Revista Mexicana de Agroecosistemas
Vol. 6 (Suplemento 2), 2019 16-18 de octubre ISSN:2007-9559
Memoria de artículos en extenso y resúmenes
"XLVI Reunión Científica de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria, A. C."

CALIDAD FERMENTATIVA Y DIGESTIBILIDAD *in vitro* DE ACCESIONES DE LEUCAENA DE DISTINTAS PROCEDENCIAS AGROCLIMÁTICAS DE MÉXICO

[FERMENTATIVE QUALITY AND *in vitro* DIGESTIBILITY OF LEUCAENA ACCESSIONS FROM DIFFERENT AGROCLIMATIC PROVENANCES IN MEXICO]

Claudio Vite-Cristóbal[1,2§], Pedro Arturo Martínez-Hernández[1], Enrique Cortés-Díaz[1], Ponciano Pérez-Hernández[3], José Manuel Palma-García[4], Luis Alberto Miranda-Romero[1]

[1]Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, C. P. 56230, Texcoco, Estado de México, México. [2]Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca. Desv. Lindero-Tametate S/N, Col. La Morita, C. P. 92100, Tantoyuca, Veracruz, México. [3]Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, Km. 88.5 Carretera Federal Xalapa-Veracruz, Predio Tepetates, C. P. 91690, Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, México. [4]Colegio Mexicano de Agroforestería Pecuaria A. C., Centro Universitario de Investigación y Desarrollo Agropecuario, Universidad de Colima, C. P. 28040, Colima, Colima, México. [§]Autor para correspondencia: (cvitec81@hotmail.com).

RESUMEN

Con el objetivo de caracterizar la cinética de fermentación *in vitro* de follaje de accesiones de Leucaena de distintos sitios y procedencias agroclimáticas de México, se realizó un experimento *in vitro* de producción de gas en el que se incluyeron dos sitios de plantación: Morelos y Veracruz, y cinco procedencias de la semilla: Colima, Cunningham, Morelos, Nuevo León y Veracruz. El forraje se recolectó a los seis meses de rebrote en ambos sitios de plantación. La producción máxima de gas varió en un rango de 159 (procedencia Veracruz) a 185 mL g^{-1} sustrato (procedencia Cunningham). El menor tiempo de establecimiento o colonización microbiana (4.6 h) se observó en el sitio Morelos, el cual fue diferente al de Veracruz ($p < 0.05$). Las desapariciones de MS y MO a las 72 h variaron de 45.8 a 54.9 % y de 67.7 a 76.9 %, respectivamente, siendo ambas variables menor y mayor en la procedencia Nuevo León que en el resto de las procedencias ($p < 0.05$). El valor mayor de la tasa de producción de gas (mL) por cada gramo de MS se observó sólo para la procedencia de Morelos ($p < 0.05$). La fracción fermentable rápida fue mayor para la procedencia Morelos, en tanto la procedencia Nuevo León mostró mayor fracción fermentable media y lenta. Se concluye que las accesiones de Leucaenas establecidas en Veracruz se asoció a disminuciones en la producción de fracciones fermentables rápidas, aunque con mayor tiempo de fase Lag, contrario a lo observado para la procedencia Morelos que mostró además alta tasa de producción de gas y degradación de la MS, características que pueden asociarse a mayor eficiencia en los procesos de fermentación.

Palabras clave: *Leucaena leucocephala*, regresión logística.

ABSTRACT

In order to characterize the *in vitro* fermentation kinetics of foliage of Leucaena accessions from different sites and agroclimatic provenances of Mexico, an *in vitro* gas production experiment was carried out in which two plantation sites were included: Morelos and Veracruz, and five

provenances of the seed: Colima, Cunningham, Morelos, Nuevo León and Veracruz. The forage was collected after six months of regrowth at both planting sites. Maximum gas production ranged from 159 (Veracruz provenance) to 185 mL g^{-1} substrate (Cunningham provenance). The shortest time of establishment or microbial colonization (4.6 h) was observed in the Morelos site, which was different from Veracruz (p <0.05). Disappearances of MS and MO at 72 h ranged from 45.8 to 54.9% and from 67.7 to 76.9%, respectively, both minor and major variables being of Nuevo Leon origin than in the rest of the provenances (p <0.05). The highest value of the gas production rate (mL) for each gram of MS was observed only for the Morelos provenance (p <0.05). The fast fermentable fraction was greater for the Morelos provenance, while the Nuevo León provenance showed a higher average and slow fermentable fraction. It is concluded that the accessions of Leucaenas established in Veracruz was associated with decreases in the production of fast fermentable fractions, although with longer Lag phase, contrary to what was observed for the Morelos provenance, which also showed a high rate of gas production and degradation of MS, characteristics that can be associated with greater efficiency in fermentation processes.

Index words: *Leucaena leucocephala*, logistic regression.

INTRODUCCIÓN

Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit (Leucaena) es una especie leñosa nativa del trópico mexicano proveedora de forraje en cantidad y calidad al animal en sistemas silvopastoriles (SSP) (Navas, 2010; Estrada *et al*., 2018). Esta calidad basada en contenidos elevados de proteína bruta (>24.9%) y energía (>4.2 Mcal EB kg MS^{-1}) y bajos en fibras (<44% FDN y <27% FDA), capaz de asegurar que el bovino en pastoreo en SSP ingiera una dieta con menor cantidad de carbohidratos estructurales pero suficiente proteína y fibra para mantener la funcionalidad del rumen (Minson, 1990; Sierra-Montoya *et al*., 2017; Martínez-Hernández *et al*., 2019).

Sin embargo, a pesar del contenido elevado de proteína, la Leucaena por su contenido elevado de fibra, se clasifica como un forraje voluminoso que podría limitar la productividad animal si no es degradada eficientemente en el rumen (Gaviria *et al*., 2015). Por tanto, resulta importante estudiar la dinámica fermentativa de la Leucaena, para determinar los patrones de fermentación de nitrógeno y energía en el rumen, con el fin de conocer si se encuentran en equilibrio o si es necesario sugerir ajustes o adiciones a la dieta de los animales que pastorean en SSP.

Además, ante la disponibilidad de Leucaena como recurso autóctono en el trópico mexicano (Palma, 2006; Cortez *et al*., 2016) y para fomentar el aprovechamiento del follaje de la misma en la ganadería se propone estudiar la calidad fermentativa en comparación con variedades mejoradas. El objetivo del presente estudio fue caracterizar la cinética de fermentación *in vitro* de follaje de accesiones de *L. leucocephala*, recolectadas y establecidas en distintas procedencias agroclimáticas de México.

Revista Mexicana de Agroecosistemas
Vol. 6 (Suplemento 2), 2019 16-18 de octubre ISSN:2007-9559
Memoria de artículos en extenso y resúmenes
"XLVI Reunión Científica de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria, A. C."

MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos de campo para el desarrollo de los modelos provinieron de dos sitios en los que se contó con parcelas experimentales plantadas con Leucaenas de diferente procedencia (Colima, Cunningham, Morelos, Nuevo León y Veracruz). Uno de los sitios fue Tepalcingo, Morelos y el otro Tantoyuca, Veracruz. Tepalcingo se localiza a 18°31'18.5"LN y 98°56'25.2"LO y 1,179 msnm, y tiene clima semicálido subhúmedo con lluvias en verano, precipitación anual de 879 mm y temperatura media de 21.8 °C (García, 2005). Tantoyuca se localiza a 21°19'56.3"LN y 98°13'22.3"LO y 136 msnm, y tiene clima cálido subhúmedo con lluvias en verano, precipitación anual de 1,228 mm y temperatura media de 23.9 °C (García, 2005). El tipo de suelo en ambos ambientes de crecimiento fue vertisol, de acuerdo con la clasificación del sistema FAO/UNESCO 2010 obtenido del continuo nacional a escala 1: 1,000,000 del INEGI.

El sitio de Tepalcingo se conformó con 11 accesiones y el de Tantoyuca con 14. Para ambos sitios todas las Leucaenas plantadas fueron originalmente crecidas en vivero en la Universidad Autónoma Chapingo y trasplantadas entre cuatro y seis meses de crecimiento. Las distancias entre hileras y plantas fueron 3 y 2 m, de forma que cada accesión tuvo una parcela con 16 plantas. Cada parcela experimental fue establecida en condiciones de temporal, sin fertilización y en un diseño de bloques al azar con dos y tres repeticiones.

Para el inicio de la toma de datos en ambos sitios se dio previamente un corte de homogeneización que consistió en podar a las plantas a 50 cm de altura a partir de la base del suelo, entre los tres y seis meses después del trasplante. Las diferencias en tiempos de establecimiento fueron compensadas con la siembra de plantas de mayor tamaño, corte de homogeneización tres meses más tarde y mayor disponibilidad de agua durante el establecimiento en Veracruz.

El follaje en estudio provino de una muestra compuesta de hojas más tallos de diámetro no mayor a 3 mm realizada en cuatro plantas de cada parcela al inicio de la época lluviosa en el año 2018, con una edad aproximada de seis meses de rebrote a partir del corte de homogeneización, trasladada en termo con gel congelante al laboratorio de forrajes de la Universidad Autónoma Chapingo (UACh), en donde se secó en estufa a aire forzado a 55 ºC hasta peso constante. Una submuestra de follaje seco fue triturada en molino de martillos tipo Wiley con malla de 1 mm y procesada en el laboratorio de Microbiología Pecuaria de la UACh. Los valores del patrón de fermentación se obtuvieron con la técnica de producción de gas de Theodorou *et al*. (1994), para lo cual se utilizó un nanómetro con escala de 0-1 kg que arrojó volúmenes de presión en kg cm^{-2}. Con dichos volúmenes fueron generadas las fracciones fermentables: rápida (FR), media (FM) y lenta (FL). Las variables de cinética de producción de gas: volumen máximo de gas producido (Vmax), fase Lag (L) y tasa de producción de gas (S) se obtuvieron mediante un modelo logístico (Gompertz) con el procedimiento NLMIXED (SAS, 2006). Las digestibilidades *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y materia orgánica (DIVMO) se obtuvieron mediante la técnica de Tilley y Terry (1963).

Las variables fueron sometidas a un análisis de varianza mediante un modelo que incluyó los efectos fijos de accesión, sitio y procedencia, la interacción sitio x procedencia y el efecto aleatorio

de accesión anidado en sitio, mediante el procedimiento MIXED (SAS, 2006). Cuando fue necesario, las medias de las variables fueron estimadas y comparadas con la prueba de Tukey mediante la instrucción LSMEANS (SAS, 2006)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las curvas de acumulación de gas del follaje de los diferentes sitios de plantación y procedencias de Leucaena estudiadas se presentan en la Figura 1 (A y B). Cabe notar que la mayor acumulación de gas se presentó para el sitio de Morelos en comparación con Veracruz (Figura 1A). En tanto, el volumen acumulado fue mayor para la procedencia de Nuevo León, menor para Veracruz e intermedias para Colima, Cunningham y Morelos. Esta relación positiva demuestra la mayor calidad del follaje de Leucaena para los sitios y procedencias con la menor acumulación de gas a través del tiempo (Naranjo *et al*., 2016).

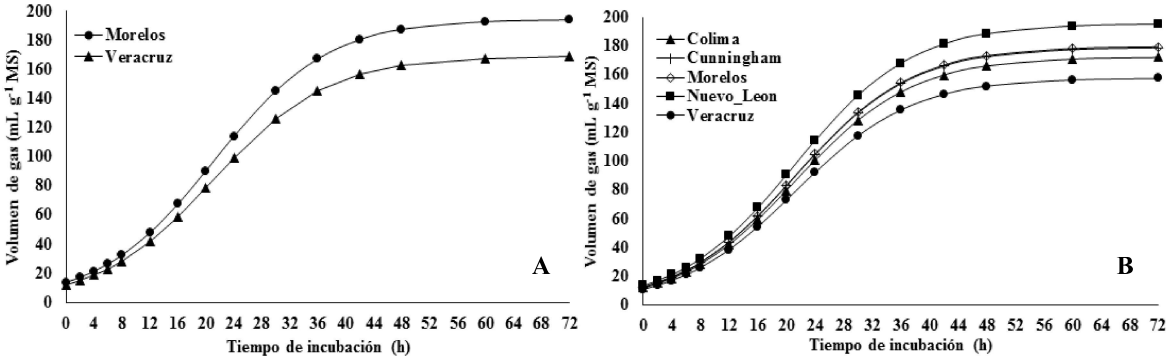

Figura 1. Curvas modeladas de producción de gas acumulado del follaje de *Leucaena leucocephala* en sitios (A) y procedencias agroclimáticas (B) distintas de México.

Las digestibilidades de la materia seca y orgánica y los parámetros obtenidos mediante la aplicación del modelo Gompertz a los datos de fermentación *in vitro* de los sitios y procedencias evaluados se muestran en el Cuadro 1. El sitio Veracruz mostró una fase de establecimiento o colonización microbiana (L) superior a 26% (p = 0.0110), así como una fracción fermentable rápida (FR) inferior a 38% (p = 0.0179), en comparación con Morelos; para esta misma variable, la plantación procedente de Nuevo León fue 27% superior (p = 0.0003) a Morelos. La tasa de producción de gas (S) del cultivo establecido en Morelos fue de 15 a 23% superior (p = 0.0003) en comparación al resto de las procedencias. La FR de la procedencia de Morelos fue 32% superior (p = 0.0029) a Colima y Veracruz; en tanto las fracciones fermentables media (p = 0.0018) y lenta (p = 0.0010) fueron 13 y 20% superiores en comparación con el resto de las procedencias. Los resultados de este estudio confirman que la producción de gas *in vitro* está relacionada con la eficiencia de utilización del alimento por parte de los microorganismos ruminales (Gaviria *et al*., 2015).

La procedencia de Nuevo León superó en más del 12% (p = 0.0133) a la DIVMO de las procedencias de Colima, Cunningham y Morelos; contrario a lo observado para DIVMS, que fue superado (p = 0.0004) en más del 20% por estas mismas procedencias (Cuadro 1). También, la

composición química de los forrajes influye sobre el volumen de gas producido, la tasa máxima de producción de gas y el tiempo en que se alcanza la fermentación ruminal *in vitro* (Gaviria *et al*., 2015). En general, Leucaenas de diferente origen cultivadas en Veracruz logran la fase de establecimiento en mayor tiempo con menor cantidad de gas para la fracción fermentable y muestran una calidad del follaje similar a las cultivadas en Morelos. Gaviria *et al*. (2015) encontraron que la mayor producción de gas se obtuvo en los forrajes con menor cantidad de FDN, lo que coincidió con los valores más altos de gas al punto de inflexión (GPI), ya que, posiblemente, la producción de gas se relacione de forma lineal con la degradación de la FDN. Esto podría justificar la mayor calidad del forraje cosechado en Veracruz, aunque la tasa de producción de gas (S) no fue diferente ($p > 0.05$) entre sitios de plantación (Cuadro 1). La semilla procedente de Morelos generó follaje con mayor S y FR, así como menor L y FL que el resto de las procedencias. Fondevila *et al*. (2002), concluyeron que altos contenidos de lignina en los forrajes explican las bajas producción de gas, ritmo de fermentación y degradabilidad, al provocar una menor disponibilidad de los carbohidratos estructurales potencialmente digestibles a los microorganismos del rumen.

Nogueira *et al*. (2000) informaron que los sustratos de mayor valor nutricional favorecen a la colonización y degradación eficiente por los microorganismos, así como el aumento de la tasa y la extensión de la fermentación. Machado *et al*. (2012); Gaviria *et al*. (2015) reportaron que los sustratos con menor contenido de FDN presentan tasas más altas de producción de gas, y esta sucede más rápido. También, Barahona *et al*. (2003) concluyeron que la presencia de niveles altos de taninos condensados (~10 % BS) reduce la producción de gas.

Cuadro 1. Parámetros de cinética de producción de gas ($\bar{x}\pm s$) obtenidos mediante la aplicación del modelo logístico y digestibilidad de accesiones de *Leucaena leucocephala*.

Factor	Cinética de fermentación			Fracciones fermentables (mL g^{-1} de sustrato)			Digestibilidad	
	Vmax	S	L	Rápida	Media	Lenta	MS	MO
Accesión (A)								
1	187±12^{a}	0.032±0.001^{a}	5.5±0.1^{a}	44.8±1.6^{a}	65.6±2.0^{a}	89.4±4.4^{a}	48.8±1.9^{a}	73.4±1.6^{a}
2	153±12^{a}	0.035±0.001^{a}	4.8±0.1^{a}	46.4±1.8^{a}	56.3±2.2^{a}	70.6±4.7^{a}	57.8±2.0^{a}	65.0±1.8^{a}
3	177±13^{a}	0.034±0.001^{a}	5.0±0.1^{a}	50.0±1.9^{a}	70.4±2.4^{a}	88.9±5.0^{a}	49.3±2.0^{a}	72.3±1.9^{a}
Sitio (S)								
Morelos	176±10^{a}	0.035±0.001^{a}	4.6±0.1^{b}	54.9±1.6^{a}	66.6±2.0^{a}	86.3±4.1^{a}	51.5±1.7^{a}	74.5±1.6^{a}
Veracruz	169±10^{a}	0.032±0.001^{a}	5.8±0.1^{a}	39.8±1.3^{b}	61.6±1.6^{a}	79.5±3.5^{a}	52.4±1.5^{a}	65.9±1.3^{a}
Procedencia (P)								
Colima	171±10^{a}	0.033±0.001^{b}	5.4±0.2^{ab}	42.3±2.2^{b}	61.1±2.7^{b}	81.2±5.2^{b}	54.8±1.8^{a}	68.1±2.1^{b}
Cunningham	185±10^{a}	0.031±0.001^{b}	5.2±0.2^{abc}	46.5±2.2^{ab}	62.4±2.7^{b}	85.1±5.2^{ab}	52.5±1.8^{a}	68.7±2.1^{b}
Morelos	165±12^{a}	0.038±0.001^{a}	4.5±0.2^{c}	56.8±2.8^{a}	65.1±3.4^{ab}	67.0±6.6^{b}	54.9±2.2^{a}	67.7±2.8^{b}
Nuevo León	181±09^{a}	0.033±0.001^{b}	5.7±0.1^{a}	47.6±1.9^{ab}	73.5±2.3^{a}	101.7±4.6^{a}	45.8±1.6^{b}	76.9±1.9^{a}
Veracruz	159±11^{a}	0.032±0.001^{b}	4.9±0.2^{bc}	43.6±2.5^{b}	58.4±3.0^{b}	79.6±5.8^{b}	51.9±1.9^{ab}	69.5±2.4^{ab}

^{a,b,c} Medias con al menos una literal igual en la misma columna por factor no presentan diferencias significativas ($p < 0.05$;Tukey). Vmax = volumen máximo de gas producido (mL g^{-1} de sustrato), L = fase Lag (mL g^{-1} de sustrato), S = tasa de producción de gas (mL g^{-1} de sustrato), MS = materia seca (%) y MO = materia orgánica (%).

Las procedencias evaluadas en este estudio que mostraron bajas DIVMS tuvieron valores elevados para DIVMO y viceversa. Aunque, estos valores de DIVMO evidencian una alta MO fermentable del follaje de leucaena, como lo indican Gaviria *et al*. (2015), como indicador de una

buena calidad nutricional que permite el aporte de nutrientes a la flora ruminal (Minson, 1990; Piñeiro-Vázquez *et al*., 2017; Sierra *et al*., 2017).

La interacción Sitio x Procedencia fue importante para S ($p < 0.0001$), FR ($p = 0.0344$) y DIVMS ($p = 0.0330$). La tasa de producción de gas solo fue superior para la procedencia Morelos cultivada en Morelos; la FR mayor se presentó para la procedencia Morelos cultivada en Morelos y las menores para las procedencias Colima y Veracruz cultivadas en Veracruz; la DIVMS fue mayor para la procedencia Morelos y menor para Nuevo León, cultivadas en Morelos (Figuras 2A y 2B).

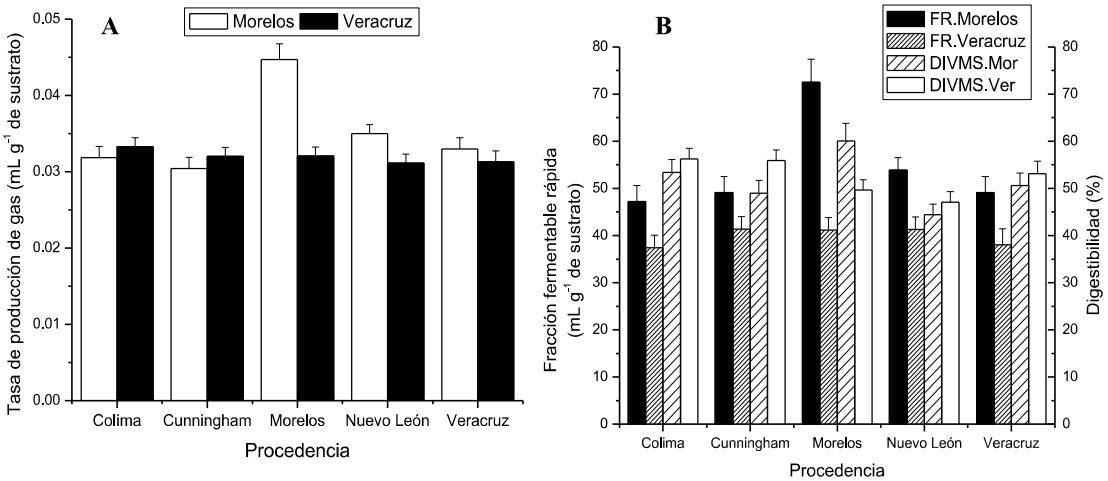

Figura 2. Efecto de la interacción Sitio x Procedencia en la tasa de producción de gas (A), la fracción fermentable rápida y digestibilidad de la materia seca (B) del follaje de *Leucaena leucocephala*.

CONCLUSIÓNES

En este estudio se demostró la calidad nutricional mayor del follaje de *Leucaena leucocephala* establecida en Veracruz y menor en Morelos, esta última como sitio de plantación y procedencia de la semilla, al mostrar la menor producción de gas y ocasionar la mayor desaparición de la materia orgánica, lo cual se asocia a una mayor eficiencia en los procesos de fermentación y beneficios para la alimentación de rumiantes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores reconocen el financiamiento y apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), el Instituto de Investigación y Posgrado en Ciencia Animal (IIPCA), al Posgrado en Producción Animal (PPA) y a la Dirección General de Investigación y Posgrado (DGIP) de la Universidad Autónoma Chapingo (UACh), y al Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca (ITSTa) para el desarrollo de la Disertación Doctoral del primer autor. El agradecimiento también es extensivo a los Sres. Claudio y Cleotilde Benítez Cardozo por el espacio facilitado para el desarrollo del trabajo de campo en el ejido Limón, Tepalcingo, Morelos, y al área de Microbiología

de Alimentos del Departamento de Zootecnia de la UACh por el apoyo con la instrumentación y técnicas para la obtención de las variables en estudio.

LITERATURA CITADA

Barahona, R., C. E. Lascano, N. Narvaez, E. Owen, P. Morris and M. K. Theodorou. 2003. *In vitro* degradability of mature and immature leaves of tropical forage legumes differing in condensed tannin and non-starch polysaccharide content and composition. J. Sci. Food Agr. 83: 1256-1266.

Cortez, E. J. G., G. M. Uribe, L. A. Cruz, B. A. Lara y J. L. L. Romo. 2016. Árboles nativos para el diseño de tecnologías silvopastoriles en la Sierra de Huautla, Morelos. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 16: 3371-3380.

Estrada, L. I., J. S. Esparza, P. B. Albarrán, A. G. Yong, A. A. A. Rayas y M. A. García. 2018. Evaluación productiva y económica de un sistema silvopastoril intensivo en bovinos doble propósito en Michoacán, México. Cienc. Ergo-Sum. 25: 1-13.

Fondevila, M., J. C. M. Nogueira-Filho and A. Barrios. 2002. *In vitro* microbial fermentation and protein utilisation of tropical forage legumes grown during the dry season. Anim. Feed Sci. Tech. 95: 1-14.

García, E. 2005. Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen. 4a Edición. Instituto de Geografía. Universidad Autónoma de México. 217 p.

Gaviria, X., J. F. Naranjo and R. Barahona. 2015. Cinética de fermentación *in vitro* de *Leucaena leucocephala* y *Megathyrsus maximus* y sus mezclas, con o sin suplementación energética. Pastos y Forrajes 38: 55-63.

Machado, P. A. S., S. C. Valadares Filho, R F. D. Valadares, M. F. Paulino, V. R. Paulino, P, y M. I. Marcondes. 2012. Desempenho e exigências de energía e proteína de bovinos de corte en pasto suplementados. Arq. Brasileiro Med. Vet. Zoot. 64: 683-692.

Martínez-Hernández, P. A., E. Cortés-Díaz, R. Purroy-Vásquez, J. M. Palma-García, P. P. Del Pozo-Rodríguez y C. Vite-Cristóbal. 2019. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit especie clave para una producción bovina sostenible en el trópico. Tropic. Subtropic. Agroecosyst. En prensa.

Minson, D. J. 1990. Forage in ruminant nutrition. San Diego: Academic Press.

Naranjo, J. F., O. A. Ceballos, X. Gaviria, A. M. Tarazona, G. A. Correa, J. D. Chará, E. Murgueitio y R. Barahona. 2016. Estudio de la cinética fermentativa *in vitro* de mezclas de forrajes que incluyen *Leucaena leucocephala* proveniente de sistemas silvopastoriles intensivos (SSPi) en Colombia. Revista CES Med. Vet. Zoot. 11: 6-17.

Navas, P.A. 2010. Importancia de los sistemas silvopastoriles en la reducción del estrés calórico en sistemas de producción ganadera tropical. Rev. Med. Vet. 19: 113-122.

Nogueira, J.C. M., M. Fondevilla, A. Barrios and M. González. 2000. *In vitro* microbial fermentation of tropical grasses at an advanced maturity stage. Anim. Feed Sci. Tech. 83: 145-157.

Palma, J. M. 2006. Los sistemas silvopastoriles en el trópico seco mexicano. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 14: 95-104.

Piñeiro-Vázquez, A. T.; G. O. Jiménez-Ferrer, A. J. Chay-Canul, F. Casanova-Lugo, V. F. Díaz-Echeverría, A. J. Ayala-Burgos, F. J. Solorio-Sánchez, C. F. Aguilar-Pérez, y J. C. Ku-Vera. 2017. Intake, digestibility, nitrogen balance and energy utilization in heifers fed low-quality

forage and Leucaena leucocephala. Anim. Feed Sci. Technol. 228: 191-201. Doi: 10.1016/j.anifeedsci.2017.04.009.

SAS. 2006. SAS/STAT® 9.3 User´s Guide. Statistic, edition. SAS Institute Inc, United States.

Sierra-Montoya, E., R. Barahona-Rosales and Z. T. Ruiz-Cortés. 2017. Reproductive behavior of crossbred dairy cows grazing an intensive silvopastoral system under tropical dry forest conditions. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 69: 1-9. Doi: 10.1590/1678-4162-8712

Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. Dhanoa, A. B. McAllan and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Tech. 48: 185-197.

Tilley, J. M. A. and R. A. Terry. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forages crops. Grass Forage Sci. 18: 104-111.