







Predicción de metano de dos frutos arbóreos por cromatografía de gases y gas *In vitro*

Methane prediction of two tree fruits by *In vitro* gas and gas chromatography

Roselia Ramírez-Díaz¹ ,
 René Pinto-Ruiz^{1*} ,
 Luis Alberto Miranda-Romero² ,
 Manuel Alejandro La O-Arias¹ ,
 David Hernández-Sánchez³ ,
 Deb Raj-Aryal¹ 

¹Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Ciencias Agronómicas. Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Sustentabilidad. CP. 30470. Villaflores, Chiapas, México.

²Universidad Autónoma Chapingo. Posgrado en Producción Animal. Carretera México-Texcoco km 38.5, CP. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

³Colegio de Postgraduados. Programa de Ganadería, Carretera México-Texcoco. Km 36.5, CP. 56230. Montecillo, Texcoco, México.

*Autor de correspondencia:
pinto_ruiz@yahoo.com.mx

Nota científica

Recibida: 26 de enero 2023

Aceptada: 23 de noviembre 2023

Como citar: Ramírez-Díaz R, Pinto-Ruiz R, Miranda-Romero LA, La O-Arias MA, Hernández-Sánchez D, Raj-Aryal D (2023) Predicción de metano de dos frutos arbóreos por cromatografía de gases y gas *In vitro*. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 10(3): e3602. DOI: 10.19136/era.a10n3.3602

RESUMEN. El objetivo fue evaluar modelos predictivos de la producción de metano de los frutos *Leucaena collinsii* y *Guazuma ulmifolia* medido a través de la técnica de producción de gas *in vitro* (TPG) y cromatografía de gases. A los frutos se realizó un análisis químico, parámetros de fermentación *in vitro*, y se estimó metano por cromatografía de gases y por la TPG. Se realizó un análisis de varianza considerando los efectos fijos de la técnica de medición y el tipo de fruto. Se hizo un análisis de correlación y regresión para conocer las ecuaciones y los coeficientes de determinación entre CH₄ por cromatografía de gases y estimación de CH₄ a partir de la TPG. Se encontró una tendencia positiva entre la estimación de metano por cromatografía de gases y por la TPG, por lo que, la TPG es promisorio para la determinación de metano de frutos de *Leucaena collinsii* y *Guazuma ulmifolia*.

Palabras clave: Correlación, regresión, composición química, fermentación, taninos.

ABSTRACT. The objective of the present work was evaluate predictive models for methane production fruits *Leucaena collinsii* and *Guazuma ulmifolia* measured through the *in vitro* gas production technique (TPG) and gas chromatography. The fruits were subjected to a chemical analysis, *in vitro* fermentation using the gas production technique GPT, and methane was measured using gas chromatography and the GPT. A correlation and regression analysis was conducted to determine the equations and the determination coefficients (R²) between CH₄ using gas chromatography and CH₄ estimation from the TPG. A positive trend was found between the estimation of methane by gas chromatography and by the TGP. It is concluded that the *in vitro* gas technique is promising for the determination of methane from *Leucaena collinsii* and *Guazuma ulmifolia* fruits compared to the conventional reference technique, gas chromatography.

Key words: Correlation analysis, regression analysis, chemical composition, rumen fermentation, tannins.

INTRODUCCIÓN

En la ganadería, el metano (CH₄) se emite principalmente por fermentación entérica en los rumiantes y es producido por arqueas metanógenas y asociaciones simbióticas de protozoos durante la fermentación del alimento (Caicedo *et al.* 2023). Para mitigar la emisión de este gas, actualmente, se han evaluado el uso de ionóforos, nitratos, aceites de diferentes semillas u oleaginosas y el uso estratégico de metabolitos secundarios, cuyo objetivo es mejorar al aprovechamiento de los alimentos, así como disminuir la actividad y proliferación de microbiota productoras de metano, sin limitar la función del rumen (Beauchemin *et al.* 2022). Así mismo, diversas investigaciones señalan que el uso de follaje y frutos de especies arbóreas tienen la capacidad de mitigar las emisiones de metano entérico, debido a su calidad nutritiva y alto contenido de metabolitos secundarios (Aragadvay-Yungán *et al.* 2022). Se ha reportado que el contenido de metabolitos secundarios en follaje y frutos de *Leucaena collinsii* y *G. ulmifolia* tienen la capacidad de mitigar las emisiones de metano entérico (Alatorre-Hernández *et al.* 2018) lo cual puede ayudar a establecer estrategias de su uso en la alimentación de rumiantes. Por otro lado, estas emisiones se han cuantificado por diversas técnicas, entre las que destacan el uso de cámaras respiratorias, la técnica del gas trazador hexafluoruro de azufre (SF₆), espectroscopía infrarroja (Bekele *et al.* 2022), no obstante, se ha señalado que una de las técnicas más exactas para medir emisiones de GEI *in vitro* es por cromatografía de gases (Ribessi *et al.* 2020), sin embargo, el uso de esta técnica es limitada, principalmente por los altos costos de implementación. Por su parte, la Técnica de Producción de Gas *in vitro* (TPG), es una técnica económica que se ha utilizado ampliamente para evaluar el efecto de diferentes forrajes, dietas y aditivos en la fermentación ruminal, y degradación de la materia seca y, recientemente, también se ha utilizado para estimar la emisión de GEI (Pereyra *et al.* 2022). Por lo anterior, es de mucha utilidad realizar trabajos que evalúen la existencia de una relación entre la TPG y cromatografía de gases al estimar la emisión de

metano. Uno de los pocos trabajos realizados al respecto es el presentado por Fievez *et al.* (2005), en el cual predijeron la producción de ácidos grasos de cadena corta y metano (energía perdida) en dietas compuestas, considerando la inclusión de frutos arbóreos (33.7%) y paja de trigo (66.3%), sin embargo, esta relación no se ha evaluado con el uso de frutos arbóreos por si solos. Por ello, el objetivo del siguiente trabajo fue evaluar modelos predictivos de la producción potencial de gas metano medido a través de la técnica de producción de gas *in vitro* y cromatografía de gases.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características del área en donde se llevaron a cabo los estudios

La producción de gas *in vitro* y análisis químicos de las muestras se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal perteneciente a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad Autónoma de Chiapas, localizada en el municipio de Villaflores, Chiapas, México. Por otro lado, el contenido de metano se determinó en el laboratorio de Cromatografía de gases del Colegio de la Frontera Sur, unidad San Cristóbal de las Casas, Chiapas.

Selección y obtención de los frutos evaluados

Los frutos de *Leucaena collinsii* y *Guazuma ulmifolia*, se encuentran de manera abundante en la región de estudio, y fueron cosechados una vez que estaban fisiológicamente maduros, de manera manual y al azar en distintos árboles. Posteriormente, se depositaron en bolsas de papel con la identificación respectiva y se trasladaron al laboratorio de Nutrición Animal, en donde se determinó el contenido MS, una estufa de aire forzado a 55 °C por 48 h (peso constante) (AOAC 2000).

Producción de gas *in vitro*

La fermentación se realizó con la técnica de producción de gas *in vitro* (Menke y Steingass 1988). Para ello, se colocó 0.5 g de cada uno de los frutos arbóreos evaluados en viales de vidrio color ámbar de 125 mL de capacidad. Posteriormente, y bajo flujo

continuo de bióxido de carbono (CO₂) se adicionó 90 mL de inóculo ruminal diluido (1:10), el cual, se obtuvo de tres ovinos cánulados de la raza Katahdin. El inóculo ruminal fue filtrado a través de ocho capas de tela de gasa y se adicionó en una proporción de 1:10 a una solución mineral reducida, compuesta de KH₂PO₄ (0.45 g L⁻¹), NaCO₃ (0.6 g L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (0.45 g L⁻¹), NaCl (0.9 g L⁻¹), MnSO₄ (0.18 g L⁻¹), CaCl₂ (0.12 g L⁻¹), L-cisteína (0.25 g L⁻¹) y Na₂S (0.25 g L⁻¹) (Meyer, Ciudad de México, México). Se incluyeron seis frascos como blancos (sin sustrato). Con el uso del manómetro se extrajo el exceso de CO₂ para igualar la presión a cero, y se colocaron en baño maría a 39 °C (Prendo[®], BM; Ciudad de México, México).

Se realizaron tres series de incubación de manera simultánea, cada serie comprendía tres repeticiones (viales) por cada fruto y fue repetida tres veces a través del tiempo, según recomienda Udén *et al.* (2012).

Determinación de la producción de metano

En técnicas de sistema cerrado, como la TPG, la producción de gas en las primeras 24 h son más representativas de lo que sucede en el animal. Por ello, para conocer la producción de metano por la Técnica de producción de gas *in vitro* y por cromatografía de gases, se midió el gas de fermentación (mL g⁻¹) cada 6 h durante las primeras 24 h con la primera y segunda serie de incubación.

Para estimar CH₄ por la técnica de producción de gas *in vitro* (TPG), se estimó el metano más gases menores (CH₄+GM). Para ello, al gas de fermentación se le realizó la separación del CO₂ por medio de una trampa (frasco de vidrio herméticamente sellado con tapón de hule y aro de aluminio) que contenía 40 mL de hidróxido de potasio (KOH) a una concentración de uno molar y una dilución de 56.10 g de KOH en un litro de agua destilada (Bartha y Pramer 1965). El volumen residual fue considerado como mL de CH₄+GM y fueron ajustados como metano teórico (CH₄) multiplicando cada valor por 0.77 (Zhong *et al.* 2016).

Por otro lado, para estimar CH₄ por cromatografía de gases, el gas de fermentación que

se obtuvo de la fermentación de los frutos cada 6 h por 24 h, se colocó al vacío en viales estériles que contenían una solución salina saturada con NaCl, en los que se conservó y traslado para su posterior análisis. Para cuantificar la producción de CH₄ se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent Modelo 7890 B GC, Wilmington, EE. UU), con inyección manual que posee un detector de ionización por llama (FID, flame ionization detector), Software Versión 01.07SR², diámetro de columna 2 mm y 1.83 m de largo, con una temperatura de inyección de 75 °C. Se inyectaron 3 mL de gas de fermentación de cada una de las 12 muestras analizadas. En ambos métodos de estimación de metano, las concentraciones de este gas se corrigieron restando la producción de metano promedio de tres blancos. La producción de CH₄ se expresó en mL de CH₄ g⁻¹ de MS.

Análisis químico de los frutos arbóreos tropicales

Se midió el contenido de materia seca (MS) de los frutos arbóreos según la NOM-116-SSA1-1994, posteriormente fueron molidos en un molino tipo Wiley con malla de 1 mm (modelo 3; Arthur H. Thomas, Filadelfia, PA). Se determinó el contenido de proteína cruda (PC), de materia orgánica (MO) y cenizas (Ce) siguiendo la metodología descrita por la AOAC (2000). También se analizaron los valores de Fibra Detergente Neutro (FDN) y Fibra Detergente Acido (FDA) (Van-Soest *et al.* 1991) y la presencia de Fenoles Totales (FT) y Taninos Condensados (TC) (Makkar 2003).

Parámetros y fracciones de fermentación *in vitro*

Para explicar el comportamiento en la producción de metano derivado de la técnica *in vitro*, se evaluaron los parámetros de fermentación *in vitro* con las muestras de la tercera serie de incubación. Para conocer los parámetros de fermentación, la presión de gas se midió con un manómetro (Infra; modelo 63100/1-4; Ciudad de México, México; 0 a 1 kg⁻¹ cm²) a 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 34, 40, 48, 54, 60 y 72 h de incubación. Los valores de presión (kg⁻¹ cm²) se transformaron a volumen de gas (mL g⁻¹ de sustrato) con la ecuación de regresión (volumen = presión/0.019 con R² = 0.98) y

se estimaron los parámetros de la cinética de producción de gas: volumen máximo ($V_{\text{máx}}$; mL g^{-1}), tasa (S ; h) y fase lag (L ; h), para el modelo logístico $V = V_{\text{mx}}/1 + e^{(2-4*S*(T-L))}$ (Schofield y Pell, 1995), utilizando el paquete estadístico SAS. Las fracciones de fermentación se obtuvieron mediante el volumen fraccional (V_f) de gas de fermentación producido a tres intervalos de tiempo: 0 h a 8 h ($V_{f_{0-8}}$), 8 h a 24 h ($V_{f_{8-24}}$) y 24 h a 72 h ($V_{f_{24-72}}$) de incubación, estos volúmenes fraccionales (mL g^{-1}) fueron transformados a fracciones (g kg^{-1}) de rápida (FR), media (FM) y lenta (FL) fermentación mediante las siguientes ecuaciones de regresión FR (g kg^{-1}) = $V_{f_{0-8}}/0.4266$ ($R^2 = 0.9441$), FM (g kg^{-1}) = $V_{f_{8-24}}/0.6152$ ($R^2 = 0.998$), FL (g kg^{-1}) = $V_{f_{24-72}}/0.3453$ ($R^2 = 0.9653$).

Análisis estadístico

Se hizo un análisis de correlación y regresión para conocer las ecuaciones y los coeficientes de determinación (R^2) entre CH_4 por cromatografía de gases y estimación de CH_4 a partir de la captura de CO_2 por Hidróxido de Potasio (KOH) en la Técnica de Producción de gas *in vitro*. El modelo de regresión se consideró como la ecuación de ajuste. Para la composición química de los frutos se utilizó un análisis de varianza para un modelo lineal. El análisis se ejecutó utilizando Proc GLM del paquete Statistical Analysis System (SAS 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se reportan valores de CH_4 , se observa que hubo interacción entre la Técnica de medición y el tipo de fruto ($P < 0.004$), y en general, el fruto de *L. collinsii* mostró valores más altos de CH_4 que la *G. ulmifolia* (7.03 vs 2.12 mL g^{-1} MS; $P < 0.0001$) y la TPG mostró valores subestimados de CH_4 con respecto a la de cromatografía (4.15 vs 4.99 mL g^{-1} MS, respectivamente) ($P < 0.0001$). De acuerdo a estos resultados, ambas técnicas de medición de CH_4 entérico presentaron tendencias similares en la estimación de metano en los frutos arbóreos evaluados. Por otro lado, en la Tabla 2, se muestra el modelo de regresión simple entre las técnicas de cromatografía de gases y TPG *in vitro*. El

modelo CH_4 (Cro) = $1.25+0.9\text{CH}_4$ (TPG)+ E_{ij} permite obtener las estimaciones de CH_4 obtenidas por la técnica de cromatografía a través de la TPG ($R^2 = 0.99$; $P < 0.0001$), lo que evidencia la factibilidad de usar la TPG *in vitro* para estimar metano entérico. En este sentido, se ha señalado que, por medio de esta técnica se puede determinar el efecto de las dietas sobre la emisión potencial de GEI (Miranda-Romero *et al.* 2018). Por otro lado, algunas investigaciones señalan que utilizando la TPG *in vitro* se puede obtener un indicador de calentamiento global a partir de la producción de CO_2 y CH_4 , concluyendo que la técnica *in vitro* es útil para estimar el impacto ambiental por la fermentación de los alimentos para rumiantes (Jiménez-Santiago *et al.* 2019, Martínez-Hernández *et al.* 2019). Así también, esta técnica se ha empleado para estimar la emisión de metano en subproductos pecuarios como la cerdaza (Pérez *et al.* 2018) y recientemente para conocer la emisión de GEI de dos dietas para engorda de bovinos (Pereyra *et al.* 2022).

Por otro lado, el error esperado con la TPG *in vitro*, con respecto a cromatografía de gases es de 0.0433 mL de CH_4 . La dispersión de los datos demuestra que ambas técnicas tuvieron un alto nivel de concordancia. Por lo que, a partir de la técnica de gas *in vitro* se podría pronosticar la emisión de metano en los frutos arbóreos evaluados (Figura 1). Sin embargo, es necesario continuar trabajando en la normalización de la técnica alternativa, para mejorar la precisión en la estimación de metano por la TPG *in vitro*, para ello, es necesario aumentar el número de repeticiones, lo que permitirá conseguir un buen estimador de los coeficientes de regresión. Lo que concuerda con otra investigación (Ribessi *et al.* 2020), en la que correlacionaron la emisión de CH_4 de una dieta con 14.2% de PC por cromatografía de gases y por espectroscopia de absorción infrarroja y encontraron un $R^2 = 0.99$, y concluyen que el número de repeticiones es fundamental para mejorar los coeficientes de correlación y regresión entre ambas técnicas.

Por otra parte, se conoce que el potencial para mitigar la emisión de metano entérico en frutos arbóreos depende de su composición química. En este sentido, el fruto de *L. collinsii* presentó mayor con-

Tabla 1. Estimación de metano (mL^{-1}g de sustrato) por cromatografía de gases y la técnica de producción de gas *in vitro* de frutos arbóreos del trópico seco.

	Metano		R^2	CV (%)	p de F			DSM 0.05 =
	TPG	Cro			Téc	TF	Téc*TF	
Lc	6.73	7.32	0.9979	2.45	<0.0001	<0.0001	0.004	0.17
Gu	1.56	2.66						
DMS	0,05 = 0.17	0.17						

Lc: *Leucaena collinsii*; Gu: *Guazuma ulmifolia*; TPG: técnica de producción de gas *in vitro*; Cro: cromatógrafo de gases; CV: coeficiente de variación; Téc: técnica de medición; TF: tipo de fruto; DSM: diferencia mínima significativa; p de F: probabilidad de Fisher.

Tabla 2. Modelo de regresión simple entre las técnicas de estimación de metano por cromatografía de gases y la técnica de producción de gas *in vitro*.

Y	β_0	$\beta_1 X_1$	$\beta_2 X_2$	$\beta_3 X_3$	R^2	p de F
CH_4	1.25	0.9 TPG			0.99	<0.0001

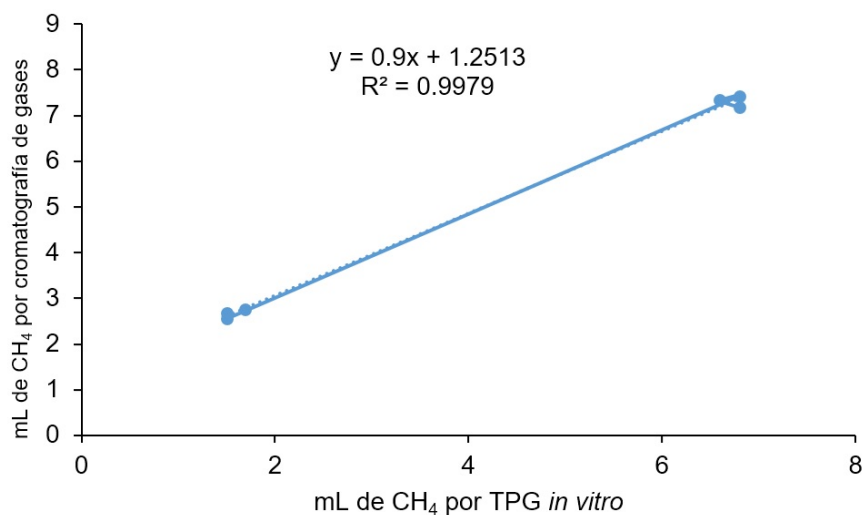


Figura 1. Correlación entre metano estimado por cromatografía de gases y la técnica de gas *in vitro* de frutos arbóreos del trópico seco.

centración de PC y menor en *G. ulmifolia*, con 19.14 y 8.35%, respectivamente ($P < 0.0001$; Tabla 3). El contenido de MS y FDN fueron similares entre los frutos evaluados ($P > 0.15$). Respecto al contenido de metabolitos secundarios, la concentración de FT y TC fue mayor para los frutos de *L. collinsii* ($P < 0.007$), pero tuvo menor cantidad de MO y FDA ($P < 0.05$). La concentración de TC reportada en la investigación, coincide con los rangos reportados en otras investigaciones, en las que se indica que el contenido de TC en frutos arbóreos puede variar de 0.21 a 3.63% (Pinto-Trinidad *et al.* 2019, Rojas-Hernández *et al.* 2015), dependiendo del tipo de especie, condiciones climáticas, sitio de muestreo y etapa vegetativa de

las plantas (Augustine *et al.* 2018). En este sentido, se ha documentado que TC con la misma concentración, pero de diferentes plantas pueden mostrar variaciones en la producción de CH_4 (Gemedá *et al.* 2015). Estas variaciones son atribuidas principalmente al peso molecular y composición química de los TC (Huyen *et al.* 2016). Al respecto, se ha reportado el efecto del peso molecular de los TC de cáscara de *Garcinia mangostana* L y *L. leucocephala* sobre la producción de CH_4 , mismas que contenían TC con un peso molecular de 0.154 y 0.310 Da, respectivamente, encontrando menor emisión de metano en *L. leucocephala*, concluyendo que a mayor peso molecular menor emisión del gas (Paengkoum *et al.*

2015). Así también, se ha señalado que el impacto de los TC sobre la emisión de CH₄, dependerá de la estabilidad química y vida útil del TC a nivel ruminal (Naumann *et al.* 2018). Por lo que, es necesario comprender que la actividad biológica de los TC y, por lo tanto, su efecto en la mitigación de metano, dependerá principalmente de su composición química. Por su parte, Cardoso-Gutiérrez *et al.* (2021) mencionan que las plantas con TC reducen la emisión de metano entérico debido a que inhiben la actividad de enzimas microbianas, disminuyen las poblaciones de protozoos y bacterias celulolíticas y forman enlaces con proteínas del forraje, reduciendo la degradación de la proteína ruminal.

Tabla 3. Composición química de frutos arbóreos del trópico seco (%).

	<i>L. collinsii</i>	<i>G. ulmifolia</i>	CV (%)	P de F
MS	96.07 ± 0.3	94.8 ± 1.2	0.91	0.15
PC	19.14 ± 0.6	8.35 ± 0.3	3.47	<0.0001
MO	93.25 ± 0.1	94.3 ± 0.6	0.49	0.05
Ce	6.74 ± 0.1	5.67 ± 0.6	7.38	0.05
FDN	52.32 ± 0.6	51.82 ± 3.4	0.01	0.82
FDA	37.64 ± 1.1	44.54 ± 1.2	2.9	0.002
FT	1.3 ± 0.2	0.73 ± 0.13	13.75	0.007
TC	36 ± 0.1	0.23 ± 0.04	4.8	<0.0001

±; Desviación estándar. MS: Materia seca; PC: proteína cruda; MO: materia orgánica; Ce: cenizas; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido; FT: fenoles totales; TC: taninos condensados.

Por otro lado, la composición química también influye sobre el aprovechamiento a nivel ruminal de los sustratos y, por lo tanto, sobre la emisión de GEI. En la Tabla 4, se presentan los parámetros de la cinética y fracciones de fermentación de los frutos arbóreos. Se observa que el fruto de *L. collinsii* tuvo mayor Vm (169.17 mL g⁻¹), posiblemente por el mayor contenido de PC (Tabla 3) y por el gas producción por las fracciones de FM y FL (P < 0.0001), así mismo la producción de gas derivada de la FR tendió a ser mejor en *L. collinsii* que en *G. ulmifolia*

(P < 0.07). No se observaron diferencias estadísticas para la S (P > 0.037), sin embargo, los frutos de *G. ulmifolia* se fermentaron más prontamente (L = 1.966 h), pero con bajo potencial de fermentación (Vm = 42.53 mL g⁻¹). Esto pudo deberse las características químicas de los FT y TC, lo que redujo el Vm, pero permitió disminuir la emisión de metano (Tabla 1).

Tabla 4. Parámetros de la cinética y fracciones de fermentación *in vitro* de frutos arbóreos tropicales del trópico seco.

	<i>L. collinsii</i>	<i>G. ulmifolia</i>	CV (%)	P de F
L (h)	967 ± 1.6	1.966 ± 1.8	29.8	0.006
S (h ⁻¹)	0.0216 ± 0.001	0.0241 ± 0.0009	18.8	0.37
Vm (mL g ⁻¹ de MS)	169.17 ± 2.7	42.53 ± 5.1	3.85	<0.0001
FR (g kg ⁻¹)	38.55 ± 8.4	22.04 ± 8.04	27.3	0.07
FM (g kg ⁻¹)	66.22 ± 3.5	20.66 ± 2.4	6.9	<0.0001
FL (g kg ⁻¹)	303.29 ± 1.8	57.00 ± 14.1	5.6	<0.0001
FT (g kg ⁻¹)	408.06 ± 11	99.70 ± 8.4	3.9	<0.0001

±; Desviación estándar; L: fase Lag; S: tasa de producción de gas; Vm: volumen máximo de producción de gas; FR: fermentación rápida; FM: fermentación media; FL: fermentación lenta; FT: fermentación total.

Aunque la composición química y la fermentación *in vitro* de la *Leucaena collinsii* fueron mejores a los de la *Guazuma ulmifolia*, estos no necesariamente se relacionan con menores emisiones de metano. La TPG tiende a subestimar los valores de metano con respecto a la cromatografía, sus valores pueden ser ajustados a través de modelos de regresión lineal simple válidos e independientemente del tipo de técnica de estimación de gas metano.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación de Chiapas por el apoyo otorgado en 2022 para llevar a cabo una estancia posdoctoral de la cual se derivó este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Alatorre-Hernández A, Guerrero-Rodríguez JD, Olvera-Hernández JI, Aceves-Ruiz E, Vaquera-Huerta H, Vargas-López S (2018) Productividad, características fisicoquímicas y digestibilidad *in vitro* de leguminosas forrajeras en trópico seco de México. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias 9: 296-315.
- AOAC (2000) Methods Committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. The 17th edition. Washington, USA.

- Aragadvay-Yungán RG, Barros-Rodríguez M, Ortiz L, Carro MD, Navarro Marcos C, Elghandour, MMY, Salem AZM (2022) Mitigation of ruminal methane production with enhancing the fermentation by supplementation of different tropical forage legumes. *Environmental Science and Pollution Research* 29: 3438-3445.
- Augustine C, Khobe D, Madugu AJ, Obidah LU, Solomsi, AA, Tarimbuka LI (2018) Chemical Composition of *Gmelina arborea* Fruits and Leaves and Their Adoption as Livestock Feed Resources in Mubi Area. *International Journal of Current Advanced Research* 1: 5-11.
- Bartha R, Pramer D (1965) Features of flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Science* 100: 68-70.
- Beauchemin KA, Ungerfeld EM, Abdalla AL, Alvarez C, Arndt C, Becquet P, Berndt A, Mauricio RM, McAllister TA, Oyhançabal W, Salami SA, Shalloo L, Sun Y, Tricarico J, Uwizeye A, De Camillis C, Bernoux M, Robinson T, Kebreab E (2022) Invited review: Current enteric methane mitigation options. *Journal of Dairy Science* 105: 9297-9326.
- Bekele W, Guinguina A, Zegeye A, Simachew A, Ramin M (2022) Contemporary methods of measuring and estimating methane emission from ruminants. *Methane* 1: 82-95.
- Caicedo YC, Garrido-Galindo AP, Fuentes IM, Vásquez EV (2023) Association of the chemical composition and nutritional value of forage resources in Colombia with methane emissions by enteric fermentation. *Tropical Animal Health and Production* 55(2): 84. DOI: 10.1007/s11250-023-03458-x.
- Cardoso-Gutiérrez E, Aranda-Aguirre E, Robles-Jiménez LE, Castelán-Ortega OA, Chay-Canul AJ, Foggi G, Angeles-Hernandez JC, Vargas-Bello-Pérez E, González-Ronquillo M (2021) Effect of tannins from tropical plants on methane production from ruminants: A systematic review. *Veterinary and Animal Science* 14: 100214. DOI: 10.1016/j.vas.2021.100214.
- Fievez V, Babayemi OJ, Demeyer D (2005) Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. *Animal Feed Science and Technology* 123-124: 197-210.
- Gemeda BS, Hassen A (2015) Effect of tannin and species variation on *in vitro* digestibility, gas, and methane production of tropical browse plants. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 28: 188-199.
- Huyen NT, Fryganas C, Uittenbogaard G, Mueller-Harvey I, Verstegen MWA, Hendriks WH (2016) Structural features of condensed tannins affect *in vitro* ruminal methane production and fermentation characteristics. *The Journal of Agricultural Science* 154: 1474-1487.
- Jiménez-Santiago A, Jiménez-Ferrer G, Alayón-Gamboa A, Pérez-Luna EJ, Piñero-Vázquez AT, Albores-Moreno S, Pérez-Escobar MG, Castro-Chan R (2019) Fermentación ruminal y producción de metano usando la técnica de gas *in vitro* en forrajes de un sistema silvopastoril de ovinos de Chiapas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 10: 298 -314.
- Makkar HPS (2003) Quantification of tannins in tree and shrubs foliage. *A Laboratory Manual*. Klumer Academic Publisher. Netherlands. 102p.
- Martínez-Hernández BE, Salvador-Flores O, Miranda-Romero LA (2019) Indicador de calentamiento global a partir de la fermentación ruminal de alimentos con diferentes niveles de energía y proteína. *Pastos y forrajes* 42: 285-289.
- 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: 7-55.

- Miranda-Romero LA, Vazquez-Mendoza P, Burgueño-Ferreira JA, Aranda-Osorio G (2018) Nutritive value of cactus pear silages for finishing lambs. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 20: 196-215.
- Naumann HD, Sepela R, Rezaire A, Masih SE, Zeller WE, Reinhardt L (2018) Relationships between structures of condensed tannins from texas legumes and methane production during *in vitro* rumen digestion. *Molecules* 23: 2123-2139.
- Paengkoum P, Phonmun T, Liang JB, Huang XD, Tan HY, Jahromi MF (2015) Molecular weight, protein binding affinity and methane mitigation of condensed tannins from mangosteen-peel (*Garcinia mangostana* L). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 28: 1442-1448.
- Pereyra C, Pinto R, Ramírez, Hernández D, Guevara F, Venegas J (2022) Estimación *in vitro* de metano y dióxido de carbono en dietas para engorda de bovinos. *Archivos de zootecnia* 71: 216-222.
- Pérez AA, Pinto R, Ley A, Ramírez R, Molina L, Guevara F, Venegas J (2018) Estimación de la producción de metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) de la cerdaza. *Avances en Investigación Agropecuaria* 22: 35-45.
- Pinto-Trinidad LR, Ramírez-Díaz R, Sandoval-González LM (2019) Efecto del uso de semillas arbóreas forrajeras sobre la actividad fermentativa de los microorganismos ruminales. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 17: 46-5.
- Ribessi RL, Vanlierde A, Rodrigues JJ, Baeten V (2020) Infrared Spectroscopy and Multivariate Method to Quantify Methane in Gas Sample Emitted by Cows. *Vibrational Spectroscopy*, <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103059>. Fecha de consulta: 22 de septiembre de 2022.
- Rojas-Hernández S, Olivares-Pérez J, Avilés-Nova F, Villa-Mancera A, Reynoso-Palomar A, Camacho-Díaz LM (2015) Productive response of lambs fed *Crescentia alata* and *Guazuma ulmifolia* fruits in a tropical region of Mexico. *Tropical Animal Health and Production* 47: 1431-1436.
- SAS (2003) SAS/STAT Software. Versión 9. Statistical Analysis Software. Cary, NC SAS, USA: Institute INC.
- Schofield P, Pell AN (1995) Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *Journal of Animal Science* 73: 3455-3463.
- Udén P, Robinson P, Mateos G, Blank R (2012) Use of replicates in statistical analyses in papers submitted for publication in *Animal Feed Science and Technology*. *Animal Feed Science and Technology* 171(1): 1-5. DOI: 10.1016/j.anifeeds.2011.10.008.
- Van-Soest P, Robertson J, Lewis B (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.
- Zhong RZ, Fang Y, Sun HX, Wang M, Zhou DW (2016) Rumen methane output and fermentation characteristics of gramineous forage and leguminous forage at differing harvest dates determined using an *in vitro* gas production technique. *Journal of Integrative Agriculture* 15: 414-423.