetum sp.* (100%); Mc=*M. calabura* (100%); Bd= *B. divaricata* (100%); McP= *M. calabura* (30%)/*Pennisetum sp.* (70%), e BdP= *B. divaricata* (30%)/*Pennisetum sp.* (70%). Vmax: volume máximo; FP: fator de partição (mg MS degradado/mL gás produzido); L: fase de defasagem; S: taxa de fermentação; EM: energia metabolizável; DIVMS: digestibilidade *in vitro* da matéria seca; E.P.M: erro padrão da média. ^{a, b, c}, diferentes literais na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$). * mg MS degradado /mL de gás produzido em 24 horas

O comportamento da fermentação ruminal depende da disponibilidade de carboidratos presentes nas forragens (Zhang *et al.*, 2017), portanto, neste estudo, tratamentos com maior Vmax de PG poderiam estar relacionados a uma maior degradação dos carboidratos estruturais presentes na folhagem. Enquanto o baixo Vmax em Mc pode ser devido a uma baixa concentração da fração solúvel da ração, diminuindo a quantidade de gás produzida. Além disso, é provável que a presença de MSec, como saponinas e flavonóides, possa ter afetado a fermentação de MS e, portanto, de PG. Estes MSec interagem diretamente na função da membrana citoplasmática dos microorganismos ruminais, inibindo a síntese da parede celular, criando um efeito de defaunação,



diminuindo assim os protozoários e conseqüentemente as artérias metanogênicas associadas a eles e diminuindo a metanogênese ruminal. No rúmen, os protozoários estão associados à arca metanogênica e sua relação pode gerar entre 9 e 37% das emissões entéricas totais de CH₄ produzidas pelos ruminantes (Rivera *et al.*, 2018; Vargas *et al.*, 2012). Enquanto isso, Velez-Terranova *et al.* (2014) e Lakhani & Lakhani, 2018 observam que plantas com alto teor de flavonóides diminuem a produção de CH₄ e induzem a estimulação extensiva do metabolismo microbiano no rúmen, o que aumenta tanto a degradabilidade de PB quanto os constituintes da parede celular, aumentando a fermentação em até 50%. A este respeito, Silivong *et al.* 2013 relataram que a produção de CH₄ na fermentação *in vitro* de *M. calabura* foi apenas 3,8%, uma concentração consideravelmente menor do que a obtida para *L. leucocephala* (7,8%) ou *G. sepium* (15.6%), o que contrasta com o que foi relatado neste estudo, no qual a análise química preliminar mostrou que só a folhagem de *M. calabura* tem uma alta presença de saponinas e flavonóides, e uma presença moderada de taninos derivados do ácido gálico; entretanto, no teste *in vitro*, o gás produzido com Mc tinha uma concentração mais alta de CH₄, próxima a 15%.

Tabela 5. Concentração de ácidos graxos voláteis da fermentação ruminal *in vitro* de *Muntingia calabura* e *Bauhinia divaricata* folhagens isoladas e em combinação com *Pennisetum sp*

AGV	Tratamento					E.P.M
	Mc	Bd	McP	BdP	P	
Ácido acético	46.20 ^a	38.01 ^b	38.76 ^{ab}	39.35 ^{ab}	42.53 ^a	0.997
Ácido propiónico	26.16	26.03	26.87	27.40	28.95	0.487
Ácido butírico	19.54	18.84	22.30	21.00	20.01	0.457
Ácido isobutírico	3.10	3.64	4.13	4.59	2.63	0.247
Ácido valérico	2.32	3.74	3.31	3.08	2.48	0.165
Ácido isovalérico	2.68 ^a	5.16 ^b	4.64 ^{ab}	4.59 ^{ab}	3.40 ^{ab}	0.271

P=*Pennisetum sp.* (100%); Mc=*M. calabura* (100%); Bd= *B. divaricata* (100%); McP= *M. calabura* (30%)/*Pennisetum sp.* (70%), e BdP= *B. divaricata* (30%)/*Pennisetum sp.* (70%); E.M.P: erro padrão da média. ^{a, b, c}, diferentes literais na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas (P<0,05)

Ácidos graxos voláteis

Não foram observadas diferenças significativas (P>0,05) na concentração de AGV, exceto para o ácido acético entre Mc e P com Bd, e isovalérico entre Mc e Bd (P≤0.05; Tabela 5). Não há estudos avaliando a produção de AGV a partir da fermentação ruminal usando *M. calabura* ou *B. divaricata* como substrato; entretanto, a modificação na produção de AGV ruminal pode ser influenciada pela presença de MSec na dieta. A este respeito, Broudiscou & Lassalas, (2000) realizaram um estudo onde avaliaram o efeito de extratos secos de *Lavandula officinalis* e *Equisetum arvense*, duas espécies conhecidas por seu alto conteúdo flavonóide, sobre a fermentação ruminal *in vitro* e



descobriram que o uso do extrato de ambas as espécies melhorou a taxa de fermentação em 50%, aumentando a produção de acetato e propionato, reduzindo assim a produção de CH₄. No presente estudo, a folhagem de *M. calabura* mostrou um alto teor de flavonóides, enquanto que na folhagem de *B. divaricata* era baixa, o que pode ter influenciado a maior concentração de ácido acético no tratamento Mc. Por outro lado, a maior concentração de ácido isovalérico em Bd poderia ter sido devido ao maior conteúdo de PB desta folhagem (quase 15% em BS), que é produzido a partir da descarboxilação e desaminação da leucina, um aminoácido de cadeia ramificada (Apajalahti *et al.*, 2019).

CONCLUSÃO

O uso de *B. divaricata* folhagem com *Pennisetum* sp., diminuiu a produção e concentração de CH₄ e tem um maior conteúdo de EM, sem afetar negativamente outras variáveis de fermentação ruminal. Portanto, a adição de *B. divaricata* em dietas de ruminantes representa uma alimentação alternativa que pode diminuir a produção de CH₄ a partir da fermentação ruminal do gado em regiões tropicais. Entretanto, dada a escassez de informações sobre este assunto, é altamente recomendável que sejam realizados mais estudos para confirmar isto.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CONACYT) do México a subvenção concedida a Adrián Adolfo Sandoval-Pelcastre, assim como o financiamento do projeto 417 "Análise transcriptômica da microbiota ruminal de gado alimentado com forragens tropicais e sua correlação com a produção de gases de efeito estufa" do Convocatoria para Atender Problemas Nacionais 2015, concedido à Dra. Mónica Ramírez-Mella.

LITERATURA CITADA

ALBORES-MORENO S, Alayón-Gamboa JA, Miranda-Romero LA, Jiménez-Ferrer G, Ku-Vera JC, Vargas-Villamil L. 2018. Nutritional composition, *in vitro* degradation and potential fermentations of tree species grazed by ruminants in secondary vegetation (acahual) of deciduous forest. *The Journal of Animal & Plant Science*. 28(5):1263-1275. ISSN: 2309-8694. <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-28-05/06.pdf>

ANANTASOOK N, Wanapat M, Cherdthong A, Gunun P. 2013. Changes of microbial population in the rumen of dairy steers as influenced by plant containing tannins and saponins and roughage to concentrate ratio. *Asian Australasian Journal of Animal Science*. 26(11): 1583–1591. ISSN: 1011-2367. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13182>

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2006. *Official methods of analysis*. 18. ed. Arlington, VA, USA: AOAC International. ISBN: 978-0-035584-77-6.



APAJALAHTI J, Vienola K, Raatikainen K, Holder V, Moran CA. 2019. Conversion of branched-chain amino acids to corresponding isoacids—an *in vitro* tool for estimating ruminal protein degradability. *Frontiers in Veterinary Science*. 6:311. ISSN: 2297-1769. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00311>

BODAS R, Prieto N, García-González R, Andrés S, Giráldez FJ, López S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*. 176(1-4):78-93. ISSN: 0377-8401. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010>

BROUDISCOU L, Lassalas B. 2000. Effects of *Lavandula officinalis* and *Equisetum arvense* dry extracts and isoquercitrin on the fermentation of diets varying in forage contents by rumen microorganisms in batch culture. *Reproduction Nutrition Development*. 40(5):431-440. ISSN: 0926-5287. <https://doi.org/10.1051/rnd:2000110>

CAB-JIMÉNEZ FE, Ortega-Cerrilla ME, Quero-Carrillo AR, Enríquez-Quiroz JF, Vaquera-Huerta H, Carranco-Jauregui ME. 2018. Composición química y digestibilidad de algunos árboles tropicales forrajeros de Campeche, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 11:2199-2204. ISSN: 2007-9230. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i11.798>

DELGADO DC, Galindo J, González R, González N, Scull I, Dihigo L, Cairo J, Aldama A I, Moreira O. 2012. Feeding of tropical trees and shrub foliages as a strategy to reduce ruminal methanogenesis: Studies conducted in Cuba. *Tropical Animal Health and Production*. 44(5):1097-1104. ISSN: 0049-4747. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-0045-5>

ERWIN ES, Marco GJ, Emery EM. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*. 44(9):1768-1771. ISSN: 0022-0302. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(61\)89956-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(61)89956-6)

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2017. *Assessment of greenhouse gas emissions and mitigation potential. Global Livestock Environmental Assessment Model (GLEAM)*. <https://www.fao.org/gleam/en/>

GARCÍA E. 2004. *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen*. Quinta edición. DF, México: Instituto de Geografía-Universidad Nacional Autónoma de México. ISBN: 970-32-1010-4. <http://www.publicaciones.igg.unam.mx/index.php/ig/catalog/view/83/82/251-1>

GARNETT T. 2010. Livestock and climate change. En: D'Silva J, Webster J. *The meat crisis: Developing more sustainable production and consumption*. Londres, Reino Unido: Earthscan. Pp. 34-56. ISBN: 978-1-84407-902-5. <https://doi.org/10.4324/9781315562032>



GÓMEZ-FUENTES-GALINDO T, González-Rebeles C, López-Ortiz S, Ku-Vera JC, Albor-Pinto CDJ, Sangines-García JR. 2017. Dominancia, composición química-nutritiva de especies forrajeras y fitomasa potencial en una selva secundaria. *Agricultura Sociedad y Desarrollo*. 14(4):617. ISSN: 2594-0244. <http://dx.doi.org/10.22231/asyd.v14i4.699>

GUIL-GUERRERO JL, Ramos L, Moreno C, Zúñiga-Paredes JC, Carlosama-Yopez M, Ruales P. 2016. Antimicrobial activity of plant-food by-products: a review focusing on the tropics. *Livestock Science*. 189:32-49. ISSN: 1871-1413. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2016.04.021>

HAQUE MN. 2018. Dietary manipulation: A sustainable way to mitigate methane emissions from ruminants. *Journal of Animal Science and Technology*. 60(1):15. ISSN: 2055-0391. <https://doi.org/10.1186/s40781-018-0175-7>

HOOK SE, Wright ADG, McBride BW. 2010. Methanogens: Methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*. 1(11). ISSN: 1472-3636. <https://doi.org/10.1155/2010/945785>

JOHNSON KA, Johnson DE. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*. 73(8):2483-2492. ISSN: 0021-8812. <https://doi.org/10.2527/1995.7382483x>

KAMALAK A, Canbolat O, Gurbuz Y, Ozay O, Ozcan CO, Sakarya M. 2004. Chemical composition and in vitro gas production characteristics of several tannin containing tree leaves. *Livestock Research for Rural Development*. 16(6):60-67. ISSN: 0121-3784. <http://www.lrrd.org/lrrd16/6/kama16044.htm>

KHOLIF AE, Elghandour MMY, Rodríguez GB, Olafadehan OA, Salem AZM. 2017. Anaerobic ensiling of raw agricultural waste with a fibrolytic enzyme cocktail as a cleaner and sustainable biological product. *Journal of Cleaner Production*. 142: 2649-2655. ISSN: 0959-6526. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.11.012>

KONGVONGXAY S, Preston TR, Leng RA, Khang DN. 2011. Effect of a tannin-rich foliage (*Mimosa pigra*) on feed intake, digestibility, N retention and methane production in goats fed a basal diet of *Muntingia calabura*. *Livestock Research for Rural Development*. 23. ISSN: 0121-3784. <http://www.lrrd.org/lrrd23/3/sito23048.htm>

LAKHANI N, Lakhani P. 2018. Plant secondary metabolites as a potential source to inhibit methane production and improve animal performance. *International Journal of Chemical Studies*. 6(3):3375-3379. ISSN: 2321-4902. <https://www.chemijournal.com/archives/2018/vol6issue3/PartAW/6-3-425-872.pdf>

MEALE SJ, Chaves AV, Baah J, McAllister TA. 2012. Methane Production of Different Forages in *In vitro* Ruminant Fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 25(1):86-91. ISSN: 1011-2367. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11249>



MENKE KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *The Journal of Agricultural Science*. 93(1): 217-222. ISSN: 0021-8596.

<https://doi.org/10.1017/S0021859600086305>

MOLINA IC, Donneys G, Montoya S, Rivera JE, Villegas G, Chará J, Barahona R. 2015. La inclusión de *Leucaena leucocephala* reduce la producción de metano de terneras Lucerna alimentadas con *Cynodon plectostachyus* y *Megathyrus maximus*. *Livestock Research for Rural Development*. 27(5):96. ISSN: 0121-3784.

<http://www.lrrd.org/lrrd27/5/moli27096.html>

ONU (Organización de la Naciones Unidas). 2019. *Población*.

<https://www.un.org/es/sections/issues-depth/population/index.html>

PANG Z, Chen J, Wang T, Gao C, Li Z, Guo L, Xu J, Cheng Y. 2021. Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: A review. *Frontiers in Plant Science*. 12:621276. ISSN: 1664-462X. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.621276>

PATRA A, Park T, Kim M, Yu Z. 2017. Rumen Methanogens and Mitigation of Methane Emission by Anti-Methanogenic Compounds and Substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 8(1): 13. ISSN: 2049-1891. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0145-9>

PEREIRA GA, Arruda HS, de Moraes DR, Eberlin MN, Pastore GM. 2018. Carbohydrates, volatile and phenolic compounds composition, and antioxidant activity of calabura (*Muntingia calabura* L.) fruit. *Food Research International*. 108:264-273. ISSN: 0963-9969. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.046>

PUJANINGSIH RI, Sulistiyanto B, Sumarsih S. 2018. Observation of *Muntingia calabura*'s leaf extract as feed additive for livestock diet. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 119:12-19. ISSN: 1755-1307. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/119/1/012019>

PUSPITANING IR. 2012. *Protozoal population and rumen fermentation characteristics of diet with Muntingia calabura leaves addition in vitro* [Licenciatura, Institut Pertanian Bogor]. <https://123dok.com/document/1y9mm8jq-protozoal-population-fermentation-characteristics-muntingia-calabura-leaves-addition.html>

RIVERA JE, Chará J, Gomez-Leyva JF, Ruíz T, Barahona R. 2018. Variabilidad fenotípica y composición fitoquímica de *Tithonia diversifolia* A. Gray para la producción animal sostenible. *Livestock Research for Rural Development*. 30(12). ISSN: 0121-3784. <http://www.lrrd.org/lrrd30/12/rive30200.html>



RIVERA JE, Molina IC, Donneys G, Villegas G, Chará J, Barahona R. 2015. Dinámica de fermentación y producción *in vitro* de metano en dietas de sistemas silvopastoriles intensivos con *L. leucocephala* y sistemas convencionales orientados a la producción de leche. *Livestock Research for Rural Development*. 27(4):1-15. ISSN: 0121-3784. <http://www.lrrd.org/lrrd25/1/phon25015.htm>

ROEHE R, Dewhurst RJ, Duthie CA, Rooke JA, McKain N, Ross DW, Hyslop JJ, Waterhouse A, Freeman TC, Watson M, Wallace RJ. 2016. Bovine host genetic variation influences rumen microbial methane production with best selection criterion for low methane emitting and efficiently feed converting hosts based on metagenomic gene abundance. *PLOS Genetics*. 12(2): e1005846. ISSN: 1553-7404. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005846>

SAS Institute. 2004. *Statistical Analysis Software SAS/STAT®*. version 9.1, Cary, N.C., USA: SAS Institute Inc., ISBN: 978-1-59047-243-9. http://www.sas.com/en_us/software/analytics/stat.html#

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. NOM-062-ZOO-1999, México: Diario Oficial de la Federación. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf

SILIVONG P, Hervasen B, Preston TR. 2013. Methane production from Jack fruit, Muntingia, Leucaena, Gliricidia (*Gliricidia sepium*), Mimosa (*Mimosa pigra*) and *Acacia auriculoformis* foliages in an *in vitro* incubation with potassium nitrate as source of NPN. *Livestock Research for Rural Development*. 25(1). ISSN: 0121-3784. <http://www.lrrd.org/lrrd25/1/phon25015.htm>

SOSA-RUBIO EE, Pérez-Rodríguez D, Ortega-Reyes L, Zapata-Buenfil G. 2004. Evaluación del potencial forrajero de árboles y arbustos tropicales para la alimentación de ovinos. *Técnica Pecuaria México*. 42(2):129-144. ISSN: 0040-1889. <https://www.redalyc.org/pdf/613/61342201.pdf>

THEODOROU MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, 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. ISSN: 0377-8401. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)

UGBOGU EA, Elghandour MMY, Ikpeazu VO, Buendía GR, Molina OM, Arunsi UO, Emmanuel O, Salem AZM. 2019. The potential impacts of dietary plant natural products on the sustainable mitigation of methane emission from livestock farming. *Journal of Cleaner Production*. 213, 915–925. ISSN: 0959-6526. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.12.233>



VALENCIA-DEL TORO G, Garín-Aguilar ME. 2010. *Manual de Prácticas de Productos Naturales*. Instituto Politécnico Nacional. DF, México.

VAN SOEST PJ, Robertson JB, Lewis BA. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74(10):3583-3597. ISSN: 0022-0302. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)

VARGAS J, Cárdenas E, Pabón M, Carulla J. 2012. Emisión de metano entérico en rumiantes en pastoreo. *Archivos de Zootecnia*. 61. ISSN: 1885-4494. <https://doi.org/10.21071/az.v61i237.2958>

VELEZ-TERRANOVA M, Campos-Gaona R, Sánchez-Guerrero H. 2014. Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 17(3):489-499. ISSN: 1870-0462. <https://www.redalyc.org/pdf/939/93935728004.pdf>

ZHANG X, Zhang H, Wang Z, Zhang X, Zou H, Tan C, Peng Q. 2017. Effects of dietary carbohydrate composition on rumen fermentation characteristics and microbial population *in vitro*. *Italian Journal of Animal Science*. 14(3):489-499. ISSN: 1870-0462. <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3366>

[Errata Erratum](#)

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>