

Valoración nutricional y fermentación *in vitro* de mezclas de follaje de árboles con harina de yuca en dietas para borregos

Nutritional assessment and *in vitro* fermentation of tree foliage mixtures with cassava flour on sheep diets

Víctor Francisco Díaz Echeverría¹, Abel Sánchez Ramos¹, Samuel Albores-Moreno², Luis Alberto Lara Pérez¹, Sara Stephanie Valencia-Salazar^{2,3}, Juan Carlos Ku-Vera⁴, José Armado Alayon-Gamboa^{5*}

¹Tecnológico Nacional de México, Campus Instituto Tecnológico de la Zona Maya, División de estudios de posgrado e investigación, Quintana Roo, México, (+52) 9831546438, diazvic@prodigy.net.mx, abel46400@gmail.com,

²El Colegio de la Frontera Sur, Laboratorio en Ganadería y Cambio Climático. San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México, (+52) 9676749000, samuel.albores@ecosur.mx,

³Centro Internacional de Agricultura Tropical, Valle del Cauca, Colombia, (+57)3232312470, sara.valencia@estudianteposgrado.ecosur.mx,

⁴Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Yucatán, México, (+52) 9999423200, kvera@correo.uady.mx,

⁵El Colegio de la Frontera Sur. Departamento de Agricultura, Sociedad y Ambiente, Ganadería Sustentable y Cambio Climático. Campeche, México, (+52) 981 811273720, jalayon@ecosur.mx,

*Autor de correspondencia

Resumen

El objetivo del estudio fue evaluar el valor nutricional de dietas de *Panicum maximum* suplementadas con 30% de follajes arbóreos mezclados con yuca (*Manihot esculenta*). Se compararon seis tratamientos: T0 (*P. maximum*), T1 (*Leucaena leucocephala*), T2 (*Moringa oleifera*), T3 (*Tithonia diversifolia*), T4 (*Guazuma ulmifolia*) y T5 (*Hibiscus rosa-sinensis*). Se determinó la composición química, fermentación y digestibilidad *in vitro*, así como la producción de ácidos grasos volátiles (AGV). Los datos se analizaron con un análisis de varianza. La proteína cruda fluctuó de 8.34% a 11.70%, y la fermentación y la digestibilidad de la materia seca aumentaron (hasta 38.23% y 18.23%, respectivamente) ($p < 0.05$) con T5, T2, T1 y T3. Además, T5 y T2 incrementaron ($p < 0.001$) el ácido propiónico, mientras que T1 y T3 incrementaron el ácido butírico. Se concluye que la adición de *H. rosa-sinensis*, *M. oleifera*, *L. leucocephala* y *T. diversifolia* mejoran el perfil de AGV, fermentación y digestibilidad de la dieta.

Palabras clave: Rumiantes; suplementación; digestibilidad; trópicos.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the nutritional value of *Panicum maximum* diets supplemented with 30% tree foliage mixed with cassava (*Manihot esculenta*). Six treatments were compared: T0 (*P. maximum*), T1 (*Leucaena leucocephala*), T2 (*Moringa oleifera*), T3 (*Tithonia diversifolia*), T4 (*Guazuma ulmifolia*) and T5 (*Hibiscus rosa-sinensis*). Chemical composition, *in vitro* fermentation and digestibility, and volatile fatty acids (VFA) production were determined. The data was analyzed with an analysis of variance. Crude protein fluctuated from 8.34% to 11.70%, and fermentation and dry matter digestibility increased (up to 38.23% and 18.23%, respectively) ($p < 0.05$) with T5, T2, T1, and T3. Furthermore, T5 and T2 increased ($p < 0.001$) propionic acid, and T1 and T3 increased butyric acid. It is concluded that the addition of *H. rosa-sinensis*, *M. oleifera*, *L. leucocephala*, and *T. diversifolia* improve the VFA profile, fermentation, and digestibility of the diet.

Keywords: Ruminants; supplementation; digestibility; tropics.

Recibido: 29 de abril de 2022

Aceptado: 13 de enero de 2023

Publicado: 22 de febrero de 2023

Cómo citar: Díaz Echeverría, V. F., Sánchez Ramos, A., Albores-Moreno, S., Lara Pérez, L. A., Valencia-Salazar, S. S., Ku-Vera, J. C., & Alayon-Gamboa, J. A. (2023). Valoración nutricional y fermentación *in vitro* de mezclas de follaje de árboles con harina de yuca en dietas para borregos. *Acta Universitaria* 33, e3558. doi: <http://doi.org/10.15174/au.2023.3558>

Introducción

La ganadería tiene un papel central en la diversificación de los modos de vida de los agricultores. A nivel mundial, se estima que más de 200 millones de productores crían ganado bajo pastoreo de gramíneas nativas e introducidas, entre las que destacan *Cynodon plestostachyus*, *Cynodon nlemfuensis*, *Cynchrus ciliaris*, *Antropogon gayanus*, *Panicum maximum*, *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizantha* y *Brachiaria humidicola*, entre otras (Food and Agriculture Organization [FAO], 2018). La calidad nutricional de las gramíneas cambia según la región geográfica. Particularmente, en las regiones tropicales, los pastos presentan bajos contenidos de proteína cruda (PC < 7%) y menor digestibilidad de la materia seca (50%). Así mismo, presentan una alta proporción de carbohidratos estructurales (60% a 80%) (Ashford *et al.*, 2016; Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2017). Estas características impactan sobre el comportamiento productivo de los animales. Ante ello, se ha emprendido la búsqueda y diseño de distintas estrategias que promuevan mejoras en los aportes nutricionales de la dieta de los rumiantes, a través del uso de insumos locales de bajo costo y que favorezcan la productividad animal en los sistemas tropicales (Hernández-Morales *et al.*, 2018).

Una alternativa para aumentar el aporte de nutrientes en la dieta de los rumiantes en el trópico es la utilización de follaje de árboles y arbustos, por su alto contenido de proteína cruda y mayor digestibilidad (De Oliveira *et al.*, 2017). Su utilización aumenta la concentración de nitrógeno requerido para cubrir las funciones ruminales y de producción animal (Hernández-Morales *et al.*, 2018), además de que mejora la calidad de la dieta cuando se combina con fuentes de energía, como el tubérculo de yuca (*Manihot esculenta* Cantz) (Castro-González *et al.*, 2008), maíz (*Zea mays*), melaza y plátano (*Musa paradisiaca* L.) (Jiménez *et al.*, 2019; Jiménez-Guillén *et al.*, 2020). Este efecto se debe a que las especies arbóreas tienen, en general, contenidos de PC que fluctúan entre el 15% y 20%, valores inferiores al 40% de fibra detergente neutro (FDN), y alta (mayor a 60%) digestibilidad *in vitro* de la materia seca (Hernández-Morales *et al.*, 2018).

En la región tropical del sureste de México se ha reportado una diversidad de especies forrajeras con potencial en la alimentación de rumiantes (Albores-Moreno *et al.*, 2018; Molina-Botero *et al.*, 2020; Valencia-Salazar *et al.*, 2021); algunas de estas especies se caracterizan por su alta fermentación, cambios en el perfil de ácidos grasos volátiles (AGV) hacia una mayor producción de ácido propiónico y butírico, o inhibición en la producción de metano entérico (Albores-Moreno *et al.*, 2020a; Valencia-Salazar *et al.*, 2021). Entre dichas especies destacan, por su amplio uso en la ganadería, *Thitonia diversifolia*, *Moringa oleífera*, *Leucaena leucocephala*, *Hibiscus rosa-sinensis* y *Guazuma ulmifolia* (Aye, 2016; Holguín *et al.*, 2020; Luna, 2021; Molina-Botero *et al.*, 2020; Valencia-Salazar *et al.*, 2021). Estas especies presentan variaciones en su contenido de nutrientes (PC, Energía, FDN, FDA) y metabolitos secundarios (taninos y saponinas) debido a su estado fenológico, condiciones de salud de la planta, exposición de las plantas a estresores bióticos y abióticos, así como fluctuaciones en tiempo (Bryant *et al.*, 1992; Patra *et al.*, 2017). Estos cambios influyen sobre la dinámica de la fermentación, la digestibilidad de los nutrientes y la producción de AGV (Pérez-Can *et al.*, 2020). Al respecto, se ha observado que, dependiendo de la concentración de taninos condensados (TC) en los follajes mezclados con yuca (*M. esculenta*), estos pueden ejercer efectos negativos sobre la digestibilidad de la PC (Castro-González *et al.*, 2008) o afectar negativamente el potencial de producción de gas y la fermentación de la materia seca (MS), materia orgánica (MO), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) (Albores-Moreno *et al.*, 2019). No obstante, las especies cuyos follajes poseen concentraciones de TC menores al 3% de la MS influyen positivamente sobre la digestibilidad, la fermentación ruminal, la producción de metano entérico y el perfil de AGV (Barros-Rodríguez *et al.*, 2017; Elghandour *et al.*, 2017; Ku-Vera *et al.*, 2020b).

Por otro lado, si se aporta un exceso de follaje arbóreo, superior al 40% del consumo de MS, puede aumentar la excreción de N en la orina (Piñeiro-Vázquez *et al.*, 2017). Por ello, la suplementación con follajes arbóreos implica asegurar una fuente de energía de rápida disponibilidad, para hacer más eficiente el metabolismo del nitrógeno en el rumen (Arjona *et al.*, 2020). En el trópico es común el uso de maíz como suplemento energético, pero compite con la alimentación humana. Una alternativa poco explorada es el uso de yuca (*M. esculenta*). La yuca es un cultivo con alta adaptabilidad y rendimientos que pueden alcanzar hasta 16.03 t Ha⁻¹ (Modeste *et al.*, 2018). Posee en su raíz un alto contenido de carbohidratos en forma de almidones (72.81%) y azúcares simples (5.26%) (Yam-Chale *et al.*, 2018). Su composición de carbohidratos le confiere diferentes tiempos de fermentación en el rumen, con efectos positivos sobre la población microbiana y la producción animal (De Oliveira *et al.*, 2017). En este sentido, se ha observado que el uso de harina de yuca con adición de follaje de *Brosimum alicastrum* favorece el consumo y la digestibilidad de la MS, MO, PC y FDN, y el balance de N en los animales (Castro-González *et al.*, 2008). Lo anterior hace suponer que la incorporación de harina de yuca en mezclas con forraje arbóreo y pastos tropicales podría contribuir a mejorar los patrones de fermentación en el rumen.

Son pocos los estudios dirigidos a conocer los cambios en los patrones de fermentación y la digestibilidad de las dietas donde se incorpora la suplementación con yuca combinada con follajes arbóreos. En este sentido, es importante conocer el potencial de los patrones de fermentación y degradabilidad ruminal de dietas suplementadas con follajes arbóreos mezcladas con harina de yuca, con el propósito de diseñar sistemas de alimentación acordes a la disponibilidad local de recursos alimenticios e incrementar la producción de los rumiantes en los trópicos. De acuerdo con lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la dinámica de fermentación y digestibilidad *in vitro* de diferentes dietas para ovinos, a base de *P. máxima* y suplementadas con distintos follajes arbóreos mezclados con harina de yuca.

Materiales y métodos

Ubicación del sitio de estudio

El estudio se realizó en el Instituto Tecnológico de la Zona Maya (ITZM), localizado a 18° 30' 58" N y 88° 29' 19" O, en el municipio de Othón P. Blanco, Quintana Roo, México. En la región, predomina un clima cálido subhúmedo (tipo Aw₁) y suelos *gleysoles haplicos* (García, 1973; Unión Internacional de Ciencias del Suelo [UICS], 2007). Durante el periodo de estudio, se registraron los datos climáticos del sitio experimental con una estación meteorológica WatchDog 2900ET (Spectrum Technologies, Inc.) y se determinó que el promedio de la temperatura y la precipitación total fue de 26.5 °C y 1009 mm, respectivamente.

Forrajes y preparación de dietas

Las muestras de forraje arbóreo se obtuvieron a 45 d del rebrote mediante la cosecha total del forraje. El total de biomasa cosechada se mezcló homogéneamente de forma manual y se obtuvo una muestra compuesta que representó el 5% del total. Previo a la obtención de las muestras, las plantas se sometieron a un corte de uniformización. Las especies muestreadas fueron *Leucaena leucocephala*, *Moringa oleífera*, *Tithonia diversifolia*, *Guazuma ulmifolia* e *Hibiscus rosa-sinensis*. Las plantas se cultivaron en parcelas que se mantuvieron limpias de maleza y bajo condiciones de estacionalidad climática. Para la cosecha de forraje se seleccionaron las plantas con mayor cantidad de follaje y se podaron de forma manual con una tijera para podar. Por otro lado, el forraje de *P. maximum* se cortó a 50 cm del suelo y a 45 d de rebrote. Para la elaboración de la harina de yuca se cosechó manualmente el tubérculo fresco de una parcela con ocho meses de establecimiento. Todos los forrajes se secaron en una estufa de aire forzado (marca Binder 9010-0104 modelo FD) a 60 °C hasta obtener peso constante, y se estimó el porcentaje de materia seca. Posteriormente, se molieron en un molino (IKA® MF10 basic) con un tamaño de criba de 1 mm. Los forrajes molidos se almacenaron en bolsas con cierre hermético y se tomó una muestra compuesta del 10% para su análisis químico proximal y contenido de metabolitos secundarios.

Se prepararon seis dietas experimentales en las que se sustituyó el pasto por la adición de follaje arbóreo y yuca. El nivel de incorporación de los follajes y la harina de yuca tomó como criterio aportar los niveles de nitrógeno (N) y energía (E) necesarios para no limitar la actividad microbiana en el rumen. Las dietas experimentales fueron: T0 = 100% *P. maximum*; T1 = 30% *L. leucocephala* + 30% *M. esculenta* + 40% *P. maximum*; T2 = 30% *M. oleífera* + 30% *M. esculenta* + 40% *P. maximum*; T3 = 30% *T. diversifolia* + 30% *M. esculenta* + 40% *P. maximum*; T4 = 30% *G. ulmifolia* + 30% *M. esculenta* + 40% *P. maximum*; y T5 = 30% *H. rosa-sinensis* + 30% *M. esculenta* + 40% *P. maximum*. Las dietas se prepararon mezclando manualmente las proporciones de cada componente. Al finalizar la mezcla de los componentes de la dieta, se tomó una muestra para su análisis químico. En las Tablas 1 y 2 se observa la composición química y el contenido de metabolitos secundarios de las materias primas utilizadas para las dietas experimentales.

Tabla 1. Composición química de los forrajes utilizados (% de la MS) en las dietas experimentales.

| Forraje | Materia Seca | Materia Orgánica | Proteína Cruda | Fibra Detergente Neutra |
|-------------------------------|--------------|------------------|----------------|-------------------------|
| <i>Leucaena leucocephala</i> | 28.08 ± 1.05 | 90.24 ± 1.36 | 25.73 ± 2.90 | 58.99 ± 2.68 |
| <i>Moringa oleifera</i> | 21.62 ± 1.52 | 87.70 ± 1.21 | 22.22 ± 1.81 | 39.37 ± 6.28 |
| <i>Tithonia diversifolia</i> | 18.19 ± 1.69 | 84.12 ± 1.50 | 24.70 ± 1.32 | 50.05 ± 1.83 |
| <i>Guazuma ulmifolia</i> | 38.92 ± 1.87 | 90.12 ± 1.36 | 15.87 ± 1.64 | 68.04 ± 3.63 |
| <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> | 23.54 ± 1.45 | 85.85 ± 2.30 | 14.66 ± 1.42 | 46.37 ± 4.77 |
| <i>Manihot esculenta</i> | 34.02 ± 1.42 | 90.61 ± 1.98 | 2.32 ± 0.04 | 12.84 ± 0.98 |
| <i>Panicum maximum</i> | 30.75 ± 1.68 | 87.44 ± 0.93 | 8.81 ± 1.32 | 69.68 ± 2.99 |

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2. Contenido de metabolitos secundarios de los forrajes utilizados (% de la MS) en las dietas experimentales.

| Forraje | Fenoles Totales | Taninos Totales | Taninos Condensados |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|---------------------|
| <i>Leucaena leucocephala</i> | 4.81 ± 0.23 | 2.74 ± 0.15 | 4.98 ± 0.47 |
| <i>Moringa oleifera</i> | 3.30 ± 0.12 | 1.50 ± 0.56 | 2.90 ± 0.25 |
| <i>Tithonia diversifolia</i> | 1.60 ± 0.26 | 1.97 ± 0.27 | 1.99 ± 0.48 |
| <i>Guazuma ulmifolia</i> | 2.36 ± 0.52 | 1.60 ± 0.13 | 2.90 ± 0.18 |
| <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> | 1.70 ± 0.06 | 0.76 ± 0.45 | 0.97 ± 0.37 |
| <i>Manihot esculenta</i> | 0.09 ± 0.52 | 0.04 ± 0.48 | 0.05 ± 0.16 |
| <i>Panicum maximum</i> | 0 | 0 | 0 |

Fuente: Elaboración propia.

Análisis químico

Se determinó el contenido de materia seca total (MS) de los forrajes y de las mezclas preparadas, mediante secado, en una estufa (marca Binder 9010-0104 modelo FD) de aire forzado a 60 °C. El contenido de cenizas se determinó por incineración en una mufla (Novatech BTC-9100) a 600 °C por 6 h (método número 923.03) (Association of Official Analytical Chemists [AOAC], 1990), y la materia orgánica (MO) se calculó por la diferencia entre los contenidos de MS y ceniza. El contenido de nitrógeno (N) se determinó con un analizador elemental de combustión seca (marca Perkin Ermer, modelo FP, serie 628) y se multiplicó por 6.25 para calcular el valor de proteína cruda (PC) (método número 992.15) (AOAC, 1990). Los contenidos de fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina se determinaron con un digestor Ankom 2000 (modelo A200), de acuerdo con el procedimiento establecido por Van Soest *et al.* (1991). Adicionalmente, mediante el método de Folin-Ciocalteu, se determinó los contenidos de fenoles totales (FT) y taninos totales (TT), adicionando polivinilpirrolidona (PVPP) para la determinación de TT (García *et al.*, 2015). Los taninos condensados (TC) se determinaron por su equivalente en catequina usando el método de Vainillina descrito por Terrill *et al.* (1992). El contenido de energía bruta (EB) se determinó mediante una bomba calorimétrica, según las especificaciones descritas por la International Standard Organization (ISO 983; ISO 1988).

Animales donantes de inóculo ruminal

Se utilizaron como donantes de líquido ruminal a tres ovinos cruzados (*Pelibuey* x *Black Belly*), con un peso vivo promedio de 30.56 kg ± 2.42 kg. Los animales se alojaron en corrales individuales, donde se sometieron a un periodo de adaptación durante 30 d previos al experimento. Durante este tiempo, se les aplicó vitaminas A, D, E, complejo B, y se desparasitaron contra parásitos internos y externos. Su alimentación consistió en una dieta para mantenimiento a base de libre acceso de *P. maximum*, la cual se cosechó y ofreció en fresco todos los días; y junto con el forraje, se les proporcionó un suplemento de sales minerales y agua. Posterior al periodo de adaptación, se procedió a la obtención del líquido ruminal. Para esto, los animales se sometieron a un ayuno de 12 h previas a la extracción de líquido ruminal; posteriormente, se obtuvo el líquido ruminal empleando una sonda esofágica (Ramos-Morales *et al.*, 2014). El líquido ruminal se depositó en un termo con cierre hermético e inmediatamente se trasladó al laboratorio y se filtró con gasas de ocho capas (Krishnamoorthy *et al.*, 2005).

Fermentación y producción de gas *in vitro*

La determinación de gas *in vitro* a 72 h se realizó mediante la técnica descrita por Theodorou *et al.* (1994). Se realizaron dos corridas de fermentación (bloques) en el tiempo, y en cada una de ellas se tuvieron tres repeticiones por tratamiento. Para incubar las muestras se utilizaron frascos de color ámbar de 125 ml, a los que se agregaron 0.5 gr de muestra de cada dieta. Adicionalmente, se incorporó 90 ml de inóculo ruminal previamente mezclado, en una relación 1:9, con una solución buffer (Menke & Steingass 1988) y manteniendo un flujo continuo de CO₂. Cada frasco se selló herméticamente usando un tapón de goma y un anillo de aluminio. Posterior al sellado, se extrajo el aire de cada frasco con una aguja hasta igualar la presión interior a 0. Por último, los frascos se colocaron en un baño maría con temperatura constante a 39 °C. Adicional a los tratamientos experimentales, se incubaron tres frascos con solo líquido ruminal y se utilizaron como blancos para corregir las lecturas de las dietas experimentales.

La presión de gas generada por la fermentación se midió con un manómetro (Metron, modelo 63100) con escala de 0 kg cm⁻² a 1 kg cm⁻², al que se adaptó una aguja hipodérmica. Las mediciones se realizaron a las 0 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h, 30 h, 36 h, 42 h, 48 h, 60 h y 72 h después de la incubación, y se transformó a volumen de gas mediante la ecuación $V = 0.4364(P) + 0.3956$, con una $R^2 = 0.9728$, obtenida a partir de la calibración del equipo de medición y basado en el procedimiento descrito por Elmasry *et al.* (2016), donde V = volumen de gas producido y P = presión que se genera en cada botella.

El volumen máximo (Vm, ml g⁻¹), la tasa de fermentación (S, h⁻¹) y la fase de retraso (L, h⁻¹) en la producción de gas se estimaron utilizando el modelo logístico $V = Vm / (1 + e^{(2 - 4 S(t - L)})$ propuesto por Pell & Schofield (1993), donde V = volumen de gas en el tiempo (t); Vm = volumen máximo de gas que corresponde a la digestión del sustrato (asíntota); S = velocidad de fermentación específica, similar a la tasa de degradación; y L = tiempo requerido por los microorganismos para colonizar e iniciar la fermentación del sustrato. El modelo logístico tuvo mediciones de convergencia de $R < 0.0000098$ y una significancia de $p < 0.0001$. También, se obtuvieron las fracciones de fermentación a intervalos de tiempo de: 0 h a 8 h, de 8 h a 24 h y de 24 h a 72 h. El volumen de gas registrado en los intervalos de tiempo se utilizó para estimar las fracciones de fermentación rápida (FR), fermentación media (FM) y fermentación lenta (FL), utilizando las ecuaciones propuestas por Miranda *et al.* (2015), donde $FR (mg g^{-1}) = V 0-8/0.427$; $FM (mg g^{-1}) = V 8-24/0.615$; y $FL (mg g^{-1}) = V 24-72/0.345$. La suma de las tres fracciones representó la fracción fermentable total (FFT; mg g⁻¹).

Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y materia orgánica (DIVMO)

Al finalizar la incubación a las 72 h, se recuperó y filtró el material residual de cada tratamiento, utilizando papel filtro (Mod. 617, Código P.V.NO. 1034) y un embudo Buchner adaptado a una bomba de vacío. La digestibilidad *in vitro* de la materia seca a 72 h (% DIVMS72) se estimó por diferencia entre los valores de MS inicial y MS residual, determinada por secado en una estufa de aire forzado a 60 °C por 48 h (Monforte-Briceño *et al.*, 2005); la digestibilidad *in vitro* de la MO a 72 horas (% DIVMO72) se calculó por diferencia entre los valores de materia orgánica (MO) inicial y MO residual determinados por incineración a 500 °C (Miranda *et al.*, 2015).

Producción de ácidos grasos volátiles (AGV).

La determinación de AGV se realizó a las 24 horas de incubación. En cada frasco se tomaron 4 ml de muestra y se depositaron en viales de 10 ml. A cada vial se adicionó 1 ml de solución desproteinizante (2 g de ácido metafosfórico, 80 ml de agua destilada y 0.32 ml de ácido 3-metilvalérico), de acuerdo con la técnica descrita por Ryan (1964). Las muestras se analizaron con un cromatógrafo de gases (Hewlett-Packard 5890, serie III), equipado con un detector de ionización de flama (DIF) y una columna HP-FFAP de 30 m x 0.53 mm, a una temperatura del inyector y del detector a 200 °C.

Diseño experimental y análisis estadístico

Los datos de producción de gas, digestibilidad *in vitro* y producción de ácidos grasos volátiles se analizaron mediante un análisis de varianza en un diseño experimental de bloques completos al azar, y se consideró como bloque cada corrida realizada en el tiempo (Cochran & Cox, 1991). Para el análisis de varianza se usó el procedimiento modelos lineales generalizados (MLG) con el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS, 2014). El modelo estadístico empleado fue: $Y_{ij} = \mu + \eta_i + \alpha_j + \varepsilon_{ij}$, donde: Y_{ij} = puntuación del sujeto i bajo tratamiento j ; μ = promedio de todos los tratamientos experimentales; $\eta_i = \mu_i - \mu$ = efecto asociado al bloque i ; $\alpha_j = \mu_j - \mu$ = efecto atribuido al tratamiento j ; y ε_{ij} = error experimental asociado con el sujeto i bajo tratamiento j . También, se realizaron comparaciones de medias mediante la prueba de Tukey (SAS, 2014).

Resultados

Composición química

La composición química y el contenido de metabolitos secundarios en los forrajes que formaron la dieta se presentan en las Tablas 1 y 2. Los follajes tuvieron un alto contenido de MS y MO. La MS fluctuó de 18.19% (*T. diversifolia*) a 38.92% (*G. ulmifolia*), mientras que la MO varió de 84.12% (*T. diversifolia*) a 90.61% (*M. esculenta*). Respecto a la concentración de PC de las especies arbóreas, esta fluctuó de 14.66% (*H. rosa-sinensis*) a 25.73% (*L. leucocephala*). *T. diversifolia* (24.70%), *M. oleífera* (22.22%) y *L. leucocephala* (25.73%) tuvieron las mayores concentraciones de PC. Por otro lado, *M. oleífera* y *H. rosa-sinensis* tuvieron las menores concentraciones de FDN (39.37% y 46.37%, respectivamente), y las mayores concentraciones se observaron en *G. ulmifolia* (68.04%) y *L. leucocephala* (58.99%). Respecto a los metabolitos secundarios, tanto *L. leucocephala* como *M. oleífera* presentaron las mayores concentraciones de FT (4.81% y 3.30%, respectivamente) y TC (4.99% y 2.90%, respectivamente), mientras que *H. rosa-sinensis* y *T. diversifolia* tuvieron las menores concentraciones de FT (1.70% y 1.60%, respectivamente) y TC (0.97% y 1.99%, respectivamente). Por otro lado, *M. esculenta* y *P. maximum* tuvieron las menores concentraciones de FT, TT y TC.

La incorporación de follajes en la dieta incrementó las concentraciones de PC, FT, TT y TC, al mismo tiempo que se redujo la concentración de FDN, FDA y lignina (Tabla 3). Las mayores concentraciones de PC se observaron en las dietas con *T. diversifolia* (T3) y *L. leucocephala* (T1) (11.70% y 11.37%, respectivamente), y la menor concentración se encontró en *H. rosa-sinensis* (T5, 8.34%). Respecto a la concentración de FDN y FDA, se observaron menores concentraciones en *H. rosa-sinensis* (T5, 33.86% y 19.22%, respectivamente), seguido de *M. oleífera* (T2, 33.35% y 20.83%, respectivamente), y las mayores concentraciones se observaron en *G. ulmifolia* (T4, 39.44% y 24.45%, respectivamente). La concentración de lignina fue menor en la dieta con *L. leucocephala* (T1, 1.29%) y *M. oleífera* (T2, 1.43%). Respecto a los metabolitos secundarios, las mayores concentraciones de FT, TT y TC se encontraron en las dietas con *L. leucocephala* (T1) (FT: 1.45%; TT: 0.83%; TC: 1.53%) y *M. oleífera* (T2) (FT: 1.00%; TT: 0.48%; TC: 0.88%), mientras que las menores concentraciones se obtuvieron con las dietas de *H. rosa-sinensis* (T5) (FT: 0.53%; TT: 0.24%; TC: 0.30%) y *T. diversifolia* (FT: 0.49%; TT: 0.36%; TC: 0.36%).

Tabla 3. Componentes y composición química de las dietas experimentales con follaje arbóreo, yuca y pasto.

| | Dietas | | | | | |
|---|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | T0 | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
| Composición química | % de la MS | | | | | |
| Materia seca | 97.40 | 95.91 | 96.26 | 96.29 | 96.15 | 96.24 |
| Materia orgánica | 90.58 | 89.70 | 89.73 | 87.83 | 89.72 | 90.01 |
| Proteína cruda | 8.46 | 11.37 | 9.89 | 11.70 | 9.53 | 8.34 |
| Fibra detergente neutro | 69.68 | 35.63 | 33.35 | 38.02 | 39.44 | 33.86 |
| Fibra detergente acida | 37.66 | 22.09 | 20.83 | 23.14 | 24.45 | 19.22 |
| Lignina | 1.94 | 1.29 | 1.43 | 1.80 | 1.65 | 1.80 |
| Energía bruta (Mcal kg MS ⁻¹) | 3.941 | 3.741 | 3.918 | 3.772 | 4.062 | 3.822 |
| Fenoles totales * | 0.0 | 1.45 | 1.00 | 0.49 | 0.72 | 0.53 |
| Taninos totales * | 0.0 | 0.83 | 0.48 | 0.36 | 0.49 | 0.24 |
| Taninos condensados** | 0.0 | 1.53 | 0.88 | 0.36 | 0.88 | 0.30 |

Nota: T0 = 100% P. maximum; T1 = 30% L. leucocephala + 30% M. esculenta + 40% P. maximum; T2 = 30% M. oleífera + 30% M. esculenta + 40% P. maximum; T3 = 30% T. diversifolia + 30% M. esculenta + 40% P. maximum; T4 = 30% G. ulmifolia + 30% M. esculenta + 40% P. maximum; T5 = 30% H. rosa-sinensis + 30% M. esculenta + 40% P. maximum; *Equivalentes a ácido tánico

**Equivalentes a Catequina.
Fuente: Elaboración propia.

Producción de gas *in vitro* y fermentación

La inclusión de follajes (T1, T2, T3, T4, T5) en las dietas aumentó la fermentación y producción de gas *in vitro* ($p < 0.05$, Tabla 4), principalmente con la adición de *H. rosa-sinensis* (T5, 339.83 ml g⁻¹) y *G. ulmifolia* (T4, 326.28 ml g⁻¹). Adicionalmente, se redujo ($p < 0.05$) el tiempo de inicio de la fermentación (L), sin cambiar significativamente ($p > 0.05$) la tasa de fermentación (S), principalmente con la adición de *M. oleífera* (T2, 4.31 h) y *H. rosa-sinensis* (T5, 4.67 h). Junto con la mayor producción de gas, se observó un aumento ($p < 0.05$) en la digestibilidad de la MS y MO de las dietas adicionadas con follaje arbóreo (T1, T2, T3, T4, T5). Entre los follajes se observó que la mayor DIVMS ($p < 0.05$) ocurrió con la incorporación de *H. rosa-sinensis* (T5, 73.76%) y fue similar entre *M. oleífera* (T2, 68.50%), *L. leucocephala* (T1, 67.25%) y *T. diversifolia* (T3, 66.33%), mientras que el menor valor de DIVMS se observó en *G. ulmifolia* (T4, 62.33%). La DIVMO fue mayor ($p < 0.05$) con la adición de *H. rosa-sinensis* (T5, 73.62%), *L. leucocephala* (T1, 70.37%), *T. diversifolia* (T3, 69.91%) y *M. oleífera* (T2, 68.22%) y menor con *G. ulmifolia* (T4, 61.08%).

Respecto a las distintas fracciones de fermentación, se encontró que tanto la fracción de rápida fermentación como la fracción de fermentación media se incrementaron ($p < 0.05$) con la incorporación de los follajes arbóreos (T1, T2, T3, T4, T5). La adición de *H. rosa-sinensis* (T5) y *M. oleífera* (T2) ocasionó el mayor incremento de la fracción de rápida fermentación (164.87 mg g⁻¹ y 164.69 mg g⁻¹, respectivamente). Las dietas con *G. ulmifolia* (T4) y *L. leucocephala* (T1) fueron similares (139.85 mg g⁻¹ y 123.54 mg g⁻¹ respectivamente), y la menor fermentación se observó con *T. diversifolia* (T3, 119.47 mg g⁻¹). No obstante, a las diferencias en la fermentación de las primeras 24 horas (FR y FM) no se observaron cambios significativos ($p > 0.05$) en las fracciones de lenta fermentación (FL) y en la fracción fermentable total a las 72 h (FFT, Tabla 4).

Tabla 4. Producción *in vitro* de gas y parámetros de fermentación, y digestibilidad de las dietas experimentales con follaje arbóreo, yuca y pasto.

| Parámetros | Dietas | | | | | | EE | Sig. |
|--|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|--------|------|
| | T0 | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | | |
| Vm (mL g ⁻¹) | 208.50 ^b | 285.85 ^{ab} | 278.85 ^{ab} | 250.35 ^{ab} | 326.28 ^a | 339.83 ^a | 27.112 | * |
| S (h ⁻¹) | 0.05 ^a | 0.04 ^a | 0.04 ^a | 0.05 ^a | 0.03 ^a | 0.04 ^a | 0.006 | NS |
| L(h) | 6.754 ^a | 5.549 ^{ab} | 4.306 ^b | 6.217 ^{ab} | 5.864 ^{ab} | 4.668 ^{ab} | 0.528 | * |
| DIVMS (%) | 55.53 ^d | 67.25 ^b | 68.50 ^b | 66.33 ^b | 62.33 ^c | 73.76 ^a | 0.648 | ** |
| DIVMO (%) | 55.06 ^c | 70.37 ^{ab} | 68.22 ^{ab} | 69.91 ^{ab} | 61.08 ^{bc} | 73.62 ^a | 2.2383 | ** |
| Fracción fermentable (mg g ⁻¹) | | | | | | | | |
| FR | 88.93 ^d | 123.54 ^{bc} | 164.69 ^a | 119.47 ^c | 139.85 ^b | 164.87 ^a | 4.181 | ** |
| FM | 136.73 ^b | 212.43 ^a | 205.14 ^a | 225.44 ^a | 223.48 ^a | 255.37 ^a | 14.601 | ** |
| FL | 286.84 ^a | 360.19 ^a | 267.61 ^a | 313.53 ^a | 433.89 ^a | 392.30 ^a | 62.372 | NS |
| FFT | 512.50 ^a | 696.20 ^a | 237.40 ^a | 658.40 ^a | 797.20 ^a | 812.50 ^a | 71.171 | NS |

Nota: * Diferencia significativa ($p < 0.05$); ** Diferencia altamente significativa ($p < 0.001$); NS = Diferencia no significativa ($p > 0.05$); EE = error estándar de la diferencia entre medias; a, b, c = Medias con diferente letra en la misma fila son diferentes ($p < 0.05$); Vm = Volumen máximo; S = tasa de fermentación; L = fase de retraso; DIVMS = Digestibilidad *in vitro* de la materia seca; DIVMO = Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica; FR = Fracción de fermentación rápida; FM = Fracción de fermentación media; FL = Fracción de fermentación lenta y FFT = Fracción fermentable total.

Fuente: Elaboración propia.

Producción de ácidos grasos volátiles

La producción de ácido acético disminuyó ($p < 0.05$) con el uso de follajes, con excepción de *G. ulmifolia* (T4), la cual fue similar ($p > 0.05$) a la dieta de pasto (T0) (48.1% y 48.1% respectivamente, Tabla 5). Por otro lado, se observó un incremento altamente significativo ($p < 0.001$) en el porcentaje de ácido propiónico y ácido butírico al suplementar con follajes (T1, T2, T3, T4, T5, Tabla 5); el mayor porcentaje de ácido propiónico se observó al adicionar follaje de *H. rosa-sinensis* (T5, 35.95%), *M. oleífera* (T2, 32.45%) y *G. ulmifolia* (T4, 32.24%), mientras que los menores porcentajes se observaron con *T. diversifolia* (T3, 28.81%) y *L. leucocephala* (T1, 30.61%). Respecto al ácido butírico, el mayor porcentaje se observó al incorporar *L. leucocephala* (T1, 26.97%) y *T. diversifolia* (T3, 23.27%), seguida de *M. oleífera* (T2, 19.79%) y *H. rosa-sinensis* (T5, 19.06%). Por otra parte, el ácido isobutírico disminuyó ($p < 0.05$) con la incorporación de follajes en la dieta, a excepción del uso de *T. diversifolia* (T3, 2.82%); los menores porcentajes se encontraron con la incorporación de *H. rosa-sinensis* (T5, 1.49%), *G. ulmifolia* (T4, 1.57%) y *M. oleífera* (T2, 2.19%). En cuanto al ácido valérico, no se observaron cambios significativos ($p > 0.05$), y el ácido isovalérico solo disminuyó ($p < 0.05$) con el uso de *H. rosa-sinensis* (T5) y *G. ulmifolia* (T4) (0.76% y 1.64%, respectivamente) (Tabla 5).

Tabla 5. Producción porcentual (%) de ácidos grasos volátiles en las dietas experimentales con follaje arbóreo, yuca y pasto.

| Ácido | Dietas | | | | | EE | Sig. |
|-------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------|------|
| | T0 | T1 | T3 | T4 | T5 | | |
| Acético | 48.17 ^a | 40.98 ^b | 41.53 ^b | 48.14 ^a | 41.76 ^b | 0.419 | ** |
| Propiónico | 25.68 ^d | 30.61 ^{cb} | 28.81 ^c | 32.34 ^b | 35.95 ^a | 0.51 | ** |
| Butírico | 13.34 ^d | 26.97 ^a | 23.27 ^{ab} | 15.72 ^{cd} | 19.06 ^{bc} | 0.418 | ** |
| Isobutírico | 3.37 ^a | 2.47 ^b | 2.82 ^{ab} | 1.57 ^c | 1.49 ^c | 0.069 | ** |
| Valérico | 1.92 ^a | 1.33 ^a | 1.24 ^a | 1.31 ^a | 2.58 ^a | 0.134 | NS |
| Isovalérico | 2.92 ^a | 2.58 ^a | 2.67 ^a | 1.64 ^b | 0.76 ^c | 0.077 | ** |

Nota: * Diferencia significativa ($p < 0.05$); ** Diferencia altamente significativa ($p < 0.001$); NS = Diferencia no significativa ($p > 0.05$); EE = error estándar de la diferencia entre medias; ^{a, b, c} = Medias con diferente letra en la misma fila son diferentes ($p < 0.05$).

Fuente: Elaboración propia.

Discusión

Composición química

La elevada concentración de PC y su fluctuación entre los follajes arbóreos es característico de muchas especies leguminosas y no leguminosas que consumen los bovinos en el trópico de México (Albores-Moreno *et al.*, 2019; Jiménez *et al.*, 2019; Valencia-Salazar *et al.*, 2021). Las fluctuaciones en su concentración se ven influenciadas por factores propios de las plantas y por su interacción con el ambiente. Entre ellos se encuentran las características propias de cada especie, la edad de rebrote del follaje y las distintas etapas fenológicas de la planta. En este sentido, se ha observado que *T. diversifolia* presenta elevados valores de PC a edades de 30 días en la etapa de botón (16.6%), y disminuye el valor (11.7%) en su etapa de floración (Mauricio *et al.*, 2014). Asociado a la disminución en la concentración de PC, se encuentra un incremento en los carbohidratos estructurales que forman parte de las paredes celulares, ocasionando un aumento en el contenido de fibras, entre ellos, de FDN (Sánchez, 2002). Lo anterior ha sido evidenciado por Cruz-Hernández *et al.* (2019), quienes observaron una disminución de la PC (17.3%) y un aumento de FDN al cosechar follajes de 60 días de *H. rosa-sinensis* con respecto a la concentración de PC y FDN encontrado en follajes de 30 días de edad. De igual manera, el estrés ambiental a la que pudieron estar sometidas las plantas pudo influir en la concentración de metabolitos secundarios (FT, TT, TC) (Bryant *et al.*, 1992). A medida que las plantas se enfrentan a un mayor estrés ambiental, como puede ser la defoliación por herbívoros, generan mecanismos químicos de defensa (metabolitos secundarios), entre los que están los compuestos polifenólicos. A pesar de la variación observada en FT, TT y TC entre las especies utilizadas, las concentraciones de TC en el presente estudio se encuentran dentro del rango de valores reportados (0.05% a 1.16% de la MS) para distintas especies forrajeras del sureste de México (Albores-Moreno *et al.*, 2019; Pérez-Can *et al.*, 2020). En algunos casos, incluso las concentraciones de taninos fueron menores (0.76% a 2.74% de la MS) a lo previamente reportado, como es el caso para *M. oleífera* y *T. diversifolia*, cuyas concentraciones de TT estuvieron por debajo de lo señalado por Aye (2016), quien encontró concentraciones de 7.6% y 8.8% para *M. oleífera* y *T. diversifolia*, respectivamente.

Al incorporar follajes arbóreos como estrategia de suplementación de dietas a base de gramíneas tropicales, es común encontrar un incremento (20.90% en promedio) en la concentración de proteína cruda y una reducción en la concentración de carbohidratos estructurales (48.20% en promedio de FDN y 41.72% en promedio de FDA), lo que ocasiona que se presenten fluctuaciones en el contenido proteico y energético de la dieta (Albores-Moreno *et al.*, 2019; Albores-Moreno *et al.*, 2020a; Pinzón *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2014). Lo anterior influye sobre la actividad de los microorganismos en el rumen y pueden incluso afectar el consumo voluntario de los animales. En este sentido, se considera que la incorporación de *H. rosa-sinensis* (T5) se encuentra dentro del nivel mínimo requerido de PC (60 g kg⁻¹ MS-80 g kg⁻¹ MS) para no afectar el consumo voluntario y la actividad microbiana en el rumen (Van Soest, 1965), mientras que con los tratamientos con *L. leucocephala* (T1) y *T. diversifolia* (T3) se podría aportar proteína necesaria para cubrir el nivel requerido (110 g kg⁻¹ MS-120 g kg⁻¹ MS) en animales en pastoreo con un nivel medio de producción (National Research Council [NRC], 2016).

Al mismo tiempo que aumenta la concentración de PC con la adición de follaje y yuca, se reduce la concentración de FDN en la dieta. Esta reducción puede llegar a alcanzar valores del 30% (T4) al 36% (T2), tal y como lo han reportado previamente Holguín *et al.* (2020) con dietas que incorporan *T. diversifolia*. Estas reducciones en FDN y aumento de PC en las dietas con follaje arbóreo podrían no afectar el consumo voluntario y la digestibilidad de los nutrientes en los animales, ya que las concentraciones de FDN se mantuvieron por debajo del valor crítico (550 g kg⁻¹ MS) en el que se comienza a comprometer la digestibilidad de los nutrientes y el consumo voluntario (Van Soest, 1965).

Contrario a la reducción en la concentración de FDN y FDA, con la suplementación de follajes aumentó la concentración de FT, TT y TC. Este aumento y variación en la concentración puede ser resultado de las diferencias propias de la especie de planta utilizada (Patra *et al.*, 2017), sobresaliendo entre ellas las concentraciones observadas en los tratamientos con *L. leucocephala* (T1), *M. oleífera* (T2) y *G. ulmifolia* (T4). No obstante la fluctuación en la concentración de TC entre las dietas con follaje arbóreo (0.30% a 1.53% de la MS, Tabla 3), estas concentraciones, junto con la disponibilidad de energía aportada por la yuca, pudieron ejercer un efecto positivo sobre la actividad microbiana, al modular la actividad microbiana e incrementar la fermentación y la digestibilidad de la materia orgánica de dieta (Molina-Botero *et al.*, 2020), en lugar de afectarla negativamente, como se ha reportado con dietas con concentraciones superiores a 6% de TC en la MS (Rodríguez-Villanueva *et al.*, 2019).

Fermentación y producción de gas *in vitro*

Durante el proceso de fermentación *in vitro*, el gas que se genera es resultado del metabolismo microbiano y su volumen depende de las características físico químicas del sustrato presente en el rumen (Yuliana *et al.*, 2019). Los mayores volúmenes de gas encontrados con el uso de follaje, principalmente con la inclusión de *G. ulmifolia* (T4) y *H. rosa-sinensis* (T5), pudo verse favorecido por un mejor aporte en la proteína y energía disponible en las dietas, promoviendo una mayor actividad microbiana y un menor tiempo de colonización del sustrato; principalmente por un aumento en la concentración de proteína soluble, de nitrógeno no proteico disponible y de carbohidratos como almidón, pectinas y azúcares solubles; los cuales ocasionaron un rápido inicio de la fermentación (Tabla 4), que se mantuvo durante 24 horas; dando como resultado una mayor digestibilidad de la materia orgánica (Albores-Moreno *et al.*, 2019; Jiménez-Guillen *et al.*, 2020; Molina-Botero *et al.*, 2020). Al respecto, Aye (2016) reporta una mejora en la disponibilidad de nitrógeno y en el aporte energético en dietas con *M. oleífera* (15.7 MJ Kg) y *T. diversifolia* (16.4 MJ Kg) debido a una mayor solubilidad de la proteína y a un aumento en la concentración de carbohidratos no estructurales y de grasa en la dieta. Un resultado similar reporta Luna (2021), al utilizar *T. diversifolia* en condiciones *in vitro* en dietas para pequeños rumiantes.

Contrario a los resultados encontrados en este estudio, Yuliana *et al.* (2019) reporta que una mezcla de 30% *H. rosa-sinensis* y 70% de *P. purpureum* no mejora la producción de gas *in vitro* en las primeras 24 h y 48 h de incubación. Esta divergencia en los resultados podría deberse al efecto que ejerció la incorporación de harina de yuca, que posee altos contenidos de almidón y azúcares solubles, y que pudieron promover un rápido crecimiento de los microorganismos. Adicionalmente, la mayor fermentación observada en las dietas con follaje arbóreo podría ser resultado de la combinación de un bajo contenido de FDN, FDA y TC (Tabla 3) (Giuburuncă *et al.*, 2014). Al respecto, Cruz-Hernández *et al.* (2019) encontraron una correlación negativa entre el contenido de TC y las tasas de degradación de MS y PC en mezclas con *H. rosas-sinensis* y *M. alba*. En este sentido, se observó que todas las mezclas con forraje arbóreo tuvieron concentraciones de taninos inferiores a 50 g kg MS y podría considerarse como un nivel en el que los taninos no afectan el crecimiento de los microorganismos en el rumen, el metabolismo ruminal y la digestibilidad de la dieta (Reed, 1995). En este mismo sentido, Molina-Botero *et al.* (2020) encontraron que mezclas de forrajes de *Brachiaria brizantha*, *Gliricidia sepium* y *Enterolobium cyclocarpum*, con contenidos de TC de 6.20 g kg MS a 13.08 g kg MS y con bajos contenidos de FDN (660 g Kg MS a 687 g Kg MS), promovieron una mayor fermentación y producción de gas. Por otro lado, Arjona-Alcocer *et al.* (2020) reportan la influencia de las fuentes energéticas sobre la utilización de nitrógeno en vacas alimentadas con *L. leucocephala* y *P. purpureum*. Los autores señalan que la suplementación con carbohidratos de rápida fermentación ruminal induce una rápida respuesta en el uso del nitrógeno por parte de los microorganismos, mientras que aumenta la digestibilidad de la materia seca con respecto a la dieta sin suplementación energética, al pasar de 57.1% hasta 63.5%, similar a como se encontró en este estudio.

Las variaciones en las distintas fracciones fermentables son indicadoras de la diferencia en el contenido de polisacáridos, proteínas, almidón y fibra entre las dietas (Guo *et al.*, 2008) e influyen sobre la velocidad en la disponibilidad potencial de los nutrientes en las dietas (Rosales & Rios, 1999). En este estudio, la mayor fracción de rápida fermentación observada con la incorporación de *H. rosa-sinensis* (T5) y *M. oleífera* (T2) podría estar vinculada con sus bajos contenidos de FDN, FDA y lignina (Tabla 3), mientras que la mayor fracción de fermentación media, observada con todos los follajes, probablemente fue influenciada por la inclusión del 30% de harina de yuca, junto con la presencia de carbohidratos presentes en los follajes arbóreos; los cuales pudieron afectar el aporte de energía y, por tanto, mantener altos los valores de la fracción de fermentación media (Tabla 4) (Hartmann, 2007), a pesar de que no hubo cambios en la fracción de lenta fermentación y la fermentación total (Albores-Moreno *et al.*, 2020b; Ku-Vera *et al.*, 2020b).

Producción de ácidos grasos volátiles (AGV)

El microbiota ruminal transforma los carbohidratos contenidos en la dieta y produce ácidos grasos volátiles (Yuliana *et al.*, 2019). La producción de los AGV se encuentra directamente relacionada con la digestibilidad de la materia seca y materia orgánica y con la calidad de la dieta; a medida que esta calidad disminuye, la producción de ácidos grasos volátiles es menor (Ku-Vera *et al.*, 2020b), tal y como se encontró en la dieta con solo pasto (T0). Es común que en las dietas a base de gramíneas el perfil de los AGV se distribuya en 65% de ácido acético, 20% de ácido propiónico, 13% de ácido butírico y 2% de otros ácidos (Corbett *et al.*, 1995). Si bien en este estudio no se encontró esta distribución en la dieta testigo (T0), fue con esta dieta, junto con el uso de *G. ulmifolia* (T4), donde se obtuvo los mayores porcentajes de ácido acético (Tabla 5). Esta producción fue similar a la encontrada por Holguín *et al.* (2020) en mezclas de *P. purpureum* y *T. diversifolia*, y posiblemente se relaciona con el aumento en la concentración de fibra detergente neutro que favorece la predominancia de bacterias celulolíticas y una menor digestibilidad, dando como resultado un aumento en la concentración del ácido acético (Ku-Vera *et al.*, 2020a).

Por otro lado, la menor producción de acético en las dietas T1, T2, T3 y T5 pudo ser influenciada por un aumento en el aporte de proteínas y carbohidratos solubles, los cuales propiciaron un incremento de las fracciones de rápida y media fermentación (Tabla 4) y, en consecuencia, un aumento en la digestibilidad de la materia orgánica, probablemente por una mayor predominancia de consorcios bacterianos que utilizan carbohidratos no estructurales, junto con especies proteolíticas. Lo anterior favorece un aumento en la eficiencia de utilización de la energía de la dieta al aumentar la producción de ácido propiónico (Tabla 5; *H. rosa-sinensis*, *M. oleífera*) y ácido butírico (*L. leucocephala*, *T. diversifolia*) (Holguín *et al.*, 2020; Meale *et al.*, 2012; Ungerfeld, 2015), tal y como lo encontraron Abdel-Raheem & Hassan (2021) al suplementar con 15% de hojas de *M. oleífera*, ocasionando un aumento de ácido propiónico (20.03%) con respecto a la dieta sin follaje (19.24%).

Por otro lado, la mayor producción de ácido butírico observada con *L. leucocephala* (T1) y *T. diversifolia* (T3) no concuerda con los hallazgos sobre la suplementación con follajes de *Gliricidia sepium*, como lo señalan Molina-Botero *et al.* (2020), quienes no encontraron diferencias significativas con respecto al tratamiento de *Brachiaria* a 24 h de incubación (6.76 mmol/100 mol y 6.53 mmol/100 mol, respectivamente). También difieren de los resultados sobre la producción de ácido butírico (13.45%) reportado por Pinzón *et al.* (2011) al emplear 25% de *H. rosa-sinensis* como suplemento en la dieta. Es posible que esta divergencia de resultados se deba a la complejidad de las relaciones microbianas y sus rutas fermentativas que utilizan H₂. Al respecto, se señala que los microorganismos del rumen pueden cambiar sus patrones de fermentación en respuesta a pequeñas diferencias en la necesidad de conservación de la energía, dejando de usar vías metabólicas menos eficientes (Galindo-Blanco *et al.*, 2018).

Conclusiones

La incorporación de follajes de especies arbóreas mezcladas con harina de *M. esculenta* y pasto *P. maximum* mejora las características nutricionales de las dietas que se expresan en mejores patrones de fermentación ruminal y aumento en la digestibilidad de la materia seca y materia orgánica. Particularmente, con la incorporación de *H. rosa-sinensis* (T5), *M. oleífera* (T2) y *G. ulmifolia* (T4) se promueve una mayor producción de ácido propiónico, mientras que con la incorporación de *L. leucocephala* (T1) y *T. diversifolia* (T3) es posible incrementar la producción de ácido butírico; por ello, estas cinco especies constituyen una opción en la alimentación de rumiantes bajo condiciones de pastoreo de gramíneas en el trópico.

Agradecimientos

Al Tecnológico Nacional de México (TecNM) (Proyecto con clave 5070.19-P) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) (Proyecto: 2700666) por el apoyo financiero para llevar a cabo la investigación y por la beca de posgrado otorgada al segundo autor.

Conflicto de interés

Los autores declaramos que no existe ningún conflicto de interés en esta investigación.

Referencias

- Abdel-Raheem, S. M., & Hassan, E. H. (2021). Effects of dietary inclusion of *Moringa oleifera* leaf meal on nutrient digestibility, rumen fermentation, ruminal enzyme activities and growth performance of buffalo calves. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(8), 4430-4436. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.037>
- Albores-Moreno, S., Alayón-Gamboa, J. A., Miranda-Romero, L. A., Alarcón-Zúñiga, B., Jiménez-Ferrer, G., Ku-Vera, J. C., & Piñeiro-Vázquez, A. T. (2020a). Effect of supplementation with tree foliage on *in vitro* digestibility and fermentation, synthesis of microbial biomass and methane production of cattle diets. *Agroforestry Systems*, 94(5), 1469-1480. doi: <https://doi.org/10.1007/s10457-019-00416-1>
- Albores-Moreno, S., Alayón-Gamboa, J. A., Morón-Ríos, A., Ortiz-Colin, P. N., Ventura-Cordero, J., González-Pech, P. G., & Piñeiro-Vázquez, A. T. (2020b). Influence of the composition and diversity of tree fodder grazed on the selection and voluntary intake by cattle in a tropical forest. *Agroforestry Systems*, 94, 1651-1664. doi: <https://doi.org/10.1007/s10457-020-00483-9>
- Albores-Moreno, S., Alayón-Gamboa, J. A., Miranda-Romero, L. A., Alarcón-Zúñiga, B., Jiménez-Ferrer, G., Ku-Vera, J. C., & Piñeiro-Vázquez, A. T. (2019). Effect of tree foliage supplementation of tropical grass diet on *in vitro* digestibility and fermentation, microbial biomass synthesis and enteric methane production in ruminants. *Tropical Animal Health and Production*, 51(2), 893-904. doi: <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1772-7>
- Albores-Moreno, S., Alayón-Gamboa, J. A., Miranda-Romero, L. A., Jiménez-Ferrer, G., Ku-Vera, J. C., & Vargas-Villamil, L. (2018). Nutritional composition, *in vitro* degradation and potential fermentation of tree species grazed by ruminants in secondary vegetation (*acahual*) of deciduous forest. *Journal of Animal & Plant Science*, 28(5), 1263-1275.
- Arjona-Alcocer V. A., Aguilar-Pérez C. F., Ku-Vera J. C., Ramírez-Avilés, L., & Solorio-Sánchez, F. J. (2020). Influence of energy supplementation on dietary nitrogen utilization and milk production in cows fed foliage of *Leucaena leucocephala*. *Tropical Animal Health and Production*, 52(5), 2319-2325. doi: <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02254-1>
- Ashfod, D., Lara-Lara, P. E., Aguilar-Urquiza, E., Cen-Chuc, F. E., Ku-Vera, J. C., & Sanginés-García, J. R. (2016). Digestibilidad *in vivo* y balance de nitrógeno en dietas para ovinos con follaje de árboles forrajeros en sustitución de harina de soya. *Agroforestry Systems*, 91(6), 1079-1085. doi: <https://doi.org/10.1007/s10457-016-9982-3>

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990). *Official methods of analysis* (15a ed). AOAC International.
- Aye, P. A. (2016). Comparative nutritive value of *Moringa oleifera*, *Thitonia diversifolia* and *Gmelina arborea* leaf meals. *American Journal of Food and Nutrition*, 6(1), 23-32. doi: <https://doi.org/10.5251/ajfn.2016.6.1.23.32>
- Barros-Rodríguez, M., Oña-Rodríguez, J., Mera-Andrade, R., Artieda-Rojas, J., Curay-Quispe, S., Avilés-Esquivel, D., Solorio-Sánchez, J., & Guishca-Cunhuay, C. (2017). Degradación ruminal de dietas a base de biomasa cosechada de *Amaranthus cruentus*: efecto sobre los protozoos del rumen y producción de gas *in vitro*. *Revista de Investigación Veterinarias del Perú*, 28(4), 812-821. doi: <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13931>
- Bryant, P. J., Reichardt, B. P., Clausen, P. T., Provenza, D. F., & Kuropat, J. P. (1992). Woody plant-mammal interactions. En A. G., Rosenthal & R. M., Berenbaum (eds.), *Herbivores. Their interactions with secondary plant metabolites* (pp. 344-365). Academic Press Inc.
- Castro-González, A., Alayón-Gamboa, J. A., Ayala-Burgos, A., & Ramírez-Avilés, L. (2008). Effects of *Brosimum alicastrum* and *Lysiloma latisiliquum* mixtures on voluntary intake, nutrient digestibility and nitrogen balance in sheep fed tropical pastures. *Animal Feed Science and Technology*, 141(3-4), 246-258. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2007.06.033>
- Cochran, W. G., & Cox, G. M. (1991). *Diseños experimentales* (2a ed.). Trillas.
- Corbett, J. L., & Freer, M. (1995). Ingestion et digestion chez les ruminant's au pâturage. En R., Jarrige, Y., Ruckbusch, C., Demarquilly, M. H., Farce, & M., Journet, M. (eds.) *Nutrition des ruminants domestiques* (pp. 871-900). INRA.
- Cruz-Hernández, A., Hernández-Sánchez, D., Gómez-Vázquez, A., Govea-Luciano, A., Pinos-Rodríguez, J. M., Álvarez-González, C. A., Chay-Canul, A., Córdoba-Izquierdo, A., & Brito-Vega, H. (2019). Tannin concentration and degradation rate *in vitro* of *Morus alba* and *Hibiscus rosa-sinensis*. *Acta Universitaria*, 29, e2197, 1-6. doi: <https://doi.org/10.15174/au.2019.2197>
- De Oliveira, M., Detmann, E., De Campos, S., Darlison, E., De Almeida, L. M., Medrado, M., & Ribeiro, A. (2017). Intake, digestibility, and rumen and metabolic characteristics of cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogen and different levels of starch. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 30(6), 797-803. doi: <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0629>
- Elghandour, M. M. Y., Vázquez, J. C., Salem, A. Z. M., Kholif, A. E., Cipriano, M. M., Camacho, L. M., & Márquez, O. (2017). *In vitro* gas and methane production of two mixed rations influenced by three different cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Animal Research*, 45(1), 389-395. doi: <https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1204304>
- Elmasry, A. M. A., Mendoza, G. D., Miranda, L. A., Vázquez, G., Salem, A. Z. M., & Hernández, P. A. (2016). Effects of types and doses of yeast on gas production and *in vitro* digestibility of diets containing maize (*Zea mays*) and lucerne (*Medicago sativa*) or oat hay. *South African Journal of Animal Science*, 46(4), 391-397. doi: <https://doi.org/10.4314/sajas.v46i4.7>
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2018). *Livestock environmental assessment and performance partnership*. FAO.
- Galindo-Blanco, J. L., Rodríguez-García, I., González-Ibarra, N., García-López, R., & Herrera-Villafranca, M., (2018). Sistema silvopastoril con *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray: efecto en la población microbiana ruminal de vacas. *Revista Pastos y Forrajes*, 41(4), 273-280. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942018000400006
- García, E. (1973). *Modificación al sistema climático de Köppen*. UNAM.
- García, E. M., Fernández, I., & Fuentes, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. Universidad Politécnica de Valencia. <https://hdl.handle.net/10251/52056>
- Giuburuncă, M., Criste, A., Cocan, D., Constantinescu, R., Răducu, C., & Mireșan, V. (2014). Effects of plant secondary metabolites on methane production and fermentation parameters *in vitro* ruminal cultures. *Journal of Animal Science and Biotechnologies*, 47(2), 78-82.
- Guo, Y. Q., Liu, J., Lu, Y., Zhu, W. Y., Denman, S. E., & McSweeney, C. S. (2008). Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of mcrA gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*, 47(5), 421-426. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02459.x>

- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831-2846. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>
- Hernández-Morales, J., Sánchez-Santillán, P., Torres-Salado, N., Herrera-Pérez, J., Rojas-García, A. R., Reyes-Vázquez, I., & Mendoza-Núñez, M. A. (2018). Composición química y degradaciones *in vitro* de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9(1), 105-120. doi: <https://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v9i1.4332>
- Holguín, V. A., Cuchillo-Hilario, M., Mazabel, J., Quintero, S., & Mora-Delgado, J. (2020). Efecto de la mezcla ensilada de *Pennisetum purpureum* y *Tithonia diversifolia* sobre la fermentación ruminal *in vitro* y su emisión de metano en el sistema RUSITEC. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(1), 19-37. doi: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4740>
- International Standard Organization (ISO). (1988). *Animal feeding stuffs, animal products, and faeces or urine - Determination of gross calorific value bomb calorimeter method*. ISO.
- Jiménez-Guillén, R., Noriega, D. H., Rojas-Hernández, S., Olivares, J., Villa-Mancera, A., Olmedo-Juárez, A., Paredes-Díaz, D., & Hernández-Hernández, H. (2020). Chemical composition and ruminal digestion of corn silage with *Morus alba* L. foliage. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 7(1), e2228. doi: <https://doi.org/10.19136/era.a7n1.2228>
- Jiménez, A., Jiménez, G., Alayón-Gamboa, J. A., Pérez-Luna, E. J., Piñero-Vázquez, A. T., Albores-Moreno, S., Pérez-Escobar, M. G., & Castro-Chan, R. (2019). Quantifying ruminal fermentation and methane production using the *in vitro* gas technique in the forages of a sheep silvopastoral system in Chiapas, Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 10(2), 298-314. doi: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4529>
- Krishnamoorthy, U., Rymer, C., & Robinson, P. H. (2005). The *in vitro* gas production technique: limitations and opportunities. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124 (1), 1-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2005.04.015>
- Ku-Vera, J. C., Castelan-Ortega, O. A., Galindo-Maldonado, F. A., Arango, J., Chirinda, N., Jiménez-Ocampo, R., Valencia-Salazar, S. S., Flores, E. J., Montoya-Flores, M. D., Molina-Botero, I. C., Piñero-Vázquez, A. T., Arceo-Castillo, J. I., Aguilar-Pérez, C. F., Ramírez-Avilés, L., & Solorio-Sánchez, F. J. (2020a). Review: Strategies for enteric methane mitigation in cattle fed tropical forages. *Animal*, 14(3), 453-463. doi: <https://doi.org/10.1017/S1751731120001780>
- Ku-Vera, J. C., Jiménez-Ocampo, R., Valencia-Salazar, S. S., Montoya-Flores, M. D., Molina-Botero, I. C., Arango, J., Gómez-Bravo, C. A., Aguilar-Pérez, C. F., & Solorio-Sánchez, F. J. (2020b). Role of secondary plant metabolites on enteric methane mitigation in ruminants. *Frontiers in Veterinary Science*, 584(7), 1-14. doi: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00584>
- Luna, M. A. A. (2021). *Digestibilidad in vitro de dietas para ovinos de engorda suplementadas con follaje de Thitonia diversifolia* (Tesis Maestría). Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Tizimín.
- Mauricio, R. M., Ribeiro, R. S., Silveira, S. R., Silva, P. L., Calsavara, L., Pereira, L. G. R., & Paciullo, D. S. C. (2014). *Thitonia diversifolia* for ruminant nutrition. *Tropical Grasslands - Forrajes Tropicales*, 2, 82-84. doi: [https://doi.org/10.17138/TGFT\(2\)82-84](https://doi.org/10.17138/TGFT(2)82-84)
- Meale, S. J., Chaves, A. V., Baah, J., & McAllister, T. A. (2012). Methane production of different forages *in vitro* ruminal fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 25(1), 86-91. doi: <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11249>
- Menke, K., & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28(4), 7-55. <https://www.scienceopen.com/document?vid=e1859372-e696-424a-85fb-d305b0b594bc>
- Miranda, R. L. A., Vázquez, M. P., Améndola, M. R., Sandoval, G. L., & González, O. R. (2015). Cuantificación de las fracciones fermentables de alfalfa y tuna por la técnica de producción de gas. *Asociación Latinoamericana de Producción Animal, XXIV Congreso de la asociación Latinoamericana de producción animal y XL Congreso de la sociedad chilena de producción animal 2015*. Puerto Varas, Chile.
- Modeste, K. K., Adolphe, M., Boni, N., Edmond, K., & Camille, K. (2018). Status of Cassava (*Manihot Esculenta* Crantz) in Côte d'Ivoire: from production to consumption and evaluation of technology adoption. *European Scientific Journal*, 14(9), 285. doi: <https://doi.org/10.19044/esj.2018.v14n9p285>
- Molina-Botero, I. C., Mazabel, J., Arceo-Castillo, J., Urrea-Benítez, J. L., Olivera-Castillo, L., Barahona-Rosales, R., Chirinda, N., Ku-Vera, J., & Arango, J. (2020). Effect of the addition of *Enterolobium cyclocarpum* pods and *Gliricidia sepium* forage to *Brachiaria brizantha* on dry matter degradation, volatile fatty acid

- concentration, and *in vitro* methane production. *Tropical Animal Health and Production*, 52(4), 2787-2798. doi: <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02324-4>
- Monforte-Briceño, G. E., Sandoval-Castro, C. A., Ramírez-Avilés, L., & Capetillo, C. M. (2005). Defaunation capacity of tropical fodder trees: Effects of polyethylene glycol and its relationship to *in vitro* gas production. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 313-327. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.016>
- National Research Council (NRC). (2016). *Committee on nutrient requirements of beef cattle*, (8^a ed.). National Academy Press.
- 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), 1-18. doi: <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0145-9>
- Pell, A. N., & Schofield, P. (1993). Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 76(4), 1063-1073. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77435-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77435-4)
- Pérez-Can, G. E., Tzec-Gamboa, M., Albores-Moreno, S., Sanginés-García, J., Aguilar-Urquizo, E., Chay-Canul, A., Canul-Solis, J., Muñoz-Gonzalez, J., Díaz-Echeverría, V., & Piñeiro-Vázquez, A. T. (2020). Degradabilidad y producción de metano *in vitro* del follaje de árboles y arbustos con potencial en la nutrición de rumiantes. *Acta Universitaria*, 30, e2840, 1-13. doi: <https://doi.org/10.15174/au.2020.2840>
- Pinzón, G., Aranda-Ibáñez, E. M., Pérez, J., Hernández, A., Da Silva, I. C., & Vitti, A. (2011). Rumen characteristics of young bulls fed diets based on grass and commercial concentrate supplemented with *Hibiscus rosa-sinensis* and Saccharin. *Ciencia Animal Brasileña*, 12(1), 26-36. doi: <https://doi.org/10.5216/cab.v12i1.4878>
- Piñeiro-Vázquez, A., Canul, J. R., Casanova, F., Chay-Canul, A. J., Ayala-Burgos, A. J., Solorio-Sánchez, F. J., Aguilar-Pérez, C. F., & Ku-Vera, J. C. (2017). Enteric methane emission in sheep fed *Pennisetum purpureum* and tropical trees containing condensed tannins. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(2), 111-119. doi: <https://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v8i2.4401>
- Ramos-Morales, E., Arco-Pérez, A., Martín-García, A. I., Yáñez-Ruiz, D. R., Frutos, P., & Hervás, G. (2014). Use of stomach tubing as an alternative to rumen cannulation to study ruminal fermentation and microbiota in sheep and goats. *Animal Feed Science and Technology*, 198(12), 57-66. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.09.016>
- Reed, J. D. (1995). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*, 73(5), 1516-1528. doi: <https://doi.org/10.2527/1995.7351516x>
- Rodríguez-Villanueva, H., Puch-Rodríguez, J., Muñoz-González, J., Sanginés-García, J., Aguilar-Urquizo, E., Chay-Canul, A., Casanova-Lugo, F., Jimenez-Ferrer, G., Alayón-Gamboa, J., & Piñeiro-Vázquez, A. (2019). Intake, digestibility, and nitrogen balance in hair sheep fed *Pennisetum purpureum* supplemented with tropical tree foliage. *Agroforestry Systems*, 94(3), 665-674. doi: <https://doi.org/10.1007/s10457-019-00439-8>
- Rosales, M., & Rios, C. I. (1999). Avances en la investigación en la variación del valor nutricional de procedencias de *Trichanthera gigantea*. En M. D., Sánchez & M. R., Méndez (eds.), *Agroforestería para la producción animal en América Latina* (pp. 351-362). FAO.
- Ryan, R. K. (1964). Concentrations of glucose and low-molecular-weight acids in the rumen of sheep changed gradually from a hay to a hay-plus-grain diet. *American Journal of Veterinary Research*, 25, 646-652. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14141503/>
- Sánchez, M. D. (2002). *Mulberry for animal production*. FAO.
- Statistical Analysis System (SAS). (2014). *The SAS system for Windows*. USA: SAS Institute Inc.
- Terrill, T. H., Rowan, A. M., Douglas, G. B., & Barry, T. N. (1992). Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58(3), 321-329. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740580306>
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3-4), 185-197. doi: [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)

- Ungerfeld, E. M. (2015). Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: a meta-analysis. *Frontiers in Microbiology*, 37(6), 1-17. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00037>
- Unión Internacional de Ciencias del Suelo (UICS). (2007). *Base referencial mundial del recurso suelo*. FAO.
- Valencia-Salazar, S. S., Jiménez-Ferrer, G., Arango, J., Molina-Botero, I., Chirinda, N., Piñeiro-Vázquez, A., Jiménez-Ocampo, R., Nahed-Toral, J., & Ku-Vera, J. (2021). Enteric methane mitigation and fermentation kinetics of forage species from Southern Mexico: *in vitro* screening. *Agroforestry Systems*, 95(2), 293-305. doi: <https://doi.org/10.1007/s10457-020-00585-4>
- Van Soest, P. J. (1965). Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by ruminants: voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility. *Journal of Animal Science*, 24(3), 834-843. doi: <https://doi.org/10.2527/jas1965.243834x>
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal Dairy Science*, 74(10), 3583-3597. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vargas, J., Pabón, M., & Carulla, J. (2014). Producción de metano *in vitro* en mezcla de gramíneas-leguminosas del trópico alto colombiano. *Archivos de Zootecnia*, 63(243), 397-407. doi: <https://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922014000300001>
- Yam-Chale, E., Díaz-Echeverría, V., Chavarría-Díaz, A., Oros-Ortega, I., Chay-Canul, A., Cen-Hoy, A., & Casanova, F. (2018). Forage and tuber yield and nutritional composition of *Manihot esculenta* Crantz meal with organic fertilization. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 5(13), 127-132. doi: <https://doi.org/10.19136/era.a5n13.1263>
- Yuliana, P., Laconi, E. B., Jayanegara, A., Achmadi, S. S., & Samsudin, A. A., (2019). Effect of napier grass supplemented with *Gliricidia sepium*, *Sapindus rarak* or *Hibiscus rosa-sinensis* on *in vitro* rumen fermentation profiles and methanogenesis. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 44(2), 167-176. doi: <https://doi.org/10.14710/jitaa.44.2.167-176>