

Efecto del uso de semillas arbóreas forrajeras sobre la actividad fermentativa de los microorganismos ruminales

Effect of the use of forage tree seeds on the fermentative activity of ruminal microorganisms

Efeito do uso de sementes de árvores forrageiras sobre a atividade fermentativa de microrganismos ruminais

LUIS RENÉ PINTO-TRINIDAD¹, ROSELIA RAMÍREZ-DÍAZ²,
LAURA MARICRUZ SANDOVAL-GONZÁLEZ³.

Historial del Artículo

Recibido para evaluación: 9 de Enero de 2019.

Aprobado para publicación: 18 de Marzo de 2019.

- 1 Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla. Estudiante de Ingeniero en Biotecnología. Puebla, México
- 2 Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad Autónoma de Chiapas, Agroforestería Pecuaria. MC. Villaflores Chiapas, México.
- 3 Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Zootecnia. IAZ. Texcoco, México.

Correspondencia: luis_rne96@hotmail.com

Cómo citar este artículo: PINTO-TRINIDAD, LUIS RENÉ, RAMÍREZ-DÍAZ, ROSELIA, SANDOVAL-GONZÁLEZ, LAURA MARICRUZ. (2019). EFECTO DEL USO DE SEMILLAS ARBÓREAS FORRAJERAS SOBRE LA ACTIVIDAD FERMENTATIVA DE LOS MICROORGANISMOS RUMINALES. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial,17(2), 46-52, DOI:<http://dx.doi.org/10.18684/bsaa.v17n2.1252>

RESUMEN

Para conocer el efecto de las semillas arbóreas forrajeras en la alimentación de rumiantes, es necesario conocer el efecto de semillas forrajeras con taninos sobre la actividad fermentativa de los microorganismos ruminales, para ello se evaluó la fermentación in vitro, a través de la técnica de producción de gas de semilla de *Acacia angustissima*, *Enterolobium cyclocarpum* y *Guazuma ulmifolia*. Las variables fueron: volumen máximo (Vm; mL/g), tasa (S; h⁻¹) y fase lag (L; h) de producción de gas, y digestibilidad in vitro de la materia seca a 24 horas (DIVMS): estas se correlacionaron con el contenido de taninos de las especies arbóreas evaluadas. El contenido de taninos fue superior para la semilla de *A. angustissima* (P<0,05) y la menor concentración se presentó en semilla de *G. ulmifolia*. El Vm, S y L fueron similares para *E. cyclocarpum* y *G. ulmifolia* (P>0,05), pero menores (P< 0,05) para la semilla de *A. angustissima*. La mayor DIVMS se presentó en las semillas de *E. cyclocarpum*, seguida de *G. ulmifolia* y menor para *A. angustissima* (P< 0,05). En el análisis de correlación se observó que el contenido de taninos mostró una correlación significativa y negativa con los valores de DIVMS ($Y = -0,2799x + 63,678$ $R^2 = 0,89$) y el Vm ($Y = -1,4816x + 277,56$, $R^2 = 0,81$). Se concluye que las semillas *E. cyclocarpum* y *G. ulmifolia* se fermentan más favorablemente en rumen, mostrando mejor potencial y mayor fracciones de fermentación de los azúcares y carbohidratos de reserva, mejorando la digestibilidad in vitro, lo que sugiere su uso en la alimentación de rumiantes, mientras que la cantidad de taninos de *A. angustissima* afectó la cinética de fermentación ruminal y la digestibilidad in vitro, sin embargo, se necesitan investigaciones adicionales para evaluar la inclusión de semillas como ingredientes en dietas así como evaluaciones in situ.

ABSTRACT

To know the effect of forage tree seeds in ruminant feeding, it is necessary to know the effect of forage seeds with tannins on the fermentative activity of ruminal microorganisms, for this in vitro fermentation was evaluated, through the production technique of seed gas of *Acacia angustissima*, *Enterolobium cyclocarpum* and *Guazuma ulmifolia*. The variables were: maximum volume (Vm, mL / g), rate (S, h⁻¹) and lag phase (L; h) of gas production, and in vitro digestibility of the dry matter at 24 hours (DIVMS): these were correlated with the tannin content of the evaluated tree species. The content of tannins was higher for the *A. angustissima* seed (P <0,05) and the lowest concentration was found in *G. ulmifolia* seed. The Vm, S and L were similar for *E. cyclocarpum* and *G. ulmifolia* (P> 0,05), but lower (P <0,05) for the *A. angustissima* seed. The highest DIVMS was present in the seeds of *E. cyclocarpum*, followed by *G. ulmifolia* and lower for *A. angustissima* (P <0,05). In the correlation analysis it was observed that the tannin content showed a significant and negative correlation with the DIVMS values ($Y = -0,2799x + 63,678$ $R^2 = 0,89$) and the Vm ($Y = -1,4816x + 277,56$, $R^2 = 0,81$). It is concluded that *E. cyclocarpum* and *G. ulmifolia* seeds are fermented more favorably in the rumen, showing better potential and higher fermentation fractions of the sugars and reserve carbohydrates, improving the in vitro digestibility, suggesting its use in the feeding of ruminants, while

PALABRAS CLAVE:

Taninos, Parámetros de fermentación, Digestibilidad, Alimentación animal

KEY WORDS:

Tannins, Fermentation parameters, Digestibility, Animal feeding

PALAVRAS-CHAVE:

Taninos, Parâmetros de fermentação, Digestibilidade, Alimentação animal

the amount of tannins of *A. angustissima* affected the kinetics of ruminal fermentation and in vitro digestibility, however, additional research is needed to evaluate the inclusion of seeds as ingredients in diets as well as in-situ assessments.

RESUMO

Para conhecer o efeito das sementes da árvore de forragens na alimentação a ruminantes, é necessário conhecer o efeito dos taninos semente forragem sobre a actividade fermentativa de microrganismos ruminais, para esta fermentação in vitro foi avaliada por meio da técnica de produção *A. angustissima* semente gás, *Enterolobium cyclocarpum* e *Pithecellobium*. As variáveis estudadas foram: volume máximo (Vm; mL/g), a taxa de (S; h-1) e atraso de fase (L; h) de produção de gás, e a digestibilidade in vitro da matéria seca a 24 horas (DIVMS): estes foram correlacionados com o teor de taninos das espécies arbóreas avaliadas. O teor de tanino foi mais elevada para as sementes de *A. angustissima* ($P < 0,05$) e a concentração mais baixa foi apresentada em *G. ulmifolia* semente. Vm, S e G foram semelhantes com *E. G. cyclocarpum* e *ulmifolia* ($P > 0,05$), mas inferior ($P < 0,05$) As sementes de *A. angustissima*. Mais DIVMS apresentado em sementes *E. cyclocarpum*, seguido por *G. ulmifolia* e inferior para *A. angustissima* ($P < 0,05$). Na análise de correlação observou-se que o teor de tanino mostraram uma correlação negativa significativa com os valores DIVMS ($Y = -0,2799x + 63,678$ $R^2 = 0,89$) e Vm ($Y = -1,4816x + 277,56$, $R^2 = 0,81$). A conclusão que as sementes e *E. cyclocarpum* e *G. ulmifolia* sementes fermentados mais favoravelmente no rúmen, que mostra frações melhor potenciais e maiores de fermentação de açúcares e hidratos de carbono de reserva, melhorando a digestibilidade in vitro, sugerindo a sua utilização em alimentos para ruminantes, enquanto a quantidade de tanino *A. angustissima* afectada a cinética da fermentação no rúmen e digestibilidade in vitro, no entanto, é necessária mais investigação para avaliar a inclusão de sementes como ingredientes em dietas, bem como avaliações in situ.

INTRODUCCIÓN

El uso de arbustos y árboles en la alimentación de los rumiantes representa una importante alternativa en el desarrollo de una producción animal sostenible [1, 2]. En el trópico mexicano se cuenta con diversas opciones de arbóreas con potencial forrajero debi-

do a su alto valor nutritivo [3]. Sin embargo, muchas de estas especies contienen cantidades elevadas de compuestos secundarios [4], tales como los taninos, los cuales, se ha demostrado, afectan la actividad microbiana en el rumiante [5], lo que puede restringir, en términos de nutrición y eficiencia productiva su aprovechamiento pero también pueden producir una disminución de gases efecto invernadero [6,7], lo cual es de suma importancia desde el punto de vista ambiental [8,9]. Destacan entre estas las semillas de Timbre (*Acacia angustissima*), Guanacastle (*Enterolobium cyclocarpum*) y Caulote (*Guazuma ulmifolia*). No obstante, hay algunas indicaciones de que el contenido moderado de taninos podría ejercer efectos beneficiosos sobre los animales que los consumen, tales como reducir la degradación de la proteína de la dieta y conseguir así un mayor aporte de aminoácidos al intestino delgado [10]. Por lo anterior, el objetivo particular de este trabajo fue conocer el efecto de semillas arbóreas forrajeras altas en taninos sobre la actividad fermentativa de los microorganismos ruminales.

MÉTODO

Características y manejo de las muestras arbóreas

El experimento fue conducido en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad Autónoma de Chiapas. Se utilizaron las semillas de *Acacia angustissima*, *Enterolobium cyclocarpum* y *Guazuma ulmifolia* por su concentración de taninos y por su uso como alimento en ganadería de bajos insumos. Las muestras de cada una de éstas fueron cosechadas manualmente durante la primavera (época de seca) de distintos árboles y fueron secadas en una estufa de aire forzado a 60°C durante dos horas. Una vez secas, las muestras fueron procesadas en un molino tipo Wiley con una criba de 2 mm.

Análisis químico de las muestras

El contenido de taninos (TAN) se estimó por el método de las proantocianidinas [11], utilizando butanol/HCl (95:5 v/v) y sulfato ferrico (20 g/l2 M HCl); la absorbancia se midió contra un blanco a 550 nm.

Digestibilidad y producción de gas in vitro

Se utilizaron tres tratamientos (semillas de *A. angustissima*, *E. cyclocarpum* y *G. ulmifolia*) con tres repeti-

ciones (viales). Para evaluar la cinética de fermentación se utilizó la técnica de producción de gas [12], para lo cual se usaron frascos color ámbar de 125 mL de capacidad a los que se les colocó 0,5 g de MS de cada semilla. Posteriormente y bajo un flujo continuo de bióxido de carbono (CO₂), a cada frasco se le agregaron 90 mL de inóculo ruminal diluido (1:10) el cual se obtuvo de dos ovinos de la raza Pelibuey, el líquido ruminal se filtró a través de ocho capas de tela de gasa y se adicionó en una proporción de 1:9 a una solución mineral reducida compuesta de K₂HPO₄ (0,45 g/L), KH₂PO₄ (0,45 g/L), NaCO₃ (0,6 g/L), (NH₄)₂SO₄ (0,45 g/L), NaCl (0,9 g/L), MnSO₄ (0,18 g/L), CaCl₂ (0,12 g/L), L-cisteína (0,25 g/L) y Na₂S (0,25 g/L).

Se incluyeron tres frascos como blancos sin sustrato. Se cerraron herméticamente con un tapón de goma y un aro de aluminio. El exceso de CO₂ de cada frasco se extrajo con el manómetro para igualar la presión a cero y se incubaron en baño maría a 39°C. La presión de gas de fermentación se midió con el manómetro a (0 a 1 kg.cm⁻²) 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 46, 58 y 72 h de incubación.

Los valores de presión (kg.cm⁻²) se transformaron a volumen de gas (mL/g sustrato) con la ecuación de regresión (volumen= presión/0,019). Por un lado, se analizó el volumen fraccional del gas de 0 a 8 h, de 8 a 12 y de 12 a 72 h de incubación. Por otro lado, se obtuvo el volumen acumulado de gas de 0 a 72 h de incubación, y se estimaron los parámetros de la cinética de producción de gas: volumen máximo (Vm; mL/g), tasa (S; h⁻¹) y tiempo de retardo (L; h), para el modelo logístico $V=Vm/1+e^{(2-4S(T-L))}$ [13] y utilizando el paquete estadístico SAS.

Por otro lado, se obtuvo la digestibilidad *in vitro* a 24 h (DIVMS). Al final del período de incubación el residuo de cada frasco se filtró a través de papel de filtrado previamente pesado. Los papeles con residuo se secaron a 65 °C por 48 h y se pesaron. Por diferencia de peso se obtuvo la materia seca (MS) residual para determinar la DIVMS de 24 h de incubación.

Análisis estadísticos

Para el análisis de datos se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos y tres repeticiones. Utilizando el paquete estadístico y la prueba de comparación múltiple de medias Tukey [14]. Además se hizo un análisis de regresión

para conocer las ecuaciones y los coeficientes de determinación (R²) para cada una de las variables.

RESULTADOS

El contenido de taninos para las semilla de *A. angustissima*, *E. cyclocarpum* y *G. ulmifolia* fueron de 2,12, 14,23 y 139 mg/g, respectivamente. El contenido del metabolito secundario puede variar debido a la especie, genotipos dentro de especies, madurez de la planta y factores del medio ambiente [4, 15]. Los estudios de nutrición de rumiantes con árboles y arbustos forrajeros han indicado un contenido óptimo de TAN de 22 mg/g, mientras el rango de 60-100 mg/g de taninos puede afectar el aprovechamiento de los nutrientes de estas especies [16]. En este sentido, se sabe que los animales que consumen plantas con elevados niveles de taninos disminuyen la utilización de nutrientes [17], afectando la dinámica digestiva y fermentativa de los animales [18], incluso provocar intoxicación en rumiantes [19] En contraste, al consumirse en cantidades moderadas los efectos son generalmente positivos al formar complejos proteína-taninos, evitando así la degradación de la proteína en el rumen [20], aumentando la cantidad de aminoácidos esenciales que son absorbidos en abomaso y duodeno, optimizando el uso de los nutrientes por parte de los animales y mejorando los parámetros productivos. No obstante, el aprovechamiento de las proteínas puede variar de acuerdo con la característica de los TAN, al origen de las proteínas, así como el pH del rumen [21]. Por otro lado, el contenido de taninos puede afectar la actividad fermentativa de los microorganismos a nivel ruminal [22]. En este sentido, en el Cuadro 1, se presentan los parámetros de fermentación y digestibilidad *in vitro* de materia

Cuadro 1. Taninos, parámetros de fermentación y digestibilidad *in vitro* de materia seca de semillas.

Sustratos	Taninos (mg/g)	Vm (mL/g MS)	L (h)	S (h ⁻¹)	DIVMS 24 h (%)
<i>G. ulmifolia</i>	2,12 ^a	275,83 ^a	0,80 ^b	0,041 ^a	60,54 ^b
<i>E. cyclocarpum</i>	14,23 ^b	271,8 ^a	0,53 ^b	0,038 ^a	65,62 ^a
<i>A. angustissima</i>	139 ^c	59,81 ^b	5,53 ^a	0,022 ^b	22,31 ^c

Medias en la misma columna con letras distintas difieren estadísticamente (Tukey, P<0,05)

Vm= volumen máximo de producción de gas; L=fase Lag; S= tasa de producción de gas; DIVMS=digestibilidad *in vitro* de la materia seca.

seca de semillas evaluadas. Se observa que existen diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) para las variables V_m , L y S , así como la digestibilidad de las semillas arbóreas a 24 h. Las semillas de *E. cyclocarpum* y *G. ulmifolia* se fermentan más pronta ($L=0,8$ y $0,53$ h, respectivamente) y rápidamente ($S=0,041$ y $0,038$ h⁻¹, respectivamente) que la semilla de *A. angustissima* ($S= 0,022$ h⁻¹; $L= 5,53$ h). Igualmente, su potencial de fermentación dado por el V_m , fue mayor para la semilla de *G. ulmifolia* (275,83 mL/g) y *E. cyclocarpum* (271,8 mL/g) respecto a semilla de *A. angustissima* (59,81 mL/g). Respecto a la DIVMS de las semillas *E. cyclocarpum* y *G. ulmifolia* fueron mayores (60,54 y 65,62%, respetivamente) en comparación con la semilla de *A. angustissima* (22,31%). La DIVMS de las semillas *G. ulmifolia* fue superiores a lo reportado por [23] con 51%, mientras que la DIVMS de *E. cyclocarpum* fue similar a [24] con 62%. La digestibilidad de estas semillas fue superior al 60%, consideradas como una digestibilidad que va de media a alta, por su parte la semilla *A. angustissima* fue considerada de baja digestibilidad [25], por lo que la respuesta nutritiva las semillas de *G. ulmifolia* y *E. cyclocarpum* permite considerarla para evaluaciones *in situ* e *in vivo*. Este comportamiento, posiblemente se deba al contenido de TAN presente en las semillas, ya que inhibe la producción total de gas y de ácidos grasos volátiles (AGV) [26], lo que indica una disminución de la digestibilidad. Lo anterior, es corroborado al correlacionarse negativamente el contenido de taninos con el volumen máximo ($Y=-1,4816x + 277,56$, $R^2=0,81$) y digestibilidad de las semillas forrajeras evaluadas ($Y=-0,2799x + 63,678$ $R^2=0,89$). Lo anterior se refleja en la curva de producción de gas con respecto al tiempo (Figura 1), donde se observa una evidente diferencia ($P < 0,05$) en la cinética de fermentación entre la semilla de *A. angustissima* y las semillas de *E. cyclocarpum* y *G. ulmifolia*. Lo que indica que a mayor concentración de taninos menor digestibilidad y menos producción de gas del material fermentado.

El contenido de TAN posiblemente modificó el volumen fraccional de gas (Figura 2). En esta Figura se presentan las tres fracciones de fermentación: de rápida, media y lenta fermentación (0 a 8, de 8 a 12 y de 12 a 72 h, respectivamente); atribuidas a azúcares y oligosacáridos solubles, polisacáridos de reserva como almidón, dextranas, pectina, y polisacáridos de pared celular (celulosa y hemicelulosa ligadas a lignina), respectivamente [27]. El volumen fraccional de

0-8 h, fue mayor para semillas de *E. cyclocarpum* y *G. ulmifolia* ($P < 0,05$) y menor para la semilla de *A. angustissima*. Una tendencia similar ocurrió en la fracción de media fermentación (8 a 24 h), en la cual la producción de gas fue mayor para las semillas de *E. cyclocarpum* y *G. ulmifolia*, pero menor para la semilla de *A. angustissima*. La fracción de lenta fermentación (24 a 72 h) fue mayor para la semilla de *E. cyclocarpum* ($P < 0,05$), seguida por *G. ulmifolia* y finalmente semilla de *G. ulmifolia*. La oscilación de las fracciones fermentables, se debe a la capacidad de colonización de los microorganismos ruminales, misma que depende de la fracción soluble de las semillas (azúcares y oligosacáridos solubles y polisacáridos de reserva) [28], no obstante, se considera que el contenido de TAN en *A. angustissima* influyó en la colonización de

Figura 1. Cinética de fermentación *in vitro* de las semillas de *A. angustissima*, *E. cyclocarpum* y *G. ulmifolia*.

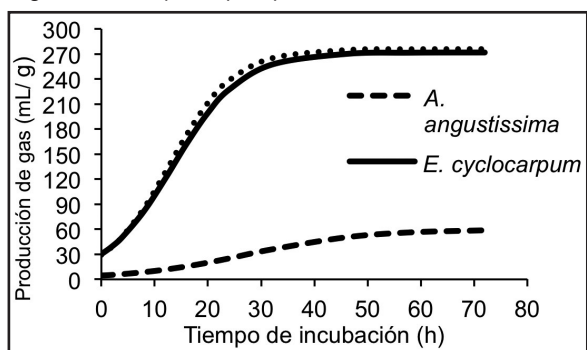
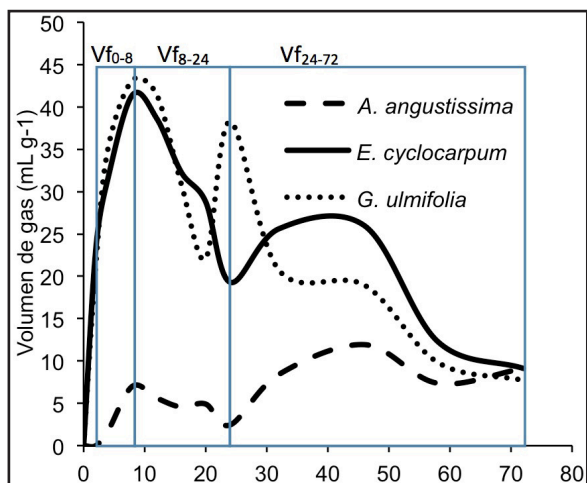


Figura 2. Producción fraccional de gas de fermentación *in vitro* de semilla de *E. cyclocarpum*, *G. ulmifolia* y *A. angustissima*, por bacterias ruminales. Los recuadros indican las fracciones de tiempo de rápida, media y lenta fermentación e indican los periodos de gas fraccional.



los microorganismos, obtenido bajo aprovechamiento de las fracciones de fermentación de la semilla.

Este resultado coincide con lo reportado por otra investigación [16], en la cual se reporta una correlación negativa entre el contenido de taninos y la producción de gas ($R^2 = -0,883$). Lo anterior podría indicar que las plantas altas en taninos impiden el aprovechamiento de nutrientes a nivel ruminal. Esto se comprobó con el volumen fraccional de gas (Figura 2) donde se apreció mayor aprovechamiento de los nutrientes de las semillas de *G. ulmifolia* y *E. cyclocarpum* en cada una de las fracciones (rápida, media y lenta fermentación) en las cuales se obtuvieron mayores volúmenes de gas en comparación con las fracciones de fermentación de la semilla de timbre. Sin embargo, se considera que lo anterior puede ser de importancia nutricional, ya que al evitar una sobre fermentación de la semilla de *A. angustissima* a nivel ruminal se evita también la degradación de las proteínas en rumen, ya que la proteína ligada a taninos resiste el ataque microbiano, lo que aumenta la cantidad de proteína de sobrepaso y aprovechamiento a nivel de intestino delgado, lo que se verá reflejado en mejores parámetros productivos por los animales que la consuman.

Así también, la disminución en la producción de gas y digestibilidad de los nutrientes en el rumen podría disminuir la producción de H_2 y CO_2 precursores de la síntesis de metano [29], lo que sugiere establecer estrategias asociativas entre semillas de árboles y arbustos forrajeros con diferentes concentraciones de taninos y dietas de los rumiantes como una vía para manipular la fermentación microbiana ruminal, que podría tener significación biológica y ambiental al aumentar el aprovechamiento de nutrientes a nivel duodenal pero disminuyendo la producción de gas a nivel ruminal, principalmente de metano [30]. Así mismo, se ha demostrado que incluir semillas o forraje con TAN en las dietas de rumiantes podría mejorar el aprovechamiento de los nutrientes, así como mejorar el consumo de materia seca [31, 32].

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados, se concluye que las semillas *E. cyclocarpum* y *G. ulmifolia* se fermentan más favorablemente en rumen, mostrando mejor potencial y mayor fracciones de fermentación de los azúcares y carbohidratos de reserva, mejorando la

digestibilidad *in vitro*, lo que sugiere su uso en la alimentación de rumiantes, mientras que la cantidad de taninos de *A. angustissima* afectó la cinética de fermentación ruminal y la digestibilidad *in vitro*, sin embargo, se necesitan investigaciones adicionales para evaluar la inclusión de semillas como ingredientes en dietas así como evaluaciones *in situ*.

REFERENCIAS

- [1] PADILLA, C. *et al.* Requerimientos agronómicos de *Moringa oleifera* (Lam.) en sistemas ganaderos. *Livestock Research for Rural Development*, 29 (11), 2017.
- [2] TORRES, J. *et al.* Revalorizando el uso de la selva baja caducifolia para la producción de rumiantes. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 19, 2016, p. 73-80.
- [3] HERNÁNDEZ, J. *et al.* Valor nutricional de seis plantas arbóreo-arbustivas consumidas por cabras en la Mixteca Poblana, México. *Ciencia y Tecnología*, 8(1), 2015, p. 19-23.
- [4] HERNÁNDEZ, J. *et al.* 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), 2018, p.105-120.
- [5] TIRADO, D., TIRADO, G. y MIRANDA, L. Sobre el efecto de enzimas fúngicas en la alimentación de rumiantes. *Interciencia*, 40(11), 2015, p. 758-766.
- [6] SÁNCHEZ, P. *et al.* Potencial de emisión de gases efecto invernadero de plantas forrajeras por fermentación entérica. *Agroproductividad*, 11(2), 2018, p. 40-45.
- [7] CARDONA, J., MAHECHA, L. y ANGULO, J. Arbustivas forrajeras y ácidos grasos: estrategias para disminuir la producción de metano entérico en bovinos. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 2016, p. 273-288.
- [8] ORTIZ, D., POSADA, S. y NOGUERA, R. Potencial antimetanogénico de recursos forrajeros y subproductos agroindustriales a través de la técnica *in vitro* de producción de gas. *Livestock Research for Rural Development*, 28 (5), 2016.
- [9] BUITRAGO, M., OSPINA, L. y NARVÁEZ, W. Sistemas salvopastoriles: Alternativa en la mitigación y adaptación de la producción bovina al cambio climático. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 22(1), 2018, p. 31-42.

- [10] GAVIRA, X., RIVERA, J. and BARAHONA, R. Nutritional quality and fractionation of carbohydrates and protein in the forage components of an intensive silvopastoral system. *Pastos y Forrajes*, 38(2), 2015, p. 194-201.
- [11] MAKKAR, H. Quantification of tannins in tree and shrubs foliage. A Laboratory Manual. Amsterdam (Netherlands): Klumer Academic Publisher, 2003, p. 102.
- [12] MENKE, K. and STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analyses and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28, 1988, p. 7-55.
- [13] SCHOFIELD, P. and PELL, A. A validity of using accumulated gas pressure readings to measure forage digestion *in vitro*: a comparison involving three forages. *Journal of Dairy Science*, 78, 1995, p. 2230-2238
- [14] SAS. SAS User's Guide: Statistics. Ver. 9.2. Cary (USA): SAS Institute, 2004, 5180 p.
- [15] RODRÍGUEZ, R. *et al.* Biological effect of tannins from four tropical tree species on *in vitro* ruminal fermentation indicators. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 50(1), 2016, p. 89-97.
- [16] GURBUZ, Y. Efecto del contenido de taninos condensados de algunas especies leguminosas en la emisión de gas metano. *Revista cubana de Ciencias Agrícolas*, 43(3), 2009, p. 265-272.
- [17] SOSA, G. *et al.* Uso de frutos tropicales (*Fabaceae*) para complemento alimenticio de pequeños rumiantes. *Agroproductividad*, 10(2), 2017, p. 37-41
- [18] MOSCOSO, J. *et al.* Producción de metano en vacunos al pastoreo suplementados con ensilado, concentrado y taninos en el Altiplano Peruano en época seca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(4), 2017, p. 822-833
- [19] LAMY, E. *et al.* The effect oftannins on Mediterranean ruminant ingestive behavior: The role of the oral cavity. *Molecules*, 16, 2011, p. 2766-2784.
- [20] OLMEDO, A. *et al.* Extracto de *Lysiloma acapulcensis* en la digestibilidad y fermentación ruminal de una dieta para ovinos. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(5), 2015, p. 173-182.
- [21] LORENZ, M. *et al.* Relationship between condensed tannin structures and their ability to precipitate feed proteins in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 2014, p. 963-968.
- [22] TORRES, N. *et al.* Producción de gases efecto invernadero *in vitro* de leguminosas arbóreas del trópico seco mexicano. *Archivos de Zootecnia*, 67(257), 2018, p. 55-59.
- [23] GÓMEZ, G. *et al.* Efecto de la inclusión del fruto de *Guazuma ulmifolia* como sustituto del maíz en la dieta sobre el comportamiento productivo y rendimiento en canal de ovinos pelibuey. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17, 2014, p. 215-222.
- [24] MOLINA I. *et al.* Effects of tannins and saponins contained in foliage of *Gliricidia sepium* and pods of *Enterolobium cyclocarpum* on fermentation, methane emissions and rumen microbial population in crossbred heifers. *Animal Feed Science and Technology*, 251, 2019.
- [25] LENG R. Factors affecting the utilization of 'poor-quality' forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutrition research reviews*, 3(01), 1990, p 277-303.
- [26] NAUMANN, H. *et al.* The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(12), 2017, p 929- 949.
- [27] SANDOVAL, L. *et al.* Fermentación *in vitro* y la correlación del contenido nutricional de *Leucaena* asociada con pasto estrella. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 16, 2016, p. 3185-3196.
- [28] ROSERO, R. y POSADA, S. Modelación de la cinética de degradación de alimentos para rumiantes. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20, 2007, p. 174-182.
- [29] VARGAS, J., PABÓN, M. y CARULLA, J. Producción de metano *in vitro* en mezcla de gramíneas-leguminosas del trópico alto colombiano. *Archivos de Zootecnia*, 63(243), 2014, p. 397-407.
- [30] NAUMANN, H. *et al.* Molecular weight and protein-precipitating ability of condensed tannins from warm-season perennial legumes. *Journal of Plant Interactions*, 9, 2014, p.212-219.
- [31] MABEZA, G., MASAMA, E. and MPOFU, I. Evaluation of browse legume diets (*Acacia angustissima*, *Leucaena trichandra* and *Calliandra calothyrsus*) on feed intake and growth of goats. *Universal Journal of Agricultural Research*, 6(1), 2018, p 18-22.
- [32] PIRES, T. *et al.* Characterization and biological activity of condensed tannins from tropical forage legumes. *Pesquisa agropecuaria brasileira*, 53(9), 2018, p.1070-1077.