

Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2020; 10:1-11. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2020.11>
Artigo Original. Recebido: 30/01/2020. Aceito: 03/06/2020. Publicado: 15/06/2020. Chave: 2020-9.

Substituição de folhas de alho por feno de alfafa e seu efeito na fermentação ruminal *in vitro*

Substitution of garlic leaves to alfalfa hay and its effect on *in vitro* ruminal fermentation

Torres-Fraga Karla^{1*}, Páez-Lerma Jesús² , Pámanes-Carrasco Gerardo³ ,
Herrera-Torres Esperanza⁴ , Carrete-Carreón Francisco⁴ , Murillo-Ortiz
Manuel^{**4} 

¹Estudiante del Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad Juárez del Estado de Durango, México. ²Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Durango, México. ³Instituto de Silvicultura e Industria de la Madera, Universidad Juárez del Estado de Durango, México. ⁴Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Juárez del Estado de Durango, México. *Autor responsable: Torres-Fraga Karla. **Autor para correspondência: Murillo-Ortiz Manuel, Carretera Durango - Mezquital Km 11.5, C.P. 34307. 6181830274. Durango, Durango, México. karlatf12@hotmail.com, jpaez@itdurango.edu.mx, gerardo.pamanes@gmail.com, hetoes99@yahoo.com.mx, focc1928mx@yahoo.com, manuelmurillo906@gmail.com

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a substituição do feno de alfafa por folhas de alho na produção *in vitro* de gás e metano, bem como nos padrões de fermentação ruminal. Quatro tratamentos foram avaliados: (T1) feno de alfafa (50%); (T2) feno de alfafa (33%) + folhas de alho cru (17%); (T3) feno de alfafa (17%) + folhas de alho cru (33%) e (T4) folhas de alho cru (50%). Os maiores valores de "a" (produção de gás da fração solúvel); "b" (produção de gás da fração insolúvel) e "c" (taxa de produção de gás) foram encontrados em T4 (mL); enquanto foram menores em T1 ($P < 0,05$); mas não foram observadas diferenças entre T2 e T3 ($P > 0,05$). A maior concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foi registrada em T4 e a menor em T1 ($P < 0,05$). As concentrações de propionato aumentaram com T4 e diminuíram com T1, enquanto aquelas de acetato diminuíram com T4 e aumentaram com T1 ($P < 0,05$). A maior produção de metano foi registrada em T1 e a menor em T4 ($P < 0,05$). Conclui-se que a substituição do feno de alfafa por folhas de alho em dietas para bovinos melhorou a fermentação ruminal e diminuiu a produção de metano em condições *in vitro*.

Palavras-chave: folhas de alho, produção de gás, fermentação ruminal e metano.

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the substitution of alfalfa hay to garlic leaves during the *in vitro* gas and methane production, as well as in ruminal fermentation patterns. There were four treatments: (T1) alfalfa hay (50%); (T2) alfalfa hay (33%) + raw garlic leaves (17%); (T3) alfalfa hay (17%) + raw garlic leaves (33%) and (T4) raw garlic leaves (50%). The highest values of "a" (gas production from the soluble fraction); "b" (gas production from the insoluble fraction) and "c" (gas production rate) were found in T4 (mL); while lower in T1 ($P < 0.05$); but no differences were observed between T2 and T3 ($P > 0.05$). The highest ammonia-nitrogen (NH₃-N) concentration was recorded in T4 and the lowest in T1 ($P < 0.05$). The propionate concentrations increased with

T4 and decreased with T1, whereas the acetate decreased with T4 and increased with T1 ($P<0.05$). The highest methane production was recorded in T1 and the lowest in T4 ($P<0.05$). It is concluded that substitution of alfalfa hay to garlic leaves in beef cattle diets, improved the ruminal fermentation and decreased methane production under *in vitro* conditions.

Keywords: garlic leaves, gas production, ruminal fermentation, methane.

INTRODUÇÃO

Há uma tendência de demanda mundial pelo consumo de alho, o que tem gerado empregos na alimentação, principalmente em ruminantes, de seus principais subprodutos como cascas, folhas e palhas (Kallel e Ellouz, 2017). Em vários países, as folhas de alho obtidas durante a colheita são incineradas e, como consequência, existem problemas associados aos custos de eliminação e contaminação ambiental (Han *et al.*, 2013).

Nesse sentido, pode-se afirmar que as emissões de metano pelos ruminantes não só causam graves problemas ambientais, mas também representam uma importante fonte de perda de energia para os animais. (Gallegos *et al.*, 2019; Lan e Yang, 2019). A produção de gases de efeito estufa (GEE) que são produzidos em diferentes sistemas pecuários e seu impacto nas mudanças climáticas são uma grande preocupação em todo o mundo. O metano entérico foi relatado como o GEE mais importante emitido (50-60%) em sistemas de produção de ruminantes (Tapio *et al.*, 2017; Haque, 2018).

Como resultado desse problema, muitas tentativas foram feitas para modificar a fermentação ruminal e diminuir a produção de metano; entre eles está a incorporação na dieta de ruminantes de forragens de boa qualidade, como o feno de alfafa. O alho e alguns de seus componentes também diminuem a produção de metano em condições *in vivo* e *in vitro* (Kamra *et al.*, 2012). Na verdade, até agora poucos estudos investigaram os efeitos do alho e seus subprodutos da colheita na fermentação ruminal e na produção de metano.

Com base no exposto, assumimos que a substituição de folhas de alho por feno de alfafa em dietas para bovinos de corte produz mudanças semelhantes nos padrões de fermentação ruminal e produção de metano durante a fermentação *in vitro*. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a substituição do feno de alfafa por folhas de alho na produção de gás e metano *in vitro*, bem como nos padrões de fermentação ruminal.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na unidade metabólica e no laboratório de Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica da Universidade Juárez do estado de Durango (México).

Amostragem de folhas de alho cru. As amostras (folhas de 25 cm de comprimento) de alho cru (*Allium sativum*) utilizadas neste estudo foram coletadas na região norte de México. Para garantir uma amostragem representativa, as amostras foram coletadas cinco vezes, entre janeiro e maio de 2019. Antes das análises químicas e dos testes *in vitro*, as amostras foram secas e depois moídas em malha de 1 mm.

Tratamentos experimentais. Em cada tratamento experimental, feno de alfafa e feno de folha de alho cru foram usados como fontes de forragem. A composição química do feno de alfafa cru e do feno de folha de alho é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química do feno de alfafa e folhas de alho (% MS)

	Feno de alfafa	Folhas de alho
MS	90.2	89.5
MO	88.9	90.1
PC	18.0	18.1
EE	1.6	2.1
FDN	33.2	35.1
FDA	23.7	26.7
CHT	68.8	66.3
CNF	35.6	31.2
L	5.7	6.8

MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PC = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; CHT = carboidratos totais, CNF = carboidratos não fibrosos; L = lignina

Foram avaliados quatro tratamentos: (T1) feno de alfafa (50% MS) + folhas de alho cru (0% MS); (T2) feno de alfafa (33% MS) + folhas de alho cru (17% MS); T3 feno de alfafa (17% MS) + folhas de alho cru (33% MS); Feno de alfafa T4 (0% MS) + folhas de alho cru (50% MS). Proporções semelhantes de milho moído, caroço de algodão e minerais foram usadas em todos os tratamentos. A composição nutricional dos tratamentos experimentais é apresentada na Tabela 2.

Composição nutricional. Cada amostra dos tratamentos experimentais foi analisada em triplicata para matéria seca (MS), proteína bruta (PC), extrato etéreo (EE) e matéria orgânica (MO) (AOAC, 2000). As análises de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina em detergente ácido (ADL) foram determinadas usando a técnica de bolsa de filtro com um analisador de fibra (ANKOM Technology, Fairport, NY, EUA). O teor de carboidratos não fibrosos (CNF) foi calculado pela diferença entre os carboidratos totais (CHT) e a% de FDN. A digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e matéria orgânica (DIVMO) foi determinada usando a incubadora Daisy (ANKOM Technology, Fairport, NY, EUA).

Tabela 2. Composição nutricional dos tratamentos experimentais

	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Feno de alfafa	50	33	17	0
Folhas de alho	0	17	33	50
Milho moído	39	39	39	39
Farinha	10	10	10	10
Minerais	1	1	1	1
	Composição química (MS%)			
	T1	T2	T3	T4
MS	96.1	95.6	95.6	93.9
MO	92.5	91.8	92.0	93.0
PC	15.0	14.6	14.7	15.6
EE	2.0	2.0	2.5	2.1
DIVMS	58.2	60.3	62.2	64.2
DIVMO	56.1	58.5	59.1	62.2
FDN	53.3	49.3	50.9	47.1
FDA	28.3	23.3	21.7	19.2
CNF	21.5	27.2	23.9	28.2

MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; PC = proteína bruta; EE = extrato etéreo; DIVMS = digestibilidade *in vitro* da matéria seca; DIVMO = digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; CNF = carboidratos não fibrosos

Gás *in vitro*, padrões de fermentação ruminal e produção de metano. A produção de gás *in vitro* foi medida usando o sistema de produção de gás ANKOM. O líquido ruminal foi coletado aproximadamente 3 horas após a alimentação matinal de dois novilhos fistulados no rúmen, alimentados em acesso aberto com feno de alfafa. O fluido ruminal foi imediatamente filtrado por quatro camadas de gaze e transportado para o laboratório em uma garrafa térmica selada. O fluido ruminal resultante foi purgado com CO₂ antes de ser usado como inóculo. Aproximadamente 1 g de amostras secas e moídas de cada tratamento foram pesadas em triplicata e colocadas em módulos de vidro. O líquido ruminal foi pipetado para cada módulo e misturado com saliva de McDougall (120 mL).

A produção de gás foi registrada após 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 72 e 96 h de incubação. A cinética de produção de gás (PD) foi ajustada ao modelo não linear proposto por Ørskov e McDonald (1979), que é o seguinte: $PD(t) = a + b \times (1 - \exp(-ct))$; onde "a" é a produção de gás da fração solúvel (mL), "b" é a produção de gás da fração insolúvel (mL), "c" é a taxa constante de produção de gás (mL/h) e "t" é o tempo de incubação. Para a determinação do metano, após 24 h de incubação, 10 mL de gás foram coletados do espaço superior dos módulos do sistema de produção de gás, de onde foram retiradas subamostras de 3 mL e a produção de metano foi determinada em um cromatógrafo de gás (Kara, 2015).

Da mesma forma, após o término das 24 horas de incubação e antes da filtração, foram coletadas duas amostras (5 mL) do líquido de cada módulo, sendo o pH imediatamente

medido e armazenado a -20 °C até a análise posterior de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos voláteis (AGV) (Ammar *et al.*, 2005).

Análise estatística. Uma análise de variância foi realizada em um delineamento inteiramente casualizado para comparar os parâmetros de produção de gás *in vitro*, metano e padrões de fermentação ruminal com o procedimento MIXED de SAS (2002). As médias individuais foram separadas pelo teste de intervalo múltiplo de Tukey. As diferenças médias foram consideradas significativas para $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parâmetros de produção de gás *in vitro*. Os maiores valores de "a", "b" e "c" (Tabela 3), foram encontrados em T4; enquanto os menores valores em T1 ($P < 0,05$); mas não foram observadas diferenças entre T2 e T3 ($P > 0,05$). Diferenças no valor "a + b" foram observadas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Os resultados são consistentes com aqueles relatados por Tag El-Dini *et al.* (2012), que encontraram um valor "a" de 0,60% quando a polpa de alho foi fermentada em condições *in vitro* ao nível de 3% do concentrado.

Neste estudo, as diferenças observadas entre os tratamentos no valor "a" podem ser atribuídas às diferentes concentrações dos tratamentos em carboidratos não fibrosos (La O *et al.*, 2008). Os valores médios de "b" e a + b encontrados no presente estudo foram 116,0 mL 200 mg⁻¹ MS e 116,5 mL 200 mg⁻¹ MS, respectivamente. Esses valores coincidem com os relatados por Sahli *et al.* (2018) quando o alho em pó, nas doses de 32 mg, foi incubado *in vitro* em dieta composta de 50% de feno de azevém e 50% de concentrado comercial.

O valor de "c" registrado com T4 (9,2 mL h⁻¹) foi superior ao encontrado por Anassori *et al.* (2012) (3,5 mL h⁻¹), que avaliou a cinética de produção de gás *in vitro* de alho cru.

No presente estudo, a alta taxa constante de produção de gás "c" registrada em T4 indica uma alta disponibilidade de nutrientes para os microrganismos ruminais; enquanto os menores valores de "c" observados em T1 podem ser resultado de um alto teor de FDN, cujos componentes químicos podem diminuir a taxa de fermentação do substrato (Fievez *et al.*, 2005).

Tabela 3. Parâmetros de produção de gás dos tratamentos experimentais

	Tratamentos				média	EPM
	T1	T2	T3	T4		
a (mL 0.2 g ⁻¹ MS)	0.56 ^c	0.70 ^b	0.72 ^b	0.76 ^a	0.68	0.12
b (mL 0.2 g ⁻¹ MS)	110.7 ^c	117.7 ^b	115.1 ^b	120.2 ^a	116	0.81
c (mL h ⁻¹)	6.0 ^c	8.0 ^b	8.0 ^b	9.2 ^a	5.8	0.025
a+b (mL 0.2 g ⁻¹ MS)	111.2 ^d	118.4 ^b	115.8 ^c	120.9 ^a	116.5	1.10

^{abc} Valores com letras diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$).

a = Produção de gás da fração solúvel, b = Produção de gás da fração insolúvel; c = taxa constante de produção de gás; a + b = Potencial produção de gás; EPM: erro padrão da média

Padrões de fermentação ruminal e produção de metano. Os padrões de fermentação ruminal e produção de metano são apresentados na Tabela 4. A concentração de N-NH₃ variou de 15,1 a 18,1 mg/dL. A maior concentração de N-NH₃ foi registrada em T4 e a menor em T1 (P <0,05). Não houve diferenças entre T2, T3 e T4 nas concentrações totais de AGV (P > 0,05); mas ambos os tratamentos foram diferentes em T1 (P <0,05).

A maior concentração de acetato foi registrada em T1 e a menor em T4 (P <0,05); enquanto a maior concentração de propionato foi registrada em T4 e a menor em T1 (P <0,05). Não houve diferença entre T1, T2 e T3 na relação acetato: propionato (P > 0,05); mas ambos os tratamentos foram diferentes em T4 (P <0,05). A maior produção de metano foi registrada em T1 e a menor em T4 (P <0,05).

As concentrações ruminiais de N-NH₃ registradas em todos os tratamentos avaliados mantiveram-se dentro da faixa sugerida para ótimo crescimento microbiano. De acordo com [Wanapat e Pimpa \(1999\)](#), uma faixa de 15 a 30 mg/100 mL são as concentrações mínimas necessárias para a síntese ideal de proteína microbiana.

Em contraste, com os resultados obtidos neste estudo, vários estudos *in vitro* e *in vivo* relatam que o óleo de alho e o pó de alho reduzem ou não têm efeito na concentração de N-NH₃ no fluido ruminal ([Cardozo et al., 2004](#)); no entanto, [Yang et al. \(2007\)](#) encontraram aumento na concentração de N-NH₃ ruminal, quando o alho cru foi incorporado às dietas de vacas em lactação. Neste estudo, a maior concentração de N-NH₃ obtida com o T4 pode ser explicada pelo alto teor de proteína bruta fornecida pelas folhas de alho ([Panthee et al., 2017](#)).

Tabela 4. Padrões de fermentação ruminal e produção de metano dos tratamentos experimentais

	Tratamentos					EPM
	T1	T2	T3	T4	Média	
pH	6.7 ^a	6.7 ^a	6.6 ^a	6.5 ^a	6.6	0.07
N-NH ₃ , mg dL ⁻¹	15.1 ^c	17.1 ^b	17.5 ^b	18.1 ^a	16.7	0.03
AGV totais, mM	86.6 ^b	104.4 ^a	104.6 ^a	104.8 ^a	100	0.36
Acetato VFA, mol 100 mol ⁻¹	52.8 ^a	50.5 ^b	50.8 ^b	48.1 ^c	50.5	0.10
Propionato mol 100 mol ⁻¹	24.8 ^c	28.0 ^b	27.8 ^b	33.0 ^a	28.4	0.08
Butirato mol 100 mol ⁻¹	12.2 ^a	12.6 ^a	13.5 ^a	13.2 ^a	12.8	0.02
Razão A: P	2.1 ^a	1.8 ^a	1.8 ^a	1.4 ^b	1.7	0.03
Metano (mL g ⁻¹ MS)	19.1 ^a	17.0 ^b	16.8 ^b	9.5 ^c	15.6	0.53

^{abc} Valores com letras diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes (P <0,05).

EPM: erro padrão da média

As concentrações totais de AGV obtidas com T2, T3 e T4 são consistentes com outros estudos *in vitro*, onde não diferiram com a adição de óleos de alho ([Klevenhusen et al., 2011](#)). A concentração de propionato observada no T4 foi maior que nos demais tratamentos; isto é evidenciado pela diminuição da razão acetato: propionato.

Além disso, o aumento na concentração de propionato pode ser atribuído à quantidade de carboidratos não fibrosos fornecidos pelo T4 ([Van Soest, 1994](#)). Da mesma forma, a redução na proporção de acetato para propionato registrada em T4 indica uma melhora na contribuição de energia líquida ([Zhong et al., 2019](#)). Resultados semelhantes são relatados por [Mirzaei-Aghsaghali e Maheri-Sis \(2011\)](#), que descobriram que o óleo de alho aumentou as proporções de propionato e butirato, mas reduziu a proporção de acetato. Neste estudo, a baixa concentração de metano foi obtida com T4 (alto teor de folhas de alho); e coincide com os resultados encontrados por [Kongmun et al., \(2010\)](#), que relatam uma diminuição na produção de metano quando o alho em pó foi avaliado na dieta de ruminantes. Em nosso estudo, os valores de metano registrados nos quatro tratamentos foram inferiores aos relatados por [Zafarian e Manafi \(2013\)](#), que avaliaram em condições *in vitro*, a adição de diferentes doses de alho em pó (2, 4 e 6% MS) em dietas com 50% de fibra e 50% de concentrado.

Neste estudo, a redução da produção de metano registrada no T4 em comparação com os demais tratamentos pode ser atribuída ao aumento da concentração de propionato, pois a formação do propionato consome equivalentes redutores; enquanto a formação de acetato gera H₂ para metanogênese ([Moss et al., 2000](#)). Qualquer componente ou variável na dieta que cause uma mudança em favor da produção de propionato será acompanhada por uma redução na produção de metano por unidade de dieta fermentada; enquanto o oposto é observado para acetato e butirato ([Pinares-Patiño, 2003](#)). No entanto, as diferenças observadas neste estudo na produção de metano, em comparação com as relatadas na literatura, podem estar relacionadas a diferentes variedades genéticas e possivelmente ao estado fenológico da planta do alho; o que resulta em diferentes conteúdos da parede celular e como consequência nos padrões de fermentação ruminal ([Lee et al., 2017](#)).

CONCLUSÕES

A substituição do feno de alfafa por folhas de alho na dieta de bovinos de corte melhorou alguns indicadores de importância nutricional, como a produção de gás a partir da fração solúvel e a taxa constante de produção de gás. Da mesma forma, aumentou as concentrações de N-NH₃ e AGV total e reduziu a produção de metano. Mais pesquisas são necessárias para avaliar os efeitos das folhas de alho na dieta de ruminantes sobre os padrões de fermentação ruminal e produção de metano em condições *in vivo*; bem como avaliar a sustentabilidade da suplementação foliar com alho para mitigar a metanogênese ruminal sem efeitos deletérios no desempenho animal.

LITERATURA CITADA

- AMMAR H, López S, González JS. 2005. Assessment of the digestibility of some Mediterranean shrubs by *in vitro* techniques. *Animal Feed Science and Technology*. 119: 323-331. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.12.013>
- ANASSORI E, Dalir-Naghadeh B, Pirmohammadi R, Taghizadeh A, Asri-Rezaei S, Farahmand-Azar S, Besharati M, Tahmoozi M. 2012. *In vitro* assessment of the digestibility of forage based sheep diet, supplemented with raw garlic, garlic oil and monensin. *Veterinary Research Forum*. 3: 5-11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4312812/>
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis, Association of AOAC International. 17th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, USA. Disponible: <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis-21st-edition-2019/>
- CARDOZO P W, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C. 2004. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science*. 82:(11) 3230-3236. <https://doi.org/10.2527/2004.82113230x>
- FIEVEZ V, Babayemi OJ, Demeyer D. 2005. Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124: 197-210. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.05.001>
- GALLEGOS FP, Bañuelos VR, Delgadillo RL, Echavarría CF, Meza LC, Rodríguez TD. 2019. Differential evaluation of oregano extracts in the production of volatile fatty acids and methane during ruminal fermentation *in vitro*. *Abanico Veterinario*. 9(1):1-18. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2019.91>
- HAN X, Cheng Z, Meng H, Yang X, Ahmad I. 2013. Allelopathic effect of decomposed garlic (*Allium sativum* L.) stalk on lettuce (*L. Sativa* Var. *Crispa* L.). *Pakistan Journal of Botany*. 45:225-233. [https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/45\(1\)/32.pdf](https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/45(1)/32.pdf)
- HAQUE MN. 2018. Dietary manipulation: a sustainable way to mitigate methane emissions from Ruminants. *Journal Animal Science and Technology*. 60: 15. <https://doi.org/10.1186/s40781-018-0175-7>

KALLEL F, Ellouz CS. 2017. Perspective of garlic processing wastes as low-cost substrates for production of high-added value products: a review. *Environmental Progress and Sustainable Energy*. 36: 1765-1777. <https://doi.org/10.1002/ep.12649>

KAMRA DN, Agarwal N, Sakthivel PC, Chaudhary LC. 2012. Garlic as a rumen modifier for eco-friendly and economic livestock production. *Journal of Applied Animal Research*. 40: 90-96. <https://doi.org/10.1080/09712119.2011.607764>

KARA K. 2015. *In vitro* methane production and quality of corn silage treated with maleic acid. *Italian Journal of Animal Science*. 14: 718-722. <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3994>

KLEVENHUSEN F, Zeitz JO, Duval S, Kreuzer M, Soliva CR. 2011. Garlic oil and its principal component diallyl disulfide fail to mitigate methane, but improve digestibility in sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 166-167: 356-363. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.071>

KONGMUN P, Wanapat M, Pakdee P, Navanukraw C. 2010. Effect of coconut oil and garlic powder on *in vitro* fermentation using gas production technique. *Livestock Science*. 127: 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.08.008>

LA O, García R, Ruiz O, Castillo Y, Muro A, Rodríguez C, Arzola C, González H, Ortiz B. 2008. Potencial fermentativo ruminal *in vitro* de dos árboles (*Pithecellobium dulce* y *Tamarindos indica*) de importancia para la ganadería en ecosistemas frágiles, salinos y de alta sequía, situados en el Oriente de Cuba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 42: 57-61. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193015413009>

LAN W, Yang C. 2019. Ruminant methane production: Associated microorganisms and the potential of applying hydrogen-utilizing bacteria for mitigation. *Science of the Total Environment*. 654: 1270-1283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.180>

LEE YH, Kim YI, Oh YK, Ahmadi F, Kwak WS. 2017. Yield survey and nutritional evaluation of garlic stalk for ruminant feed. *Journal of Animal Science and Technology*. 59: 22. <https://doi.org/10.1186/s40781-017-0147-3>

MIRZAEI-AGHSAGHALI A, Maheri-Sis N. 2011. Factors affecting mitigation of methane emission from ruminants I: Feeding strategies. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 6: 888-908. <http://dx.doi.org/10.14269/2318-1265/jabb.v4n1p22-31>

MOSS AR, Jouany JP, Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annals of Zootechnie*. 49: 231-253. <https://doi.org/10.1051/animres:2000119>

ØRSKOV ER, McDonald I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*. 92: 499-503. https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/E2DB4F2290E374E10E9800E512D127A7/S0021859600063048a.pdf/estimation_of_protein_degradability_in_the_rumen_from_incubation_measurements_weighted_according_to_rate_of_passage.pdf

PANTHEE A, Matsuno A, Al-Mamun M, Sano H. 2017. Effect of feeding garlic leaves on rumen fermentation, methane emission, plasma glucose kinetics, and nitrogen utilization in sheep. *Journal of Animal Science and Technology*. 59: 14. <https://doi.org/10.1186/s40781-017-0139-3>

PINARES-PATÍÑO CS, Ulyatt MJ, Waghorn GC, Lassey KR, Barry TN, Holmes CW, Johnson DE. 2003. Methane emissions by alpaca and sheep fed on lucerne hay or grazed on pastures of perennial ryegrass/white clover or birdsfoot trefoil. *Journal of Agricultural Science*. 140: 215-226. <https://doi.org/10.1017/S002185960300306X>

SAHLI F, Darej C, Moujahed N. 2018. Potential of white garlic powder (*Allium sativum* L.) to modify *in vitro* ruminal fermentation. *South African Journal of Animal Science*. 48: 253-260. <http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v48i2.6>

SAS. System Analytics Static. 2002. User's Guide: Statistics Ver 9.0. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.

TAG EL-Dini AE, Mohara MS, Nour AA, Nasser ME. 2012. Effect of some herbs on the rumen fermentation: 1- Effect of ginger (*zingiber officinale*) and garlic (*allium sativum*) on gas production, energy values, organic matter digestibility and methane emission, *in vitro*. *Journal Agriculture and Enviromental Science, Damanhoure University Egypt*. 11: 33-52. <http://www.damanhour.edu.eg/pdf/agrfac/Root1/Vol.11-2-2.pdf>

TAPIO I, Snelling TJ, Strozzi F, Wallace RJ. 2017. The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 8: 7. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0141-0>

VAN Soest PJ. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. Ithaca, Cornell University Press, USA.

[https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=TlluDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Van+Soest+P+J.++\(1994\).+Nutritional+Ecology+of+the+Ruminant.+Ithaca,+Cornell+University+Press,+USA.&ots=lnCgEloYfy&sig=KEkNXOzwc9BFqFueYB25IK5Hvk8#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=TlluDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Van+Soest+P+J.++(1994).+Nutritional+Ecology+of+the+Ruminant.+Ithaca,+Cornell+University+Press,+USA.&ots=lnCgEloYfy&sig=KEkNXOzwc9BFqFueYB25IK5Hvk8#v=onepage&q&f=false)

WANAPAT M, Pimpa O. 1999. Effect of ruminal NH₃-N levels on ruminal fermentation, purine derivatives, digestibility and rice straw intake in swamp buffaloes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 12: 904–907.

<https://doi.org/10.5713/ajas.1999.904>

YANG WZ, Benchaar C, Ametaj BN, Chaves AV, He ML, McAllister TA. 2007. Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 90: 5671–5681.

<https://doi.org/10.3168/jds.2007-0369>

ZAFARIAN R, Manafi M. 2013. Effect of Garlic Powder on Methane Production, Rumen Fermentation and Milk Production of Buffaloes. *Annual Review and Research in Biology*. 3:1013-1019. <http://www.journalarrb.com/index.php/ARRB/article/view/24989>

ZHONG RZ, Xiang H, Cheng L, Zhao C, Wang F, Zhao X, Fang Y. 2019. Effects of feeding garlic powder on growth performance, rumen fermentation, and the health status of lambs infected by gastrointestinal nematodes. *Animals*. 9: 2-10.

<https://doi.org/10.3390/ani9030102>