

Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2020; 10:1-13. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2020.18>
 Artigo Original. Recebido: 18/02/2020. Aceito: 20/06/2020. Publicado: 28/07/2020. Chave:2020-14.

Leucaena leucocephala* e *Opuntia ficus-indica* reduzem a produção de metano *in vitro

Leucaena leucocephala and *Opuntia ficus-indica* reduce the ruminal methane production *in vitro*

Araiza-Ponce Karina¹ ID, Murillo-Ortiz Manuel¹ ID, Herrera-Torres Esperanza² ID, Valencia-Vázquez Roberto³ ID, Carrete-Carreón Francisco¹ ID, Pámanes-Carrasco Gerardo^{*4} ID

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Juárez del Estado de Durango. Durango, México. C.P. 34307. ²Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana. Tecnológico Nacional de México. Durango, México. ³Instituto Tecnológico de Durango. Tecnológico Nacional de México, Durango, México. C.P. 34080. ⁴Instituto de Silvicultura e Industria de la Madera. Universidad Juárez del Estado de Durango. Durango, México. *Autor de correspondência: Pámanes-Carrasco Gerardo. Universidad Juárez del Estado de Durango. Blvd. Guadiana 501, Ciudad Universitaria. Durango, Durango, México. C.P. 34130. kari_araiza@hotmail.com, manuelmurillo906@gmail.com, focc1928mx@yahoo.com, gerardo.pamanes@gmail.com. heotes99@yahoo.com.mx, roberto.valenciav@gmail.com.

Resumo

O objetivo foi avaliar a inclusão de *Leucaena leucocephala* (LL) e *Opuntia ficus-indica* (OFI) frescas e fermentadas como substituto do feno de alfafa (HA) na fração forrageira nos padrões de fermentação, cinética da produção de gás e metano *in vitro*. Quatro tratamentos (T1: 50% HA; T2: 30% LL e 20% HA; T3: 30% OFI e 20% HA; T4: 30% OFI fermentado e 20% HA) foram formulados como dietas bovinas. O conteúdo de compostos fenólicos totais e taninos condensados aumentou mais de 400% com T2 (P <0,05); taninos condensados aumentaram 45% quando OFI fermentado em T4 foi incluído. A concentração de nitrogênio amoniacal, os ácidos graxos voláteis, a produção de gás e a razão acetato:propionato foram diferentes entre os tratamentos (P <0,05). A produção máxima de gás foi observada quando LL foi adicionado à ração (P <0,05); não foram observadas alterações entre T1, T2 e T3 (P > 0,05). Além disso, a fase de atraso diminuiu com T2 (P <0,05). Também, a produção de metano foi diferente entre os tratamentos (P <0,05); reduções de 26% foram observadas quando LL foi incluído e 14% com OFI. De acordo com os resultados obtidos, LL e OFI são ingredientes que podem ser incluídos na dieta bovina e, assim, contribuem para a mitigação de gases de efeito estufa.

Palavras-chave: metanogênese, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentação ruminal, cacto forrageiro.

Abstract

This study aimed to evaluate the inclusion of *Leucaena leucocephala* (LL) and *Opuntia ficus-indica* (OFI) fresh and fermented as alfalfa hay substitute in the forage fraction on the ruminal fermentative parameters, gas production kinetics and methane production *in vitro*. Four treatments were formulated as beef cattle diets (T1: 50% HA; T2: 30% LL y 20% HA; T3: 30% OFI y 20% HA; T4: 30% OFI fermentado y 20% HA). Total phenolics compounds and condensed tannins (CT) increased over 400% when LL was included (P<0.05). Additionally, CT increased 45% when fermented OFI was included in the ration in T4 (P<0.05). Ammonia-nitrogen, volatile fatty acids, gas production and acetate:propionate ratio were different among treatments. The maximum gas production was observed when LL was included in T2 (P<0.05). However, no changes were observed among T1, T2 and T3 (P>0.05). In addition, lag phase decreased in T2 (P<0.05). Furthermore, methane production was different among treatments (P<0.05); reductions of 26 and 14% were observed when including LL and OFI, respectively. Thus, according to the obtained results, LL and OFI are ingredients, which may be included in the bovine diets and thereby contribute to the greenhouse gases mitigation.

Keywords: methanogenesis, *Saccharomyces cerevisiae*, ruminal fermentative, prickly pear.

INTRODUÇÃO

O setor pecuário passou por transformações substanciais nas últimas décadas. A crescente demanda resultante da explosão demográfica requer aumentos na produção pecuária (INECC, 2018). No México, a produção de bovinos teve um crescimento constante de 1,6% somente na última década, que atualmente possui uma produção de 1,88 milhões de toneladas de carne de carcaça (INECC, 2018). No entanto, um aumento na produção pecuária leva a um aumento nas emissões de gases de efeito estufa (GEE) da fermentação entérica ruminal; principalmente metano. Além disso, a síntese ruminal de metano representa uma perda de energia de até 12% para o animal (Johnson e Johnson, 1995). O metano é um gás que possui um valor calorífico até 28 vezes maior que o CO₂, por isso busca reduzir suas emissões. O metano antropogênico atinge até 40% do total de metano emitido na atmosfera, dos quais 18% são atribuíveis ao gado por fermentação entérica ruminal (IPCC, 2015).

Somente no México, em 2015, foram registradas emissões de 510.043 Gg de CO₂e (equivalentes de CO₂), dos quais 13% estão relacionados à atividade pecuária; aproximadamente 40% dessas emissões são metano (INECC, 2018). Por esse motivo, infinitas investigações em todo o mundo tentaram criar diversas estratégias que diminuam a produção de metano no rúmen, através de: modificações na dieta, uso de vários aditivos, vacinas, uso de extratos naturais, administração de compostos químicos e, ultimamente, a suplementação de compostos bioativos extraídos de plantas (Martin *et al.*, 2010; Pámanes-Carrasco *et al.*, 2019).

Atualmente, os esforços têm sido focados no uso de fontes não convencionais de forragem, que apresentam uma alternativa alimentar na produção animal. Dessa forma, algumas plantas cujo uso não é comum na alimentação de ruminantes podem ser usadas como uma alternativa para reduzir as emissões de GEE. De fato, devido à disponibilidade limitada de forragem em áreas áridas e semi-áridas, existem algumas árvores, arbustos e cactos que poderiam ser usados como fonte de forragem. Nesse sentido, *Leucaena leucocephala* (LL) é conhecida por apresentar alta qualidade nutricional, principalmente proteína (22-27% de MS; Aye e Adegun, 2013) e geralmente se adapta à desfolhamento e rebrota na estação seca; em zonas áridas, pode produzir até 112 t ha⁻¹ em áreas de até 430 mm de precipitação anual e temperatura média de 32 °C (Singh e Toky, 1995).

Além disso, em investigações anteriores, não foram relatadas alterações no consumo de matéria seca e no ganho de peso diário quando 40% do LL foi adicionado à ração (Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2017). Da mesma forma, certos cactos sem espinhos, como a variedade *Opuntia ficus-indica* (OFI), são considerados forrageiras frescas e palatáveis que são produzidas na estação seca e representam uma importante fonte de água para os animais (González-Arreola *et al.*, 2019). Entretanto, como o conteúdo de proteínas nos cactos é baixo, os pesquisadores desenvolveram procedimentos biotecnológicos que melhoram o conteúdo de proteínas brutas através de

fermentações em estado sólido, utilizando diferentes culturas de leveduras com sucesso (Flores-Ortiz y Reveles-Hernández, 2010; Herrera *et al.*, 2014, 2017). Além disso, a adição de células vivas, como leveduras, mostra uma redução na metanogênese em experimentos *in vitro* (Hristov *et al.*, 2013). Além disso, ambas as espécies (LL e OFI) contêm metabólitos secundários, como taninos condensados, saponinas e/ou flavonóides, que podem atuar como inibidores da síntese de metano (Aye e Adegun, 2013; Alves *et al.*, 2017; Pámanes-Carrasco *et al.*, 2019;). Consequentemente, o uso dessas espécies como fontes de forragem na alimentação de ruminantes pode ser uma alternativa na redução das emissões de GEE, principalmente metano; sem afetar o desenvolvimento produtivo.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a inclusão de *Leucaena leucocephala* e *Opuntia ficus-indica*, frescas e fermentadas, como substituto do feno de alfafa na fração forrageira nos padrões de fermentação, cinética da produção de gás e metano *in vitro*

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e materiais

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Juárez do Estado de Durango, México. As plantas de *L. leucocephala* foram coletadas aleatoriamente durante o outono de 2017, numa cultivar localizada na mesma Universidade. As plantas coletadas tinham 1 m de comprimento e a folhagem foi removida manualmente após a colheita. As folhas de *O. ficus-indica* (variedade AV6) foram coletadas de uma plantação localizada em terreno adjacente à Universidade. As culturas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foram adquiridas numa loja local. A Tabela 1 mostra a análise química proximal dos principais ingredientes (alfafa, LL, OFI e OFI fermentados).

Fermentação de *O. ficus-indica*

As amostras de OFI foram fermentadas com *Saccharomyces cerevisiae* a 32 ° C, por 48h, de acordo com os procedimentos relatados por Herrera *et al.* (2014). Culturas de levedura foram adicionadas a 1% (DM). Após a fermentação, as amostras foram secas e reduzidas a um tamanho de partícula de 1 mm para análise posterior.

Formulação de tratamentos experimentais e análises químicas

Foram formulados quatro tratamentos experimentais (Tabela 2), como dietas para bovinos com inclusão de *L. leucocephala* (T2), *O. ficus-indica* (AV6), fresco (T3) e *O. ficus-indica* fermentado (T4), como substituição parcial da fração de feno de alfafa no tratamento controle (T1).

Tabela 1. Caracterização química e nutricional dos ingredientes da fração forrageira em tratamentos experimentais

	Ingredientes (% MS)			
	Alfalfa	Leucaena	Nopal	Nopal Fermentado
MS Parcial	-	44.9	9.3	8.3
MS Total	89.7	89.5	90.0	88.1
Matéria orgânica	87.1	91.5	72.0	79.6
Proteína bruta	16.7	21.3	5.3	17.4
Extracto etéreo	1.4	3.1	1.7	3.1
FDN	45.0	42.9	53.9	42.2
FDA	27.6	13.8	13.5	21.2
Hemicelulose	17.3	29.1	40.3	21.0
Celulose	18.6	7.5	8.3	9.1
Lignina	6.5	8.1	4.8	5.3
DIVMS	55.7	45.7	51.5	65.8
DIVMO	50.0	42.3	40.0	59.8
CFT (mgEAG/gMS)	47.8	252.2	71.4	70.5
TC (mgEC/gMS)	5.3	69.3	3.1	2.0

MS: matéria seca; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra detergente ácida; DIVMS: Digestibilidade *in vitro* da matéria seca às 48h; DIVMO: Digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica às 48h; CFT: compostos fenólicos totais; CT: taninos condensados; mgEAG: miligramas equivalentes de ácido gálico; mgEC: miligramas de catequina equivalente.

10 kg de cada tratamento experimental foram preparados e misturados num misturador rotativo de capacidade de 150 L (Gladiator PRO, modelo H8155/16); então, uma amostra representativa de 1 kg foi coletada e, pelo método de quarteamento, subamostras para cada análise. Todos os tratamentos experimentais foram submetidos à análise de composição química (Tabela 3) de acordo com os procedimentos padronizados de AOAC (2010). Além disso, a fibra em detergente neutro (FDN) e a fibra em detergente ácido (FDA), bem como a celulose, a hemicelulose e a fração de lignina, foram determinadas num kit Fiber Analyzer 200 (ANKOM Technology, EUA), conforme proposto pelo fabricante (ANKOM, 2020). A digestibilidade *in vitro* do material seco (DIVMS) e a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) foram analisadas de acordo com os procedimentos sugeridos por ANKOM (2018).

Tabela 2. Ingredientes dos tratamentos experimentais

Ingredientes (% MS)	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Feno de alfalfa	50	20	20	20
<i>L. leucocephala</i>	0	30	0	0
<i>O. ficus-indica</i>	0	0	30	0
<i>O. ficus-indica fermentado</i>	0	0	0	30
Milho moído	30	30	30	30
Harinolina	19	19	19	19
Mistura mineral	1	1	1	1

Compostos fenólicos totais e taninos condensados

Os compostos fenólicos totais (CFT) foram determinados de acordo com os métodos propostos por [Heimler et al. \(2005\)](#). Além disso, os taninos condensados (CT) foram analisados conforme relatado por [Porter et al. \(1986\)](#).

Padrões de fermentação *in vitro*

Para testes de fermentação *in vitro*, o líquido ruminal foi obtido de dois bezerros Brangus, equipados com uma cânula ruminal, pesando aproximadamente 450 kg, alimentados com silagem de milho e concentrado na proporção de 50:50. Aproximadamente 1 g de amostra de cada tratamento experimental foi incubado com 120 mL de solução tampão-inóculo ruminal na proporção de 2: 1 a 39 °C em módulos de vidro ANKOM (ANKOM Technology, EUA), com tampas de borracha e plástico herméticas, conforme proposto pelo fabricante em triplicado ([ANKOM 2018](#)). Após 24 horas de incubação, os módulos foram abertos e o pH foi medido. Imediatamente, foram tomadas alíquotas de 10 mL para serem colocadas em garrafas de vidro, para posterior análise de ácidos graxos voláteis (AGV) e nitrogênio amoniacal, conforme proposto por [Galyean \(2010\)](#).

Produção de gás *in vitro*

Aproximadamente 1 g de cada tratamento experimental foi colocado em módulos de vidro ANKOM (ANKOM Technologies, EUA), equipados com um transdutor de pressão sem fio triplicado. As fermentações foram realizadas de acordo com o proposto pelo fabricante ([ANKOM, 2018](#)), incubando a amostra com uma mistura de solução tampão-inóculo ruminal na proporção de 2: 1. As incubações foram realizadas até 96h e as mudanças de pressão foram registradas a cada hora durante o processo. A cinética da produção de gás *in vitro* foi estimada ajustando os dados obtidos ao modelo de Gompertz, de acordo com a seguinte equação ([Murillo-Ortiz et al., 2018](#)):

$$GP = Ae^{-Le^{-(k_d t)}}$$

Onde GP = produção de gás no tempo t (mL); A = produção máxima de gás (mL); k_d = constante de produção de gás (h^{-1}); e L=tempo de latência antes do início da produção de gás (h). Além disso, para as medições das proporções de metano e CO₂, a válvula de alívio de pressão dos módulos foi aberta por 2 s e o gás liberado foi conduzido através de um tubo a um analisador de gás portátil, de acordo com o procedimento proposto pelo fabricante (GEMTM5000, LANDTEC, EUA) e adaptado por [González-Arreola et al. \(2019\)](#).

A energia metabolizável (EM) foi estimada de acordo com a equação proposta por [Menke et al. \(1979\)](#), que é apresentado abaixo:

$$EM = (1.1456 * GP_{24}) + (0.07675 * PC) + (0.1642 * EE) + 1.198$$

Onde ME = energia metabolizável (MJ/kg MS); GP24 = produção de gás após 24 h de incubação (mL); PC = proteína bruta (% MS); EE = extrato etéreo (% MS).

Análise estatística

Os dados experimentais obtidos foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado, utilizando o procedimento GLM do pacote estatístico SAS (2011). A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey, declarando diferenças significativas com $P < 0,05$.

Tabela 3. Análise química de tratamentos experimentais

Nutrientes (% MS)	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
MO	90.3	91.3	87.6	87.3
PC	17.4	18.1	14.3	17.5
EE	1.6	2.0	1.5	1.3
FDN	53.3	52.8	52.6	46.5
FDA	23.8	23.4	17.7	15.6
Hemicelulose	29.5	29.4	34.9	30.9
Celulose	16.3	14.5	11.9	11.6
Lignina	7.4	8.8	5.8	3.9
DIVMO	53.7	47.6	59.8	59.4
EM (Mcal/kgMS)	4.7	4.4	4.7	4.6

MO: matéria orgânica; PC: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra detergente ácida; DIVMO: Digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica às 48h; EM: energia metabolizável; T1: 50% de alfafa + 50% de concentrado; T2: 20% de alfafa + 30% de LL + 50% de concentrado; T3: 20% de alfafa + 30% de OFI + 50% de concentrado; T4: 20% de alfafa + 30% de OFI fermentado + 50% de concentrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os padrões fermentativos dos tratamentos experimentais estão apresentados na tabela 4. A concentração de nitrogênio amoniacal foi diferente entre os tratamentos ($P < 0,05$); o maior valor foi obtido com o tratamento controle (T1). Assim, quando LL e OFI foram adicionados à ração, reduções de 26,5, 28,7 e 18,4% foram observadas em T2, T3 e T4, respectivamente, em comparação com T1. Além disso, os valores obtidos para o N-NH₃ neste estudo estão dentro da faixa ideal (5 a 10 mg/dL), o que maximiza o consumo de matéria seca e o uso de matéria orgânica no rúmen (Chandrasekharaiah *et al.*, 2011). Da mesma forma, a concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) e ácidos graxos voláteis totais (AGVT) apresentou diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$). De acordo com o exposto por Sutton *et al.* (2003), as concentrações normais de ácido acético, propiônico e butírico numa fermentação ruminal são de aproximadamente 60, 20 e 15%, respectivamente; no entanto, os valores relatados neste estudo diferem daqueles reportados anteriormente.

As maiores concentrações de ácidos graxos voláteis totais (AGVT) e ácido acético ocorreram em T3. Em contraste, as concentrações de ácido butírico e propiônico foram menores em T3. No entanto, ao calcular a concentração molar de cada ácido graxo volátil, as quantidades de acetato, propionato e butirato são maiores em T3 do

que nos outros tratamentos. Essas mudanças na concentração de AGV podem estar relacionadas ao aumento do conteúdo de carboidratos, como a hemicelulose; devido à adição de OFI fresco à ração. Nesse sentido, [Johnson e Johnson \(1995\)](#) comentam que uma diminuição na razão acetato: propionato representa um processo de fermentação mais eficiente e uma redução nas perdas de energia através da formação de seus produtos finais. Isso pode ser observado diminuindo a produção de propionato, quando OFI fresco é incluído em T3.

Tabela 4. Padrões de fermentação ruminal *in vitro* e concentração de compostos fenólicos de tratamentos experimentais

	Tratamentos					EEM
	T1	T2	T3	T4		
pH	6.9 ± 0.01	7.0 ± 0.04	6.9 ± 0.01	6.9 ± 0.01		0.05
N-NH ₃ (mg/dL)	13.6 ± 0.62 ^a	10.0 ± 0.17 ^b	9.7 ± 0.04 ^b	11.1 ± 0.22 ^b		0.34
AGVT (mM)	78.7 ± 1.32 ^b	78.7 ± 2.04 ^b	132.9 ± 6.39 ^a	76.3 ± 1.88 ^b		1.03
Acético (% AGVT)	46.8 ± 0.39 ^b	46.4 ± 0.77 ^b	57.0 ± 1.28 ^a	45.1 ± 0.65 ^b		0.84
Propiônico (% AGVT)	32.7 ± 0.32 ^a	33.2 ± 0.51 ^a	25.1 ± 1.05 ^b	34.0 ± 0.46 ^a		0.64
Butírico (% AGVT)	15.0 ± 0.02 ^a	14.9 ± 0.15 ^a	12.4 ± 0.15 ^b	15.4 ± 0.07 ^a		0.11
Acetato:Propionato	1.4 ± 0.02 ^b	1.4 ± 0.4 ^b	2.2 ± 0.14 ^a	1.3 ± 0.03 ^b		0.08
CFT (mgEAG/gMS)	14.1 ± 0.43 ^c	77.1 ± 1.04 ^a	20.9 ± 0.25 ^b	20.1 ± 0.43 ^b		0.61
TC (mgEC/gMS)	1.55 ± 0.03 ^b	20.4 ± 0.17 ^a	0.90 ± 0.07 ^c	0.50 ± 0.08 ^c		0.10

^{ab}Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$). EEM: erro padrão da diferença entre médias; N-NH₃ = concentração de nitrogênio amoniacal após 24 horas de fermentação *in vitro*; AGVT = ácidos graxos voláteis totais; CFT = compostos fenólicos totais; CT = taninos condensados; mgEAG: miligramas equivalentes de ácido gálico; mgEC: miligramas de catequina equivalente.

Como pode ser visto na Tabela 1, há uma diferença acentuada nas concentrações de compostos fenólicos totais (CFT) e taninos condensados (CT) entre os diferentes ingredientes da fração forrageira. Por esse motivo, a Tabela 4 mostra diferenças entre os tratamentos na CFT e na TC ($P < 0,05$). O conteúdo de CFT aumentou mais de quatro vezes quando LL foi incluído na ração T2. Da mesma forma, as CFTs aumentaram cerca de 45% quando o OFI foi incluído no T3. [Karimi et al. \(2013\)](#) observaram três vezes menor conteúdo de CFT quando compararam alfafa com LL. Além disso, o conteúdo da CFT nos cladódios OFI depende da maturidade da planta; mesmos valores relatados em valores próximos a 33 mg/g de MS ([Figueroa-Pérez et al. 2016](#)). Da mesma forma, o conteúdo da TC é diferente entre os tratamentos experimentais ($P < 0,05$); quando LL foi incluído em T2; O conteúdo de CT foi aumentado em cerca de 20 mgEC/g MS. Esses resultados concordam com os relatados por [Berard et al. \(2011\)](#). Como o LL é considerado uma planta tanífera, o conteúdo de CFT e CT deve ser maior em T2 comparado aos demais. Além disso, quando OFI foi adicionado a T3 e T4, foi observada uma redução na concentração de CT. [Márquez e Suárez \(2008\)](#) relataram um conteúdo de CT na alfafa perto de 0,5 mg/g MS; enquanto nos cladodes OFI as concentrações foram menores.

Este estudo encontrou o mesmo efeito. Nesse sentido, o alto conteúdo de CFT com a inclusão de OFI pode ser atribuído a outros compostos fenólicos além do CT, como afirma [Cardador-Martínez et al. \(2011\)](#). Além disso, [Koenig et al. \(2018\)](#) afirmaram que a adição de extratos puros de CT acima de 3,5%, não afeta o consumo de matéria seca em bezerros de engorda.

Os parâmetros da cinética da produção de gás são apresentados na Tabela 5. A produção máxima de gás "A" foi diferente entre os tratamentos ($P < 0,05$). O valor de "A" registrado em T4 foi diferente do obtido em T2, apresentando uma média de 138,4 (mL/g MS) ($P < 0,05$); enquanto os valores na fase de defasagem (L) diminuíram quando o LL foi incluído no T2, quando comparado ao T3 e T4 ($P < 0,05$). De acordo com Van Soest (1994), os microrganismos celulolíticos levam menos tempo para atravessar a parede celular da forragem com um menor teor de lignina; no entanto, esse efeito não é observado neste estudo. Aparentemente, os aumentos na fração de celulose em T3 e T4 levam a um aumento na fase de defasagem (L). Esse efeito também foi encontrado por [Grilli et al. \(2015\)](#), quando mediram a degradabilidade da hemicelulose em várias forragens; a hemicelulose contida na alfafa se degradou em menos tempo do que a contida em outras espécies forrageiras.

Tabela 5. Parâmetros da cinética da produção de gás, metano e dióxido de carbono das fermentações ruminais *in vitro*

	Tratamentos				EEM
	T1	T2	T3	T4	
A (mL/g MS)	155.4 ± 1.78 ^{ab}	162.9 ± 9.06 ^a	142.6 ± 0.14 ^{ab}	138.4 ± 3.14 ^b	1.65
k _d (h ⁻¹)	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.05
L (h)	2.0 ± 0.15 ^{ab}	1.6 ± 0.14 ^b	2.3 ± 0.01 ^a	2.4 ± 0.04 ^a	0.10
PG _{24h} (mL/gMS)	123.7 ± 6.30	111.2 ± 0.22	122.0 ± 0.56	120.0 ± 1.01	1.31
CH ₄ (mL/gMS)	15.0 ± 0.65 ^a	11.1 ± 0.08 ^c	13.1 ± 0.27 ^b	12.9 ± 0.07 ^b	0.35
CO ₂ (mL/gMS)	102.8 ± 3.85 ^a	90.5 ± 0.39 ^b	98.9 ± 2.32 ^{ab}	93.7 ± 0.24 ^{ab}	1.22
CO ₂ :CH ₄	6.8 ± 0.04 ^c	8.1 ± 0.09 ^a	7.5 ± 0.02 ^b	7.2 ± 0.06 ^b	0.05

^{ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$). EEM: erro padrão da diferença entre médias; A = produção máxima de gás (mL/g MS); k_d = taxa constante de produção de gás (% / h); L = fase de latência (h). T1: 50% de alfafa + 50% de concentrado; T2: 20% de alfafa + 30% de leucaena + 50% de concentrado; T3: 20% de alfafa + 30% de pera espinhosa + 50% de concentrado; T4: 20% de alfafa + 30% de nopal fermentado + 50% de concentrado.

Por outro lado, a produção de gás às 24h não apresentou alterações entre os tratamentos ($P > 0,05$). No entanto, reduções de 26 e 14% na produção de metano foram observadas com a inclusão de LL e OFI em T2 e T3, respectivamente; dos quais T2 registraram a menor produção de metano ($P < 0,05$). Reduções na produção de metano podem ser atribuídas à presença de metabólitos secundários na ração. Nesse sentido, as maiores concentrações de CFT e CT ocorreram em T2. Esses resultados concordam com os relatados por [Tavendale et al. \(2005\)](#), que estabelecem que os maiores conteúdos de CT tendem a formar complexos com proteínas, o que limita sua degradação devido à ação dos microrganismos presentes durante a fermentação. Além disso, a produção de metano diminui reduzindo a digestão da fração fibrosa. Este último foi observado em T2, que apresentou menor digestibilidade. Da mesma

forma, [Tan et al. \(2011\)](#) relataram que a TC contida no LL pode reduzir a população de microrganismos metanogênicos, devido à maior presença de protozoários, afetando a transferência de íons hidrogênio. Assim, a produção de metano como eliminador de elétrons é limitada. Além disso, a redução na produção de metano em T3 e T4 está diretamente relacionada à presença de CFT. Isso coincide com pesquisas anteriores realizadas por [Tavendale et al. \(2005\)](#) e [Murillo-Ortiz et al. \(2018\)](#). Esses autores afirmam que a presença de metabólitos secundários, como CFTs, são moléculas solúveis e não fermentáveis que estão negativamente relacionadas à síntese de metano.

Por outro lado, a menor produção de CO₂ foi registrada em T2, em comparação com T1 (P <0,05). Por outro lado, a maior proporção de CO₂: CH₄ foi encontrada em T2 em comparação com T1. Estes resultados são consistentes com a presença de taninos condensados; A tomografia computadorizada de plantas reduz a metanogênese ruminal inibindo os metanógenos ([Tavendale et al., 2005](#)). Da mesma forma, os altos valores da razão CO₂: CH₄ em T1 indicam que, em algum momento da via metabólica, a metanogênese está sendo inibida, uma vez que existe mais volume de CO₂ presente, que não é sintetizado em metano.

A síntese ruminal de metano envolve a redução sucessiva de CO₂ em metano, através de diferentes níveis de formil, metileno e metil, e sua reação com as coenzimas; entre eles, a coenzima M na última etapa da síntese ([Liu y Whitman, 2008](#)). Nesse sentido, [Patra e Saxena \(2010\)](#) mencionam que a atividade antimetanogênica dos taninos pode estar na atividade de certas proteínas funcionais (enzimas), localizadas em certos locais acessíveis dos matanógenos. Essa ação pode interromper a metanogênese ruminal, mostrando a inibição do CH₄ num ponto em que o CO₂ é consumido como substrato; [Murillo-Ortiz et al. \(2018\)](#) observaram o mesmo efeito.

CONCLUSÕES

Esses resultados indicam que a substituição da alfafa por *Leucaena leucocephala* mantém a qualidade nutricional; bem como valores semelhantes na produção de gás e na quantidade de AGV *in vitro*. Além disso, a inclusão de 30% de *Leucaena leucocephala* e *Opuntia ficus-indica* reduz a concentração de metano *in vitro* em 26 e 14%, respectivamente. Portanto, devido à sua qualidade nutricional e às suas características fermentativas, elas podem ser incluídas na dieta bovina e, assim, contribuir para a mitigação dos gases de efeito estufa.

LITERATURA CITADA

ALMEIDA A, Nafarrete E, Alvarado A, Cervantes A, Luevanos Oropeza R, Balagurusamy N. 2011. Expresión genética en la digestión anaerobia: un paso adelante en la comprensión de las interacciones tróficas de esta biotecnología. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 3(6):14-34. <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%206/3.html>

- ALVES FAL, Andrade AP, Bruno RLA, Silva MGV, Souza MFV, dos Santos DC. 2017. Seasonal variability of phenolic compounds and antioxidant activity in prickly pear cladodes of *Opuntia* and *Nopalea* genres. *Food Science and Technology*. 37(4):536-543. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.19316>
- ANKOM. 2018. RF Gas production system operator's manual. ANKOM Technology, USA. https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/RF_Manual.pdf
- ANKOM. 2020. Fiber analyzer operator's manual. ANKOM Technology, USA. https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/A200_Manual.pdf
- AOAC. 2010. Official method of Analysis. 18th Ed 3rd Revision. Washington DC, USA. Association of Officiating Analytical Chemists. 2590 p. ISBN: 9780935584820
- AYE PA, Adegun MK. 2013. Chemical composition and some functional properties of Moringa, Leucaena and Gliricidia leaf meals. *Agricultural and Biology Journal of North America*. 4(1):71-77. <https://doi.org/10.5251/abjna.2013.4.1.71.77>
- BERARD NC, Wang Y, Wittenberg KM, Krause DO, Coulman BE, McAllister TA, Ominski KH. 2011. Condensed tannin concentrations found in vegetative and mature forage legumes grown in western Canada. *Canadian Journal of Plant Sciences*. 91:669-675. <https://doi.org/10.4141/cjps10153>
- CARDADOR-MARTÍNEZ A, Jiménez-Martínez C, Sandoval G. 2011. Revalorization of cactus pear (*Opuntia* spp) wastes as a source of antioxidants. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 31(3):782-788. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000300036>
- CHANDRASEKHARAI AH M, Thulasi A, Suresh KP, Sampath KT. 2011. Rumen degradable nitrogen requirements for optimum microbial protein synthesis and nutrient utilization in sheep fed on finger millet straw (*Eleusine coracana*) based diet. *Animal Feed Science and Technology*. 163:130-135. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.10.015>
- FIGUEROA-PÉREZ M, Pérez-Ramírez I, Paredes-López O, Mondragón-Jacobo C, Reynoso-Camacho R. 2016. Phytochemical composition and in vitro analysis of nopal (*O. ficus-indica*) cladodes at different stages of maturity. *International Journal of Food Properties*. 21(1):1728-1742. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1206126>
- FLORES-ORTIZ M, Reveles-Hernández M. 2010. Producción de nopal forrajero de diferentes variedades y densidades de plantación. In: VIII Simposium-Taller Nacional y 1er Internacional "Producción y Aprovechamiento del Nopal". Nuevo León, México: RESPYN; 2010. pp. 198-210. <http://respyn2.uanl.mx/especiales/2010/ee-05-2010/documentos/17.pdf>
- GALYEAN ML. 2010. Laboratory Procedures in Animal Nutrition Research. 13 ed, Lubbock. USA. https://www.depts.ttu.edu/afs/home/mgalyean/lab_man.pdf
- GONZÁLEZ-ARREOLA A, Murillo-Ortiz M, Pámanes-Carrasco G, Reveles-Saucedo F, Herrera-Torres E. 2019. Nutritive quality and gas production of corn silage with the addition of fresh and fermented prickly pear cladodes. *Journal of Animal & Plant Sciences*. 40(1): 6544-6553. <https://m.elewa.org/Journals/wp-content/uploads/2019/04/4.Gonzalez.pdf>

- GRILLI DJ, Páez-Lama SA, Egea AV, Cerón-Cucchi ME, Cobos E, Allegretti L, Arenas N. 2015. Degradación y utilización de la hemicelulosa contenida en especies forrajeras *Pseudobutyribrio ruminis* y *Pseudobutyribrio xilanivorans*. *REV FCA/Uncuyo*. 47(2):231-243. https://www.redalyc.org/pdf/3828/Resumenes/Resumen_382842590018_1.pdf
- HEIMLER D, Vignolini P, Dini M, Romani A. 2005. Rapid Tests to Assess the Antioxidant Activity of *Phaseolus vulgaris* L. Dry Beans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53(8):3053-3056. <https://doi.org/10.1021/jf049001r>
- HERRERA-TORRES E, Murillo M, Berumen L, Páez J, Villarreal G. 2014. Efecto de *Sacharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* durante el tiempo de fermentación en la calidad nutritiva del nopal forrajero. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 1(1):33-40. <http://www.scielo.org.mx/pdf/era/v1n1/v1n1a4.pdf>
- HERRERA TE, Murillo M, Berumen L, Soto-Cruz NO, Páez-Lerma JB. 2017. Protein Enrichment of *Opuntia Ficus-indica* using *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation. *Ciencia e Investigación Agraria*. 44:113-120. <http://dx.doi.org/10.7764/rcia.v44i2.1767>
- HRISTOV AN, Oh J, Firkins JL, Dijkstra J, Kebreab E, Waghorn G, Makkar HPS, Adesogan AT, Yang W,, Lee C, Gerber PJ, Henderson B, Tricario JM. 2013. Special Topics – Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science*. 91:5045-5069. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2013-6583>
- IPCC. 2015: Meeting Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Expert Meeting on Climate Change, Food, and Agriculture. Mastrandrea MD, Mach KJ, Barros VR, Bilir TE, Dokken DJ, Edenhofer O, Field CB, Hiraishi T, Kadner S, Krug T, Minx JC, PichsMadruga R, Plattner JK, Qin D, Sokona Y, Stocker TF, Tignor M (eds.). World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland, 68 pp. https://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_and_data_supporting_material.shtml
- INECC. 2018. Sexta comunicación nacional y segundo reporte bienal de actualización ante la convención marco de las Naciones Unidas sobre el cambio climático. Secretaría del Medio ambiente y recursos naturales (SEMARNAT). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. México. <http://cambioclimatico.gob.mx:8080/xmlui/handle/publicaciones/117>
- JOHNSON KA, Johnson DE. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*. 73:2483-2492. <https://doi.org/10.2527/1995.7382483x>
- KARIMI E, Oskoueian E, Oskoueian A, Omidvar V, Hendra R, Nazeran H. 2013. Insight into the functional and medicinal properties of *Medicago sativa* (Alfalfa) leaves extract. *Journal of Medical Plants Research*. 7(7):290-297. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1663>
- KOENIG KM, Beauchemin KA, McGinn SM. 2018. Feeding condensed tannins to mitigate ammonia emissions from beef feedlot cattle fed high-protein finishing diets

containing distillers grains. *Journal of Animal Science*. 96(10):4414-4430. <https://doi.org/10.1093/jas/sky274>

LIU Y, Whitman WB. 2008. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1125(1):171–189. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>

MÁRQUEZ D, Suárez A. 2008. El uso de taninos condensados como alternativa nutricional y sanitaria en rumiantes. *Revista de Medicina Veterinaria*. 16:87-109. <https://doi.org/10.19052/mv.1449>

MARTIN C, Morgavi DP, Doreau M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*. 4(3):351–365. <https://doi.org/10.1017/S1751731109990620>

MENKE K, 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. *Journal of Agricultural Science*. 93(1):217-222. <https://doi.org/10.1017/S0021859600086305>

MURILLO OM, Herrera TE, Corral LA, Pámanes CG. 2018. 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 Journal of Animal Research*. 52(8):1298-1303. <https://doi.org/10.18805/ijar.11417>

PÁMANES-CARRASCO G, Herrera-Torres E, Murillo-Ortiz M, Reyes-Jáquez D. 2019. “Climate change mitigation in livestock production: nonconventional feedstuffs and alternative additives”. En: Abubakar M, *Livestock health and farming*. London, UK: IntechOpen publishers. <http://doi.org/10.5772/intechopen.89433>

PATRA AK, Saxena J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*. 71(11-12):1198-1222. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.05.010>

PIÑEIRO-VÁZQUEZ AT, Jiménez-Ferrer GO, Chay-Canul AJ, Casanova-Lugo F, Días-Echeverría VF, Ayala-Burgos AJ, Solorio-Sánchez FJ, Aguilar-Pérez CF, Ku-Vera JC. 2017. Intake, digestibility, nitrogen balance and energy utilization in heifers fed low-quality forage and *Leucaena leucocephala*. *Animal Feed Science and Technology*. 228:194-201. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.04.009>

PORTER LJ, Hrstich LN, Chan BG. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*. 25:223-230. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94533-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94533-3)

SAS Institute Inc. 2011. SAS 9.3. Cary, NC: SAS Institute Inc. ISBN 978-1-60764-896-3

SUTTON JD, Dhanoa MS, Morant SV, France J, Napper DJ, Schuller E. 2003. Rates of Production of Acetate, Propionate, and Butyrate in the Rumen of Lactating Dairy Cows Given Normal and Low-Roughage Diets. *Journal of Dairy Science*. 86:3620-3633. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73968-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73968-X)

SINGH V, Toky OP. 1995. Biomass and net primary productivity in Leucaena, Acacia and Eucalyptus, short rotation, high density ('energy') plantations in arid India. *Journal of Arid Environments*. 31(3):301-309. [https://doi.org/10.1016/S0140-1963\(05\)80034-5](https://doi.org/10.1016/S0140-1963(05)80034-5)

TAN HY, Sieo CC, Abdullah N, Liang JB, Huang XD, Ho YW. 2011. Effects of condensed tannins from Leucaena on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa in vitro. *Animal Feed Science and Technology*. 169(3-4):185-193. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.07.004>

TAVENDALE MH, Meagher LP, Pacheco D, Walker N, Attwood GT, Sivakumaran S. 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*. 123:403-419. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.037>

VAN SOEST PJ. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2da Edición. Ithaca, EEUU. Cornell University Press. Pp. 476. ISBN: 9780801427725.